مقاله پژوهشی
مجاهد دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره هفتم، شماره اول، بهار 1387، 20-31
بررسی پلی مورفیسم در ایزوله‌های گونه لیشمیا ماژور تهیه شده در مناطق اندمیک لیشمیا
بوستی ایران با استفاده از مار کریات ماکروستالیت
دکتر مهدی شکری‌یار، دکتر عارف جاویار، دکتر محمدحسین علی‌محمدیان، دکتر ایرج شریفی، دکتر محسن
رضاییان، دکتر فاطمه محسنی مقیم

چکیده
زمینه و هدف: اگر لیشمیا ماژور پیکر از عوامل اتیولوژیک لیشمیاپوز جدی در مناطق مختلف ایران است. امروره تکنیک‌های مختلف مکملی با استفاده از توالی‌های پلیمر فیزیک DNA به طور گسترده در بررسی هتروژنیسیتی عوامل اتیولوژیک است (MLMT) Multilocus Microsatellite Typing لیشمیاپوز با کار می‌رود. یکی از تکنیک‌های جدید در این زمینه روش که در سال‌های اخیر مورد توجه حسین قرار گرفته است. این مطالعه از این روش به منظور بررسی پلی مورفیسم در گونه لیشمیا ماژور (نام لیشمیاپوز نوع روستاپی) در ایران استفاده شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی تعداد 24 ایزوله اگر لیشمیا ماژور جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به لیشمیاپوز بوستی در مناطق مختلف اندمیک لیشمیاپوز بوستی نوع روستاپی در ایران (استان‌های شمالی، مرکزی، غرب و جنوب غربی ایران) برای اولین بار توسط روش MLMT مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهش با استفاده از هدف جست‌جو برای قرار گرفته است. مار کریات ماکروستالیت بست داده شد و به منظور بررسی پلی مورفیسم محصولات واکنش بر روی زل پلی آریل‌اکسید مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در محصولات حاصل از Polymerase Chain Reaction (PCR) با استفاده از شش جفت پرایمر مورد بررسی، پلی مورفیسم دیده شد و تمام مورفیک‌نتا در محصولات بست داده شده توسط یک پرایمر مشاهده گردید. در کل هفت زننوتیپ مختلف در بین نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد. بر اساس نتایج این تحقیق زننوتیپ‌های مختلف در بین انواع‌های گونه لیشمیا ماژور در نواحی اندمیک اصفهان، تهران و سمنان شناسایی شد. در نهایی که بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق اندمیک ایلام و خوزستان هم‌زمینی دیده شد و نه یک زننوتیپ مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در مجمع دیگر این مطالعه با استفاده از تکنیک MLMT هفت زننوتیپ مختلف در بین ایزوله‌های گونه لیشمیا ماژور در نواحی اندمیک لیشمیاپوز نوع روستاپی در ایران مشاهده شد. در نهایت نتایج این تحقیق در ارزیابی هتروژنیسیتی در گونه لیشمیا ماژور است.

واژه‌های کلیدی: ماکروستالیت تایپینگ، لیشمیا ماژور، پلی مورفیسم

1- نویسنده مسئول: استادیار گروه آموزشی علوم آموزشی‌ها، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
m_tashakori44@yahoo.com
تلفن: 021-88920181، 0912-3820181
فکس: 021-88920381
پست الکترونیکی: m_tashakori44@yahoo.com
2- استادیار آموزشی پزشکی اصلاح، انجمن جهانی اصلاح، چرگیلو، فلسطین
3- استادیار گروه آموزشی امکان‌پذیری، استادیار پستدان ایران
4- استادیار گروه آموزشی امکان‌پذیری، مرکز تحقیقات لیشمیاپوز، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
5- دانشیار گروه آموزشی پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
6- مربی و عضو هیئت علمی گروه آموزشی علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
لیشمانیوز پوستی با طیف وسیع بیولوژیکی توسط گونه‌های مختلف انگلیس لیشمانیا از خانواده تربی سلولاریکه Trypanosomatidea جدی بهداشتی در کشورهای مختلف جهان در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرم‌سیری به شمار می‌آید و در کشور ایران نیز شایع است [1]. لیشمانیوز پوستی در ایران به دو صورت اپیدمیولوژیکی لیشمانیوز پوستی نوع رستناکی با زنونتیک و لیشمانیوز پوستی Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Anthroponotic Cutaneous نوع شهروی یا آنتروپونوتیک Leishmaniasis مازور عامل اپیدمیولوژیک لیشمانیوز پوستی مرطوب یا نوع روستایی در ایران است. این نوع از بیماری در نواحی مختلف ایران از جمله نواحی زیر باید به‌شمار رسانده شود: 

الف: نواحی مرکزی ایران شامل استان‌های اصفهان [3] و زیر ب: نواحی شمال و شمال شرقی ایران شامل استان‌های سمنان و خراسان [5-7].

c: نواحی غرب و جنوب غربی شامل استان‌های ایلام و خوزستان [6].

d: نواحی جنوب ایران شامل استان‌های فارس و هرمزگان و بوشهر [8-10].

لیشمانیوز شهروی که عامل آن لیشمانیا تروبیکا است از شهرهای بزرگ و کوچک مانند کرمان، بوم، مشهد، نیشابور و سبزوار گزارش شده است [11-12]. مطالعات محققین با استفاده از تکنیک‌های مختلف سرولوژی بیوشیمیایی و مولکولی بر روی جنس لیشمانیا نشان‌دهنده پلی‌مرفیم و وجود سوره‌های متداول در گونه‌های مختلف این انگل است [13-14]. در حال حاضر تکنیک استاندارد برای تشخیص گونه و سوره‌های مختلف انگل لیشمانیا مورسی بررسی اپیدمیولوژیکی است [15]. ولی این روش که مدت نسبتاً سخت، پر‌زمان و وقت‌گیر است و ضمانت در بعضی موارد قابلیت کالی جهت شناسایی پلی‌مرفیم در گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا را ندارد. لذا امروزه اپیدمیولوژی و سیستم در روش‌های مولکولی این دسته‌ای روش‌های مکملی به‌عنوان روش‌های مکملی به‌عنوان
لیشمانیوز پوستی از مناطق مختلف اندمیک لیشمانیوز پوستی
روستایی جمع‌آوری شدند.

بحث

جدول 1- نوسان‌های لیسیشن‌ها مورد استفاده در این مطالعه، کارکن مشاهده شدند در هر لکوس ترتیب اندازه‌گیری از نظر تکه‌کاری کد مشخص شد. است. برگردان علی، حرف A ناپاسخ داده شد است.

<table>
<thead>
<tr>
<th>گروه GTG 1</th>
<th>CA 1</th>
<th>GACA 1</th>
<th>GC 1</th>
<th>GTG 2</th>
<th>GTG 3</th>
<th>زننده</th>
<th>محل جمع‌آوری</th>
<th>کد بین المللی</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 1</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>Lm II</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 2</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 3</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>Lm II</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 4</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>Lm III</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 5</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm IV</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 6</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 7</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>Lm II</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 8</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>Lm II</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 9</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>Lm IV</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 10</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>Lm II</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 11</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>Lm II</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 12</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 13</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 14</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 15</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 16</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 17</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 18</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 19</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm I</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 20</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>D</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A/B*</td>
<td>Lm V</td>
<td>سمنان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 21</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>D</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>A/B*</td>
<td>Lm VI</td>
<td>سمنان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 22</td>
</tr>
<tr>
<td>B</td>
<td>D</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td><em>C/B</em></td>
<td>A/B*</td>
<td>Lm VII</td>
<td>سمنان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 23</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>D</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>Lm VI</td>
<td>سمنان</td>
<td>MHOM/IR/00/PII 24</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>C</td>
<td>A</td>
<td>A</td>
<td>B</td>
<td>B</td>
<td>Lm VIII</td>
<td>اصفهان</td>
<td>MRHO/IR/76/ER</td>
</tr>
</tbody>
</table>

*(B/C) و آ/ب از ترتیب جمع‌آوری دیگر گروه A/B و C است.
برای تهیه DNA زنومیک از فرم پروپرامتیگو انگل کشت

شده در محیط مايع RMDI استفاده شد و مورد
نظر توسط تکنیک فل نکلر و استحکام در آب مقطع حلال
گردد. [16]

سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. از
استاندارد لیشمانی مازور (MRHO/IR/76/ER) استفاده
گرفته شده از

دکتر جواد باهنر (دانشکده پزشکی دانشگاه تهران) در طول
مطالعه استفاده شد.

واکنش

PCR

زنومیک از DNA موجود بر پرسی توسط هفت جفت

برای اخضاع برای توالی های ماکروستیات که جریان

PCR آن در جدول ۲ مشاهده می شود بسط داده شد. مخلوط

جدول ۲ - ماکروستیات مواد استفاده در مطالعه

<table>
<thead>
<tr>
<th>دوره</th>
<th>شماره</th>
<th>بال</th>
<th>تعداد</th>
<th>مارکر</th>
<th>زنومیک از DNA موجود بر پرسی</th>
<th>تعداد</th>
<th>مارکر</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>۵۸</td>
<td>۳۵</td>
<td>F CGGT T GCGG T GAAAGGC CG</td>
<td>۴ GTG</td>
<td>۵۸</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
<td>۵۸</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
</tr>
<tr>
<td>۵۷</td>
<td>۳۲</td>
<td>F GGAGGG CTGGT GGGT TTTG</td>
<td>۷ GTG</td>
<td>۵۷</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
<td>۵۷</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
</tr>
<tr>
<td>۵۶</td>
<td>۳۱</td>
<td>F GTCGCAACGACACCACACA</td>
<td>۱ GC</td>
<td>۵۶</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
<td>۵۶</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
</tr>
<tr>
<td>۵۵</td>
<td>۳۰</td>
<td>F CTCTGCAAGGT TGGT TCTT</td>
<td>۱ AT</td>
<td>۵۵</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
<td>۵۵</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
</tr>
<tr>
<td>۵۴</td>
<td>۲۹</td>
<td>F GaAAGGGCAAGGACGGGAT</td>
<td>۱ GAGA</td>
<td>۵۴</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
<td>۵۴</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
</tr>
<tr>
<td>۵۳</td>
<td>۲۸</td>
<td>F TTAGG T CACATACCCCG</td>
<td>۱ CA</td>
<td>۵۳</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
<td>۵۳</td>
<td>درجه سانتی گراد</td>
</tr>
</tbody>
</table>

روی تابع ۲ با بافر TBE ظرف ۴۸ ساعت و ولتاژ ۸۰ ولت و ولتاژ ۸۰ ظرف کتروفورور

در مرحله آخر برای گسترش نهایی (Final extension)

مخلوط PCR در جدول ۲ درجه به مدت ۶ دقیقه قرار گرفت.

جهت اطمینان از وجود محصول واکنش، ابتدا حاصل بر

PCR توسط تکنیک فل نکلر و استحکام در آب مقطع حلال

گردد و پس از رنگ آمیزی با ایندیکور برپا می شود (میلی گرم

در میلی لیتر) در زیر ترکس لومیناتور مواد برپا قرار گرفت.
نتایج

محصولات بسط داده شده توسط کلپ هفت گفت پراپرم

مورد استفاده در این مطالعه در محصولات واکنش بسط داده شده توسط پلی‌مورفیسم در محصولات واکنش بسط داده شده توسط دیده شد. به طوری که تنها محصولات واکنش با پراپرم PCR مثبت هستند.

\[
\text{شکل 1-1: محصولات واکنش کمی از نمونه‌های مورد مطالعه توسط پراپرم AT (714T).}
\]

A: آل بزرگ‌کن
B: آل کوچک‌کن

دوره ۱۳۸۷، شماره ١، سال ١
در کل تعداد 7 زنوتیپ در بین 34 نمونه مورد مطالعه دیده شد. زنوتیپ‌های LmV نا LmV مارک‌های ایران و زنوتیپ‌های LmV نیز به طور انحصاری در منطقه اندمیک استان سمنان مشاهده گردید. در حالی که زنوتیپ LmI به طور مشترک در منطقه مرکزی ایران با مناطق غربی و جنوب غربی ایران دیده شد.

بحث

در صفحه آخر روش‌های مولکولی متنوع برای تعبیه سویه‌های مختلف انجام لیشمانی های نوسان مورد استفاده قرار گرفته است. در این مطالعه از مارک‌های ماکروستلاتی لیشمانیا تروپیکا و Tashakori ماکروستلاتی نشان دادند [23]. مطالعه و Leishmania major نشان داد [15].

ب- بر اساس نتایج این تحقیق 6 زنوتیپ مختلف در بین نمونه‌های مورد بررسی دیده شد که این نتیجه در راستای گزارش‌های مختلف قابل می‌باشد. مطالعات و Le Blancq گزارش‌های مختلف قابلیت می‌باشد. این آزمایش‌ها نشان داد [23].

الف- نتایج این بررسی توانایی مارک‌های ماکروستلاتی را در بررسی پلی‌مورفیسم در گونه لیشمانیا ماژور اشکار کرد. گزارشات محققین قبلی نیز دلایل بر توانایی این روش در تایپینگ گونه‌های مختلف لیشمانیا دارد به طوری که هر گزارشات محققین با استفاده از مارک‌های Ochsenreither

در اینجا مراجع مقاله، مقاله دانشگاه علوم پرورشی رفسنجان
در ارتباط با نوع از ریزولیهای لیشمانیا مازور در ایران بر اساس اطلاعات ویسندگان سه گزارش وجود دارد که هر سه مطالعه دلایلی به وجود تعداد نسبی از ریزولیهای این گونه دارد، حامی و همکاران و تشکری و همکاران با به کارگیری بررسی اپیزودیزمها و ۲ سویه مختلف لیشمانیا مازور را در بین نمونه‌های مورد مطالعه خود گزارش نمودند [۱۱، ۱۲]. در بررسی قبیل ۵ سویه مختلف در از ریزولیهای لیشمانیا مازور با به کارگیری تکنیک ITS-SSCP گزارش شده است [۱۵].

اگرچه بر اساس نتایج بررسی حاضر یلی، مورسی و سویه‌های بیشتری در این گونه مشاهده شد ولی نتایج با گزارش قبیل ما هم‌خوانی داشت به طوری که در این مطالعه از نقش مافیا تنومنی برای نسل‌های جمع‌آوری شده از نواحی مرکزی و شمالی هموزئیت در اپیزودیزم‌های این مورد بررسی اندمیک و جنوب غربی ایران دیده شد که این نتیجه در مطالعه قبیل ما نیز گزارش شده بود [۱۵]. مشاهده گزارش یک بیشتر در این مطالعه در مقایسه با مطالعه قبلی، با توجه به کارگیری مرکزی این بیشتر در این بررسی قابل توجه است.

- در این بررسی رسیدگی به تنها هموزئیت و هتروژئیت
- ۳ تعبیر بود که در نتایج مطالعات محققین مختلف در گونه‌های مختلف لیشمانیا نیز این پدیده

References


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


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

M. Tashakori PhD¹, A. Al-Jawabreh PhD², M.H. Alimohammadian PhD³, I. Sharifi PhD⁴, M. Rezaeian PhD⁵, F. Mohseni Moqhadam MD⁶

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

**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.