

فرایند جداسازی دو ژن *wsp* و *16S rRNA* باکتری داخل سلولی *Wolbachia pipientis* در پشه خاکی *Flubitomus پاپاتاسی* ناقل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی ایران

پرویز پرویزی^{۱*}، فرزانه فرید^۲، عارف امیرخانی^۳

۱) آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، انستیتو پاستور ایران

۲) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۳) بخش اپیدمیولوژی انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: پرویز پرویزی، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، انستیتو پاستور ایران- تهران، ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱ - ایران

تلفن: ۰۲۱-۶۶۹۶۸۸۵۵ - پارپ@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۶/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: باکتری داخل سلولی *Wolbachia pipientis* از جمله باکتری‌های ریکتزیایی است. ژن این باکتری در حشرات به صورت مادرزادی به ارث می‌رسد و می‌تواند عامل ایجاد ناسازگاری‌های سیتوپلاسمی باشد. این باکتری به‌طور بالقوه می‌تواند در دستکاری‌های ژنتیکی جمعیت و کنترل ناقلین برخی بیماری‌ها مفید باشد. در این مطالعه *W. pipientis* با استفاده از روش PCR در پشه خاکی گونه *فلبیتوموس پاپاتاسی*، ناقل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستائی ایران، ردیابی و مشخص شد. برای این منظور از ژن rDNA (16 s rDNA) و ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp gene*) استفاده گردید. روش بررسی: برای تشخیص و ردیابی باکتری *W. pipientis* از ژن rDNA (16 s rDNA) و ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp gene*) استفاده شد. با استفاده از روش PCR، از دو جفت پرایمر اختصاصی (*wsp 691R/81F*) و (*16S 994R/99F*) استفاده گردید. توالی‌های بدست آمده با نرم افزار Sequencher TM v.3.1 ویراستاری و مقایسه شدند. جهت مشخص کردن هاپلوتایپ‌های *W. pipientis* و آنالیز و ترسیم درخت فیلوژنتیکی آن از نرم افزار PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) استفاده شد.

یافته‌ها: از ۱۶۵ عدد پشه خاکی *فلبیتوموس پاپاتاسی*، قطعه ژنی *wsp* در ۱۲۴ (۷۵/۲٪) و قطعه ژنی 16s rDNA در ۱۲۳ (۷۴/۵٪) پشه خاکی تکثیر و تعیین توالی شد. برای هر ژن فقط یک هاپلوتایپ منفرد یافت شد.

نتیجه گیری: استفاده از یک سویه ژنتیکی تعریف شده برای *W. pipientis* در استفاده از ترانسژن‌ها، امکان انتقال *Leishmania major* را توسط پشه خاکی، به منظور جلوگیری از انتشار آن، افزایش می‌دهد. سویه‌های ژنتیکی این باکتری می‌توانند فنوتیپ ناسازگاری سیتوپلاسمی را در جمعیت پشه خاکی گونه *فلبیتوموس پاپاتاسی* نشان دهند. با توجه به وجود آلودگی طبیعی *ولباکیا* در پشه خاکی‌ها و ناسازگاری سیتوپلاسمی، امکان استفاده از *ولباکیا* به عنوان ترانسژن ژن‌های هدف در بین جمعیت پشه خاکی‌ها مورد نظر، می‌توان جمعیت ناقلین را تحت کنترل در آورد و با گسترش بیماری لیشمانیوز مقابله کرد.

کلید واژه‌ها: *Wolbachia pipientis*، *فلبیتوموس پاپاتاسی*، ژن rDNA ریبوزومی (16 s rRNA)، ژن پروتئین سطحی (*wsp gene*)، ایران

مقدمه:

باکتری داخل سلولی *ولباکیا* اولین بار درون بافت‌های تولید مثل پشه *Culex pipiens* توسط Hertig & Wolbach در سال ۱۹۲۴ گزارش شد. و این ریکتزیا بعد از آن *Wolbachia pipientis* نام گرفت. این دسته از باکتری‌های گرم منفی، ریکتزیا هستند که از طریق سیتوپلاسم انتقال پیدا می‌کنند و باعث ایجاد عفونت‌های داخل سلولی توارثی در بسیاری از میزبانان بی مهره می‌شوند. این باکتری‌ها در بافت‌های تولید مثل (تخمندان و بیضه‌ها) طیف وسیعی از بندپایان یافت می‌شوند (۱). این باکتری‌ها باعث ایجاد شماری تغییرات تولید مثلی در میزبانانشان می‌شوند. تغییرات شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی (Cytoplasmic incompatibility=CI) بین سویه‌ها و گونه‌های مرتبط، القاء پارتوژنز و مؤنث‌سازی ژنتیکی نرها، (شکل ۱) است. این حالت زمانی رخ می‌دهد که نرهای آلوده با ماده‌های سالم جفت‌گیری کنند، یا ماده‌ها سویه متفاوتی از *W. pipientis* را حمل نمایند. *W. pipientis* به‌وسیله این مکانیسم می‌تواند بین جمعیت‌های میزبان، بدون نیاز به انتقال عرضی، انتشار یابد. در چنین حالتی، ممکن است از این باکتری‌ها به منظور حمل ترانس‌ژن‌ها بین جمعیت‌های حشراتی که اهمیت پزشکی دارند، به منظور ایجاد تداخل و همچنین کنترل انتقال انگل، استفاده شود (۲،۳).

این توصیفات و تغییرات تولید مثلی میزبان باعث بهره‌مندی باکتری از مزایای انتخابی می‌شود. ولباکیاها بسیار وسیع‌الطیف هستند (۱،۳). طی مطالعات اخیر این باکتری در بیش از ۲۰٪ گونه‌های حشرات، از جمله در پشه خاکی‌های ناقل بیماری لیشمانیوز، به‌طور طبیعی پیدا شده است (۴،۵).

پشه خاکی *فلبوتوموس پاپاتاسی* ناقل لیشمانیا میجر (*Leishmania major*)، عامل لیشمانیوز جلدی روستائی در انسان است. این پشه خاکی چندین آربوویروس را هم در نواحی خشک آفریقای شمالی و آسیای غربی از مدیترانه غربی تا بنگلادش انتقال می‌دهد (۶،۷). محققین باکتری داخل سلولی شبه ریکتزایی *W. Pipientis* را در پشه خاکی‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و با تکثیر قطعات ژن rRNA ریپوزومی 16s (16s rDNA) و نیز ژن پروتئین سطحی *ولباکیا* (*wsp*)، شناسایی کرده‌اند (۱۰-۷).

مواد و روش‌ها:

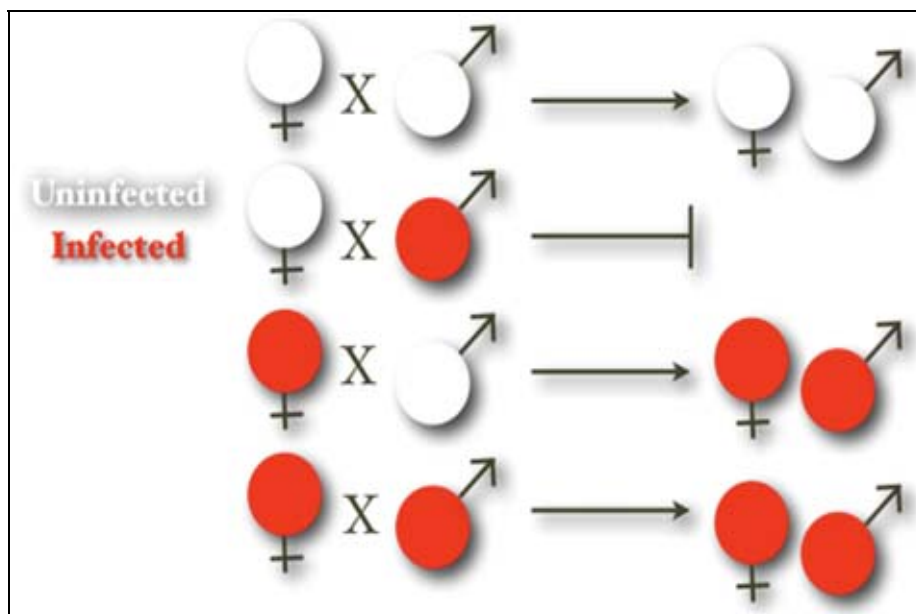
پشه خاکی‌ها از مناطق تحت مطالعه با استفاده از تله چسبان، تله قیفی، تله نورانی CDC و اسپیراتور صید و جمع‌آوری شدند (شکل ۲ نقشه مناطق مورد مطالعه) (۷). پشه خاکی‌ها به‌وسیله دود سیگار و یا قرار دادن در فریزر کشته شده و سپس در الکل ۹۶٪ قرار گرفتند. نمونه‌ها جهت آزمایش‌های مولکولی ابتدا در یخچال ۴+ درجه و سپس در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شدند. پشه خاکی‌ها از داخل لوله‌ها به داخل یخ در ظروف پتری شیشه‌ای، حاوی ۱٪ مایع ظرفشویی در آب استریل، منتقل شده و به مدت دو دقیقه در این حالت نگهداری می‌شدند. سپس با سمپلر مایع ظرفشویی ۱٪ در آب استریل را خالی نموده و پس از قرار دادن پشه خاکی‌ها به مدت پنج دقیقه در آب استریل برای مرحله دوم شستشو می‌شدند. هر پشه خاکی روی یک قطره 1 x TE در روی الام تمیز زیر لوپ بررسی می‌شد. سر و انتهای بدن جهت شناسایی جدا و مابقی جهت جدا کردن DNA تشریح می‌شدند (۷، ۱۱، ۱۲).

extraction (جداسازی و خالص‌سازی DNA) پشه خاکی‌ها با استفاده از روش Ready و همکاران (۱۹۹۱) انجام گرفت (۱۳).

میکروتیوب‌های حاوی بدن پشه خاکی (به غیر از سر و دو بند انتهایی شکم) داخل فریزر 20°C - به دمای آزمایشگاه منتقل می‌شد. این عمل به‌منظور ایجاد شوک فیزیکی جهت بهتر له شدن بدن پشه خاکی ۲ بار تکرار می‌شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول Grinding Mix داخل میکروتیوب ریخته و با نوک سرسمپلر بدن پشه خاکی کاملاً له می‌شد. سپس ۵۰ میکرولیتر مابقی از محلول G.M (در مجموع ۱۰۰ میکرولیتر) در میکروتیوب ریخته می‌شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول SDS mix به هر میکروتیوب اضافه می‌گردید. تمامی میکروتیوب‌ها ورتکس می‌شد و به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ می‌گردید (short spin). تمامی میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در بن ماری قرار داده می‌شد. به منظور کاهش دمای نمونه‌ها، میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌گرفتند و بعد ۳۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم (KOAC) ۸ مولار به آنها اضافه می‌شد. مجدداً میکروتیوب‌ها به ترتیب ورتکس و سانتریفوژ کوتاه می‌شدند، سپس به مدت ۱۲۰-۴۵

می شدند. سپس میکروتیوب‌ها را به صورت وارونه بر روی کاغذ خشک کن یا دستمال کاغذی کشیده می شد تا هیچگونه الکلی در آنها باقی نماند. این مراحل ۳ بار تکرار می شد. در تمام میکروتیوب‌ها باز و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می گرفت تا داخل آنها خشک شود و الکل موجود در آنها کاملاً تبخیر گردد. به منظور جلوگیری از قرار گرفتن گرد و غبار درون میکروتیوب‌ها یک دستمال کاغذی بر روی آنها قرار داده می شد. پس از کسب اطمینان از تبخیر شدن کامل الکل، ۱۵ میکرولیتر 1X TE buffer به تمام آنها اضافه می شد. به تک تک میکروتیوب‌ها تکان مختصری داده و سپس سانتریفوژ کوتاه می شدند (۴ بار این عمل تکرار می شد). میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می گرفت و بعد برای استفاده کوتاه مدت، نمونه‌ها در یخچال 4°C و برای استفاده بلند مدت در فریزر -20°C نگهداری می شدند.

دقیقه داخل یخ خرد شده قرار می گرفتند. نمونه‌ها با دور 13000 rpm و به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ می شدند. محلول روئی با استفاده از سمپلر جدا می شد و به میکروتیوب‌های جدید و کدگذاری شده، منتقل می گردیدند. 300 میکرولیتر اتانول 96% سرد (درون فریزر نگهداری می شود) به میکروتیوب‌ها اضافه می شد. نمونه‌ها در تمام طول شب (over night) در فریزر -20°C نگهداری می شدند. صبح روز بعد نمونه‌ها از فریزر خارج می شد تا از سرمای آن کاسته شود. میکروتیوب‌ها با دور 13000 rpm و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ می شدند. محلول رویی میکروتیوب‌ها با کج کردن، دور ریخته می شد و 500 میکرولیتر اتانول 75% به رسوب DNA موجود در ته میکروتیوب‌ها اضافه می شد. میکروتیوب‌ها را تکان مختصری داده و با دور 13000 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می شدند. مجدداً الکل رویی موجود در میکروتیوب‌ها با کج کردن خارج



شکل ۱: ناسازگاری سیتوپلاسمی القائی و لباکیا در بندپایان



شکل ۲: مناطق مورد مطالعه پشه خاکی‌های جمع‌آوری شده جهت تعیین آلودگی ولباکیا

یکصد نانوگرم از DNA خالص برای هر نمونه جهت تعیین توالی DNA و یا اسید آمینه با کیت BI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 373/377 sequencing systems (ABI, PE) و دستگاه Applied Biosystems مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). جهت وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه‌ها و تنظیم توالی و مطابقت کردن نوکلئوتیدها با کروماتوگرافی هر نمونه، از نرم افزار Sequencher™ 3.1.1 software (Gene Codes Corporation) استفاده شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم افزار Phylogenetic Analysis Using Parsimony و یا PAUP× استفاده شد (۱۵).

یافته‌ها:

باکتری ولباکیا در پشه خاکی فلپوتوموس پاپاتاسی و در جمعیت‌های متفاوت، از نظر زیستگاه طبیعی و مناطق مختلف ایران، بررسی شد. با استفاده از فناوری‌های مولکولی، این باکتری جدا شد (شکل ۲ مناطق مورد مطالعه). با استفاده از فناوری PCR ژن‌های 16s rDNA و ژن پروتئین سطحی ولباکیا (*wsp*) در پشه مذکور تکثیر یافت و آلودگی به *W. Pipientis* بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد در مناطق مورد مطالعه

برای تعیین وجود باکتری ولباکیا در پشه خاکی‌ها با استفاده از پرایمرهای عمومی *wsp* به نام *81F* (forward) با نوکلئوتیدهای (5' TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC 3') و نیز پرایمر *69IR* (reverse) با نوکلئوتیدهای (5' AAAAAATTAACGCTACTCCA 3') یک قطعه که حدود ۵۵۰ (base pair)، بدون احتساب پرایمرها می‌باشد، تکثیر یافتند. برای ژن rDNA (16 s rDNA)، از پرایمری به نام *99F* (forward) با نوکلئوتیدهای (5' TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT 3') و نیز پرایمر *994R* (reverse) با نوکلئوتیدهای (5' GAATAGGTATGATTTTCATGT 3') استفاده شد (۹،۵). جهت اطمینان از کارکرد درست PCR از کنترل مثبت (نمونه پشه خاکی‌هایی که توسط پرویزی و همکاران در بررسی‌ها و مطالعات قبلی در Natural History Museum انگلستان انجام گرفته است. این نمونه‌ها دارای میزان بالای ژن *wsp* هستند که به‌عنوان کنترل مثبت در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند) و اطمینان از عدم آلودگی PCR از کنترل منفی (آب مقطر) استفاده می‌شد. محصول PCR بدون کلون کردن و به‌طور مستقیم تعیین توالی گردید.

پاپاتاسی مستقیماً تعیین توالی شدند و فقط یک هاپلوتایپ منفرد یافت شد. با تعیین توالی مستقیم همه ۱۲۳ توالی 16s rDNA تکثیر شده از فلپوتوموس پاپاتاسی‌های ایرانی، یک هاپلوتایپ منفرد با توجه به منشاء ژئوگرافیک و زیستگاه بدست آمد (شماره دسترسی EU780684 در بانک ژن). توالی‌های هر دو ژن نیز در بانک جهانی ژن به ثبت رسید و شماره دسترسی EU780684 در بانک جهانی ژن برای ژن پروتئین سطحی ولبایک (wsp)، و شماره دسترسی EU780683 در این بانک برای ژن 16s rDNA ثبت گردید.

مشخص شد. آلودگی به ولبایک هم در مناطق اندمیک بیماری لیشمانیوز در ۴ روستا در اصفهان و نیز مناطق غیر اندمیک بیماری در همدان و کرج یافت شد (جدول ۱). پشه خاکی فلپوتوموس پاپاتاسی که بر اساس تکثیر قطعه ژن wsp ولبایک مثبت بود، با استفاده از پرایمرهای 16s rDNA، برای این ژن نیز مثبت بود. فقط یک پشه برای قطعه ژن 16s rDNA مثبت بود اما برای قطعه ژن wsp مثبت نبود.

یک نوع هاپلوتایپ در پشه خاکی فلپوتوموس پاپاتاسی صید شده از ایران، مستقل از منشاء ژئوگرافی و از نظر زیستگاه طبیعی مناطق مختلف مورد مطالعه در ایران، تشخیص داده شد. همگی ۱۲۴ قطعه ژنی wsp تکثیر یافته از پشه خاکی فلپوتوموس

جدول ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی *W. pipientis* جدا شده با دو روش مولکولی در پشه خاکی

فلپوتوموس پاپاتاسی صید شده به تفکیک مناطق مختلف ایران

درصد موارد مثبت 16s rDNA	موارد مثبت 16s rDNA	کل موارد بررسی با روش 16s PCR (rDNA)	درصد موارد مثبت wsp	موارد مثبت wsp	تعداد موارد بررسی با روش (wsp)PCR	نواحی مورد بررسی	
						منطقه	استان
۷۹/۴	۲۷	۳۴	۷۹/۴	۲۷	۳۴	شاپورآباد	اصفهان
۶۸/۲	۴۰	۵۸	۷۰/۷	۴۱	۵۸	حبیب آباد	اصفهان
۷۵/۰	۲۴	۳۲	۷۵/۰	۲۴	۳۲	خرزوق	اصفهان
۶۸/۲	۱۵	۲۲	۶۸/۲	۱۵	۲۲	زردجان جی	اصفهان
۸۷/۵	۱۴	۱۶	۸۷/۵	۱۴	۱۶	همدان	همدان
۱۰۰/۰	۳	۳	۱۰۰/۰	۳	۳	کرج	تهران
۷۴/۵	۱۲۳	۱۶۵	۷۵/۲	۱۲۴	۱۶۵	جمع	

بحث:

تشخیص از گروه A سویه *W. pipientis* (wPap) است، پیش از این از فلپوتوموس پاپاتاسی از کرانه باختری رود اردن (با شماره دسترسی در بانک ژن AF237883) و هند (با شماره دسترسی در بانک ژن AF237882)، بدست آمده است. این نتیجه پس از مقایسه با همگی پشه خاکی‌های موجود از اسپانیا و ایران و همچنین مجموعه‌ای از دو تا سه دسته از پشه خاکی‌هایی که توالی شماره دسترسی در بانک ژن AF237883 را داده

قطعات ژنی wsp و 16s rDNA به ترتیب از ۷۵/۲ درصد و ۷۴/۵ درصد از پشه خاکی‌های فلپوتوموس پاپاتاسی تکثیر و تعیین توالی شدند. برای هر ژن فقط یک هاپلوتایپ منفرد یافت شد.

هاپلوتایپ ژن wsp 546 bp (بدون احتساب پرایمرها) (با شماره دسترسی EU7800683 در بانک ژن) که غیر قابل

بودند بدست آمد (۹،۷،۶). سایر توالی‌ها از فلپوتوموس پاپاتاسی‌هایی جدا شد که در کلونی‌های آزمایشگاهی پرورش داده شده بودند. با استفاده از پرایمرهای ژن *wsp* مشابه، Cui و همکارانش قطعه‌ای حدوداً 600 bp را از فلپوتوموس پاپاتاسی‌های جمع‌آوری شده از کرانه باختری رود اردن، شمال صحرای سینا در مصر، و عربستان سعودی تکثیر کردند. البته آن‌ها هیچ توالی جدیدی را گزارش نکردند. در اصل این طور گزارش شد که هاپلوتایپ *wPap* یک باز میهم (C/T) در موقعیت نوکلئوتید ۱۰۲ دارد (شماره دسترسی در بانک ژنی AF020082) (۴). اما، یک باز C در این موقعیت در کار حاضر و همچنین در تمام بررسی‌های دیگر یافت شد. توالی 16s rDNA هاپلوتایپ ما با 854 bp (بدون احتساب پرایمرها) (شماره دسترسی EU780683 در بانک ژنی) به واسطه چهار جهش نقطه‌ای و وقوع سه جهش حذف-جایگزینی از آن چه که قبلاً توسط O'Neill و همکارانش یافت شده بود، متفاوت بود (۱۸،۳). توالی جدید با توالی‌های 16s rDNA ای ولبکیا بدست آمده از سایر حشرات مقایسه شد (شماره دسترسی EU780684 در بانک ژنی). ارتباطات فیلوژنتیکی را می‌توان با استفاده از الگوریتم‌های قرابتی و نیز استفاده از PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) تائید کرد (۱۵). فیلوگرام بدست آمده توسط یک آنالیز، الحاق مجاور در دو توالی از فلپوتوموس پاپاتاسی را روی شاخه انتهایی، مشابه گروه A سویه‌های *W. pipientis*، جایگزین کرده است.

مطالعات فیلوژنتیکی با استفاده از 16s rDNA نشان داد که سویه‌های *W. pipientis* از میزبان‌های بسیار واگرا (دور از نظر قرابت ژنتیکی) از دسته مونوفیلیتیک، مرتبط با دسته Ehrlichia در زیر شاخه α از Proteobacteria می‌باشد (۸،۵). ژن 16s rDNA توالی حفاظت شده‌ای است که نه تنها جایگزاری فیلوژنتیکی گونه‌های باکتریایی را مجاز می‌کند بلکه باعث افتراق فیلوژنتیکی *W. pipientis* به دو گروه A و B می‌شود (۳،۲). به تازگی به دلیل دسترسی سریع‌تر به ژن *wsp*، جهت بهبود افتراق فیلوژنتیک بین دسته گونه‌های *W. pipientis* استفاده شده است. در این نظر به چهار گروه (A-D) و ۱۲ زیرگروه تقسیم شده است (۳، ۸، ۱۶). گروه‌های A و B مشابه آن‌هایی هستند که به وسیله 16s rDNA سویه‌های *W. pipientis* بدست آمده از حشرات، مایت‌ها و سخت پوستان شناسایی شده بود. در حالیکه گروه‌های C و D مربوط به سویه‌های

بدست آمده از نماتودهای فیلاریال است. پیش از این، یک سویه ژنتیکی منفرد از *W. pipientis* با هدف قرار دادن ژن *wsp* در فلپوتوموس پاپاتاسی‌های وحشی ایران و اسپانیا شناسایی شد. اما این احتمال که اگر یک یا هر دو پرایمرهای PCR، هاپلوتایپ‌های اختصاصی را ابراز کنند، سایر سویه‌ها ممکن است از بین بروند، وجود داشت و باقی ماند (۱۷،۱۶). در موقعیت‌های مشابه، تکثیر 16s rDNA یا سایر قطعات ژنی گاهی اوقات امکان شناسایی آلودگی‌های دو گانه را ایجاد می‌کند (۳). بنابراین، ما در گزارش حاضر آلودگی‌های *W. pipientis* در پشه خاکی‌های وحشی فلپوتوموس پاپاتاسی را از طریق هدف‌گیری ژن 16s rDNA بعلاوه ژن *wsp* جستجو کردیم. جمعیت‌های فلپوتوموس پاپاتاسی از ایران مجدداً بررسی شدند، که فقط یک هاپلوتایپ برای هر ژن بدست آمد. ما این طور استنباط کردیم و حدس می‌زنیم که قطعات 16s rDNA از منشاء باکتریایی مشابه هستند، مثل قطعات ژن *wsp*، و بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که با وجود طیف بسیار وسیع آن، فقط یک سویه گروه A از *W. pipientis* در گونه‌های پشه خاکی یافت می‌شود. برای یک کلونی آزمایشگاهی فلپوتوموس پاپاتاسی بدست آمده از کرانه باختری رود اردن، توالی متفاوتی از 16s rDNA توسط O'Neill و همکارانش گزارش شد (۳) و یک هاپلوتایپ متفاوت از ژن *wsp* نیز توسط Zhou و همکارانش گزارش شد (۸). این ممکن است یک سویه ثانویه ای از *W. pipientis* یافت شده در خاورمیانه را نشان دهد، اما توالی‌ها ممکن است حقیقی نباشند (مصنوعی باشند). به این دلیل که نه تنها از یک کلونی آزمایشگاهی فلپوتوموس پاپاتاسی بدست آمده‌اند بلکه آن‌ها فقط یکبار تعیین توالی شده‌اند. هیچ تنوع ژنتیکی سویه *W. pipientis* در فلپوتوموس پاپاتاسی‌های وحشی یافت نشد حتی برای ژن *wsp*، که اغلب پلی مورفیک است (۴). این با یافته‌های جمعیت پشه خاکی‌ها سازگار بوده و مغایر نمی‌باشد.

Cui و همکارانش آلودگی‌های ولبکیا را در سه دسته کلونی آزمایشگاهی فلپوتوموس پاپاتاسی بدست آمده از کرانه باختری رود اردن، مصر و عربستان سعودی پیدا کردند. اما در یک کلونی جمع‌آوری شده از اردن یافت نشد (۴). Kassem و همکارانش دو کلونی فلپوتوموس پاپاتاسی بدست آمده از مصر را برای ولبکیا مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که پشه‌های جمع‌آوری شده از شمال صحرای سینای مصر آلودگی ولبکیایی را در خود جای داده‌اند، در حالیکه پشه بدست آمده از اسکندریه (Alexandria) این آلودگی را نداشت (۱۰).

حمل ژن (ترانسژن)هایی برای ایجاد تداخل در انتقال لیسمانیا در میان جمعیت‌های پشه خاکی، بالا می‌برد. برپایه تئوری کلی، این سویه تعریف شده ژنتیکی مجبور است فنوتیپ CI (ناسازگاری سیتوپلاسمی) را به منظور انتشار سریع بین جمعیت‌های پشه خاکی وحشی، در فلپوتوموس پاپاتاسی‌ها نشان دهد. همچنین پشه‌ها همانطور که گفته شد مجبورند با نوع وحشی سویه *W. pipientis* آلوده شوند اگر چه باید CI ناسازگاری سیتوپلاسمی نشان دهند.

می‌توان از ولباکیا به‌عنوان یک سیستم انتقال دهنده ژن یا ترانسژن حشرات (پشه‌ها) استفاده کرد. بدین صورت که ژن‌های هدف را توسط علم مهندسی ژنتیک طراحی و سنتز نمود و سپس به داخل ژنوم ولباکیا منتقل کرد، و آن را به داخل جمعیت حشره وارد کرد. این کار در جهت کنترل بیولوژیک و مبارزه با انواع انگل‌ها و ویروس‌های منتقله توسط بندپایان بسیار مفید و مؤثر خواهد بود. (۱۳، ۱۹).

تقدیر و تشکر:

نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه آقای مهدی باغبان و همچنین از همکاران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی که در جمع آوری نمونه کمک شایانی نموده‌اند، تشکر می‌نمایند. بودجه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی انستیتو پاستور ایران به طرح مصوب ۳۶۶ دکتر پرویزی تامین گردیده است.

نتیجه‌گیری شد که برخی جمعیت‌های این پشه خاکی به‌طور جغرافیائی ایزوله شده‌اند.

البته وجود *W. pipientis* به‌طور اکید در ارتباط با اندمیک بودن ZCL (بیماری لیسمانیوز جلدی نوع روستائی) نیست. به این دلیل که این باکتری در جمعیت‌های فلپوتوموس پاپاتاسی بدست آمده از نواحی غیر اندمیک ایران نیز یافت شده است (۷). آلودگی بالای فلپوتوموس پاپاتاسی به باکتری ولباکیا می‌تواند به دلیل خصوصیات فیزیولوژیک و اکولوژیک این پشه در توانایی حفظ و نگهداری این باکتری و انتقال به نسل‌های بعدی این پشه خاکی باشد. زیرا در گونه‌های دیگر پشه خاکی یا اصلاً آلودگی باکتری ولباکیا دیده نشده و یا موارد بسیار کمتر بوده است. ما در پروژه تحقیقاتی اخیر این موارد را مشاهده نمودیم. همچنین علی‌رغم تحقیقات گسترده در سطح جهان تاکنون در پشه‌های آنوفل (ناقلین بیماری مالاریا) باکتری ولباکیا را نتوانسته‌اند بیابند. آلودگی بالای فلپوتوموس پاپاتاسی به باکتری ولباکیا در گزارشات محققین در دیگر نقاط جهان نیز دیده شده است (۹، ۱۰).

نتیجه‌گیری:

با توجه به هاپلوتا پ میتوکندریایی، زیست‌گاه و منشاء ژئوگرافیکی، مشخص شده که فلپوتوموس پاپاتاسی می‌تواند به *W. pipientis* آلوده نباشد. در غیر اینصورت با یک سویه وسیع الطیف معمول آلوده باشد. این امر به نوبه خود، احتمال استفاده از فقط یک سویه تعریف شده ژنتیکی *W. pipientis* را جهت

فهرست مراجع:

- Rousset F, Solignac M. Evolution of single and double Wolbachia symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 6389-6393.
- Braig HK, Zhou W, Dobson SL, O'neill SL. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 2373-2378.
- O' Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 2699-2702.
- Cui L, Chang SH, Stickman D & Rowton E. Frequency of Wolbachia infection in laboratory and field sand fly Diptera Psychodidae populations. *J Am Mosq Control Assoc* 1999; **15**: 571-572.
- Ono M, Braig HR, Munstermann LE, Ferro C, O'neill SL. Wolbachia infections of phlebotomine sand flies Diptera Psychodidae. *J Med Entomol* 2001; **38**: 237-241.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; **95**: 239-243.
- Parvizi P, Benlarbi M, Ready PD. Mitochondrial and Wolbachia markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi* little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province Iran. *Med Vet Entomol* 2003; **17**: 351-362.
- Zhou W, Rousset F, O'neill S. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains

- using *wsp* gene sequences. *Proc Biol Sci* 1998; **265**: 509-515.
9. Benlarbi M, Ready PD. Host specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* Diptera Psychodidae and prospects for driving genes into these vectors of Leishmania. *Bull Entomol Res* 2003; **93**: 383-391.
 10. Kassem HA , Hassan AN, Abdel Hamed I, Osman G, El Khalab EM, Madkour MA. *Wolbachia* infection and the expression of cytoplasmic incompatibility in sandflies Diptera Psychodidae from Egypt. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; **97**: 639-644.
 11. Parvizi P& Ready PD . Nested PCRs of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sanflies from Iranian Foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop Med & Int Health* 2008; **13**: 1159-1171.
 12. Lewis DJ. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* Diptera Psychodidae. *Bull Br Mus* 1982; **45**: 121-209.
 13. Ready PD , Lainson R , Shaw JJ, Souza AA. DNA probes for distinguishing *Psychodopygus wellcomei* from *Psychodopygus complexus* Diptera Psychodidae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; **86**: 41-49.
 14. Testa JM, Montoya Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD. Molecular identification of vectors of Leishmania in Colombia mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Trop* 2002; **84**, 205-218.
 15. Swofford DL. PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods. version 40 Sinauer Associates Sunderland Massachusetts 2002.
 16. Weeks AR , Reynolds KT, Hoffmann AA. *Wolbachia* dynamics what has and has not been demonstrated. *Trends Ecol Evol* 2002; **17**: 257-262.
 17. Curtis CF, Sinkins SP. *Wolbachia* as a possible means of driving genes into populations. *Parazitol* 1998; **116**: S111-115.
 18. Mitsuhashi W, Saiki T, Wei W, Kawakita H, Sato M. Two novel strains of *Wolbachia* coexisting in both species of mulberry leafhoppers. *Insect Mol Biol* 2002; **11**: 577-584.
 19. Turelli M, Hoffmann AA. Microbe induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations. *Insect Mol Biol* 1999; **8** : 243-255.