

The study of genetic polymorphism of *leishmania major* and *leishmania tropica* by PCR-RFLP technique in two hyper-endemic regions: Isfahan and Bam, Iran

Doudi M^{1*}, Eslami G², Setorki M³, Hejazi SH⁴

1. Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Department of Parasitology, Shahid-Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
3. Department of Biology, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, Iran
4. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received: 13 June 2010, Accepted: 8 Sep 2010

Abstract

Background: *Leishmania major* and *leishmania tropica* are the main causes of cutaneous leishmaniasis in Iran, especially in Isfahan and Bam regions. In this study, noticing the effect of diversity of this parasite strains on designing disease control strategies, human isolates were examined through PCR-RFLP to determine the type of strains.

Materials and Methods: In this experimental study, 340 samples obtained from CL patients due to *Leishmania* were cultured and prepared for microscopic study and examined through PCR-RFLP. The products of some of these samples were sequenced and analyzed. ITS1 region of genomic DNA was extracted and amplified with LITSr and L5.8s primers. Data on sequencing the samples were related to ITS1 region that in extracted DNAs with LITSr and L5.8s primers appeared with four kinds of genotype patterns, two for *L. major* and two for *L. tropica* in Isfahan and Bam regions.

Results: Genotypic groups, LmA and LmB, were detected from *L. major* isolates while LtA and LtB genotypic groups were indicated for *L. tropica* in these two regions. The most prevalent genotypes related to isolates of Isfahan were LmA genotype, whereas LtA genotype was mostly reported in isolates of Bam.

Conclusion: *Leishmania major* and *leishmania tropica*, the causative agents of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) in Isfahan and anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) in Bam, respectively, are genetically polymorphic species. There exists a relationship between genetic heterogeneity and clinical manifestation and geographical regions of this disease in human.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, ITS1, PCR-RFLP, Polymorphism

*Corresponding author:

Address: Department of Microbiology, Islamic Azad University of Falavarjan, Isfahan, Iran
Email: Doudi@iaufala.ac.ir

بررسی پلی مورفیسم ژنتیکی لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا به کمک تکنیک در دو منطقه‌ی هایپر آندمیک اصفهان و بم-PCR – RFLP

منیر دودی^{1*}، کیلدا اسلامی²، محبوبه سترکی³، سیدحسین حجازی⁴

1- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران

2- استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

3- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه، ایذه، ایران

4- دانشیار، گروه فارچ و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: 89/3/23، تاریخ پذیرش: 89/6/17

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا عوامل اصلی به وجود آورنده لیشمانیوز جلدی در بخش‌های مختلف ایران بویژه دو منطقه اصفهان و بم می‌باشند. در این مطالعه به دلیل تأثیر تنوع سویه‌های انگل در طراحی استراتژی‌های کنترل بیماری، ایزوله‌های انسانی جهت تعیین نوع سویه با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از 340 گونه‌ی جدا شده از بیماران دارای زخم پوستی سالک ناشی از گونه‌های لیشمانیا کشت و لام میکروسکوپی تهیه شد و با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. محصول تعدادی از این نمونه‌ها سکانس شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اطلاعات حاصل از سکانس نمونه‌ها متعلق به محل ITS1 بوده که در DNA های استخراج شده، با دو پرایمر LITSr و L5.8S شده و 4 الگوی متفاوت ژنوتایپ، دو الگو برای لیشمانیا ماژور و دو الگو برای لیشمانیا تروپیکا را در دو منطقه اصفهان و بم نمایان نموده است.

یافته‌ها: دو گروه ژنوتایپی LmA و LmB در میان ایزوله‌های لیشمانیا ماژور و دو گروه ژنوتایپی LtA و LtB در میان ایزوله‌های لیشمانیا تروپیکا مشخص و در این دو منطقه گزارش شد. ژنوتایپ LmA در میان ایزوله‌های اصفهان و ژنوتایپ LtA عمدتاً در میان ایزوله‌های بم بیشترین فراوانی را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: لیشمانیا ماژور عامل اصلی بوجود آورنده لیشمانیوز جلدی مرطوب در اصفهان و لیشمانیا تروپیکا عامل اصلی بوجود آورنده لیشمانیوز جلدی خشک در بم از نظر ژنتیکی دو گونه‌ی پلی مورفیک هستند و احتمال دارد رابطه‌ای بین ناهمگنی ژنتیکی و بروز بالینی و منطقه جغرافیایی این بیماری در انسان وجود داشته باشد.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم، لیشمانیوز پوستی، PCR-RFLP، ITS1

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران

Email: Doudi@iaufala.ac.ir

مقدمه

لیشمانیوز یک بیماری با توزیع وسیع جهانی می باشد به طوری که در حال حاضر 350 میلیون نفر در 88 کشور جهان توسط این بیماری تهدید می شوند که عمده‌ی موارد به صورت اشکال جلدی بروز می یابد و شواهدی مبنی بر افزایش میزان بروز سالانه این بیماری وجود دارد (3-1). لیشمانیوز جلدی در ایران به دو شکل لیشمانیوز جلدی مرطوب، ناشی از لیشمانیا ماژور و لیشمانیوز جلدی خشک ناشی از لیشمانیا تروپیکا می باشد. کانون‌های هایپرآندمیک لیشمانیوز جلدی مرطوب در کشور ایران در استان‌های اصفهان، گلستان، خوزستان، ایلام، بوشهر و سمنان گزارش شده است، در حالی که لیشمانیوز جلدی خشک در بسیاری از شهرهای بزرگ از جمله تهران، شیراز، مشهد، کرمان (بم) به شکل آندمیک وجود دارد (4، 5). هر چند از نظر کلینیکی بین دو شکل بیماری تفاوت‌های واضحی وجود دارد ولی لیشمانیوز جلدی مرطوب و خشک علاوه بر شکل تپیک، موجب بروز طیف وسیعی از ضایعات می شود که از عفونت‌های بدون علامت تا ضایعات بسیار وسیع پوستی را شامل می گردد (1 و 6). تعیین مشخصات گونه‌ی لیشمانیا، برای تشخیص صحیح و پیشگیری از این بیماری، همچنین برای تصمیم‌گیری در مورد درمان و اعمال روش‌های کنترل بیماری بسیار حائز اهمیت است (9-7). در دهه‌های گذشته انگل‌های لیشمانیا به طور مستقیم از طریق بررسی مرفولوژی لام میکروسکوپی نمونه‌های بالینی، توزیع جغرافیایی ایزوله‌ها به خصوص در مناطق آندمیک، بیماری‌زایی برای میزبان و الگوی رشد در محیط کشت تعیین هويت و طبقه‌بندی می شدند. این روش‌ها فاقد دقت لازم بوده است، به عنوان مثال ممکن است چندین گونه‌ی لیشمانیا به طور هم زمان در یک منطقه موجود باشند (10). روش‌های مذکور با توجه به روش‌های مولکولی و سایر روش‌های دقیق، امروزه از اولویت خارج شده و در حال حاضر تحلیل ایزوآنزیم‌ها و استفاده از DNA انگل یک استاندارد طلایی برای متمایز کردن گونه‌های لیشمانیا محسوب می گردد (8). تعیین گونه‌ی لیشمانیا بر اساس علائم و نشانه‌های بالینی می تواند مشکل‌آفرین باشد، به عنوان مثال

لیشمانیوز جلدی، به دلیل اشکال بالینی متنوع، به تشخیص افتراقی نیاز دارد (11). با پیشرفت تکنولوژی واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction-PCR) و چندین آزمایش مبتنی بر PCR مانند میکروساتلایت، DNA کینتوپلاستی، توالی‌های تلو‌مریک یا گلیکو پروتئین 63 (gp63)، پروتئین شوک حرارتی 70 (hsp70)، مینی‌اکسون، بتاتوبولین که ژن‌های RNA ریپوزومی (rRNA) را مورد هدف قرار می دهند، پیشنهاد شده است (15-12). در میان این روش‌ها (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) تجزیه‌ی محصولات PCR از ژن‌های چند نسخه‌ای نتایج امیدوار کننده‌ای را نشان داده است. روش PCR-RFLP روی (Internal Transcribed Spacer-ITS) متعلق به ژن‌های ریپوزومی در گونه‌های لیشمانیا دنیای جدید توسط کوپولیلو و همکاران انجام شده است (2، 6، 16، 17). ولی این روش عمدتاً بر روی گونه‌های لیشمانیا دنیای قدیم انجام نشده است. اهمیت بررسی ITS1 این است که رابطه‌ی فیلوژنیک بین گونه‌ها، بر اساس مقایسه‌ی رشته‌ی یک قطعه از محل ژن rRNA قابل استنتاج است زیرا ITS1 بین گونه‌ها نسبت به ژن‌های rRNA کمتر محافظت شده است، بنابراین برای تشخیص فیلوژنیک ارگانسیم‌هایی که گونه‌های آنها بسیار نزدیک و مرتبط به هم هستند، بررسی و هدف قرار دادن ITS1 می تواند انتخاب صحیحی باشد (9). با استفاده از تکنیک‌های دقیق PCR-RFLP نه تنها می توان این بیماری را از سایر بیماری‌های پوستی با علائم مشابه متمایز کرد، بلکه با شناخت گونه و استرین‌های عامل بیماری می توان استراتژی درمانی قاطعی را برای بیماران با تجویز داروهای موثر با اثرات سمی کمتر و با هزینه‌های درمانی پایین‌تر مورد استفاده قرار داد. از آنجایی که روش‌های درمانی این بیماری گران قیمت و دارای عوارض جانبی هستند و در دنیای کنونی گونه‌های مقاوم به داروی انتخابی این بیماری (گلوکانتیم) گزارش شده است، تعیین مشخصات دقیق گونه‌ی لیشمانیا می تواند تا حدودی دلایل شکست‌های درمانی را توجیه نماید. علاوه بر این، چنین

اطلاعاتی می‌تواند جهت مطالعات اکولوژیکی، کلینیکی و همه گیر شناسی، مطالعه‌ی چرخه‌ی زندگی و انتشار گونه‌های لیشمانیا در میزبانان انسان و حیوان، همچنین در ناقلان حشره به عنوان یک پیش نیاز برای طراحی معیارهای کنترل مناسب بیماری و تهیه‌ی واکسن موثر علیه این بیماری ارزشمند باشد (18). در این مطالعه روش PCR-RFLP به عنوان ابزاری برای تعیین گونه‌ی لیشمانیا به کار برده شد و برای مشخص کردن بیشتر ویژگی‌های پلی مورفیسم DNA در میان ایزوله‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا از دو بخش هایپراآندمیک اصفهان و بم تعدادی از نمونه‌ها که پروفایل هضم آنزیمی آن‌ها با مطالعات حاضر متفاوت بود تعیین توالی ژنی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، 450 بیمار مبتلا به لیشمانیوز جلدی مورد بررسی قرار گرفت که 215 بیمار از کانون لیشمانیوز جلدی مرطوب اصفهان و 125 بیمار از کانون لیشمانیوز جلدی خشک بم انتخاب شدند. نمونه‌گیری از اول فروردین لغایت آخر اسفند 1387 در این دو شهر انجام شد. موارد انتخاب شده دارای زخم‌های پوستی متفاوت از نظر بالینی دارای طیفی از یک ندول کوچک تا زخم‌های پیش‌رونده و بدشکل، متشکل از انواع ندولی، زخمی شده، ندولی - زخمی همراه با پوست‌اندازی یا بدون پوست‌اندازی بود. جهت نمونه برداری برش‌هایی از بافت برای بررسی میکروسکوپی نمونه (از طریق خراش دادن لبه‌ی داخلی زخم‌های پوستی با یک چاقوی جراحی) انجام شد. سپس برش بافت بر روی دو لام شیشه‌ای قرار داده شد یکی از آن‌ها فقط با متانول 100 درجه جهت آزمایش‌های مولکولی تثبیت شد و دیگری علاوه بر تثبیت با متانول 100 درجه جهت تشخیص پارازیتولوژی با گیمسا رنگ آمیزی شد و از نظر وجود اشکال آماسیتگوت به دقت بررسی گردید. نمونه‌هایی از لبه‌ی داخلی زخم‌ها تحت شرایط استریل گرفته شد و به کمک محیط انتقالی BHI مایع برای کشت به محیط NNN منتقل و در انکوباتوری با دمای 24 ± 1 درجه سانتی گراد قرار داده شد. محیط‌ها هر سه روز یک

بار به مدت 4 هفته قبل از این که منفی گزارش شود مورد بررسی میکروسکوپی قرار می‌گرفت. در صورت مثبت بودن کشت، پروماسیتگوت‌ها در اواخر مرحله‌ی لگاریتمی برداشت شده و یک‌بار با بافر فسفات (PBS)، قبل از تجزیه‌ی DNA شسته و سپس در فریزر منهای 70 درجه سانتی گراد جهت آزمایش‌های بعدی قرار می‌گرفت. سه گونه‌ی مرجع به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت که عبارت بودند از لیشمانیا ماژور سویه MHOM/IR/99/YAZ1، لیشمانیا تروپیکا MHOM/IR/75/ER و لیشمانیا اینفانتوم سویه MCAN/IR/97/LON 49. جهت استخراج DNA از لام‌های بدون رنگ آمیزی ابتدا با محلول PBS استریل (pH=7/4) مرطوب شد و سپس با تیغ جراحی استریل داخل یک میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتری تراشیده شد، در مرحله بعد سه بار با PBS استریل سرد به مدت 5 دقیقه با 2500 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد شستشو شد (8) سپس به رسوب حاصله 200 میکرولیتر TE (-Tris) و 200 میکرولیتر EDTA، 200 میکرولیتر Binding Buffer و 20 میکرولیتر پروتیناز K اضافه شد و به مدت 2-4 ساعت در بن‌ماری 72 درجه سانتی گراد انکوبه و یا به مدت 24 ساعت در دمای 56 درجه سانتی گراد قرار داده شد. بقیه‌ی مراحل مطابق دستور کیت استخراج DNA (High Pure PCR Template Preparation Kit; Cat.No.11796 Roche) انجام شد.

در مورد انگل‌های کشت شده 3-1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون پروماسیتگوت‌های لیشمانیا که دارای 5×10^6 انگل در هر میلی‌لیتر محیط NNN بود از فریزر منهای 70 درجه سانتی گراد خارج و دو بار با PBS استریل با 2500 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد شستشو داده شد. مایع رویی حذف و به رسوب حاصل 200 میکرولیتر PBS، و 200 میکرولیتر Binding Buffer و 40 میکرولیتر پروتیناز k اضافه شد و محتویات به مدت 10 دقیقه در بن‌ماری 70 درجه سانتی گراد قرار داده شد بقیه‌ی مراحل مطابق دستور کیت Roche انجام شد و در نهایت DNA در 200 میکرولیتر Elution Buffer حل شد.

به کمک تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. در منطقه اصفهان از 215 بیمار، 6 ایزوله (2/8 درصد) تک باند 450 bp و 209 ایزوله (97/2 درصد) تک باند 350 bp را آشکار ساختند، و در منطقه بی‌م از 125 بیمار، 3 ایزوله (2/4 درصد) تک‌باند 450 bp و 122 ایزوله (97/6 درصد) از بیماران تک‌باند 350 bp را آشکار نمودند (شکل 1).



شکل 1. نتایج الکتروفورز ITS1-PCR لام‌های میکروسکوپی یا کشت‌های بیماران دارای لیشمانیوز جلدی M: نشانگر مولکولی (50 bp)، خط 1: استاندارد لیشمانیا ماژور (MHOM/IR/75/ER)، خط 2: استاندارد لیشمانیا تروپیکا (MHOM/IR/99/YAZ1)، خط 3: استاندارد لیشمانیا اینفانتوم (MCAN/IR/97/LON49)، خط 4: محصول PCR مطابق با نمونه استاندارد در اصفهان، خط 5: محصول PCR مطابق با نمونه استاندارد در بی‌م، خط 6: محصول PCR که مطابق با نمونه استاندارد در اصفهان و بی‌م نبود، خط 7: کنترل منفی

اندازه‌ی باند در بخشی از این تحقیق تغییری به اندازه 100 bp در سایز محصولات PCR تعداد کمی از ایزوله‌های مطالعه شده در مقایسه با نمونه‌های استاندارد، با استفاده از ژل آگارز 1 درصد نشان داده است. همه‌ی نمونه‌ها از طریق هضم محصولات ITS1 PCR به کمک آنزیم Hae III (فرمنتاز-لیتوانی) مورد بررسی قرار گرفتند، در 6 مورد (2/8 درصد) از 215 ایزوله‌ی اصفهان و 3 مورد (2/4 درصد) از 125 ایزوله‌ی منطقه بی‌م قطعات 300 bp و 150 آشکار شد که با توجه به آنالیز سکانس انجام شده با کربتیدیا شباهت داشته است. در 205 مورد (95/3 درصد) از ایزوله‌های اصفهان و 50 مورد (40 درصد) از ایزوله‌های بی‌م پس از هضم آنزیم Hae III قطعات، 210 bp و 140 آشکار شد که مطابق با الگوی استاندارد مربوط به لیشمانیا ماژور بود. در 4 مورد (1/9 درصد) از ایزوله‌های اصفهان و 72 مورد (57/6 درصد) از ایزوله‌های بی‌م پس از هضم آنزیم Hae III قطعات 200 bp و 60 نمایان شد که مطابق با

تکثیر ناحیه‌ی ITS1 به روش PCR

ناحیه‌ی rDNA ITS1 به روش PCR تکثیر شد. تکثیر نواحی SSUrRNA, 5.8 SrRNA با استفاده از پرایمرهای زیر انجام شد (8، 19-21).

(5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3')

Forward:LITSr

Reverse: (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3')

L5.8S

واکنش در حجم 250 میکرولیتر و در دستگاه ترموسایکلر

CORBET ساخت کشور استرالیا صورت گرفت

تحلیل RFLP برای ITS1 تقویت شده

محصولات ITS1-PCR جهت تعیین گونه تحت تاثیر آنزیم (BUSRI) Hae III (فرمنتاز - لیتوانی) و بافر مربوطه، در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 2 ساعت هضم شد و سپس جهت بررسی پلی مورفیسم تحت تاثیر آنزیم Taq I 1U (فرمنتاز - لیتوانی) و بافر Tanq در دمای 65 درجه سانتی گراد به مدت 3 ساعت قرار گرفت.

تعیین توالی DNA

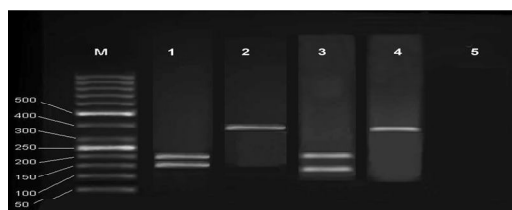
محصولات PCR متعلق به ایزوله‌هایی که پروفایل‌های متفاوتی را در تحلیل PCR-RFLP پس از استفاده از آنزیم Taq I به نمایش گذاشتند ابتدا با استفاده از کیت تصفیه‌ی محصولات PCR از روی ژل High Pure PCR Product Purification Kit; Cat.No.11732668001;Roche بر اساس پروتکل کارخانه‌ی سازنده تصفیه شدند و سپس جهت سکانس ارسال گشتند. جهت بررسی توزیع فراوانی گونه‌های لیشمانیا و ژنوتایپ‌های آن در دو منطقه اصفهان و بی‌م از آزمون کای - اسکوئر استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از میان 450 بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی، 215 بیمار از اصفهان و 125 بیمار از بی‌م، نمونه‌های کشت و لام آن‌ها مثبت گزارش شد. کشت‌های آلوده به عوامل باکتریایی یا قارچی و لام‌های میکروسکوپی منفی از مطالعه حذف شدند. 340 بیمار مجموعاً در دو منطقه همگی

و دو پروفایل پلی مورفیک برای لیسمانیا تروپیکا (LtA)
(LtB) در اصفهان و بم مشخص شد.

تعدادی از نمونه‌های لیسمانیا ماژور مربوط به
ژنوتایپ‌های LmA و LmB جهت سکانس ارسال شد و
نتایج مربوطه بر اساس آنالیز مولکولی با نرم‌افزار Blast
مشخص کرد که ژنوتایپ LmA مشابه استرین
MHOM/IR/00/PII1 دارای شماره دست یابی
(number) AY550178 بوده و ژنوتایپ LmB مشابه
استرین MHOM/IR/00/PII2 دارای شماره دست یابی
AY573187 بوده و ژنوتایپ LtA مشابه استرین
MHOM/IR/10/Bam-163 دارای شماره دست
یابی HM101131 بوده که برای اولین بار از منطقه بم
گزارش شد و ژنوتایپ LtB مشابه استرین
MHOM/AF/88/KK27 می‌باشد که دارای شماره دست
یابی GQ913688 بود (جدول 3).



شکل 3. نتایج هضم آنزیمی ناحیه تکثیر شده ITS1 لیسمانیا ماژور و
لیسمانیا تروپیکا با آنزیم Taq I در دو منطقه اصفهان و بم
M: نشانگر مولکولی (50 bp)، خط 1: LmA، خط 2: LmB، خط 3: LtA،
خط 4: LtB، خط 5: کنترل منفی

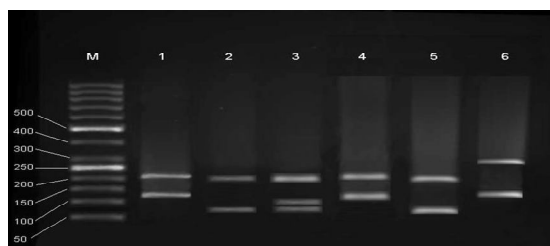
بر اساس آنالیز مولکولی به کمک نرم‌افزار Blast
تعداد کمی از ایزوله‌های اصفهان و بم با گونه‌های مرجع
لیسمانیا ماژور و لیسمانیا تروپیکا فاقد شباهت بودند در حالی
که توالی این ایزوله‌ها همولوژی بالایی با کریتیدیا داشته و
توالی ژن مزبور در بانک جهانی ژن برای اولین بار با شماره
دست یابی GQ331988 به ثبت رسید.

بحث

در دهه‌های گذشته، تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر
DNA، توان تعیین گونه‌ی انگل‌های لیسمانیا را ارتقاء
داده‌اند. در این تحقیق از روش ITS1-PCR برای تعیین

الگوی استاندارد مربوط به لیسمانیا تروپیکا بود (جدول 1،
شکل 2).

پس از مشخص شدن گونه‌ها، محصولات PCR
مربوط به هر دو گونه‌ی لیسمانیا تحت تاثیر آنزیم Taq I
قرار گرفت. در 201 ایزوله (96/2 درصد) از اصفهان و 49
ایزوله (40/2 درصد) از بم پس از مواجهه با آنزیم Taq I
باندهای 200 و 150 را آشکار ساخت که در الگوی
ژنوتایپ LmA قرار گرفت. در 4 ایزوله (1/9 درصد) از
اصفهان و 1 ایزوله (0/8 درصد) از بم در مواجهه با آنزیم
Taq I هیچ باند برش یافته‌ای مشاهده نشد و باند اصلی بدون
هیچ تغییری باقی ماند که در الگوی ژنوتایپ LmB قرار
گرفت. در 3 ایزوله (1/4 درصد) از اصفهان و 71 ایزوله
(58/2 درصد) از بم در مواجهه با آنزیم Taq I باندهای 200
و 135 را آشکار ساخت که در الگوی ژنوتایپ LtA
قرار گرفت و در 1 ایزوله (0/5 درصد) از اصفهان و 1 ایزوله
(0/8 درصد) از بم پس از مواجهه با آنزیم Taq I هیچ باند
برش یافته‌ای مشاهده نشد و باند اصلی بدون هیچ تغییری
باقی ماند که در الگوی ژنوتایپ LtB قرار گرفت (جدول 2،
شکل 3).



شکل 2. نتایج هضم آنزیمی ناحیه تکثیر شده توسط آنزیم
Hae III در لام‌های میکروسکوپی یا کشت بیماران دارای لیسمانیا
جدلی

M: نشانگر مولکولی (50 bp)، خط 1: استاندارد لیسمانیا ماژور، خط 2:
استاندارد لیسمانیا تروپیکا خط 3: استاندارد لیسمانیا ایفانتوم، خط 4: لیسمانیا ماژور
مطابق با نمونه استاندارد اصفهان و بم، خط 5: لیسمانیا تروپیکا مطابق با نمونه
استاندارد اصفهان و بم، خط 6: کریتیدیا، خط 7: کنترل منفی

از مقایسه‌ی نتایج فوق با الگوی هضم آنزیمی
گونه‌های مرجع و تحلیل PCR-RFLP در منطقه‌ی ITS1
دو پروفایل پلی مورفیک برای لیسمانیا ماژور (LmA, LmB)

قطعه‌ی 200 bp و 80 و 60 بوده است (8، 9، 20 و 22). با در نظر گرفتن نقشه هضم آنزیمی Hae III، چهار قطعه‌ی 200 bp و 64، 55 و 20 بایستی حاصل هضم آنزیمی لیشمانیا تروپیکا باشد ولی به دلیل اندازه‌ی کوچک اولین قطعه (20 bp) و هم‌پوشانی دو قطعه با وزن مولکولی نزدیک (64 bp و 55) باعث شده فقط قطعات 200 bp و 60 قابل تشخیص باشند (20).

جدول 2. توزیع فراوانی ژنوتایپ‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا جداسازی شده از لام میکروسکوپی یا کشت بیماران دارای لیشمانیوز پوستی در دو منطقه اصفهان و بم

ژنوتایپ	اصفهان	بم	کل
LmA	201 (96/2)	49(40/2)	25 (75/5)
LmB	4 (1/9)	1(0/8)	5 (1/5)
LtA	3(1/4)	71(58/2)	74 (22/4)
LtB	1 (0/5)	1 (0/8)	2 (0/6)
کل	209	122	331 (100)

نتایج روش PCR-RFLP در این تحقیق نشان داد که در میان ایزوله‌های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا در ناحیه‌ی ITS1 به کمک تحلیل تعیین توالی برای تعدادی از نمونه‌ها، پلی مورفیسم ژنتیکی وجود دارد، دو پروفایل ژنتیکی LmA و LmB مربوط به لیشمانیا ماژور و دو پروفایل ژنتیکی LtA و LtB مربوط به لیشمانیا تروپیکا بود، که این نتایج می‌تواند به دلیل هتروزیگوت بودن گونه و یا گونه‌های مختلط شده (هیبرید ژنتیکی) باشد، زیرا این تجزیه‌ها حاصل مطالعه‌ی ایزوله‌هایی بوده است که شبیه‌سازی نشده و یا به صورت ترانسژنیک مورد استفاده قرار نگرفته و مستقیماً از بیماران جداسازی شده است (22).

گونه انگل‌های ایزوله شده از مناطق اصفهان و بم و از تحلیل PCR-RFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای در هر یک از گونه‌های لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور استفاده گردید. طبق مطالعات انجام شده قطعه حاصل از تکثیر گونه‌های مختلف استاندارد لیشمانیا با استفاده از دو پرایمر LITSr و L5.8S قطعه‌ی 350 bp می‌باشد ولی در برخی از ایزوله‌های این مطالعه قطعه‌ای به طول 450 bp وجود داشته است.

جهت آنالیز بهتر این تفاوت 100 bp در گروه‌های فوق‌الذکر، تعدادی از ایزوله‌های هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و جهت سکانس ارسال شد و بر اساس آنالیز مولکولی با نرم‌افزار Blast مشخص گردید که توالی مزبور 97 درصد با کریتیدیا فاسیکولاتا و 90 درصد با کریتیدیا لوسیلیا تشابه داشت، توالی مزبور در بانک جهانی ژن با شماره دست یابی GQ331988 به ثبت رسید. از آنزیم Hae III جهت تعیین گونه‌ی نمونه‌های جدا شده از بیماران استفاده شد.

جدول 1. توزیع فراوانی خانواده‌ی Tripanosomatidae جداسازی شده از لام میکروسکوپی یا کشت بیماران دارای لیشمانیوز پوستی

جنس	اصفهان	بم	کل
لیشمانیا ماژور	205(95/3)	50(40)	255(75)
لیشمانیا تروپیکا	4 (1/9)	72 (57/6)	76(22/4)
کریتیدیا	6 (2/8)	3 (2/4)	9 (2/6)
کل	215	125	340 (100)

در گونه لیشمانیا ماژور محصول هضم آنزیمی ITS1-PCR قطعات 220 bp و 140، گونه لیشمانیا تروپیکا دو قطعه 200 bp و 60 و در گونه لیشمانیا اینفانتوم سه

جدول 3. ارائه گروه‌های ژنتیکی لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا همراه با استرین مربوطه و کد ژنتیکی هر کدام در بانک جهانی ژن در دو منطقه اصفهان

و بم

ژنوتایپ‌ها	استرین	منطقه	شماره دست یابی
LmA	MHOM/IR/00/PII 1	ITS1	AY550178
LmB	MHOM/IR/00/PII 2	ITS1	AY573187
LtA	MHOM/IR/10/Bam-163	ITS1	HM101131
LtB	MHOM/AF/88/KK 27	ITS1	GQ913688

سازگاری با کانون‌های جدید محسوب گردند. تداوم این ژنوتایپ‌ها در انطباق با محیط‌های مختلف می‌تواند گویای تفاوت‌های انطباق با ناقلین و مخازن حیوانی در یک ناحیه معین باشد (16). به علاوه کروتزر و همکاران به وسیله میکرواسپکتروفتومتری کمی نشان دادند که ادغام هسته‌ای و تولید مثل جنسی در اشکال آماسیت‌گوت‌های داخل سلولی می‌تواند روی دهد (23). این مسئله به وسیله یوسف و همکاران در آماسیت‌گوت و پروماسیت‌گوت‌ها با استفاده از DNA هسته‌ای و تصویر کامپیوتری نشان داده شده است (24). به علاوه در ارتباط با نوترکیبی بین گونه‌ها بعضی مطالعات تبادل ژنتیکی را پیشنهاد کرده‌اند و در دنیای جدید هیبرید بین لیشمانیا پروویانا، لیشمانیا گویانسیس و لیشمانیا برازیلنسیس را شرح داده‌اند (25-27) بعد از هیبریدیزاسیون، استرین‌های دورگه در جمعیت به طور طبیعی تکثیر پیدا می‌کنند، مثالی از این نوع هیبرید بین لیشمانیا برازیلنسیس که ایجاد لزیون‌های جلدی یا لزیون‌های جلدی مخاطی در انسان می‌کند و حتماً بایستی بیمار تحت درمان شیمیایی قرار گیرد و لیشمانیا پروویانا که ایجاد لزیون‌های جلدی خشک خوش‌خیم می‌کند که خودبه‌خود بهبود می‌یابد دیده می‌شود، هیبرید بین این دو، در بیماران پرو دیده شده است که هم لزیون‌های جلدی - مخاطی و هم لزیون‌های خوش‌خیم مخصوص مربوط به عفونت با لیشمانیا پروویانا بروز می‌دهند (26). همان‌طور که بیان گردید تبادل ژن‌ها و هیبریدیزاسیون بین انگل‌های لیشمانیا، می‌تواند منجر به بروز سویه‌های جدید انگل و احتمالاً بروز اشکال متفاوت کلینیکی بیماری در مناطق مختلف جغرافیایی گردد (28)، (29). از طرف دیگر بیماری لیشمانیوز جلدی مرطوب و خشک در تعدادی از افغان‌های مهاجر به ایران در اصفهان و بم وجود دارد و با توجه به این که احتمال انتقال شخص به شخص را به وسیله پشه خاکی نمی‌توان نادیده گرفت و این مسئله شانس ایجاد هیبرید جدید را بین استرین‌های مختلف جغرافیایی فراهم می‌آورد لذا ممکن است منجر به ایجاد نوع جدیدی از زخم گردد

نتایج سکانس ژنوتایپ‌های LtA، LtB، LmA، LmB و نشان داد که ژنوتایپ LmA با استرین MHOM/IR/00/PII1 نه تنها بیشترین فراوانی را در منطقه اصفهان نشان داده بلکه مطابق گزارشات تشکری و همکاران علاوه بر فراوانی این ژنوتایپ در اصفهان در سایر مناطق جغرافیایی ایران مانند کاشان، تهران، دزفول و دهلران نیز یافت شده است (4)، ولی ژنوتایپ LmB به استرین MHOM/IR/00/PII2 مربوط می‌باشد که کمترین فراوانی را در منطقه اصفهان داشته و مطابق گزارشات تشکری و همکاران این ژنوتایپ فقط در منطقه‌ی کاشان یافت شده است و از آنجایی که هیچ‌گونه اطلاعی در مورد تاریخچه سفرهای بیماران در داخل ایران، نداشتیم، چنین به نظر می‌رسد که این ژنوتایپ ناشی از انتقال بیمار از منطقه‌ی کاشان به ناحیه اصفهان بوده است. ژنوتایپ LtA مربوط به استرین MHOM/IR/10/Bam-163 بوده که بیشترین فراوانی را در منطقه بم به خود اختصاص داده است و برای اولین بار مشخصات ژنوتایپی آن در ایران گزارش شده است. این ژنوتایپ بر اساس آنالیز مولکولی با نرم‌افزار Blast نشان داد که در منطقه ITS1 با استرین‌های MHOM/IR/02/Mash-10، MHOM/IR/02/Mash-2 و MHOM/IR/03/Mash-878 که از منطقه مشهد جداسازی شده‌اند به ترتیب در 3، 4 و 7 نوکلئوتید تفاوت داشت و با استرین MHOM/IR/07/Kermanshah که از منطقه کرمانشاه جداسازی شده در 6 نوکلئوتید تفاوت داشت (19)، در حالی که ژنوتایپ LtB مربوط به استرین MHOM/AF/88/KK27 بود و از فراوانی بسیار کمی در دو منطقه اصفهان و بم برخوردار است و به نظر می‌رسد مربوط به مهاجران افغانی است.

همان‌طور که مشخص شد بیشتر ژنوتایپ‌ها اختصاصی برخی از مناطق جغرافیایی خاص هستند و چنین به نظر می‌رسد که ژنوتایپ LmA مربوط به لیشمانیا ماژور و LtA مربوط به لیشمانیا تروپیکا به ترتیب در دو منطقه اصفهان و بم ممکن است نه تنها قدیمی‌ترین ژنوتایپ بلکه ژنوتایپ‌های اصلی بوده و بقیه به نوعی از این ژنوتایپ‌ها تکامل یافته باشند و در اصل موفق‌ترین ژنوتایپ از نظر

pleomorphism. *Infect Genet Evol.* 2005; 5(2): 109-16.

3. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. *Tropical disease research: progress 1975-94 : highlights 1993-94 : twelfth programme report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR):* World Health Organization; 1995.

4. Tashakori M, Ajdary S, Kariminia A, Mahboudi F, Alimohammadian MH. Characterization of *Leishmania* species and *L.* major strains in different endemic areas of Cutaneous Leishmaniasis in Iran. *Irn Biomed J.* 2003; 7(2):43-50.

5. Tashakori M, Mahnaz T, Kuhls K, Katrin K, Al-Jawabreh A, Amer AJ, 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.

6. Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa Cabrera T, Pérez-Montfort R, Becker I. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res.* 2002;88(10):918-25.

7. Hajjaran H, Mohebbali M, Razavi M, Rezaei S, Kazemi B, Edrissian GH, et al. Identification of *Leishmania* species isolated from human cutaneous leishmaniasis, using random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Iranian journal of public health.* 2004;33(4).

8. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47(1): 349-58.

9. Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pralong F, Nacher M, Dedet JP, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(2):459-67.

10. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and

نتیجه گیری

از نتایج این مطالعه می توان چنین استنتاج نمود که لیشمانیا ماژور عامل لیشمانیوز جلدی مرطوب و لیشمانیا تروپیکا عامل لیشمانیوز جلدی خشک در اصفهان و بم پلی مورفیک هستند. علاوه بر آن اگر چه علائم کلینیکی لیشمانیوز جلدی و بررسی پاتوژنز بیماری تحت تاثیر خصوصیات فردی میزبان و خصوصیات ژنتیکی انگل می باشد ولی نتایج ارائه شده در این تحقیق نشان می دهد که خصوصیات ژنتیکی انگل می تواند نقش مهمی در بروز علائم کلینیکی، پاتوژنز بیماری، همه گیرشناسی و طبقه بندی انگل بازی کند که اظهار نظر قطعی درباره این موضوع نیازمند مطالعات وسیع به ویژه در نمونه های جدا شده از میزبانان ذخیره، ناقلین و همچنین انسان ها در مناطق مختلف می باشد.

تشکر و قدردانی

از رئیس مرکز تحقیقات پوست و سالک صدیقه طاهره (س) اصفهان، جناب آقای دکتر محمدعلی نیلفروشزاده و سرکار خانم ها، لیلا شیرانی و نوشین هاشمی به خاطر همکاری های صمیمانه در اجرای این پروژه تحقیقاتی کمال تشکر و قدردانی را داشته و از انستیتو پاستور تهران به جهت فراهم نمودن سوش های رفرانس لیشمانیا و سرکار خانم سمیه خانجانی صمیمانه قدردانی می گردد، در ضمن شایان ذکر است که این پروژه تحقیقاتی منتج شده از پایان نامه ای تحت عنوان بررسی پلی مورفیسم ژنتیکی لیشمانیا ماژور و مقایسه آن با لیشمانیا تروپیکا می باشد.

منابع

1. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(1):102-9.
2. Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, et al. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical

- differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3147-53
11. Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 2007;25(2):203-11.
12. Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med.* 2003; 49(1):55-60.
13. Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2003; 3(5): 657-67.
14. Vega-López F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16(2): 97-101.
15. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*). *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2):601-6.
16. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7): 3126-32.
17. Rodriguez-Bonfante C, Bonfante-Garrido R, Grimaldi G, Momen H, Cupolillo E. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. *Infect Genet Evol.* 2003;3(2):119-24.
18. Kelly JM. Isolation of DNA and RNA from *Leishmania*. *Methods Mol Biol.* 1993;21:123-31.
19. Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Hajjaran H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in Giemsa-stained slides by PCR-RFLP. *Iranian Journal of Public Health.* 2008;37(1):54-60.
20. Mohebbali M, Edrissian GH, Nadim A, Hajjaran H, Akhoundi B, Hooshmand B, et al. Application of Direct Agglutination Test (DAT) for the Diagnosis and Seroepidemiological Studies of Visceral Leishmaniasis in Iran
- Iranian journal of parasitology.* 2006; 1(1): 15-25.
21. Jaffe CL, Baneth G, Abdeen ZA, Schlein Y, Warburg A. Leishmaniasis in Israel and the Palestinian Authority. *Trends Parasitol.* 2004; 20(7): 328-32.
22. Schönian G, Schnur L, el Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Köhler W, et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(2): 217-24.
23. Kreutzer RD, Christensen HA. Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *Am J Trop Med Hyg.* 1980; 29(2): 199-208.
24. Youssef MY, Eissa MM, el Mansoury ST. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* of the Old World. *J Egypt Soc Parasitol.* 1997;27(3):651-7.
25. Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, et al. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop.* 1995; 59(4):293-307.
26. Belli AA, Miles MA, Kelly JM. A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology.* 1994; 109 (Pt 4):435-42.
27. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998; 93(5): 663-8.
28. Delgado O, Cupolillo E, Bonfante-Garrido R, Silva S, Belfort E, Grimaldi Júnior G, et al. Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92(5): 581-2.
29. Schönian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylén S, Pratlong F, et al. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;106(2):239-48.