# جداسازی و تایپ مولکولی *Wolbachia pipientis* از دو گونه پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتوموس مونگولنسیس (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

علی بردبار(M.Sc)[۱و۲]- *دکتر پرویز پرویزی(Ph.D)[۱]- دکتر شجاع سلطان(M.D)[۳]- امیر طاهرخانی(M.Sc)[۴]- دکتر مهدی آسمار(Ph.D)[۱و۲]

***نویسنده مسئول:** تهران، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، گروه انگل‌شناسی

پست الکترونیک: **parp@pasteur.ac.ir**

**تاریخ دریافت مقاله:۹۰/۴/۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۷**

## چکیده

**مقدمه:** لیشمانیوزجلدی روستایی (zoonotic cutaneous leishmaniasis, ZCL) در ایران، بیماری اندمیک در بسیاری از کانون‌های شمال شرقی، غربی و نواحی مرکزی کشور و منطبق با توزیع جغرافیایی و پراکندگی مخزن (جوندگان) و ناقلان بیماری (پشه‌های خاکی) است. کنترل مخزن یا ناقل در کنترل بیماری نقش اساسی دارد. امروزه دیگر، روش‌های متداول کنترل مثل سمپاشی به‌دلیل پیچیدگی ناقلان و عامل بیماری جوابگو نیستند ازاین‌رو در سال‌های اخیر نقش باکتری‌های ولباکیا که از باکتری‌ای شبه ریکتزیایی داخل سلولی هستند در کنترل ناقلان مورد توجه قرار گرفته است.

**هدف:** تاکنون آلودگی ولباکیایی در دو گونه پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتوموس مونگولنسیس از زیرجنس پارافلبوتوموس در ایران و جهان گزارش نشده است، بنابراین، تحقیق برای ردیابی آلودگی طبیعی این باکتری در این دو پشه که از ناقلان لیشمانیوز جلدی روستایی هستند انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** دو گونه پشه خاکی از ۱۸روستا در ترکمن صحرا با استفاده از تله‌های چسبان و تله‌های نورانی صید و جمع‌آوری شدند. پشه‌های خاکی تشریح، سر و انتهای بدن مونته و با استفاده از کلید تشخیص، نوع آنها شناسایی شدند. از سینه و شکم برای استخراج DNA استفاده شد. ژن *wsp* باکتری ولباکیا، با پرایمرهای (81F/691R) تکثیر و پس از تعیین توالی، داده‌ها با نرم‌افزارهای مولکولی آنالیز شد.

**نتایج:** ژن *wsp* باکتری ولباکیا از۱۳۶پشه خاکی ردیابی شد و ۴۴ پشه آلودگی ولباکیایی داشتند که از این تعداد ۱۰ مورد دارای DNA کافی بودند و توالی آنها تعیین شد. ولباکیا پیپینتیس برای اولین بار در هر دو گونه این پشه خاکی در ایران و جهان یافت و تأیید شد. در این مطالعه ۳ هاپلوتایپ از ژن *wsp* باکتری ولباکیا در دو گونه‌ی زیرجنس پارافلبوتوموس در ۱۰ پشه‌ی خاکی در ایران شناسایی شد.

**نتیجه‌گیری:** پشه خاکی‌های پارافلبوتوموس دومین ناقل احتمالی لیشمانیوز جلدی پس از فلبوتوموس پاپاتاسی هستند که نقشی اساسی در نگهداری بیماری در میزبانانشان ایفا می‌کنند. با توجه به ردیابی ژن *wsp* باکتری ولباکیا پیپینتیس در دو گونه پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتومومس مونگولنسیس و چهار خصوصیت اصلی باکتری ولباکیا پیپینتیس (ناسازگاری سیتوپلاسمی، بکرزایی، نرکشی و ماده‌سازی نرها)، می‌توان آن‌ها در آینده از طریق ترانسژن و با استفاده از روش میکرواینجکشن به نمونه‌های غیر آلوده به باکتری در برنامه‌های پژوهشی کنترل بیماری لیشمانیوز استفاده کرد.

**کلید واژه‌ها:** پشه خاکی/ لیشمانیا/ ولباکیا

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست‌ویکم شماره ۸۱، صفحات: ۷۱-۶۲

## مقدمه

لیشمانیوز جلدی روستایی، بیماریی انگلی است که در بیش از نیمی از استان‌های ایران، گزارش شده و در سال‌های اخیر نه تنها در مناطق جدیدی پدیدار گشته بلکه به‌دلیل تغییرات جغرافیایی یا بروز بلایای طبیعی (مثل شهرستان بم) منجر به اپیدمی در این مناطق شده است. لیشمانیوز جلدی به‌عنوان بیماری اندمیک انگلی در منطقه ترکمن صحرا از استان گلستان که از دو شهرستان مراوه‌تپه و گنبدکاووس تشکیل شده و نیز بخش‌هایی دیگر از شمال‌شرقی ایران مطرح بوده است. چون انگل لیشمانیا از طریق پشه خاکی، که ناقل اصلی بیماری است، به انسان انتقال می‌یابد، مبارزه با پشه خاکی برای برنامه‌ریزی کنترل این بیماری نقش اساسی پیدا می‌کند. تجربه نشان داده که روش‌های پیشین از قبیل سمپاشی یا استفاده از پشه‌بندهای آغشته به حشره‌کش در کنترل بیماری کارساز نبوده است و نیاز بکارگیری روش‌های نوین وجود دارد. در سال‌های اخیر توجه محققان به نقش باکتری ولباکیا در کنترل بندپایان و حشرات که خیلی از آنها در انتقال بسیاری بیماری‌ها نقش اصلی دارند جلب شده است. نقش پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی بعنوان ناقل اصلی لیشمانیوز

۱. تهران، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، گروه انگل‌شناسی ۲. لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی
۳. دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز بهداشت تهران جنوب ۴. تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه بیوفیزیک

جلدی روستایی در ایران به اثبات رسیده و پشه خاکی‌های زیرجنس پارافلبوتوموس به‌عنوان ناقل ثانویه این بیماری مطرح شده و در سال‌های گذشته انگل لیشمانیا میجر از پشه خاکی‌های این زیرجنس جدا و با روش‌های مولکولی تایپ شده که نتیجه بررسی در مجله‌های معتبر خارجی نیز چاپ شده است (۱ و ۲). پشه خاکی‌های زیرجنس پارافلبوتوموس ناقلان مخازن حیوانی بیماری بوده و نقش مهمی در حفظ چرخه زندگی انگل لیشمانیا در جوندگان بخصوص رومبومیس اپیموس ایفا می‌کند که مخزن اصلی لیشمانیوز جلدی نوع روستایی است. بنابراین، کنترل پشه خاکی‌های زیرجنس پارافلبوتوموس از این نظر اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. چون نقش و اهمیت باکتری ولباکیا بخصوص در ایران ناشناخته است و حتی بسیاری از محققان باکتری شناسی نیز نام آن را نشنیده‌اند لذا در مقدمه توضیح بیشتری در مورد این باکتری ارائه می‌شود. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که این باکتری در بین بی‌مهرگان انتشار وسیعی دارد و می‌توان تخمین‌زد که به‌طور طبیعی در بیش از ۲۰٪ همه حشرات انتشار داشته باشد. البته مطالعات نتیجه محور (Meta-analysis) اخیر، بیش از ٦٥٪ گونه‌های حشرات را آلوده به ولباکیا تخمین می‌زند(۳) که با آلودگی حداقل $10^{6}$ بتنهایی، فراوان‌ترین جنس باکتری داخل سلولی در میان گونه‌های حشرات است که تا کنون کشف کرده‌اند(٤).

ولباکیا گروه‌ی بزرگ و معمولی از باکتری‌های گرم منفی ریکتزیایی هستند که اولین بار در سال ۱۹۲٤درون بافت‌های تولید مثلی پشه Culex pipiens توسط Hertig & Wolbach گزارش شدند ولی پس از آن به ***Wolbachia pipientis*** اختصاص یافت(۵). ولباکیا پیپینتیس باکتری‌های داخل سلولی اجباری هستند که به‌طور مادری وارثت یافته (Cytoplasmically (Maternally) Inherited) و در بافت‌های تولید مثل (بیضه‌ها و تخمدان‌ها) در گروه وسیعی از بندپایان یافت می‌شوند. این باکتری‌ها از طریق سیتوپلاسم تخم‌ها به نسل بعد منتقل می‌شوند و مکانیسم‌های متفاوتی را برای دستکاری و تغییر در تولیدمثل میزبانشان بکار می‌برند(۶). این باکتری‌ها باعث شماری تغییر تولیدمثلی در میزبانشان می‌شوند که شامل ناسازگاری سیتوپلاسمی ( Cytoplasmic incompatibility) بین گامت‌ها، بین سویه‌ها و گونه‌های مرتبط، در هنگام جفت‌گیری نرهای آلوده با ماده‌های سالم است (Unidirectional Infection) ممکن است ماده‌ها سویه متفاوتی (Bidirectional Infection) از ***W. pipientis*** را حمل کنند(۷). القای بکرزایی (Parthenogenesis Induction)، ماده‌سازی ژنتیکی نرها (Feminization) و نرکشی( Male killing) از مهم‌ترین خصوصیات این باکتری است که تولیدمثل میزبان را دستکاری می‌کند(۸ و ۹). در نماتودهای فیلری، میزبان وابسته به ولباکیا برای انتشار، تمایل فراوانی در زمینه دارویی برای باکتری مورد نظر در درمان فیلاریازیس فراهم آورده است(۱۰ و ۱۱).

ولباکیا همچنین به‌طور افقی بین گونه‌های حشرات منتقل می‌شود(۱۵-۱۲). این تغییر تولیدمثلی میزبان برای باکتری نتایج انتخابی در بردارد. گونه‌هایی از این باکتری دربافت‌های سوماتیک نیز شناسایی شده است(١٦ و ۱۷).

ولباکیاها در حداقل ۱۵٪ گونه‌های حشرات بررسی شده‌اند و در هر یک از راسته‌های اصلی حشرات از جمله بندپایان نیز وجود دارند این بررسی‌ها نیز روز به روز رو به افزایش است، ولباکیا در سخت پوستان (Isopods)، کنه‌ها، عنکبوت‌ها و حتی نماتودها(۱۳) نیز دیده شده است. محدوده‌ی پراکنش ولباکیا در بندپایان و دیگر شاخه‌های جانوری هنوز به‌طور کامل تعیین نشده و حتی این باکتری‌ها به‌عنوان یک سویه‌ی جدا در نماتودها نیز یافت شده‌اند(۱۷).

در ۱۰ سال گذشته، به‌دلیل توزیع بسیار گسترده و تأثیر مهم آن بر بوم‌شناسی و تکامل و زیست‌شناسی تناسلی بر گونه‌های میزبان، توجه قابل ملاحظه‌ای به هم‌زیست‌های مادرزادی ولباکیا معطوف شده است(۱۳). به‌طور تقریبی ۲۰ تا ۷۵ درصد از تمام گونه‌های حشرات، باکتری ولباکیا را دارند(۱۸). همچنین، در بسیاری از عنکبوتیان و سخت‌پوستان زمینی وجود این باکتری گزارش شده است. هر کدام از حشرات می‌توانند با چندین گونه ولباکیا آلوده شوند(۱۷ و ۱۹) و جمعیت‌های مجزای جغرافیایی از یک گونه مشابه می‌تواند سویه‌های مختلفی را در خود جای دهد(۲۰ و ۲۱). سویه‌های

ولباکیا از طریق سیتوپلاسم تخم قابلیت انتقال عمودی در یک گونه را دارند(وراثت مادرزادی) ولی دامنه گسترده میزبان‌های آلوده ولباکیایی را نمی‌توان فقط با انتقال عمودی آن توجیه کرد. توانایی این باکتری برای انتشار در گونه‌های میزبان جدید با انتقال افقی برای توزیع جهانی آن (پاندمی) توضیح قابل قبولی محسوب می‌شود، هرچند مکانیسم‌ها و الگوهای انتقال بین گونه‌ای بخوبی شناخته نشده است(۲۰).

سویه‌های ولباکیا در زیست‌شناسی زایشی، بوم‌شناسی و تکامل میزبان تا استفاده بالقوه آنها در کنترل زیستی حشرات آفت و کاربردهای پزشکی زیستی نقش دارند(۱۳).

تاکنون، ۸ سرگروه(سرگروه‌های A تا H) به‌طور مقدماتی بر مبنای داده‌های حاصل از ژن‌های 16S rRNA، fts Z و wsp (پروتئین سطحی ولباکیا [Wolbachia surface protein]) تعیین شده است(۱۵). اکثر سرگروه‌ها در بندپایان دیده شده است (سرگروه‌های A، B، E، F، G و H) و اکثر سویه‌های (استرین‌ها) ولباکیای حشرات، متعلق به سرگروه‌های A و B هستند(۲۲). ولباکیا پیپینتیس می‌تواند با مکانیسم ناسازگاری سیتوپلاسمی بین گامت‌ها، بدون نیاز به انتقال عرضی بین جمعیت‌های میزبان انتشار یابد. در چنین حالتی، ممکن است از آنها برای حمل ترانسژن‌ها در بین جمعیت حشرات دارای اهمیت پزشکی به منظور تداخل و کنترل انتقال انگل استفاده شود.

## مواد و روش‌ها

پشه‌های خاکی از ترکمن صحرا در استان گلستان با استفاده از تله چسبان(Sticky papers)، تله نورانی CDC ( Centres for disease control) و آسپیراتور صید و جمع‌آوری شدند. این منطقه از دو شهرستان مراوه‌تپه(۱۰ روستا) و گنبدکاووس(۸ روستا) تشکیل شده، طی سه سال متوالی ۱۳۸۷، ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ در فصول فعالیت پشه‌های خاکی بالغ انجام شد. اوج فعالیت پشه خاکی‌های پارافلبوتوموس با توجه به چرخه خونخواری‌شان در دو ماه تیر و شهریور است، از ۱۸ روستای یاد شده، تنها در ۹ روستا پشه خاکی‌های پارافلبوتوموس آلوده به باکتری ولباکیا مورد شناسایی قرار گرفت(جدول ۱).

پشه‌های خاکی صید شده در الکل ۹۶٪ و پس از آن ابتدا در یخچال ٤+ درجه و سپس درفریزر۲۰- درجه برای کارهای مولکولی نگهداری شدند. پشه خاکی‌ها از داخل تیوپ‌ها به داخل یخ در دیش‌های پتری شیشه‌ای حاوی ۱٪ مایع ظرفشویی در آب استریل منتقل شده و پس از دو دقیقه باقی ماندن در این حالت، با سمپلر، مایع ظرفشویی ۱٪ در آب استریل را خالی کرده و پس از قرار دادن پشه خاکی‌ها به مدت پنج دقیقه در آب استریل در دو مرحله شسته می‌شدند. هر پشه خاکی بر روی یک قطره 1 x TE روی اسلاید تمیز، زیر لوپ قرار داده می‌شد، سر و انتهای بدن برای شناسایی جدا و مابقی برای جدا کردن DNA تشریح می‌شد(۲۳ و ٢٤). سر و انتهای بدن پشه خاکی‌ها با محلول برلیز (Berlese) روی لام مونته شده و برای تشخیص نمونه‌ها از کلیدهای تشخیصی ارائه شده توسط سیدی رشتی و ندیم(۱۹۹۲) با استفاده از میکروسکوپ شناسایی و تعیین گونه می‌شدند. جدا و خالص‌سازی DNA پشه خاکی‌ها به روش پرویزی انجام می‌شد(۲۳). میکروتیوب‌های حاوی بدن پشه خاکی(به غیر از سر و دو بند انتهایی شکم) از فریزر ۲۰°C- خارج و به دمای آزمایشگاه منتقل می‌شد. پس از دو بار تکرار این عمل با هدف ایجاد شوک فیزیکی(برای بهتر له‌شدن بدن پشه خاکی)، ۱۰۰ میکرولیتر(Grinding Mix (GM را درون تیوب ریخته و به کمک تیپس(سرسمپلر)، شکم پشه خاکی را داخل میکروتیوب له‌می‌کردیم. نمونه‌ها به مدت حداقل ۱۵ دقیقه در Grinding Mix کاملاً غوطه‌ور می‌شدند تا بدن پشه خاکی براحتی له‌شود. پس از له‌کردن کامل نسج پشه، فوراً ۱۰ میکرولیتر SDS Mix به میکروتیوب اضافه کرده، تمام میکروتیوب‌ها ورتکس(vortex) و به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ(Spin Short) می‌شد. میکروتیوب‌های حاوی نمونه به مدت ۱۲۰-۳۰ دقیقه در بن ماری ٦٥ درجه و سپس برای کاهش دمای نمونه‌ها، به‌مدت ۵ دقیقه در ظرف حاوی یخ خرد شده قرار داده می‌شدند. ۳۰ میکرولیتر استات پتاسیم(KOAC) سردِ ۸ مولار به میکروتیوب‌ها اضافه شد، مجدداً تمام میکروتیوب‌ها ورتکس و بعد Short Spin می‌شدند. سپس میکروتیوب‌ها به‌مدت ٤٥ دقیقه تا ۲ ساعت در ظرف حاوی یخ خرد شده قرار داده می‌شدند. میکروتیوب‌ها به‌مدت ۲ دقیقه با rpm (Rotate per minute)

۱٤۰۰۰ سانتریفیوژ می‌شدند. محلول رویی میکروتیوب‌ها (سوپرناتانت) (supernatant) را با سمپلر جدا کرده و به میکروتیوب‌های جدید و کد گذاری شده منتقل می‌کردیم. ۳۵۰ میکرولیتر اتانول ۹٦٪ فریز شده را به تمام میکروتیوب‌های جدید اضافه کرده و یک شب در فریزر ۲۰°C- نگهداری می‌شدند. صبح روز بعد تمام میکروتیوب‌های شب قبل که در فریزر مانده بودند، به دمای آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا از سرمای آنها کاسته شود. تمام میکروتیوب‌ها در ۱٤۰۰۰ rpm به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شده، سوپرناتانت(اتانول ۹٦٪) موجود در آنها، به‌صورت دستی دور ریخته شده و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ به رسوب DNA موجود در ته میکروتیوب‌ها اضافه می‌شد. در مرحله‌ی بعد تمام میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با rpm ۱٤۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. دوباره الکل رویی(سوپرناتانت) موجود در میکروتیوب‌ها دور ریخته می‌شد. میکروتیوب‌ها را به‌صورت وارونه بر دستمال کاغذی کشیده می‌شد تا هیچ‌گونه الکلی در آنها باقی نماند. این مراحل ۳ بار تکرار شدند. در تمامی میکروتیوب‌ها را باز کرده و پس از قرار دادن یک دستمال کاغذی بر روی آنها، به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌گرفتند تا داخل‌شان خشک شده و الکل موجود در آنها کاملاً تبخیر شد. پس از خشک شدن کامل میکروتیوب‌ها، ۲۵ میکرولیتر 1X TE buffer یا آب مقطر ۲ بار تقطیر($ddH_2O$) به آنها اضافه می‌شد. طی ٤ مرحله‌ی متناوب میکروتیوب‌ها را Short Spin نموده و پس از ضربه‌های ملایم(Flicking) به میکروتیوب‌ها، حداقل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده می‌شدند. برای استفاده کوتاه مدت، نمونه‌ها در یخچال ۴°C و برای استفاده بلند مدت در فریزر ۲۰°C- نگهداری می‌شدند.

**تکثیر ژن *wsp***: برای انجام PCR و تشخیص ولباکیا در پشه خاکی‌ها دو پرایمر طراحی و استفاده شد و با پرایمرهای عمومی *wsp* بنام 81F(forward) با نوکلیوتیدهای (5´TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC3´) و نیز پرایمر دیگر بنام 691R(reverse) با نوکلیوتیدهای (5´AAAAATTAAACGCTACTCCA3´) یک قطعه که حدود ۵۵۰ جفت باز(base pair) بدون احتساب پرایمرها می‌باشد، تکثیر یافت(۲۵ و ۲۶).

در سمت راست ژن *wsp*، ژن *rpoH* فاکتور سیگمای شوک حرارتی را کد می‌کند و در سمت چپ آن ژن *hcpA*، پروتئین نامشخصی را رمزگذاری می‌کند که طول و توالی آمینواسید آن به صورت زیاد در بسیاری از باکتری‌ها حفظ می‌شود(۲۲).

پرایمرهای ذکر شده، با توجه به پروتکل‌های Ready و Benlarbi شناسایی شدند(۲۳) که در آن بررسی، آمپلی کون (Amplicon)های ژن *wsp* در باکتری ولباکیا مستقیماً توالی‌یابی (Sequence) شده و گسترش(Amplification) قطعات ژن *wsp* باکتری ولباکیا توسط پرایمرهای 81F/691R، با استفاده از PCR انجام شد(۱۵). توالی محصول PCR بدون کلون کردن و به‌طور مستقیم تعیین شد.

برای تعیین توالی DNA یا اسید آمینه صد نانوگرم از DNA خالص برای هر نمونه با کیت BI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit و دستگاه ( 373/377 sequencing systems (ABI, PE Applied Biosystems مورد استفاده قرار گرفت. در وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه‌ها و تنظیم توالی و مطابقت نوکلیوتیدها با کروماتوگرافی هر نمونه، نرم‌افزار Sequencher$^{Tm}$ 4.1.4 softwar (Gene Codes Corporation). برای کامپیوترهای PC استفاده شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم‌افزار Phylogenetic Analysis Using Parsimony یاPAUP بکار گرفته شد(۲۷).

## نتایج

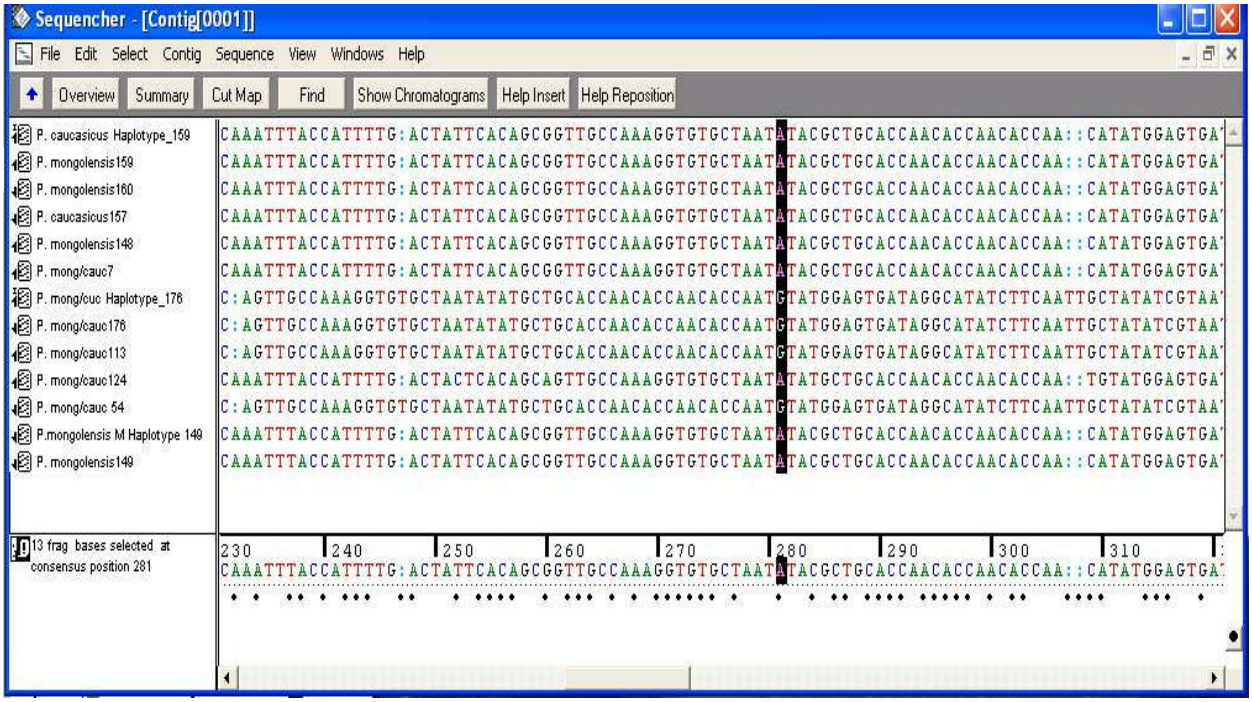
توزیع جغرافیایی پشه خاکی‌های صید شده در مناطق مختلف مورد مطالعه:

پشه خاکی‌های منطقه پس از صید و جمع‌آوری، تشریح و مونته شدند که ٤۷۷۷ پشه خاکی در سه سال متوالی ۱۳۸۹-۱۳۸۷ از ۱۸ روستای منطقه ترکمن صحرا بدست آمد. ۱۳٦ پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتوموموس مونگولنسیس از زیر جنس پارافلبوتوموس شناسایی و تفکیک شدند. فقط نرهای این دو گونه از پشه‌های خاکی‌ها صفت‌های ریخت‌شناسی داشته و قابل تفکیک و تشخیص

هستند ولی ماده‌های دو گونه از نظر ظاهر، خصوصیات و صفات ریخت‌شناسی کاملا مشابه و غیرقابل تفکیک و تشخیص‌اند(۲۶). ازاین‌رو ماده‌های این دو گونه به‌صورت *P. caucasicus/mongolensis* در این مقاله معرفی شده‌اند که می‌تواند ماده فلبوتوموس کوکازیکوس یا ماده فلبوتومومومس مونگولنسیس باشد(۱). جزییات توزیع، پراکندگی روستاها، زیستگاه و جنس این دو گونه پشه خاکی از زیر جنس پارافلبوتوموس برای تعیین میزان آلودگی طبیعی آنها به باکتری ولباکیا با استفاده از PCR و با هدف قرار دادن ژن *wsp* در جدول ۱ نشان داده شده است.

**جدول ۱: درصد آلودگی ولباکیا در دو گونه پشه خاکی مونگولنسیس و کوکازیکوس به تفکیک روستا، زیستگاه و جنسیت در منطقه ترکمن صحرا**

| جنس | زیرجنس | شهرستان / گونه | روستا / زیستگاه | گنبد کاووس: داشلی برون | شورد گش | خیر خواجه علیا | اینچه برون | دوزالوم فدوی | دانشمند | اخی تپه | مراوه تپه: قره گل غربی | سوزش | جمع آلودگی | تعداد کل گونه صید شده زیرجنس پارافلبوتوموس | درصد آلودگی ولباکیا در هر گونه | درصد آلودگی ولباکیا در زیرجنس پارافلبوتوموس |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| فلبوتوموس | پارافلبوتوموس | مونگولنسیس (نر) | طویله حیوانات | ۲ | ۳ | ۰ | ۱ | ۰ | ۷ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱۳ | ۸۵ | ۳۱/۷۶ | ۱۹/۸۵ |
| | | | اماکن‌داخل‌خانه | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | | | |
| | | | لانه جونده | ۱ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۸ | ٤ | ۰ | ۰ | ۱٤ | | | |
| | | کوکازیکوس (نر) | طویله حیوانات | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ٦ | ٦٦/٦٦ | ۲/۹٤ |
| | | | اماکن‌داخل‌خانه | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | | | |
| | | | لانه جونده | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۰ | ۲ | | | |
| | | کوکازیکوس ومونگولنسیس (ماده) | طویله حیوانات | ۱ | ۰ | ۰ | ۱ | ۱ | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ٤ | ٤٥ | ۲۸/۸۸ | ۹/٥٦ |
| | | | اماکن‌داخل‌خانه | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۳ | | | |
| | | | لانه جونده | ۲ | ۱ | ۱ | ۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ٦ | | | |
| جمع | | | | ٦ | ٤ | ۲ | ٥ | ۱ | ۱۷ | ٦ | ۱ | ۲ | ٤٤ | ۱۳٦ | * | ۳۲/۳٥ |
| درصد آلودگی (به تفکیک روستا و مجموع) | | | | ٤/٤۱ | ۲/۹٤ | ۱/٤۷ | ۳/٦۷ | ۰/۷٤ | ۱۲/٥ | ٤/٤۱ | ۰/۷٤ | ۱/٤۷ | | ۳۲/۳٥ | | |



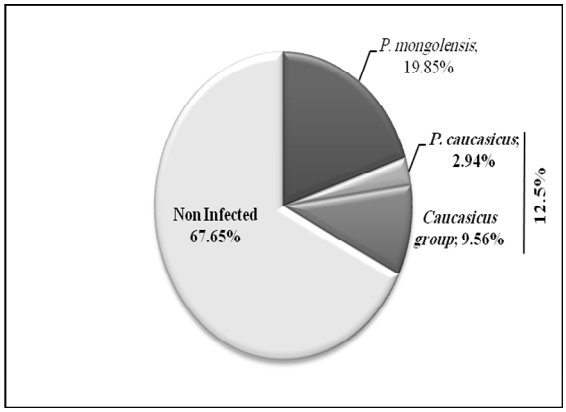

**شکل ۱: اصلاح و Alignment نمودن توالی های کانسنسوس (Consensus) ژن wsp باکتری ولباکیا از نمونه های تعیین توالی شده (ترکمن صحرا) توسط نرم افزار Sequencer Tm 4.1.4 software**

آلودگی ولباکیایی این دو پشه خاکی با هدف قراردان ژن *wsp* انجام شد. ۱۰ مورد از ٤٤ مورد مثبت DNA کافی داشتند برای تعیین توالی داشتند. پس از تعیین توالی و مقایسه با موارد مشابه باکتری ولباکیا ثبت شده در بانک جهانی ژن، آلودگی ولباکیا پیپینتیس برای اولین بار در هر دو گونه این پشه خاکی مورد تائید قطعی قرار گرفت. سه هاپلوتایپ ژن *wsp* ولباکیا پیپینتیس یافت شد. هاپلوتایپ ۱۵۹ از روستای داشلی برون که ۵ پشه خاکی از هر دو گونه پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتومومومس مونگولنسیس از جنس نر و ماده را شامل می‌شد. هاپلوتایپ ۱۷۶ از روستای اینچه برون که فقط ۴ پشه خاکی ماده از هر دو گونه را شامل می‌شد. هاپلوتایپ ۱۴۹ از روستای دانشمند که فقط پشه خاکی نر مونگولنسیس دارای این هاپلوتایپ منفرد بود. جالب‌تر این‌که سه استرین و هاپلوتایپ از این باکتری یافت شد که دو استرین، جدید و به‌طور کامل متفاوت با ولباکیا پیپینتیس ثبت شده در بانک جهانی ژن بوده است.

در ضمن توالی‌های یافت شده ولباکیا پیپینتیس از این دو پشه خاکی آنالیز و تفاوت نوکلیوتیدها وکروماتوگرام آن بخصوص در استرین‌های جدید بررسی شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

ژن *wsp* باکتری ولباکیا پیپینتیس برای اولین بار از دو گونه پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتومومومس مونگولنسیس جدا شد. ماده‌های این دو گونه پشه خاکی از ناقلان بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی بوده و نقش اصلی را در حفظ چرخه‌ی انگل در مخازن حیوانی بیماری (جوندگان) دارند(۲۸). با توجه به چهار خصوصیت اصلی باکتری ولباکیا پیپینتیس(ناسازگاری سیتوپلاسمی، بکرزایی، نرکشی و ماده‌سازی نرها) (۱۵-۱۳)، وجود این باکتری در این دو ناقل بیماری مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت تأیید وجود آن در دو گونه پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتومومومس مونگولنسیس در آینده از طریق ترانسژن و استفاده از روش میکروانجکشن به نمونه‌های غیرآلوده به باکتری در برنامه‌های پژوهشی کنترل استفاده شود(۲۹). در صد آلودگی ولباکیایی در جنس‌های نر و ماده در هر دو گونه پشه خاکی، تقریباً برابر بود(نمودار ۱). توزیع آلودگی به لحاظ آماری به کمک آزمون نسبت با $P<0.05$ اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. هر چند به دلیل شباهت‌های ریخت‌شناسی و غیرقابل تشخیص و تفکیک دو گونه پشه خاکی ماده فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتومومومس مونگولنسیس نمی‌توان گفت که چه تعداد و یا درصد از ماده‌های این دو گونه متعلق به هر کدام است ولی چون گونه پشه خاکی نر فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتومومومس مونگولنسیس از نظر ریخت‌شناسی، قابل تشخیص و تفکیک‌اند و در همین منطقه صید شده‌اند قاعدتاً ماده‌های این دو گونه نیز در منطقه وجود دارند(۳۰).




**نمودار۱: فراوانی نسبی آلودگی به ولباکیا در پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتوموس مونگولنسیس در زیرجنس پارافلبوتوموس**

میزان کلی آلودگی ولباکیا(۳۲/۳۵٪) در دو گونه پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس و فلبوتومومومس مونگولنسیس در مقایسه با فلبوتوموس پاپاتاسی از زیرجنس فلبوتوموس پایین‌تر(بیش از ۸۰٪) (۲۳) ولی نزدیک به میزان آلودگی ولباکیایی در سایر بند پایان است(۱۹-۱۷).

در این مطالعه سه هاپلوتایپ (دو هاپلوتایپ مشترک [Common Haplotype] و یک هاپلوتایپ منحصر بفرد [Unique Haplotype]) از دو گونه‌ی زیرجنس پارافلبوتوموس در ۱۰ پشه‌ی خاکی در ایران شناسایی شد و چون تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر آلودگی ولباکیایی بر پشه خاکی‌های زیر جنس پارافلبوتوموس در ایران و دنیا انجام نگرفته بود، این نخستین گزارشی است که آلودگی ولباکیایی را در این گونه‌ها گزارش می‌کند. البته تحقیقات و

گزارش‌هایی از آلودگی ولباکیایی بر پشه خاکی‌های زیرجنس فلبوتوموس و تنها بر گونه فلبوتوموس پاپاتاسی در ایران و کشورهای دیگر انجام شده و نتیجه آن انتشار یافته است (۲۳، ۳۱).

پس از آنالیز مولکولی توالی ژن *wsp* باکتری ولباکیا، مقایسه (Pairwise genetic similarity) و تعیین میزان شباهت ژنتیکی نمونه‌ها، یک هاپلوتایپ عمومی و مشترک که هاپلوتایپ ۱۷٦ نامیده شده بدست آمد که در این مطالعه ٤ نمونه‌دارای این هاپلوتایپ بودند. این هاپلوتایپ قبلاً از فلبوتوموس پاپاتاسی توسط پرویزی و همکاران(۲۳) جدا و با شماره دسترسی EU780683 در بانک جهانی ژن ثبت شده بود(۲). هاپلوتایپ ۱۵۹ که در این مطالعه ۵ نمونه از آن بدست آمد برای اولین بار یافت شد. هاپلوتایپ ۱٤۹ که منفرد(unique) است نیز برای اولین بار یافت شد. هاپلوتایپ ۱٤۹ و هاپلوتایپ ۱۵۹ تنها در یک نوکلئوتید اختلاف داشتند که نشانگر آن است که جهش ژنی در یک نوکلیوتید و در سال‌های اخیر اتفاق افتاده و مشتق شده است ولی در مقایسه با هاپلوتایپ ۱۷٦ تعداد تفاوت نوکلیوتیدی بسیار زیاد است و در نتیجه تفاوت در اسید آمینه نیز مشاهده می‌شود که نشانگر آن است که این اشتقاق در سال‌های پیش انجام شده و این دو استرین متفاوت از ولباکیا پیپینتیس می‌باشند.

برخلاف گزارش‌های پیشین(۲ و ۲۳) مبنی بر این‌که هر سویه (Strain) از باکتری ولباکیا، تنها می‌تواند یک گونه از پشه خاکی‌های زیر جنس متعلق به خود را آلوده سازد، نتایج این پژوهش نشان داد که استرین ولباکیایی جدا شده در ۲ زیر جنس متفاوت پارافلبوتوموس و فلبوتوموس، یکی هستند و این برای اولین بار است که دیده می‌شود یک استرین با هاپلوتایپ‌های مختلف این توانایی را دارد که گونه‌های متفاوت از دو زیرجنس پارافلبوتوموس و نیز فلبوتوموس پاپاتاسی از زیر جنس فلبوتوموس را آلوده سازد که خود تأییدی بر توانایی بالقوه‌ی این باکتری در انتقال عرضی است (۱۵ و ۱٦). هاپلوتایپ ۱۷٦ ژن *wsp* باکتری ولباکیا با ژن *wsp* باکتری ولباکیای موجود در گونه‌های پشه خاکی‌های فلوبوتومینه با شماره‌ی دسترسی AF237883 و AF237882 (۳۰) به ثبت رسیده در بانک جهانی ژن، به میزان ۹۹٪ مشابهت دارد. هاپلوتایپ‌های ۱۵۹ و ۱٤۹ ژن *wsp* باکتری ولباکیا با نمونه‌های باکتری ولباکیا موجود در GenBank برای گونه‌های *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) *ananassae* و *Linepithema* (Hymenoptera, Formicidae) *humile* به‌ترتیب با شماره دسترسی DQ235410 و AY446998 به میزان زیادی مشابهت دارند.

هاپلوتایپ‌های ۱۵۹ و ۱٤۹ ژن *wsp* باکتری ولباکیا با سویه‌ی wAna ژن *wsp* باکتری ولباکیا پیپینتیس با شماره‌ی دسترسی DQ235410 در GenBank در گونه‌ی *Drosophila* از یونان و سویه ی lnvA این باکتری با شماره‌ی دسترسی AY446998 در جمعیت‌های مورچه‌ی تهاجمی آرژانتینی(Invasive argentine ant) (*Linepithema humile*) از کشور آمریکا بیش از ۱۰۰bp متفاوت بودند.

مقایسه‌ی هاپلوتایپ های ۱۵۹ و ۱٤۹ با نمونه‌های موجود در GenBank، شباهت ۹۹ درصدی با گونه‌ی سویه‌های نزدیک ولباکیایی آرتروپودای موجود در کدوتنبل (Pumpkin) را نشان می‌دهد که توانایی بالقوه‌ای در انتقال افقی ( Horizontal transmission) در گیاهان دارد. این سویه با شماره‌ی دسترسی AY157681 در بانک جهانی ژن به ثبت رسیده است.

شباهت‌های سویه‌ای به علت انتقال افقی اخیر ولباکیا در عرض گونه‌های میزبان یا در گونه‌های نزدیک به واگرایی مشترک میزبان آنها و تکامل مشترک سویه‌های ولباکیا است. چون سویه‌های مشابه ژنتیکی اغلب در میزبانان حشرات مشابه دیده می‌شوند، فعل و انفعال بوم‌شناختی در میزبانان چنین انتقال افقی را تعدیل کرده است(۲۲). بنابراین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که انتقال افقی ولباکیا به‌طور کامل بتازگی اتفاق افتاده و این انتقال، غالباً در جنس *Phlebotomus* رخ داده است.

انتقال عمودی (درون گونه‌ای) پیش نیاز انتقال افقی است و فراوانی این باکتری را درون یک گونه از میزبان بالا می‌برد. انتقال افقی باعث انتقال و تبادل این باکتری در سطح وسیع و بین گونه‌ای (Intertaxon انتقال بین گونه‌ای) می‌شود(۱٦). بنابراین، نتایج بدست آمده در گونه‌های دو زیر جنس متمایز پارافلبوتوموس و فلبوتوموس از یک جنس مشترک

فلبوتوموس نشان داد که هاپلوتایپ‌های مختلف از یک سویه‌ی ولباکیا وجود دارد و به‌دلیل همان ویژگی انتقال افقی این باکتری بوده که در حد گسترده بین گونه‌های یک جنس اتفاق افتاده است.

ژن *wsp* کاندیدای مهمی در تعیین تکامل میزبان آرتروپودا و تشخیص سویه‌های تأثیرگذار(پاتوژن ولباکیا) در تغییر فنوتیپ جنسی ناقلان(میزبان آرتروپودای بیماریزا) است.

در نتیجه، این رویکردها می‌توانند تحقیقات آینده‌ی مولکولی را تسهیل ساخته و اجازه دهند سویه‌های مختلف تأثیرگذار این باکتری (ولباکیا) در مهندسی ژنتیک به عنوان سیستم‌های انتقال دهنده‌ی ترانسژنی (Transgene-driving Systems) یا ترانسژن‌های مسدود کننده‌ی بیماری ( Disease-blocking Transgenes) برای هدف‌های گوناگون بسرعت شناسایی و تایپ شوند، بدون آن‌که نیاز به کلون اختصاصی و سکانس ژنی(Sequencing) همه‌ی سویه‌های جدید بدست آمده باشد.

**تشکر و قدردانی:** نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه آقای دکتر طاهرخانی استاد دانشگاه علوم پزشکی گرگان و آقای دکتر بدیعی معاون بهداشتی و رئیس مرکز بهداشت گنبد کاووس و همکارانشان در فراهم کردن مکان اقامت گروه برای جمع‌آوری نمونه‌ها در منطقه سپاسگزاری می‌کنند. از آقایان احمد بقایی، مهدی باغبان و خانم‌ها الناز علائی نوین و فرشته احمدی پور از همکاران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی انستیتو پاستور هم که در جمع‌آوری نمونه‌ها و کمک در کارهای آزمایشگاهی نقش شایانی داشتند تشکر می‌کنیم. بودجه این تحقیق از محل اعتبار پژوهشی انستیتو پاستور ایران، طرح مصوب ۳۶۷ آقای دکتر پرویز پرویزی تأمین شده است. بخشی از نتایج این مقاله مربوط به پایان‌نامه آقای علی بردبار دانشجوی کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان است که در آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی انستیتو پاستور ایران و راهنمایی آقای دکتر پرویزی انجام شده است.

## منابع

1. Killick-Kendrick R. Phlebotomine Vectors of the Leishmaniasis. A Review Med Vet Entomol 1990; 4: 1- 24.

2. Parvizi P, Fardid F, Amirkhani A. Isolation of Two Wsp and 16S rDNA Intracellular Bacteria Genes Wolbachia Pipientis from Phlebotomus Papatasi Sandfly, the Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis of IRAN. Iranian Journal of Medical Microbiology 2010; 4: 53–60. [Text in Persian]

3. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A Werren J H. How Many Species are infected with Wolbachia?— A Statistical Analysis of Current Data. FEMS Microbiol Lett 2008; 281:215-220.

4. Van Opijnen T, Breeuwer J A J. High Temperatures Eliminate Wolbachia, A Cytoplasmic Incompatibility Inducing Endosymbiont, From The Two Spotted Spider Mite. Journal Of Experimental And Applied Acarology 1999; 23: 871–881.

5. Hertig M, Wolbach S B. Studies on Rickettsia-Like Microorganisms in Insects. J Med Res 1924; 44: 329-374.

6. Kassem H A, Osman G. Maternal Transmission of Wolbachia Infection in Phlebotomus Papatasi (Scopoli). Ann Trop Parasitol 2007: 101(5): 435- 440.

7. Kassem et al. Wolbachia Infection and the Expression of Cytoplasmic Incompatibility in Sandflies (Diptera: Psycodidae) from Egypt. Ann Trop Med Parasitol 2003; 47(6): 639- 644.

8. Hoffmann A A, Turelli M. Cytoplasmic Incompatibility in Insects. In: O'Neill S L, Werren J H, Hoffmann A A (Ed). Influential Passengers. Oxford; Oxford University Press, 1997: 42- 80.

9. Stouthamer R, Breeuwer J A J, Hurst G D. Wolbachia Pipientis: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. Annu Rev Microbiol 1999; 53: 71- 102.

10. Gilbert J C K, Nfon B L, Makepeace L M, Njongmeta I M, Hastings K M, Pfarr A, Renz V N, Tanya, A J Trees. Antibiotic Chemotherapy of Onchocerciasis: in A Bovine Model, Killing of Adult Parasites Requires A Sustained Depletion of Endosymbiotic Bacteria (Wolbachia Species). J Infect Dis 2005; 192:1483- 1493.

11. Rao R. Endosymbiotic Wolbachia Of Parasitic Filarial Nematodes As Drug Targets. Indian J Med Res 2005; 122:199- 204.

12. Sinkins S P, O'Neill S L. Wolbachia as A Vehicle to Modify Insect Populations. In: Handler a M, James A A: (Eds) Insect Transgenesis: Methods and Applications. Boca Raton, CRC, 2000: 271- 288.

13. Werren J H. Biology of Wolbachia, Annual Reviews of Entomology 1997; 42: 587- 609.

14. Werren J H, Jaenike J, Wolbachia and Cytoplasmic Incompatibility in Mycophagus Drosophila and Their Relatives. Heredity 1995; 75: 320–326.

15. Zhou W, Rousset F, O'Neill S L. Phylogeny and PCR-Based Classification of Wolbachia Strains Using WSP Gene Sequence. Proc R Soc Lond B 1998; 265: 509- 515.

16. Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Bouletreau M. Phylogenetic Evidence for Horizontal Transmission of Wolbachia in Hostparasitoid Associations. Mol Biol Evol 1999; 16: 1711- 1723.

17. Werren J H, Windsor D M. Wolbachia Infection Frequencies in Insects: Evidence of a Global Equilibrium?. Proc R Soc Lond B 2000; 267:1277-1285.

18. Jeyaprakash A, Hoy M A. Long PCR Improves Wolbachia DNA Amplification: Wsp Sequences Found in 76% of Sixty-Three Arthropod Species. Insect Mol Biol 2000; 9:393- 405.

19. Kikuchi Y, Fukatsu T. Diversity of Wolbachia Endosymbionts in Heteropteran Bugs. Appl Environ Microbiol 2003; 69:6082- 6090.

20. Mercot H, Charlat S. Wolbachia Infections in Drosophila Melanogaster and D. Simulans: Polymorphism and Levels of Cytoplasmic Incompatibility. Genetica 2004; 120:51–59.

21. Riegler M M, Sidhu W J, Miller, O'Neill S L. Evidence for a Global Wolbachia Replacement in Drosophila Melanogaster. Curr Biol 2005; 15: 1428-1433.

22. Baldo L, Dunning Hotopp J C, Werren J H. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont Wolbachia Pipientis. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 7098-7110.

23. 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.

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. Swofford DL. PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other Methods. Version 40 Sinauer Associates Sunderland Massachusetts 2002.

28. Nadim A, Seyedi-Rashti M A. A Brief Review of the Epidemiology of Various Types of Leishmaniasis in Iran. Acta Med Iran 1971; 14: 99–106.

29. Sinkins P S. Wolbachia and Cytoplasmic Incompatibility in Mosquitoes. Journal of Insect Biochemistry and Molecular Biology 2004; 34: 723-729.

30. Parvizi P, Javadian E, Assmar M, Naddaf S R, Amirkhani A. A Survey on the Host Reservoirs of Cutaneous Leishmaniasis in Turkemen Sahara Area, Iran. Parasitol Int 1998; 47: (Suppl.) 186.

31. Matsumoto K, Izri A, Dumon, H, Raoult D, Parola Ph. First Detection of Wolbachia Spp., Including A New Genotype, In Sand Flies Collected In Marseille, France. J Med Entomol 2008; 45: 466- 469.

# Isolation and Molecular Typing of *Wolbachia Pipientis* from two Species of *Phlebotomus caucasicus* and *Phlebotomus mongolensis* Sandflies

Bordbar A.(M.Sc)[1,2]-*Parvizi P.(Ph.D)[1]- Soltan Sh.(M.D)[3]- Taherkhani A.(M.Sc)[4]- Assmar M.(Ph.D)[1,2]

***Corresponding Address:** Parasitology Department, Molecular Systematics Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, IRAN

**Email: parp@pasteur.ac.ir**

**Received: 22/Jun/2011 Accepted: 29/Sep/2011**

## Abstract

**Introduction:** In Iran, zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) is an endemic disease in many foci in the northeastern, southern, and central parts of the country. This disease goes through the geographical distributions along with dispersion in their reservoirs (gerbils) and their vectors (sandflies). Therefore, controlling the vectors or reservoirs has a significant role in prevention of *Leishmania* parasites which is transmitted by sandflies. Nowadays, because of vectors implications, the routine methods of controlling and spraying has no more useful effects on vectors and reservoirs. Consequently, in recent years maternally inherited intracellular *Rickettsia* like bacteria (*Wolbachia*) has been fascinated by many researchers.

**Objective:** The aim of the present study was to improve our knowledge about detection of two species of *Paraphlebotomus* sandflies infected with *W. pipientis* which yet has not been reported in Iran and the world. The new surveys have been conducted in the case of *Wolbachia* detection in two mentioned ZCL vectors.

**Materials and Methods:** In Turkemen Sahara within the ZCL focus, two species of *Phlebotomus caucasicus* and *Phlebotomus mongolensis* sandflies has been frequently collected from eighteen villages. Sticky papers and CDC traps were used to sampling sandflies in rural areas. In the laboratory, sandflies were identified to species by dissecting and mounting genitalia of each sandfly. DNA from sandflies (Thorax and abdomen) was extracted, the *wsp* gene confirmed for the presence of *Wolbachia* using *wsp* general primers (81F/691R). After sequencing, the data were analyzed by molecular software.

**Results:** We examined a total of 136 individuals (91 male and 45 female) from *Phlebotomus caucasicus* and *Phlebotomus mongolensis* species; 10 out of 44 positive (32.35%) samples had enough DNA to sequencing. *Wolbachia* infections have been found and verified for the first time in each of two *Phlebotomus caucasicus* and *Phlebotomus mongolensis* species in Iran and the world. In this procedure, 3 haplotypes (2 common Haplotypes and 1 unique Haplotype) of 2 species of *Paraphlebotomus* subgenus has been recognized in 10 sand flies of Iran.

**Conclusion:** *Paraphlebotomus* sandflies are the secondary vectors of ZCL after *Phlebotomus* which play a decisive role in maintaining disease of their reservoirs. *Wolbachia* provide a starting point for inducing changes in host sex or sexuality. By manipulating *Wolbachia* as a transgene, it is hoped that these bacteria may be used as a controlling system for decreasing vector-borne-disease.

**Key words:** Leishmaniasis/ Phlebotomus/ Wolbachia

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 81, Pages: 62-71

1. Parasitology Department, Molecular Systematics Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, IRAN
2. Microbiology Department, Islamic Azad University Lahijan, IRAN
3. South Tehran Health Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN
4. Biophysics Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, IRAN