

تعیین تنوع ژنتیکی ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور در ایران با روش‌های مولکولی

مهناز تشکری^{۱*}، عامر الجوابرا^۲، پروین جعفرپور^۳، محمدحسین علیمحمدیان^۴، قادر خلیلی^۵

خلاصه

مقدمه: در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی متعددی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا استفاده شده که هر کدام قابلیت‌های خاصی را دارد. در این مطالعه با به کارگیری روش‌های RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) و MLMT (Multilocus Microsatellite Typing) به بررسی تنوع ژنتیکی در ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور در ایران پرداختیم.

روش: در این بررسی آزمایشگاهی تعداد ۲۴ ایزوله لیشمانیا ماژور از مناطق اندمیک لیشمانیوز جلدی در ایران بررسی شد. بدین منظور کلیه ایزوله‌ها توسط پرایمرهای اختصاصی برای نواحی Mini Exon (ME)، Internal Transcribed Spacer ribosomal RNA (ITS-rRNA) و ۱۰ جفت پرایمر برای مارکرهای ماکروستلایت بسط داده شد. محصولات نواحی ITS_rRNA و ME پس از هضم آنزیمی روی ژل پلی‌اکریلامید، بررسی شد. تغییرات ساین محصولات واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction) نواحی مایکروستلایت توسط دستگاه اتوماتیک CEQ 8000 Automated Genetic System بررسی و ساختار جمعیتی ایزوله‌ها با نرم افزار Structure Version 2.3.2 رسم شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل از روش‌های ME-RFLP و ITS-RFLP به ترتیب دو و سه سویه متفاوت دیده شد، در صورتی که آنالیز یافته‌های مارکرهای مایکروستلایت ۲۱ ژنوتیپ مختلف نشان داد که با استفاده از نرم‌افزار ساختار این ۲۱ ژنوتیپ در سه خوشه مجزا قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: تنوع ژنتیکی در ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور با روش‌های مورد استفاده در این بررسی آشکار شد، اگرچه به نظر می‌رسد نتایج آنالیز بر اساس مارکرهای مایکروستلایت جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی و ژنتیکی جمعیت مناسب‌تر است. ضمناً یافته‌های این مطالعه نشان داد سویه‌های مختلف با توزیع جغرافیایی ایزوله‌ها مرتبط می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا ماژور، PCR-RFLP، MLMT، تنوع ژنتیکی، ایران

۱- استادیار گروه آموزشی علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ۲- آزمایشگاه پزشکی اصلاح، مؤسسه خیریه اصلاح، چریکو، فلسطین ۳- مربی گروه اصول و فن دانشکده

پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ۴- استاد گروه ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران ۵- مربی گروه ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران

* نویسنده مسؤل، آدرس: رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان • آدرس پست الکترونیک: m_tashakori44@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۵ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۰/۳/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۳/۲۶

مقدمه

لیشمانیا ماژور یکی از عوامل اتیولوژیک لیشمانیوز پوستی نوع مرطوب در نقاط مختلف جهان از جمله ایران می باشد (۱،۲) که در ۱۵ استان از ۳۲ استان کشور گزارش شده است (۳). ضایعات پوستی ایجاد شده توسط این انگل شامل طیفی از ضایعات پوستی خودبخود بهبود یافته و ضایعات غیر بهبود یافته می باشد. به نظر می رسد در ایجاد انواع ضایعات متفاوت ایجاد شده توسط این انگل، سیستم ایمنی بیمار و نوع استرین انگل دخالت دارد (۴). روش برتر برای تعیین هویت گونه و زیر گونه انگلی، روش آنالیز ایزوآنزیمی می باشد ولی یک روش سخت، وقت گیر و پرهزینه می باشد و معدود آزمایشگاه هایی مهارت لازم برای به کارگیری این روش را دارند (۵). در سال های اخیر با پیشرفت های حاصله در روش های ملکولی، ابزارهای ملکولی متفاوتی در مطالعات تنوع ژنتیکی و بررسی های اپیدمیولوژیک این گونه انگلی مورد توجه محققین قرار گرفته است (۶-۹). به کارگیری این روش ها علاوه بر اینکه امکان بررسی انگل در سطح گونه و استرین را میسر نموده است، اجازه تعیین هویت گونه انگل از نمونه مستقیم بیمار را امکان پذیر کرده است (۱۰). در مطالعات ملکولی به منظور افزایش حساسیت روش های مورد استفاده در ارزیابی تنوع ژنتیکی، توالی هایی با تعداد کمی زیاد در ژنوم انگل انتخاب شده است که از جمله به توالی های Minicircle Kinetoplast، توالی های ژن Mini Exon، نواحی بینابینی قابل نسخه برداری ژن های ریبوزومال (ITS-RNA rRNA) و مارکرهای مایکروستلایت می توان اشاره نمود (۱۱-۱۳). نواحی بینابینی قابل نسخه برداری ژن های ریبوزومال RNA میان زیر واحدهای کوچک و بزرگ RNA ریبوزومی واقع شده است و شامل ژن های ITS1 و ITS2 می باشد که توسط ژن rRNA 5.8s جدا شده است. ژن های مینی آگزون در فرآیند Transsplicing mRNA هسته ای دخالت دارند و به صورت توالی های به تعداد ۱۰۰ تا ۲۰۰ کپی در ژنوم انگل

واقع شده اند. مارکرهای مایکروستلایت دسته ای از توالی های تکراری در حد ۶-۱ باز است که در ژنوم انگل لیشمانیا گسترده شده است.

موریسیو (Mauricio) و همکاران در سال ۲۰۰۴ از روش آنالیز هضم آنزیمی نواحی بینابینی قابل نسخه برداری ژن های ریبوزومال RNA و ناحیه مینی آگزون در آنالیز ملکولی این انگل استفاده نمودند (۱۲). استفاده از روش SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism) در مطالعات ال تایی (el Tai) و همکاران در سال ۲۰۰۰ و تشکری و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش شده است (۱۴،۱۵). در سال های اخیر مارکرهای مایکروستلایت در تعیین گونه های مختلف انگل لیشمانیا به کار گرفته شده است. در مطالعات دیگری در سال های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۶ از این روش در تعیین گونه لیشمانیا اینفانتوم استفاده شده است (۱۶،۱۷). Schwenkenbecher و همکاران در سال ۲۰۰۶ برای بررسی هتروژنیتی در گونه لیشمانیا تروپیکا و الجوابرا (Al-Jawabreh) و همکاران در سال ۲۰۰۸ جهت پلیمریسم در ایزوله های گونه لیشمانیا ماژور از مارکرهای مایکروستلایت استفاده کردند (۱۷،۱۸). از آنجایی که به نظر می رسد داشتن اطلاعات در مورد تنوع ژنتیکی ایزوله های گونه لیشمانیا می تواند در زمینه بررسی های اپیدمیولوژیک بیماری در مناطق مختلف مؤثر باشد، لذا در این بررسی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در ایزوله های گونه لیشمانیا ماژور به دست آمده از مناطق اندمیک لیشمانیوز پوستی مرطوب ایران، ابتدا نواحی بینابینی قابل نسخه برداری ژن های ریبوزومال RNA و توالی های تکراری ژن های مینی آگزون تکثیر شده، سپس پلیمریسم در ایزوله های مورد مطالعه با روش های RFLP در نواحی تکثیر یافته ارزیابی شد. از مارکرهای مایکروستلایت نیز علاوه بر ارزیابی پلیمریسم، جهت بررسی ساختار جمعیت ایزوله های مورد مطالعه، استفاده شد.

روش بررسی

در این بررسی تعداد ۲۴ ایزوله انگل لیشمانیا ماژور که از کشت ضایعات پوستی بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی لیشمانیوز از مناطق مختلف اندمیک پوستی مرطوب به دست آمده بود، مورد بررسی قرار گرفت. محل جداسازی تمامی ایزوله‌ها در جدول شماره ۱ مشخص شده است. کلیه ایزوله‌ها توسط آنالیز ایزوآنزیمی به‌عنوان گونه لیشمانیا ماژور تعیین هویت شده بودند (۱۹). برای آنالیز مولکولی، کلیه ایزوله‌ها ابتدا در محیط NNN، سپس بر روی محیط مایع RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله غیرفعال شده به اضافه پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و برای استخراج DNA روش فنل کلروفورم به کار برده شد. در کلیه مراحل سویه‌های استاندارد لیشمانیا ماژور (MHOM/SU/74/K27)، لیشمانیا تروپیکا (MRHO/IR/75ER) و لیشمانیا اینفانتوم (MHOM/TN/ 80/IPT1) به‌عنوان کنترل‌های مثبت و هم‌چنین آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ناحیه ITS-rRNA توسط پرایمرهای LITSV (5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3') و LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') طراحی شده توسط کوپولیلو (Cupolillo) تکثیر گردید (۲۰).

محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر تریس اسید کلریدریک اتیلن دی‌امین تتراسستیک اسید (TAE) الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و مورد ارزیابی قرار گرفت. پروفایل ایزوله‌های تکثیر شده پس از هضم آنزیمی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در مجاورت آنزیم‌های هضم‌کننده Taq I, Alu I, Bst I و Hae III بر روی ژل پلی‌اکریل‌امید ۶٪، پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره، مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور تکثیر ناحیه مینی‌اگزون از یک جفت پرایمر اختصاصی جهت ناحیه حفاظت‌شده مینی‌اگزون ME1 (5'TGATACTTATATAGCGTTAG 3') و ME2 (5'TGTACTTTATTGGTATGCG 3') استفاده شد (۲۱). محصول حاصله بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز

گردید. جهت هضم آنزیمی، آنزیم‌های Cfo I و Hae III به کار برده شد و پروفایل حاصل از هضم بر روی ژل پلی‌اکریل‌امید ۶٪ پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره بررسی شد.

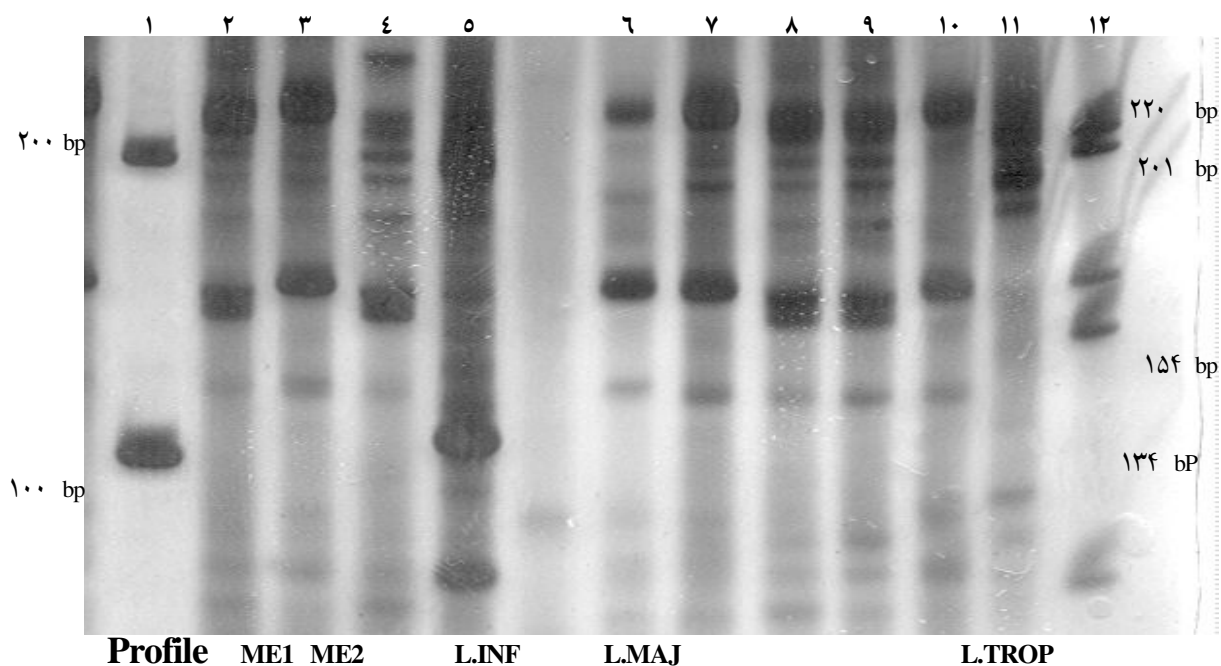
آنالیز مایکروستلایت

توالی‌های حاوی مارکرهای مایکروستلایت در ژنوم ایزوله‌های مورد بررسی، توسط ۱۰ جفت پرایمر با شرایط بیان شده توسط الجوابرا و همکاران در سال ۲۰۰۸ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸). تنوع در اندازه محصولات PCR با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌امید مورد ارزیابی قرار گرفت و تفاوت اندازه محصولات در سیستم اتوماتیک آنالیز ژنتیک CEQ 8000 (Beckman Coulter) بررسی شد. پروفایل توالی‌های تکراری هر مارکر مایکروستلایت با استفاده از model-based method و distance-based methods آنالیز گردید و ساختار جمعیت نیز با استفاده از نرم‌افزار Structure Version 2.3.2 رسم شد.

نتایج

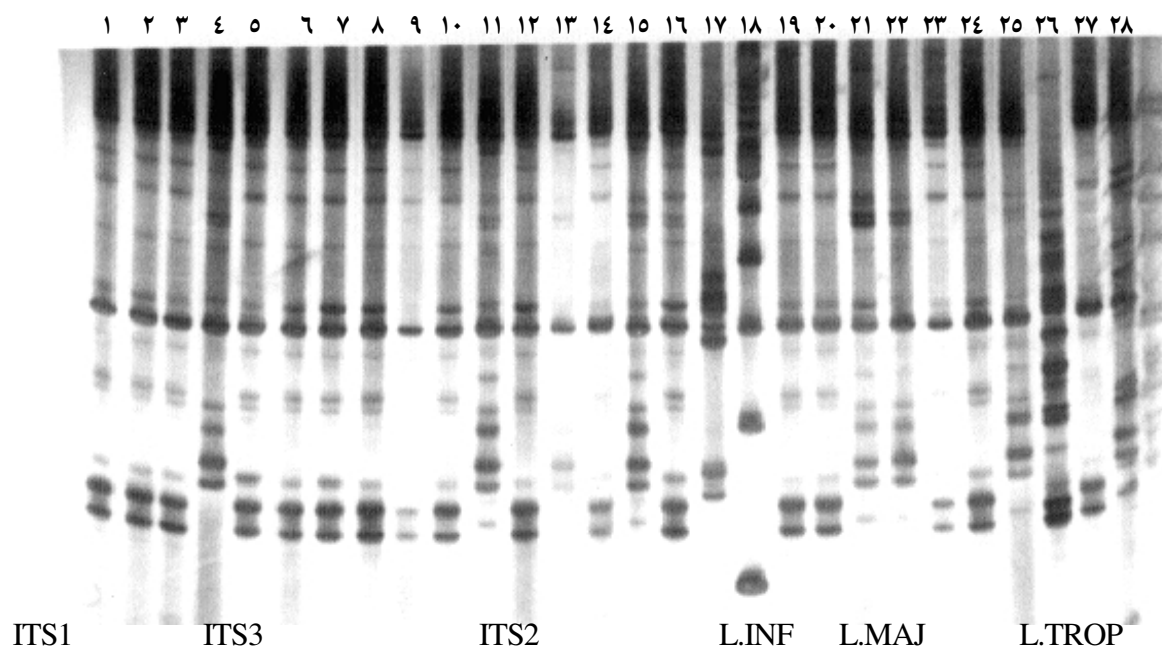
محصولات حاصل از تکثیر ناحیه ME ITS، به‌ترتیب یک باند را در محدوده‌های ۱٫۱ کیلو باز و ۴۰۰ جفت باز نشان داد.

پروفایل هضم آنزیمی ناحیه ME در ایزوله‌های مورد بررسی دوسویه متفاوت ME1 و ME2 را نشان داد (شکل ۱). در بین ایزوله‌های مورد بررسی از ناحیه مرکزی ایران شامل ایزوله‌های مربوط به استان اصفهان هر دو سویه ME1 و ME2 دیده شد. در حالیکه در ایزوله‌های مربوط به جنوب و جنوب غربی فقط سویه ME1 و در نمونه‌های شمال شرق ایران سویه ME2 مشاهده گردید. بر اساس نتایج هضم آنزیمی ناحیه ITS سه سویه متفاوت شناسایی گردید (شکل ۲).



شکل ۱. پروفایل هضم آنزیمی ناحیه مینی اگزون ایزوله‌ها با آنزیم *HaeIII*

شماره ۱ و ۱۲ مارکر ملکولی (به ترتیب ۱۰۰ bp و ۱kb)، شماره ۵ گونه استاندارد لیشمانیا اینفانتوم، شماره ۶ گونه استاندارد لیشمانیا ماژور، شماره ۱۱ گونه استاندارد لیشمانیا تروپیکا، شماره ۲ و ۳ و ۴ و ۱۰-۱۷ ایزوله‌های لیشمانیا ماژور مورد بررسی



شکل ۲. پروفایل هضم آنزیمی ناحیه بینابینی ریپوزومال RNA با آنزیم *TaqI*

شماره ۱۷ گونه استاندارد لیشمانیا اینفانتوم، شماره ۱۹ گونه استاندارد لیشمانیا ماژور، شماره ۲۶ پروفایل هضم آنزیمی گونه استاندارد لیشمانیا تروپیکا، شماره ۱۸ و ۲۸ مارکر ملکولی (به ترتیب ۱۰۰ bp و ۱kb)، سایر شماره‌ها پروفایل هضم آنزیمی ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور مورد بررسی

منطقه جنوب و جنوب غربی ۱۴ الل دیده شد (جدول ۲). هتروژنیسیته به طور محدود و در چهار مارکر از مارکرهای مورد مطالعه دیده شد. به استثنای دو مورد هتروژنیسیته، این پدیده خاص ایزوله‌های منطقه اندمیک شمال شرق بود (جدول ۱). در آنالیز پروفایل توالی‌های تکراری ۱۰ مارکر مایکروستلایت بر مبنای model-based method و distance-based methods ساختار جمعیت ایزوله‌ها سه خوشه را آشکار کرد. در خوشه اول دوازده ایزوله از ایزوله‌ها مورد بررسی قرار گرفت که ۸ ایزوله مربوط به ایزوله‌های جمع‌آوری شده از نواحی جنوب و جنوب غربی و سه ایزوله از ناحیه مرکزی و یک ایزوله از تهران بود. در خوشه دوم تنها ایزوله‌های مربوط به استان اصفهان قرار گرفت و در خوشه سوم ایزوله‌های مربوط به استان سمنان در شمال شرق دیده شد (شکل ۳).

دو سویه ITS1 و ITS2 در بین ایزوله‌های مورد مطالعه از ناحیه مرکزی دیده شد، در حالیکه در ایزوله‌های سایر نواحی مورد بررسی تنها یک سویه دیده شد. سویه آشکار شده در ایزوله‌های نواحی شمال کشور ITS3 بود. در ایزوله‌های مورد مطالعه از جنوب و جنوب غربی کشور نیز فقط سویه ITS1 دیده شد.

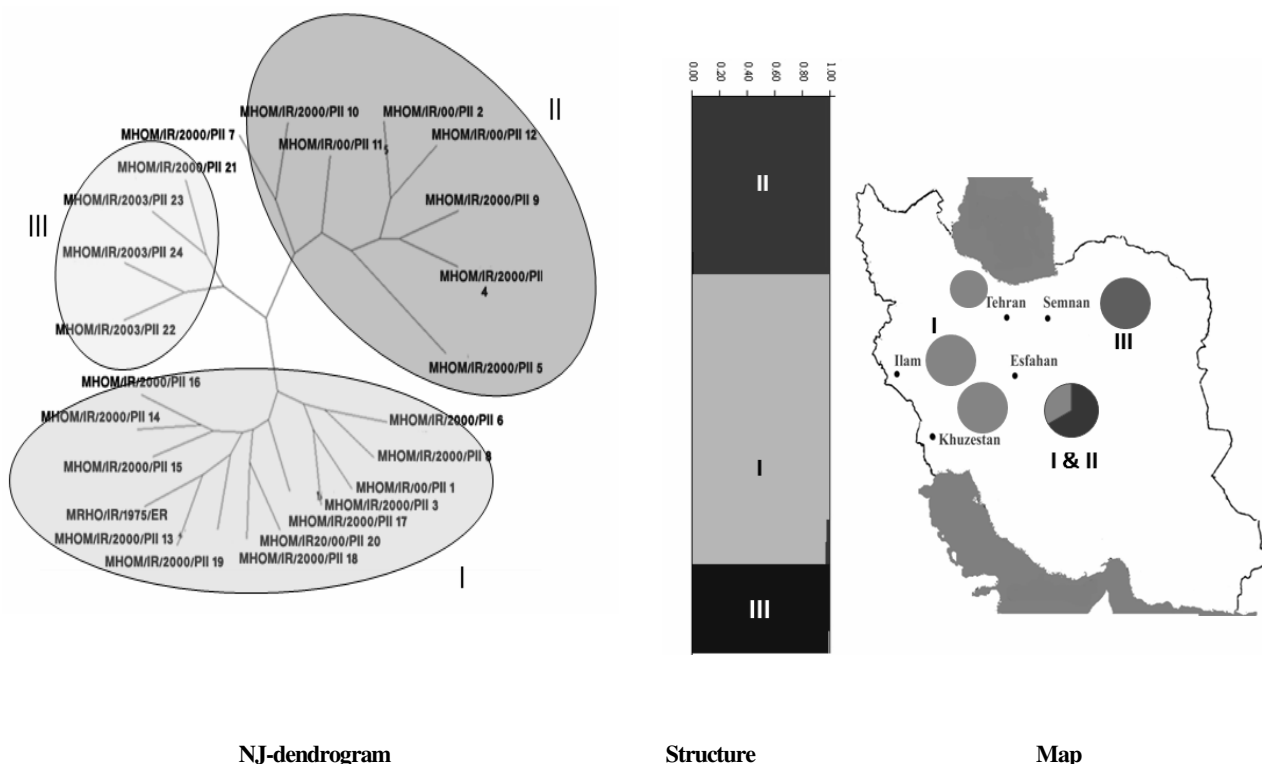
بررسی محصولات تکثیر نواحی حاوی توالی‌های مایکروستلایت نشانگر پلیمریسم در نه توالی از ۱۰ توالی مورد استفاده بود. بیشترین مارکرهای پلیمریک، مارکرهای 1CA، 28AT و 45GTG بودند (جدول ۱). تعداد الل‌های مشاهده شده در محصولات حاصل از مارکرهای مایکروستلایت مورد بررسی یک تا پنج الل بود. در مجموع بیشترین الل‌ها مربوط به ایزوله‌های جمع‌آوری شده در منطقه مرکزی ایران شامل استان اصفهان بود در حالی که در ایزوله‌های مورد مطالعه از نواحی شمال پانزده الل و در

جدول ۱. تعداد الل‌های برای مارکرهای مایکروستلایت مورد استفاده در ارزیابی ایزوله‌های لیسمانیا ماژور از مناطق اندمیک لیسمانیوز در ایران

| مارکرها | تعداد تکرار مارکر | تعداد الل‌ها در اصفهان | تعداد الل‌ها در خوزستان ایلام | تعداد الل‌ها در سمنان | جمع |
|---------|-------------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----|
| ۴GTG | ۶-۷ | ۲ | ۱ | ۲ | ۲ |
| ۲۷GTG | ۹-۱۱ | ۲ | ۱ | ۲ | ۳ |
| ۳۶GTG | ۶-۱۴ | ۳ | ۱ | ۲ | ۳ |
| ۳۹GTG | ۲-۱۲ | ۲ | ۱ | ۲ | ۲ |
| ۴۵GTG | ۴-۱۳ | ۳ | ۳ | ۱ | ۵ |
| ۱GC | ۷-۸ | ۱ | ۱ | ۱ | ۲ |
| ۲۸AT | ۸-۱۷ | ۲ | ۳ | ۱ | ۵ |
| ۷۱AT | ۱۲-۱۵ | ۳ | ۱ | ۲ | ۳ |
| GACA | ۶ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| ۱CA | ۴-۱۹ | ۳ | ۳ | ۱ | ۴ |

جدول ۲. تعداد ال‌های مارکرهای مایکروستلازیت مورد استفاده در ارزیابی اینزوله‌های لیسمانیا ماژور از مناطق اندمیک لیسمانیاوز در ایران

| مارکرهای Microsatellite | | | | | | | | | | محل جدا شدن | کد WHO | رتبه |
|-------------------------|-------|-------|------|-----|-------|-------|-------|-------|------|-------------|-----------------------|------|
| ۱ca | ۱gaca | ۷۱at | ۲۸at | ۱gc | ۴۵gtg | ۳۶Gtg | ۳۶gtg | ۲۷gtg | ۴gtg | | | |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۷ | ۸ | ۸ | ۱۲ | ۱۴ | ۱۰ | ۶ | اصفهان | MHOM/IR2000/PII 1 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۷ | ۸ | ۸ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | تهران | MHOM/IR2000/PII 3 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۷ | ۸ | ۱۲ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 6 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۷ | ۸ | ۱۳ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 8 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۶ | ۸ | — | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | خوزستان | MHOM/IR/2000/PII 13 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۶ | ۸ | ۱۳ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | خوزستان | MHOM/IR/2000/PII 14 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۶ | ۸ | ۱۳ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | خوزستان | MHOM/IR/2000/PII 15 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۷ | ۸ | ۱۳ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | ایلام | MHOM/IR/2000/PII 16 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۳ | ۸ | ۸ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | خوزستان | MHOM/IR/2000/PII 17 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۶ | ۸ | ۸ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | خوزستان | MHOM/IR/2000/PII 18 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۶ | ۸ | ۹ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | خوزستان | MHOM/IR/2000/PII 19 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | ۱۶ | ۸ | ۸ | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | ایلام | MHOM/IR/2000/PII20 | ۱ |
| ۱۷ | ۶ | ۱۲ | — | ۸ | — | ۱۲ | ۶ | ۱۰ | ۶ | اصفهان | MRHO/IR/1975/ER | ۱ |
| ۱۹ | ۶ | ۱۳ | ۸ | ۸ | ۸ | ۲ | ۱۴ | ۱۱ | ۷ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 2 | ۱ |
| ۱۹ | ۶ | ۱۳ | ۸ | ۸ | ۱۲ | ۲ | ۱۴ | ۱۱ | ۷ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 4 | ۱ |
| ۱۸ | ۶ | ۱۳ | ۸ | ۸ | ۱۲,۱۳ | ۲ | ۷ | ۱۱ | ۷ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 5 | II |
| ۱۸ | ۶ | ۱۳,۱۵ | ۸ | ۸ | ۱۲ | ۲ | ۷ | ۱۰ | ۷ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 7 | II |
| ۱۹ | ۶ | ۱۳ | ۸ | ۸ | ۱۳ | ۲ | ۱۴ | ۱۱ | ۷ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 9 | II |
| ۱۸ | ۶ | ۱۳ | ۸ | ۸ | ۱۲ | ۲ | ۷ | ۱۰ | ۷ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 10 | II |
| — | ۶ | ۱۳ | ۸ | ۸ | ۱۲ | ۲ | ۷ | ۱۱ | ۷ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 11 | II |
| ۱۹ | ۶ | ۱۳ | ۸ | ۸ | ۸ | ۲ | ۱۴ | ۱۱ | ۷ | اصفهان | MHOM/IR/2000/PII 12 | II |
| ۱۴ | ۶ | ۱۵ | ۹ | ۷ | ۴ | ۱۲ | ۶ | ۹,۱۰ | ۶,۷ | سمنان | MHOM/IR/2000/PII 21 | II |
| ۱۴ | ۶ | ۱۳ | ۹ | ۷ | ۴ | ۲ | ۹ | ۹ | ۷ | سمنان | MHOM/IR/2003/PII22 | II |
| ۱۴ | ۶ | ۱۳,۱۵ | ۹ | ۷ | ۴ | ۲ | ۶ | ۹,۱۰ | ۶,۷ | سمنان | MHOM/IR/2003/PII23 | III |
| ۱۴ | ۶ | ۱۳ | ۹ | ۷ | ۴ | ۱۲ | ۶ | ۹ | ۷ | سمنان | MHOM/IR/2003/PII 24 | III |
| ۴ | ۱ | ۳ | ۵ | ۲ | ۵ | ۲ | ۳ | ۳ | ۲ | | No. Alleles | III |
| ۱۴ | ۷ | ۱۳ | ۹ | ۷ | ۱۲ | ۹ | ۹ | ۹ | ۷ | چریکو | MHOM/IL/1980/Friedlin | III |



شکل ۳. نحوه توزیع استرین‌های مختلف لیشمانیا ماژور در مناطق مختلف ایران

بحث

آنزیمی ناحیه مینی‌اگزون استرین ناحیه شمال شرق کشور مجزا نبود، در حالیکه با روش هضم آنزیمی نواحی بینابینی قابل نسخه‌برداری سویه متفاوت در این ناحیه مشخص شد. در کل نتایج حاصل از آنالیز هضم آنزیمی دو ناحیه مختلف با هم هم‌خوانی داشت و نشان‌دهنده ارتباط سویه‌های متفاوت با محل جغرافیایی جداسازی ایزوله‌ها بود. آنالیز محصولات بسط داده شده توسط مارکرهای میکروستلایت در مقایسه با روش RFLP نشانگر هتروژنیسیته بیشتر بود و در کل در این روش ۲۱ ژنوتیپ مختلف در بین نمونه‌های مورد بررسی آشکار شد. در آنالیز الگوی توالی‌های تکراری ۱۰ مارکر میکروستلایت بر مبنای model-based method و distance-based methods ساختار جمعیت ایزوله‌ها سه خوشه را آشکار کرد. قابلیت بالای آنالیز با مارکرهای میکروستلایت در جداسازی سویه‌های مختلف یک گونه در نتایج مطالعات سایر محققین گزارش شده است. نتایج

در سال‌های اخیر روش‌های ملکولی متعددی برای تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف لیشمانیا به کار گرفته شده است. مطالعات در زمینه گونه لیشمانیا ماژور با وجود پراکندگی وسیع جغرافیایی این گونه در نقاط مختلف دنیا و وجود میزبان‌ها و ناقلین متعدد، مؤید پلیمریسم نسبتاً کمی می‌باشد (۱۸،۲۲). در این مطالعه با به‌کارگیری روش‌های مولکولی مختلف PCR-RFLP و Microsatellite typing به بررسی تنوع ژنتیکی در ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور در ایران پرداختیم. نتایج حاصل از این بررسی با به‌کارگیری روش‌های ITS-RFLP، ME-RFLP به ترتیب دو و سه سویه مختلف را در بین نمونه‌های مورد بررسی نشان داد، به‌طوری‌که یک سویه در ایزوله‌های مورد مطالعه از مناطق غرب، جنوب غرب کشور و دو سویه از نمونه‌های نواحی مرکزی ایران مشاهده شد. بر اساس یافته آنالیز هضم

در این آنالیز عمدتاً با محل جغرافیای ایزوله‌ها مرتبط بودند. این یافته در بررسی‌های سایر محققین در ایزوله‌های گونه لیشمانیا که نشانگر ارتباط توزیع جغرافیایی ایزوله‌ها با استرین‌های گوناگون گونه لیشمانیا ماژور است، هم‌خوانی دارد (۱۷، ۱۸، ۲۶). در راستای نتایج حاصل از مطالعه ما در ارتباط با وجود سه شاخه مجزا، بررسی همارشه و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی پشه *P. papatasi* از مناطق مختلف ایران نیز سه دسته مختلف را در بین نمونه‌های مورد بررسی گزارش کرده است (۲۴)، به‌طوری که پشه‌های مناطق استان خوزستان در زیر جمعیت A3 و پشه‌های منطقه اصفهان در زیر جمعیت A2 و پشه‌های استان خراسان که استان دامغان از استان‌های هم‌جوار آن است، می‌باشد در زیر جمعیت B2 قرار می‌گیرد. لذا به‌نظر می‌رسد ساختار جمعیت ناقل وانگل در ایران با یکدیگر هم‌خوانی دارد.

در مطالعات آتی جهت ارزیابی جامع‌تر در ارتباط با پلیمرفیسم ایزوله‌های گونه لیشمانیا در ایران موارد زیر پیشنهاد می‌گردد:

۱. بررسی ایزوله‌های گونه لیشمانیا از سایر مناطق لیشمانیوز جلدی از جمله استان کرمان
۲. مطالعه نمونه‌های بیشتر از مناطق مورد مطالعه در این تحقیق
۳. بررسی ارتباط احتمالی تابلوی بالینی بیماری و استرین‌های موجود در نواحی مختلف

نتیجه‌گیری

در مجموع کلیه روش‌های به کار گرفته شده در این بررسی قابلیت اشکار نمودن پلیمرفیسم در ایزوله‌های گونه لیشمانیا ماژور را دارد، اگرچه به‌نظر می‌رسد آنالیز بر اساس مارکرهای مایکروستلایت در مطالعات اپیدمیولوژیک و ژنتیک جمعیت مناسب‌تر است.

مطالعه الجوابرا و همکاران بر روی ۱۰۶ ایزوله لیشمانیا ماژور از نقاط مختلف اندمیک بر اساس روش MLMT سه ساختار جمعیتی را در ایزوله‌های لیشمانیا ماژور مورد بررسی از آسیای مرکزی، خاورمیانه و افریقا نشان داد که با مبدأ جغرافیایی ایزوله‌ها مرتبط بود (۱۸). در یک بررسی در سال ۲۰۰۶ بر روی ایزوله‌های لیشمانیا تروپیکا از مناطق آسیا و افریقا با استفاده از روش مایکروستلایت ۱۰ خوشه مجزا شناسایی شده و نتایج حاصل از تحقیق مذکور نیز ارتباط بین خوشه و محل جغرافیایی ایزوله‌ها را نشان می‌داد (۱۷). نتایج یک بررسی در سال ۲۰۱۰ با استفاده از مارکرهای مایکروستلایت نشان داد علاوه بر اینکه با این روش می‌توان پلیمرفیسم در ایزوله‌های گونه لیشمانیا اینفاتوم را مشخص نمود با به‌کارگیری این روش می‌توان ژنوتیپ‌های مختلف یک زیمودم را مشخص کرد (۲۳). نتایج بررسی همارشه (Hamarsheh) و همکاران در سال ۲۰۰۹ روش MLMT را به‌عنوان یک روش مناسب برای مطالعه آنالیز جمعیت پشه خاکی *P. papatasi* در نقاط مختلف می‌داند. نتایج بررسی با مارکرهای مایکروستلایت ارتباط جغرافیایی ایزوله‌های مختلف از پشه خاکی را با محل جداسازی نیز نشان داد (۲۴، ۲۵). در این بررسی میان خوشه‌های I، II شناسایی شده در آنالیز با مارکرهای مایکروستلایت هم‌پوشانی دیده شد که این یافته با نتایج آنالیز PCR-RFLP در این مطالعه و نتایج حاصل از به‌کارگیری روش ITS-SSCP در بررسی قبلی مطابقت داشت (۱۵). وجود سویه‌های مشترک در دو منطقه جغرافیایی مجزا می‌تواند به‌علت مهاجرت افراد آلوده یا مخزن بین دو منطقه اندمیک قابل توجه باشد. در خوشه یک هتروژنیسیته بیشتری در مقایسه با سایر خوشه‌ها مشاهده گردید. قدیمی بودن کانون اصفهان می‌تواند توجه هتروژنیسیته در این خوشه باشد. خوشه‌های شناسایی شده

References

1. WHO Expert Committee. Epidemiological aspects. In: Control of the leishmaniasis. Technical Report. Series 793. Geneva: *World Health Organisation* 1990; 41-6.
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. Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Jalalizand AR, Piazak N. Bionomics of *Phelebotomus papatasi* in an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *J Vector Ecol* 2005; 30(1): 115-8.
4. Akuffo H, Schurr E, Andersson G, Yamaneberhan T, Britton S. Responsiveness in diffuse versus local cutaneous leishmaniasis is due to parasite differences. *Scand J Immunol* 1987; 26(6): 717-21.
5. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann parasitol Hum Comp* 1990; 65(3): 111-25.
6. Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Prebser W, Schonion G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2): 495-503.
7. Schwenkenbecher JM, Fröhlich C, Gehre F, Schnur LF, Schönian G. Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Infect Genet Evol* 2004; 4(2): 99-105.
8. Botilde Y, Laurent T, Tintaya WG, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, Kuhls K, Schönian G, and Dujardin JC. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum* Infection. *Genetics and Evolution* 2006; 6(6): 440-6.
9. 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.
10. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig H.D, Prebser W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47(1): 349-58.
11. Cortes S, Mauricio I, Almedia A, Cristovao JM, Pralong F, Dedet JP, et al. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitol Int* 2006; 55(4): 277-83.
12. Mauricio IL, Stothard JR Miles MA. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. *Parasitology* 2004; 128(pt3): 263-7.
13. Oddone R, Schweynoch C, Schönian G, de Sousa Cdos S, Cupolillo E, Espinosa D, et al. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania (Viannia)* species. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9): 2818-25.
14. el Tai NO, Osman O F, El Fari M, Prebser W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-

- strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94(5): 575-9.
15. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio IL, 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 Trop* 2006; 98(1): 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 Microbiol* 2002; 40(9): 3391-7.
 17. 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.
 18. Al-Jawabreh A., Diezmann S, Muller M, Wirth T, Schnur L.F, Strelkova M.V, et al. Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania (Leishmania) major* by microsatellite analysis. *BMC Evol Biol* 2008; 8(1): 183.
 19. Tashakori M, Ajdari S, Kariminia A, Mahboudi F, Alimohammadian MH. Characterization of *Leishmania* species and *L. major* strains in different endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Iran. *Iran Biomed J* 2003; 7: 43-50.
 20. Cupollilo E, Grimaldi G, Momen H, Beverley S M. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73(1-2): 145-55.
 21. 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 mini-exon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3147-53.
 22. Pratlong F, Dereure J, Ravel C, Lami P, Balard Y, Serres G, et al. Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop Med Int Health* 2009; 14(9): 1071-85.
 23. Reale S, Lupo T, Migliazzo A, Di Mauro C, Cipri V, Calderone S, Manna L, Vitale F. Multilocus microsatellite polymorphism analysis to characterize *Leishmania infantum* strains isolated in Sicily. *Transbound Emerg Dis* 2010; 57(1-2): 37-41.
 24. Hamarsheh O, Presber W, Yaghoobi-Ershadi MR, Amro A, Al-jawabreh A, Sawalha S, et al. Population structure and geographical subdivision of the *Leishmania major* vector *Phlebotomus papatasi* as revealed by microsatellite variation. *Med Vet Entomol* 2009; 23(1): 69-77.
 25. Hamarsheh O. Distribution of *Leishmania major* zymodemes in relation to populations of *Phlebotomus papatasi* sand flies. *Parasit Vectors* 2011; 4: 9.
 26. Elfari M, Schnur L.F, Strelkova MV, Eisenberger CL, Jakobson RL, Greenblat CL, et al. Genetic and biological diversity among populations of *Leishmania major* from Central Asia, the Middle East and Africa. *Microbes Infect* 2005; 7(1): 93-103.

Genetic Heterogeneity among *Leishmania major* Isolates in Iran Determined by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Multilocus Microsatellite Typing (MLMT)

Tashakori M., Ph.D.^{1*}, Al Jawabreh A., Ph.D.², Jafarpour P., M.Sc.³, Ali Mohammadian MH., Ph.D.⁴, Khalili Gh., M.Sc.⁵

1. Assistant Professor, Dept. of Laboratory Sciences, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
2. Medical Molecular Parasitologist, Leishmaniasis Research Unit, Jericho, Palestine
3. Instructor, Nursing and Midwifery College, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
4. Professor of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
5. Instructor of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: m_tashakori44@yahoo.com

(Received: 26 Dec. 2010 Accepted: 16 June 2011)

Abstract

Background & Aims: In recent years, molecular methods for characterizing genetic heterogeneity have found a major place in modern approaches. In this study, two different molecular techniques including Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Multi Locus microsatellite typing (MLMT) were carried out in order to evaluate genetic heterogeneity among isolates of *Leishmania major* in Iran.

Methods: In this experimental study, 24 *L. major* isolates from different endemic foci of cutaneous leishmaniasis were evaluated. All samples were amplified by specific primers for Internal Transcribed Spacer ribosomal RNA (ITS_rRNA) and miniexon genes (ME). Ten different microsatellite markers were applied to 24 collected isolates as well. Restriction fragment length polymorphism of Polymerase chain reaction of ITS-rRNA and ME regions was identified in polyacrylamide gel electrophoresis. Size polymorphisms in PCR products of microsatellites markers were measured in the CEQ 8000 automated genetic analysis system. Population structure of the isolates was investigated by Structure Version 2.3.2 software.

Results: According to ITS- RFLP and ME-RFLP techniques, three and two different strains of *L. major* were determined, respectively, while microsatellites markers revealed 21 different genotypes, which were clustered in three genetic groups using structure software.

Conclusion: Although genetic heterogeneity among studied *L. major* isolates was identified by molecular tools as used in this study, it seems that microsatellites markers are more useful in population structure and epidemiological studies. Our findings also showed correlation between different identified strains and their geographical regions.

Keywords: *Leishmania major*, Genetic heterogeneity, Iran, PCR-RFLP, MLMT