Archive of SID

مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره هفتم، شماره اول، بهار ۱۳۸۷، ۳۰-۲۱

بررسی پلی‌مورفیسم در ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور تهیه شده در مناطق اندمیک لیشمانیوز پوستی ایران با استفاده از مارکرهای مایکروستلایت

دکتر مهناز تشکری[۱]، دکتر عامر الجوابرا [۲]، دکتر محمدحسین علیمحمدیان[۳]، دکتر ایرج شریفی[٤]، دکتر محسن رضائیان[٥]، دکتر فاطمه محسنی‌مقدم[٦]

دریافت مقاله: ۸٦/۲/۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸٦/۷/٤ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸٦/۷/۱۸ پذیرش مقاله: ۸٦/۸/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: انگل لیشمانیا ماژور یکی از عوامل اتیولوژیک لیشمانیوز جلدی در مناطق مختلف ایران است. امروزه تکنیک‌های مختلف ملکولی با استفاده از توالی‌های پلیمرفیک DNA به طور گسترده در بررسی هتروژنیسیتی عوامل اتیولوژیک لیشمانیوز به کار می‌رود. یکی از تکنیک‌های جدید در این زمینه روش Multilocus Microsatellite Typing (MLMT) است که در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. در این مطالعه از این روش به منظور بررسی پلی‌مورفیسم در گونه لیشمانیا ماژور (عامل لیشمانیوز پوستی نوع روستایی) در ایران استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی تعداد ۲۴ ایزوله انگل لیشمانیا ماژور جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی در مناطق مختلف اندمیک لیشمانیوز پوستی نوع روستایی در ایران (استان‌های شمالی، مرکزی، غرب و جنوب غربی ایران) برای اولین بار توسط روش MLMT مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌ها با استفاده از هفت جفت پرایمر طراحی شده برای مارکرهای مایکروستلایت بسط داده شد و به منظور بررسی پلی‌مورفیسم محصولات واکنش بر روی ژل پلی‌اکریلامید مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در محصولات حاصل از Polymerase Chain Reaction (PCR) با استفاده از شش جفت پرایمر مورد بررسی، پلی‌مورفیسم دیده شد و نمای مورفیک تنها در محصولات بسط داده شده توسط یک پرایمر مشاهده گردید. در کل هفت ژنوتیپ مختلف در بین نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد. بر اساس نتایج این تحقیق ژنوتیپ‌های مختلفی در بین ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور در نواحی اندمیک اصفهان، تهران و سمنان شناسایی شد در حالی که در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق اندمیک ایلام و خوزستان هموژنیتی دیده شد و تنها یک ژنوتیپ مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در مجموع در این مطالعه با استفاده از تکنیک MLMT هفت ژنوتیپ مختلف در بین ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور در نواحی اندمیک لیشمانیوز پوستی نوع روستایی در ایران شناسایی شد که نشان‌دهنده توانایی این تکنیک در ارزیابی هتروژنیسیتی در گونه لیشمانیا ماژور است.

واژه‌های کلیدی: مایکروستلایت تایپینگ، لیشمانیا ماژور، پلی‌مورفیسم

۱- (نویسنده مسؤول) استادیار گروه آموزشی علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
تلفن: ۰۳۹۱-۸۲۲۰۰۰۱، فاکس: ۰۳۹۱-۸۲۲۰۰۲۲، پست الکترونیکی:m_tashakori44 @yahoo.com
۲- استادیار آزمایشگاه پزشکی اصلاح، انجمن خیریه اصلاح، چریگو، فلسطین
۳- استاد گروه آموزشی ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران
۴- استاد گروه آموزشی انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات لیشمانیا، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۵- دانشیار گروه آموزشی پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۶- مربی و عضو هیأت علمی گروه آموزشی علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لیشمانیوز پوستی با طیف وسیع بالینی توسط گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا از خانواده تریپانوزوماتیده Tryponosomatidea ایجاد می‌شود. این بیماری یک معضل جدی بهداشتی در کشورهای مختلف جهان در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به شمار می‌آید و در کشور ایران نیز شایع است [۱]. لیشمانیوز پوستی در ایران به دو صورت اپیدمیولوژیکی لیشمانیوز پوستی نوع روستایی یا زئونوتیک Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis و لیشمانیوز پوستی نوع شهری یا آنتروپونوتیک Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis گزارش گردیده است [۲]. گونه لیشمانیا ماژور عامل اتیولوژیک لیشمانیوز پوستی مرطوب یا نوع روستایی در ایران است. این نوع از بیماری در نواحی مختلف ایران از جمله نواحی زیر یافت می‌شود:

الف: نواحی مرکزی ایران شامل استان اصفهان [۳] و یزد

ب: نواحی شمالی و شمال شرقی ایران شامل استان‌های سمنان و خراسان [۵-۴].

ج: نواحی غرب و جنوب غربی شامل استان‌های ایلام و خوزستان [۶]

د: نواحی جنوبی ایران شامل استان‌های فارس و هرمزگان و بوشهر [۸-۷]

لیشمانیوز شهری که عامل آن لیشمانیا تروپیکا است از شهرهای بزرگ وکوچک مانند کرمان، بم، شیراز، مشهد، نیشابور و سبزوار گزارش شده است [۱۰-۹]. مطالعات محققین با استفاده از تکنیک‌های مختلف سرولوژی، بیوشیمیایی و ملکولی بر روی جنس لیشمانیا نشان‌دهنده پلی‌مورفیسم و وجود سویه‌های متفاوت در گونه‌های مختلف این انگل است [۱۳-۱۱]. در حال حاضر تکنیک استاندارد برای شناسایی گونه و سویه‌های مختلف انگل لیشمانیا روش بررسی ایزوآنزیمی است [۱۲]. ولی این روش یک متد نسبتاً سخت، پر هزینه و وقت‌گیر است و ضمناً در بعضی مواقع قابلیت کافی جهت آشکارسازی پلی‌مورفیسم در گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا را ندارد. لذا امروزه با پیشرفت‌های وسیع در روش‌های ملکولی این دسته از روش‌ها در بررسی پلی‌مورفیسم و تعیین سویه‌های مختلف در گونه‌های مختلف جنس لیشمانیا به طور گسترده مورد استفاده محققین قرار گرفته است [۱۶-۱۴]. در مطالعات ملکولی از نواحی پلی‌مورفیک DNA هسته‌ای و کینتوپلاستی جهت تایپینگ لیشمانیا استفاده می‌شود که از جمله می‌توان به توالی‌های نواحی بینابینی ژن‌های مینی‌اگزون miniexon gene [۱۴]، نواحی بینابینی ژن‌های gp63 [۱۷]، نواحی بینابینی قابل نسخه‌برداری ژن‌های ریبوزومال RNA (ITS) [۱۵]، ژن‌های ریبوزومال RNA [۱۸]، سکانس‌های KDNA [۱۹]، توالی‌های تکراری و مارکرهای مایکروستلایت [۲۰، ۱۶] اشاره نمود. توالی‌های مایکروستلایت دسته‌ای از توالی‌های (سکانس‌های) تکراری در حدود یک تا شش باز است که در ژنوم سلول‌های یوکاریوت از جمله جنس لیشمانیا گسترده شده است. این توالی‌ها جزء توالی‌های اللیک است [۲۱] و در سال‌های اخیر به طور گسترده در تایپنگ گونه‌های مختلف جنس لیشمانیا مورد استفاده قرار گرفته است [۲۵-۲۲]. به طوری که Bulle و همکاران در سال ۲۰۰۲ از مارکرهای مایکروستلایت در آنالیز ۵۰ ایزوله لیشمانیا اینفانتوم استفاده نمودند و ۲۲ ژنوتیپ مختلف را در بین ایزوله‌های مورد بررسی نشان دادند [۱۶]. Ochsenreither و همکاران و Schwenkenbecher و همکاران در سال ۲۰۰۶ به ترتیب پلی‌مورفیسم در گونه‌های لیشمانیا دونووانی *Leishmania donovani complex,* و لیشمانیا تروپیکا *Leishmania Tropica* را با به کارگیری مارکرهای مایکروستلایت نشان دادند [۲۳-۲۲]. از آن جایی که در ارتباط با هتروژنیتی ایزوله‌های گونه‌های لیشمانیا در ایران با استفاده از این روش تاکنون گزارشی نشده است ما در این مطالعه با هدف بررسی پلی‌مورفیسم در ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور در ایران از مارکرهای مختلف مایکروستلایت استفاده نمودیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی تعداد ۲۴ ایزوله انگل لیشمانیا ماژور جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی در مناطق مختلف اندمیک لیشمانیوز پوستی ایران مورد استفاده قرار گرفت. ایزوله‌ها در مطالعه قبلی توسط بررسی ایزوانزیمی

www.SID.ir

Archive of SID

و متدهای ملکولی تعیین هویت شده بودند [۴]. جزییات مربوط به ایزوله‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. کلیه ایزوله‌ها از ضایعات پوستی بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی از مناطق مختلف اندمیک لیشمانیوز پوستی روستایی جمع‌آوری شدند.

جدول ۱- سویه‌های لیشمانیا ماژور مورد استفاده در این مطالعه، اللهای مشاهده شده در هر لوکوس بترتیب اندازه از بزرگ به کوچک مشخص شده است. بزرگترین الل با حرف A نمایش داده شده است.

۳۹GTG	۱CA	۱GACA	۱ GC	۷۱AT	۲۷GTG	۴GTG	ژنوتیپ	محل جمع‌آوری ایزوله	کد بین المللی
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 1
B	A	A	A	A	A	A	Lm II	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 2
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	تهران	MHOM/IR/00/PII 3
B	A	A	A	A	A	A	Lm II	اصفهان	MHOM/IR/00/PII4
B	B	A	A	A	A	A	Lm III	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 5
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 6
B	B	A	A	A	B	A	Lm IV	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 7
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 8
B	A	A	A	A	A	A	Lm II	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 9
B	B	A	A	A	B	A	Lm IV	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 10
B	A	A	A	A	A	A	Lm II	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 11
B	A	A	A	A	A	A	Lm II	اصفهان	MHOM/IR/00/PII 12
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	خوزستان	MHOM/IR/00/PII 13
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	خوزستان	MHOM/IR/00/PII 14
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	خوزستان	MHOM/IR/00/PII 15
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	ایلام	MHOM/IR/00/PII 16
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	خوزستان	MHOM/IR/00/PII 17
A	C	A	A	B	B	B	Lm I	خوزستان	MHOM/IR/00/PII 18
A	C	A	B	B	B	B	Lm I	خوزستان	MHOM/IR/00/PII 19
A	C	A	A	B	B	B	LmI	ایلام	MHOM/IR/00/PII 20
A	D	A	B	A	B/C *	A/B*	Lm V	سمنان	MHOM/IR/00/PII 21
B	D	A	B	A	C	A	Lm VI	سمنان	MHOM/IR/00/PII 22
B	D	A	B	A/B *	B/C *	A/B *	Lm VII	سمنان	MHOM/IR/00/PII 23
A	D	A	B	A	C	A	Lm VI	سمنان	MHOM/IR/00/PII 24
A	C	A	A	B	B	B	Lm VIII	اصفهان	MRHO/IR/76/ER

****: نمای هتروزیگوت با حرف A/B و B/C مشخص شده است.***

www.SID.ir

Archive of SID

برای تهیه DNA ژنومی از فرم پروماستیگوت انگل کشت شده در محیط مایع RDMI۱۶۴۰ استفاده شد و DNA مورد نظر توسط تکنیک فنل /کلروفرم استخراج و در آب مقطر حل گردید [۲۶] DNAهای تهیه شده در یخچال۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. از DNA سویه‌های استاندارد لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/76/ER) گرفته شده از دکتر جوادیان (دانشکده پزشکی دانشگاه تهران) در طول مطالعه استفاده شد.

واکنش PCR

DNA ژنومیک ایزوله‌های مورد بررسی توسط هفت جفت پرایمر اختصاصی برای توالی‌های مایکروستلایت که جزییات آن در جدول ۲ مشاهده می‌شود بسط داده شد. مخلوط PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۳۰ نانوگرم DNA، ۵۰ نانومول dNTP، ۱/۵ میلی مول کلرور منیزیم و یک واحد انزیم Taq پلیمراز تهیه گردید و واکنش PCR بر اساس برنامه‌ریز انجام شد: در مرحله اول برای دناتوراسیون اولیه (Primary denaturation) مخلوط PCR به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس در مرحله دوم که شامل ۳۵ سیکل بود به ترتیب مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای چسبیدن اختصاصی (Annealing Temperature) برای هر پرایمر (جدول ۲) و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه برای گسترش (Extension) انکوبه شدند.

جدول ۲- مارکرهای مایکروستلایت مورد استفاده در مطالعه

مارکر	پرایمر	دمای چسبیدن T	کروموزوم
۴GTG	F CGGTTTGGCGCTGAAAGCGG r CGTGAGGACGCCACCGAGGC	۵۸ درجه سانتی‌گراد	۳۵
۲۷GTG	F GGAGGTGGCTGTGGTTGTTG r GCCGCTGACGCTGCAGGCT	۵۸ درجه سانتی‌گراد	۳
۳۹GTG	f GTCTTGCCGCGAGGTGACCG r CCAGCACCAGCACCACCATC	۵۸ درجه سانتی‌گراد	۱
۱GC	f CTGGCACGCACACCCACACA r ATCTGCGCTCATCTGGCGAG	۶۰ درجه سانتی‌گراد	۳
۷۱AT	f TCTTGCGAAGGTGTGGTCTT r AGCCCACGTGTACATGTGTG	۵۰ درجه سانتی‌گراد	۲۱
۱GACA	f GAAAGGGCAGGAGGACGGAT r CACACACACATACACACATA	۵۴ درجه سانتی‌گراد	۱
۱CA	f TTAGTTCCATCATACACCCG r CGTTCGACATGGAGAATAAG	۴۸ درجه سانتی‌گراد	۳۵

در مرحله آخر برای گسترش نهایی (Final extension) مخلوط PCR در دمای ۷۲ درجه به مدت ۶ دقیقه قرار گرفت. جهت اطمینان از وجود محصول واکنش، ابتدا حاصل PCR بر روی ژل آگار ۲٪ با بافر ۰/۵×TBE و ولتاژ ۸۰، الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در زیر ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت.

www.SID.ir

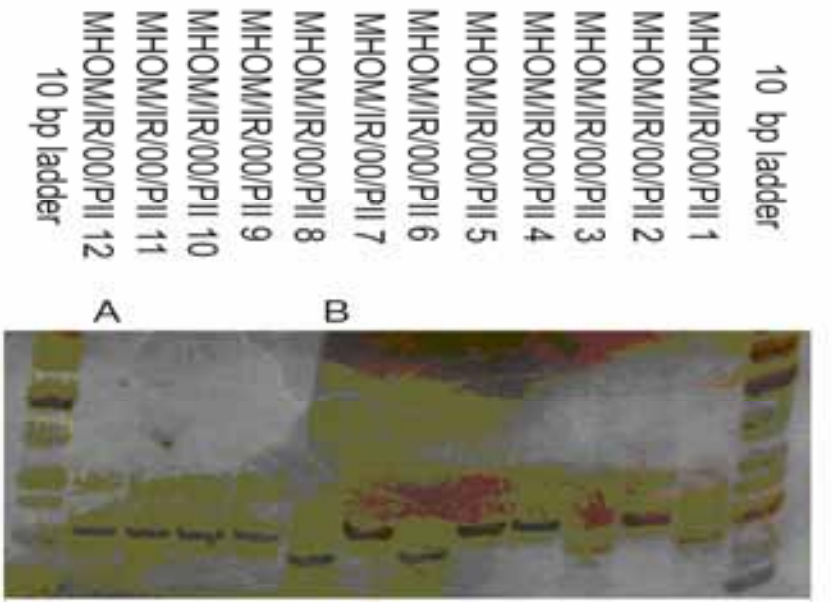
Archive of SID

به منظور تعیین پلی‌مورفیسم در ایزوله‌های مورد مطالعه، محصولات واکنش PCR بر روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۲٪ در ابعاد ۰/۸×۳۵۰×۴۵۰ میلی‌متر به مدت ۱۸ ساعت با توان ۱۰ وات الکتروفورز عمودی شد و توسط نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید. برای رنگ‌آمیزی ژل ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه در اسید نیتریک ۱٪ ثابت شده و سپس در محلول نیترات نقره ۲٪ به مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفت. جهت ظهور باندها ژل در محلول حاوی کربنات‌سدیم ۰/۲۵٪ مولار و فرمالین ۳۷٪ قرار گرفت. در نهایت ژل در اسید استیک ۱۰٪ ثابت و روی کاغذ فیلتر بلات شد [۲۲]. پلی‌مورفیسم در بین ایزوله‌ها به طور ماکروسکپی مورد ارزیابی قرار گرفت و الل‌های مشاهده شده به ترتیب اندازه از بزرگ به کوچک نامگذاری شدند.

نتایج

محصولات بسط داده شده توسط کلیه هفت جفت پرایمر مورد استفاده در این مطالعه در محدوده اندازه قابل انتظار بود. پلی‌مورفیسم در محصولات واکنش بسط داده شده توسط شش جفت از هفت جفت پرایمر مورد استفاده در این مطالعه دیده شد. به طوری که تنها محصولات واکنش PCR با پرایمر 1GACA یک نمای مشابه را در میان نمونه‌های مورد بررسی نشان دادند. در جدول ۱ به ترتیب اندازه، الل‌های متفاوت با حروف در بین نمونه‌های مختلف نشان داده شده است. تعداد الل‌های مشاهده شده در محصولات واکنش با انواع پرایمرهای مورد استفاده بین یک تا چهار الل بود. بیشترین الل در محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای 1CA و 2۷GTG مشاهده شد. در بین ایزوله‌های مورد بررسی هر دو نمای هموزیگوت و هتروزیگوت دیده شد(شکل ۱ و ۲).

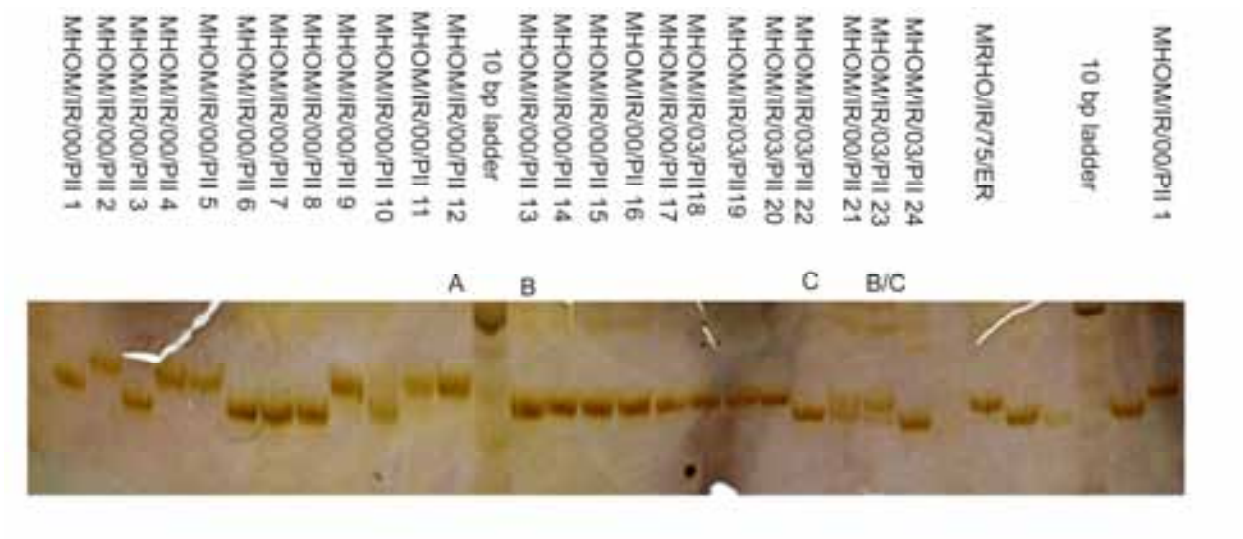
موارد هتروزیگوتی مشاهده شده بسیار نادر بود و فقط در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه شمالی ایران (استان سمنان) دیده شد. کلیه نمونه‌های جمع‌آوری شده از دو منطقه اندمیک لیشمانیوز پوستی در غرب و جنوب غربی ایران شامل استان‌های ایلام و خوزستان یک ژنوتیپ یکسان را نشان دادند در حالی که در بین نمونه‌های مناطق مرکزی و شمال ایران شامل استان‌های اصفهان، تهران و سمنان پلی‌مورفیسم قابل توجهی مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۱- محصولات واکنش بعضی از نمونه های مورد مطالعه توسط پرایمر 7IAT.
A: الل بزرگ‌تر، B: الل کوچک‌تر

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- محصولات واکنش کلیه نمونه‌های مورد مطالعه توسط پرایمر 2VGTG.
A: الل بزرگ‌تر، B و C: الل‌های دیگر، B/C: هتروزیگوت

در کل تعداد ۷ ژنوتیپ در بین ۲۴ نمونه مورد مطالعه دیده شد. ژنوتیپ‌های LmI تا LmV در ایزوله‌های مناطق مرکزی ایران و ژنوتیپ‌های LmV تا LmVII نیز به طور انحصاری در منطقه اندمیک استان سمنان مشاهده گردید. در حالی که ژنوتیپ LmI به طور مشترک در مناطق مرکزی ایران با مناطق غربی و جنوب غربی ایران دیده شد.

بحث

در سال‌های اخیر روش‌های ملکولی متنوعی برای تعیین سویه‌های مختلف انگل لیشمانیا توسط محققین مورد استفاده قرار گرفته است. در این مطالعه از مارکرهای مایکروستلایت که توالی‌های الیک و پلی‌مورفیک است جهت بررسی پلی‌مورفیسم و تعیین سویه‌های مختلف در گونه لیشمانیا ماژور استفاده شده است. نتایج به دست آمده در این مطالعه به شرح زیر است:

الف- نتایج این بررسی توانایی مارکرهای مایکروستلایت را در بررسی پلی‌مورفیسم در گونه لیشمانیا ماژور آشکار کرد. گزارشات محققین قبلی نیز دلالت بر توانایی این روش در تایپینگ گونه‌های مختلف لیشمانیا دارد به طوری که Ochsenreither و همکاران با استفاده از مارکرهای مایکروستلایت تنوع و پلی‌مورفیسم را در گونه لیشمانیا دونووانی *Leishmania donovani* گزارش دادند. آن‌ها با این روش سه دسته عمده در بین ۶۳ ایزوله لیشمانیا اینفانتوم متعلق به MON۱ شناسایی کردند [۲۲]. Schwenkenbecher و همکاران ۸۱ ژنوتیپ مختلف را در بررسی ۱۱۷ نمونه لیشمانیا تروپیکا *Leishmania tropica* بر اساس مارکرهای مایکروستلایت نشان دادند [۲۳]. مطالعه Tashakori و همکاران در زمینه بررسی گونه لیشمانیا ماژور *Leishmania major* با روش‌های ITS-SSCP و Sequencing تنوع توالی‌های مایکروستلایت را در نمونه‌های مورد بررسی در این گونه نشان داد [۱۵].

ب- بر اساس نتایج این تحقیق ۷ ژنوتیپ مختلف در بین نمونه‌های مورد بررسی دیده شده که این نتیجه در راستای گزارشات محققین قبلی می‌باشد. مطالعات Le Blancq و همکاران، تنوع در گونه لیشمانیا ماژور را با به کارگیری بررسی ایزوآنزیمی نشان داد [۲۷]. Elfari و همکاران با استفاده ازمارکرهای مختلف ملکولی پلی‌مورفیسم در نمونه‌های لیشمانیا ماژور جمع‌آوری شده از مناطق آسیای مرکزی، خاورمیانه و آفریقا را گزارش نمودند [۲۸].

www.SID.ir

Archive of SID

در ارتباط با تنوع در ایزوله‌های لیشمانیا ماژور در ایران بر اساس اطلاعات نویسندگان سه گزارش وجود دارد که هر سه مطالعه دلالت به وجود تنوع در ایزوله‌های این گونه دارد. حاتم و همکاران و تشکری و همکاران با به کارگیری بررسی ایزوآنزیم‌ها به ترتیب ۹ و ۲ سویه مختلف لیشمانیا ماژور را در بین نمونه‌های مورد مطالعه خود گزارش نمودند [۴،۱۵]. در بررسی قبلی ما ۵ سویه مختلف در بین ایزوله‌های لیشمانیا ماژور با به کارگیری تکنیک ITS-SSCP گزارش شده است [۱۵].

اگرچه بر اساس نتایج بررسی حاضر پلی‌مورفیسم و سویه‌های بیشتری در این گونه مشاهده شد ولی نتایج با گزارش قبلی ما هم‌خوانی داشت به طوری که در این مطالعه علی‌رغم مشاهده تنوع بسیار در نمونه‌های جمع‌آوری شده از نواحی مرکزی و شمالی، هموژنیتی در ایزوله‌های مورد بررسی مناطق اندمیک غرب و جنوب غربی ایران دیده شد که این نتیجه در مطالعه قبلی ما نیز گزارش شده بود [۱۵]. مشاهده تنوع بیشتر در این مطالعه در مقایسه با مطالعه قبلی، با توجه به به کارگیری مارکرهای بیشتر در این بررسی قابل توجیه است.

ج- در این بررسی هر دو نمای هموزیگوتی و هتروزیگوتی در بین نمونه‌های مورد بررسی دیده شد که در نتایج مطالعات محققین مختلف در گونه‌های مختلف لیشمانیا نیز این پدیده گزارش شده است [۲۳-۲۲]. وجود این پدیده می‌تواند به علت وجود دو الل متفاوت در یک نوع ایزوله و یا وجود دو سویه متفاوت به عنوان عامل عفونت باشد. پدیده هتروزیگوتی نیز در مطالعه قبلی گروه ما در نمونه‌های ناحیه اندمیک سمنان گزارش شده بود [۱۵].

نتیجه‌گیری

در مجموع با این روش هفت ژنوتیپ مختلف در بین ایزوله‌های مورد مطالعه شناسایی شد.که نشان‌دهنده توانایی این تکنیک در ارزیابی هتروژنیسیتی در گونه لیشمانیاماژور است. ژنوتیپ‌های شناسایی شده توزیع یکنواختی در نواحی مورد بررسی نداشت که خود نشان‌دهنده وجود کانون‌های مجزای عفونت در مناطق اندمیک لیشمانیوز پوستی روستایی در ایران است البته لازمست برای به دست آمدن اطلاعات دقیق‌تر در مطالعات بعدی نکات زیر مورد توجه قرار گیرد:

۱- بررسی نمونه‌های لیشمانیا ماژور از کلیه نواحی لیشمانیوز پوستی نوع روستایی در ایران شامل بعضی از مناطق استان کرمان و خراسان.

۲- بررسی تعداد نمونه بیشتر از مناطق مورد مطالعه از جمله استان‌های سمنان و ایلام.

۳- تعیین تعداد توالی‌های تکراری مارکرهای مورد مطالعه به منظور رسم Phenetic Tree.

References

[1] Leishmaniasis. Tropical Disease Research, Progress 1995-96. Thirteenth Programme Report, WHO, Geneva, 1997.

[2] Nadim A, Seyedi-Rashti MA. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. *Acta Medica Iranica. 1971; XIV: 99-106.*

[3] Nadim A, Faghih MA. The epidemiology of Cutaneous leshmaniasis in Isfahan province of Iran, I. The reservoir. II. The human disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1968; 62(4): 534-42.

[4] Tashakori M, Ajdari S, Kariminia A, Mahboudi F, Alimohammadian MH. Characterization of *Leishmania* species and *L Major* strains in different endemic areas of

www.SID.ir

Archive of SID

cutaneous leishmaniasis in Iran. *Iran Biomed J,* 2003; 7: 43-50.

[5] Javadian E, Nadim A, Tahvildare-Bidrudi G, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran B. Khorasan Part V: Report on a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esferayen. *Bull Soc Pathol Exot Filiales,* 1976; 69(2): 140-3.

[6] Javadian E, Mesghali A. Studies on cutaneous leishmaniasis in Khuzestan, Iran. Part I. The leptomonad infection of sandflies. *Bull Soc Pathol Exot Filiales,* 1974; 67(5): 513-6.

[7] Moaddeb A, Gettner S, Ardehali S. Studies on the causative agent of cutaneous leishmaniasis in Shiraz-Iran. *J Med Sci,* 1993; 18: 28-33.

[8] Hamzavi V, Mohebali M, Edrissian GH. And Fourozani AR. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Dashti and Dashtestani district of Bushehr province. *Iranian J Pub Health*, 2000; 29: 177-91.

[9] Sharifi I, Ardehali S, Motazadian MR, Aflatonian MR, Fekri AR, Ahmadi Mousavi A, et al. Identification and characterization of leishmania isolates in school childern in Bam, south-eastern Iran. *Irn J Med Sci*, 1997; 199: 22(3,4) 82-8.

[10] Hatam GR, Hosseini SMH, Ardehali S. Isoenzyme studies in characterization of Leishmania isolated in Iran. *Irn J Med Sci*, 1999; 24 (1,2): 8-13.

[11] Grimaldi G, David JrR, McMahon-Pratt. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg,* 1987; 36(2): 270-87.

[12] Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzyme. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp,* 1990; 65(3): 111-25.

[13] Degrave W, Fernandes O, Campell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania- a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 1994; 89(3): 463-9.

[14] Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clinic Microbiol,* 2003; 41(7): 3147-53.

[15] Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio I, Schönian G, Farajnia S, et al. Leishmania major: Genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Tropica*, 2006; 98: 52-8.

[16] Bulle B, Millon L, Bart JM, Gállego M, Gambarelli F, Portús M, et al. Practical approach for typing strains of Leishmania infantum by microsatellite analysis. *J Clin Microbial,* 2002; 40(9): 3391-7.

[17] Victoir K, Banuls AL, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noel S, et al. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of Leishmania belonging to subgenus Viannia. *Parasitology.* 1998; 117(pt 1):1-13.

[18] Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. *Mol Biochem Parasitol,* 1992: 51(1): 133-42.

[19] Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. *Exp Parasitol,* 1990; 71(3): 267-75.

[20] Piarroux R, fonts M, Perasso R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H, et al. Phylogenic relationships between Old World Leishmania strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Mol Biochem Parasitol,* 1995; 73(1-2): 249-52.

[21] Barker GC. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg,* 2002; 96(Suppl1): 21-4.

www.SID.ir

Archive of SID

[22] Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Prebser W, Schonion G. Multilocus microsatellite typing as a new tools for discrimination of Leishmania infantum MON-1 strains. *J Clin Microbial*, 2006; 44(2): 495-503.

[23] Schwenkenbecher JM, Wirth T, Schnur LF, Jaffe CL, Schallig H, Al-Jawabreh A, et al. Microsatellite analysis reveals genetic structure of Leishmania tropica. *Intr J Parasitol,* 2006; 36(2): 237-46.

[24] Botilde Y, Laurent T, Tintaya WG, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, et al. Comparison of molecular markers for strain typing of Leishmania infantum. *Infect Genet Evo*, 2006; 6(6): 440-6.

[25] Kuhls K, Keilonat K, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect,* 2007; 9(3): 334-43.

[26] Kelly JM. Isolation of DNA and RNA from Leishmania. *Methods Mol Bio*, 1993; 21: 123-31.

[27] Le Blancq SM, Schnur LF, Peters W. Leishmania in the Old World: 1. The geographical and hostal distribution of L. major zymodemes. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1986; 80(1): 99-112.

[28] Elfari M , Schnur FL, Strelkova MV. Genetic and biological diversity among populations of Leishmania major from Central Asia, the Middle East and Africa. *Microbes Infect*, 2005; 7(1): 93-103.

www.SID.ir

Archive of SID

Detection of Polymorphism within *L. major* isolates Collected from Iranian Patients Suffering from Cutaneous Leishmaniasis by Microsatellite Markers

M. Tashakori PhD[1], **A. Al-Jawabreh** PhD[2], **M.H. Alimohammadian** PhD[3], **I. Sharifi** PhD[4], **M. Rezaeian** PhD[5], **F. Mohseni Moqhadam** MD[6]

Received: 22/04/07 **Sent for Revision: 26/09/07** **Received Revised Manuscript: 10/10/07** **Accepted: 10/11/07**

Background and Objective: Protozoan parasites of *Leishmania major* is one of the causative agents of cutaneous leishmaniasis in different parts of Iran. Currently different molecular biology tools based on different polymorphic DNA sequences have been used in order to investigate heterogeneity among different *Leishmania* species. Multilocus microsatellite typing method (MLMT) is one of these interesting techniques that we applied to analyze *leishmania major* parasites collected from different endemic parts of zoonotic cutaneous Leishmaniasis (ZCL) in Iran.

Materials and Methods: In this laboratory study, twenty-four *leishmania major* parasites collected from patients suffered from cutaneous leishmaniasis in different parts of Iran were investigated using MLMT method for the first time in Iran. The isolates were amplified by seven different designed primers for microsatellite markers and then analysed after running on polyacrylamide gel electrophoresis for detection of polymorphism among these isolates.

Results: PCR products of 24 isolates using six microsatellite markers revealed polymorphic pattern, whereas monomorphic profile was observed with only one primer. Totally, seven different genotypes were demonstrated among studied isolates. Based on our results different genotypes were detected within *leishmania major* isolates collected from endemic areas of ZCL in Esfahan, Semnan and Tehran provinces, although only one genotype was observed in the studied isolated obtained from Khuzestan and Ilam foci.

Conclusion: Overall, seven different genotypes were identified based on MLMT in studied *Leishmania major* isolates in different endemic areas of ZCL in Iran. Based on our finding We suggest that MLMT can utilised as a reliable method for detection of polymorphism within *Leishmania major* species.

Key words: Multilocus Microsatellite Typing, *Leishmania major,* polymorphism

Funding: This research was funded by Institute of Microbiology and Hygiene Charity University Berlin, Germany.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Institute of Microbiology and Hygiene Charity University Berlin approved the study.

1- Assistant Prof., Dept. of Laboratory Sciences, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
(Corresponding Author) Tel:(0391) 8220001, Fax: (0391) 8220022, E- mail: m_tashakori44@yahoo.com
2- Assistant Prof., Islah Medical Laboratory, Islah Charitable Social Society, Jericho, Palestin
3- Prof., Dept. of Immunology, Pasteur Institute of Iran
4- Prof., Dept. of Parasitology, Leishmania Reaserch Center, University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5- Associate Prof., Dept. of Social Medicine, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
6- Academic Member, Dept. of Basic Science, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

www.SID.ir