پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره نوزدهم شماره ۷۰ خرداد و تیر سال ۱۳۸۸ (۴۸-۴۱)

کاربرد سیستم های برتر آنزیمی برای تعیین هویت عوامل ایجاد کننده لیشمانیوز احشائی (کالاآزار) در ایران با استفاده از روش الکتروفورز ایزوآنزیم

مهدی فخار[۱] فتانه میکائیلی[۲] غلامرضا حاتم[۳] حمد حسین معتضدیان[۴] پروانه حبیبی[۵] اسماعیل فلاح[۶]

چکیده

سابقه و هدف : بیماری لیشمانیوز احشائی(کالاآزار) از جمله بیماری‌های انگلی قابل انتقال بین انسان و حیوان است که توسط انگل‌های کمپلکس لیشمانیا دونوانی ایجاد می‌شود. هدف از این مطالعه کاربرد سیستم‌های مختلف آنزیمی در تفکیک گونه‌ها و سویه‌های عامل لیشمانیوز احشائی می‌باشد.

مواد و روش ها : دراین مطالعه تجربی، سویه مرجع لیشمانیا اینفانتوم، سویه مرجع لیشمانیا ماژور و سویه لیشمانیا تروپیکا به همراه انگل‌های لیشمانیا جدا شده از مغز استخوان بیماران مبتلا به کالاآزارو انگل‌های جدا شده از یک قلاده سگ از استان فارس و یک قلاده از آذربایجان شرقی در محیط کشت مایع آر پی ام آی ۱۶۴۰ به همراه سرم جنین گاو ۱۰ درصد انبوه‌سازی و بعد ازجمع‌آوری از محیط‌کشت، عصاره‌گیری شد و سپس با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریلامید به روش غیر پیوسته، شش سیستم آنزیمی گلوکز فسفات ایزومراز، فسفوگلوکوموتاز، مالات دهیدروژناز، گلوکز۶ فسفات دهیدروژناز، ۶ فسفو گلوکونات دهیدروژناز و نوکلئوزید هیدرولاز۲ به‌منظور تفکیک‌گونه و سوش انگل‌های بدست آمده و یافتن سیستم‌های مناسب تر جهت تفکیک آنها در مقایسه با سویه‌های مرجع مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها : پروفیل ایزوآنزیم‌های ۶ سیستم آنزیمی معرفی شده برای نمونه‌های جدا شده از بیماران و مخازن لیشمانیوز احشایی با یکدیگر و سویه مرجع مقایسه شدند و مهاجرت نسبی کلیه باندهای ایزوآنزیمی هرنمونه در سیستم‌های مورد بررسی محاسبه گردید و مشخص شد که تنها پنج سیستم آنزیمی توانایی تفکیک گونه‌های مختلف انگل را از یکدیگر می‌باشند.

استنتاج : در مطالعه حاضر، آنزیم‌های گلوکز فسفات ایزومراز و گلوکز۶ فسفات دهیدروژناز بیشترین هتروژنیتی و نوکلئوزید هیدرولاز۲ بیشترین هموژنیتی را داشتند و همچنین آنزیم‌های فسفوگلوکوموتاز و گلوکز فسفات ایزومراز و مالات دهیدروژناز از آنزیم‌های بسیار فعال بودند.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز احشائی، الکتروفورز ایزوآنزیم، ژل پلی‌آکریلامید

مقدمه

بیماری لیشمانیوز ازجمله بیماری‌های انگلی قابل انتقال بین انسان و حیوان است که توسط تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجادمی‌شود. سه‌نوع اصلی بیماری شامل لیشمانیوز پوستی(سالک)، لیشمانیوز احشایی(کالا آزار) و لیشمانیوز

مولف مسئول: دکتر مهدی فخار– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص)، دانشکده پزشکی E-mail: mahdif53@yahoo.com
۱. دکترای انگل شناسی پزشکی، استادیار دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. دانشجوی دکترای انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل شناسی
۳. دکترای انگل شناسی، دانشیار دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۴. دکترای انگل شناسی، استاد دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۵. کارشناس ارشد پاتوبیولوژی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۶. دکترای انگل شناسی، دانشیار دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
تاریخ دریافت : ۸۸/۲/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۸/۳/۲۷ تاریخ تصویب : ۸۸/۴/۳۱

www.SID.ir

جلدی مخاطی است(۱). نوع احشایی بیماری یا کالاآزار دربیشتر مناطق ایران بصورت اسپورادیک(تک‌گیر) و در مناطقی از استانهای اردبیل (مشکین شهر، دشت مغان)، آذربایجان شرقی(اهر و کلیبر)، فارس (فیروزآباد، جهرم و نورآباد)، بوشهر (برازجان و خورموج)، قم (بخش خلجستان) بصورت آندمیک دیده می‌شود(۲). لیشمانیوز احشایی (کالا آزار) در حدود ۶۶ کشور جهان شیوع دارد و میزان بروز سالیانه آن در دنیا ۵۰۰ هزار نفر تخمین زده می‌شود(۳). عامل اصلی بیماری کالا آزار در منطقه وسیع حوزه مدیترانه و از جمله ایران لیشمانیا اینفانتوم (Leishmania infantum) است. کالاآزار در ایران اغلب در کودکان و بیشتر در بین روستائیان دیده می‌شود. مخازن این بیماری در ایران شامل سگ و سگ سانان (روباه و شغال) بوده و ناقلین آنرا گونه‌های مختلف پشه خاکی از جمله گونه غالب در ایران فلبوتوموس ماژور(Phlebotomous major) تشکیل می‌دهد. علایم اصلی بیماری شامل تب، اسپلنومگالی و کم خونی است و یافته‌های آزمایشگاهی غیرطبیعی بیماری عبارتند از پان سایتوپنی، هایپرگاماگلوبینمی و هیپوآلبومینمی. در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع ممکن است تا ۹۸ درصد موجب مرگ و میر بیماران، به ویژه کودکان شود(۴). انگل لیشمانیا در بدن مهره دار به شکل بدون تاژک یا آماستیگوت و در بدن پشه خاکی و محیط‌کشت به شکل تاژک دار یا پروماستیگوت دیده می‌شود. با توجه به تشابه اشکال میکروسکوپی بدون تاژک انگل جدا شده از بیماران و عدم شناسایی گونه و سویه انگل از روی شکل ظاهری آن و نیز به دلیل اهمیت فراوان تشخیص دقیق سویه‌ها جهت انجام هرگونه برنامه‌ریزی برای کنترل و پیشگیری، مبارزه با مخازن و ناقلین، ساخت واکسن و فراهم کردن پادتن برای تشخیص و درمان (۶،۵)، استفاده از پادتن‌های تک دودمانی (Monoclonal Antibodies) (۷)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) (۸) و مقایسه ایزوآنزیم‌های انگل با بهره‌جویی از سیستم‌های گوناگون آنزیمی(۹) از دقیق‌ترین روش‌های مورد استفاده در این زمینه است و در این میان استفاده از روش مقایسه ایزوآنزیم‌ها، به علت توان بسیار بالا در تشخیص گونه‌ها و حتی سویه‌های گوناگون یک گونه، از اهمیت زیادی برخوردار است(۵).

بنابراین به منظور صرفه جویی در وقت و هزینه تلاش شده است تا سیستم‌های آنزیمی مناسب‌تر برای تشخیص گونه‌ها و سویه‌های گوناگون منطقه شناسایی و معرفی شوند لذا هدف از این مطالعه کاربرد سیستم‌های مختلف آنزیمی برای تفکیک گونه‌ها و سویه‌های عامل لیشمانیوز احشائی و معرفی سیستم‌های برتر به منظور صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی سویه مرجع لیشمانیا اینفانتوم (MCAN/IR/96/LON49) ، سویه مرجع لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) و سویه لیشمانیا تروپیکا (MHOM/IR/06/SHZ6) به همراه انگل‌های لیشمانیا جدا شده از مغز استخوان بیماران مبتلا به کالاآزار از استان‌های فارس (۲مورد)، کهگیلویه و بویراحمد (۱مورد) و آذربایجان شرقی (۱مورد) و انگل‌های جدا شده ازاحشاء یک قلاده سگ از استان فارس و یک قلاده از آذربایجان شرقی، در محیط مایع آر پی ام آی ۱۶۴۰ (PRMI 1640) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum 10%) کشت داده شدند، سپس محیط‌های کشت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد جهت رشد انگل تا میزان موردنیاز نگهداری شدند و پس از رسیدن حجم کشت‌ها به اندازه مورد نظر و قرار گرفتن پروماستیگوت‌ها در پایان مرحله رشد لگاریتمی، به منظور تهیه رسوب از انگل‌ها، آنها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد و با دور g ۲۰۰۰ سانتریفوژ نموده و پس از حذف مایع رویی، رسوب بدست آمده ۳ بار با بافر نمکی فسفات سرد شستشو شد. سپس ماده پایدارکننده آنزیم (۱ میلی‌مولار آمینوکاپروییک اسید،

Archive of SID

www.SID.ir

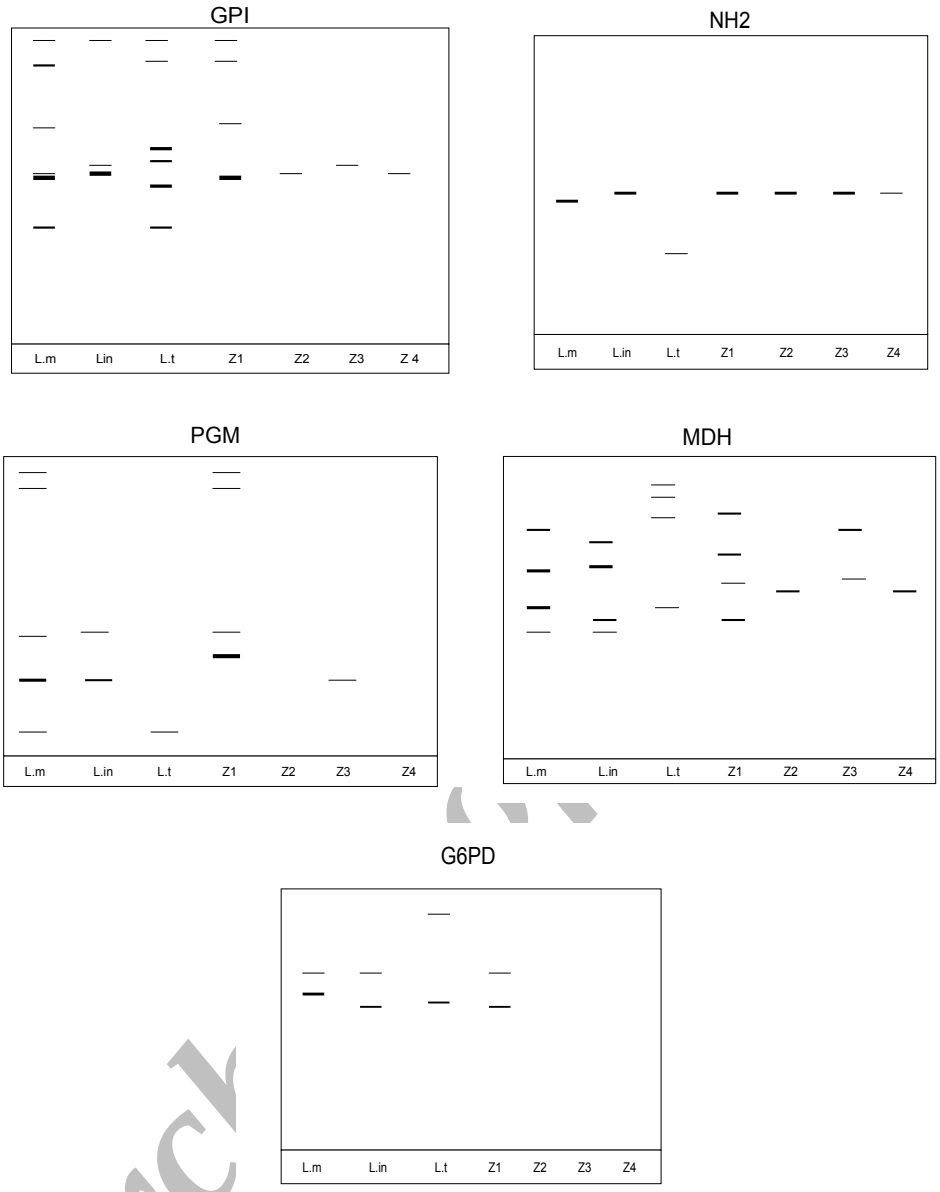
۱ میلی مولار دی تیوتریتول و ۱ میلی مولار اتیلن دی آمین ترا استیک اسید) به میزان هم حجم رسوب افزوده شد و پس از اینکه به خوبی مخلوط شد ۳ بار درازت مایع عمل انجماد و در آب ۲۵ درجه سانتیگراد عمل ذوب به طور متناوب انجام شد و در پایان، سوسپانسیون بدست آمده با دور g ۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. محلول‌های بالایی، به عنوان عصاره دارای آنزیم در ۲۰- درجه سانتیگراد تقسیم و نگهداری شدند. الکتروفورز عصاره آنزیمی روی ژل پلی آکریلامید به روش غیرپیوسته انجام پذیرفت که در این روش با استفاده از ژل جدا کننده ۷/۵ درصد و ژل متراکم کننده ۳ درصد و بافر Tris/HCl(pH=6.7)، بافر جداکننده Tris/HCl(pH=8.9) و بافر تانک Tris/HCl (pH=8.3) به مدت ۱ ساعت در جریان الکتریکی ثابت ۳۰ میلی آمپر الکتروفورز انجام گرفت. برای هر نمونه، ۶ سیستم آنزیمی بررسی شد که عبارت بودند از: گلوکز فسفات ایزومراز (GPI) E.C.5.3.1.9، گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز(G6PD) E.C.1.1.1.49، مالات دهیدروژناز (MDH) E.C.1.1.1.37، نوکلئوزید هیدرولاز۲ (NH2) E.C.3.2.2.1، ۶ فسفو گلوکونات دهیدروژناز(6PGD) E.C.1.1.1.44 و فسفوگلوکو موتاز (PGM) E.C.2.7.5.1 . مهاجرت نسبی هر باند ایزوآنزیم در صفحه الکتروفورز از تقسیم فاصله طی شده باند از مبدا به فاصله مبدا تا انتهای ژل به دست آمد و مراحل رنگ‌آمیزی اختصاصی هر سیستم برپایه روش اوانس(۱۹۸۹) انجام گرفت(۱۱،۱۰).

یافته ها

پروفیل ایزوآنزیم‌های ۶ سیستم آنزیمی گلوکز فسفات ایزومراز، گلوکز۶ فسفات دهیدروژناز، مالات دهیدروژناز، نوکلئوزیدهیدرولاز ۲ ، ۶ فسفوگلوکونات دهیدروژناز و فسفوگلوکوموتاز برای نمونه‌های جدا شده از بیماران و مخازن مبتلا به لیشمانیوزاحشایی مقایسه شد و مهاجرت نسبی کلیه باندهای ایزوآنزیمی هر نمونه در سیستم‌های مورد بررسی، محاسبه شد. در سیستم گلوکز فسفات ایزومراز، سویه مرجع لیشمانیا ماژور ۶ باند با مهاجرت نسبی ۰/۰۴ ، ۰/۱۲ ، ۰/۳۲ ، ۰/۴۸ ، ۰/۵ ، ۰/۶۶ و سویه لیشمانیا تروپیکا ۶ باند با مهاجرت نسبی ۰/۰۴ ، ۰/۱ ،۰/۴، ۰/۴۴ ، ۰/۵۲ و ۰/۶۶ را نشان دادند و در سویه مرجع لیشمانیا اینفانتوم ۳ باند با مهاجرت نسبی ۰/۰۴ ، ۰/۴۶ و ۰/۴۸ مشاهده شد. در سیستم گلوکز۶ فسفات دهیدروژناز، در لیشمانیا ماژور دو باند با مهاجرت نسبی ۰/۳۴ و ۰/۴ و در لیشمانیا تروپیکا دو باند با مهاجرت نسبی ۰/۱ و ۰/۴۴ ملاحظه گردید و در لیشمانیا اینفانتوم دو باند ۰/۳۴ و۰/۴۶ ملاحظه شد. در بررسی سیستم آنزیمی مالات دهیدروژناز سویه مرجع لیشمانیا ماژورچهار باند به ترتیب با مهاجرت ۰/۲۵ ، ۰/۳۸ ، ۰/۵ و ۰/۵۸ و سویه لیشمانیا تروپیکا چهار باند با مهاجرت ۰/۱ ، ۰/۱۳ ، ۰/۲۱ و ۰/۵ را نشان دادند، در حالیکه باندهای سویه مرجع لیشمانیا اینفانتوم مهاجرت نسبی ۰/۲۸ ، ۰/۳۶ ، ۰/۵۳ و ۰/۵۸ را نشان دادند. در سیستم نوکلئوزیدهیدرولاز ۲ در لیشمانیا ماژور یک باند با مهاجرت نسبی ۰/۵۳ و در لیشمانیا تروپیکا یک باند با مهاجرت نسبی ۰/۷ ملاحظه شد و در لیشمانیا اینفانتوم یک باند ۰/۵ ملاحظه شد. در بررسی سیستم آنزیمی فسفوگلوکوموتاز، سویه مرجع لیشمانیا ماژور پنج باند به ترتیب با مهاجرت ۰/۰۵ ،۰/۱، ۰/۶، ۰/۷۵ و ۰/۹۱ و سویه لیشمانیا تروپیکا یک باند با مهاجرت ۰/۹۱ را نشان دادند و درلیشمانیا اینفانتوم دو باند با مهاجرت نسبی۰/۵۸ و ۰/۷۵ملاحظه شد(شکل شماره۱). لازم به ذکر است که در این مطالعه سیستم آنزیمی۶ فسفو گلوکونات دهیدروژناز بدلیل نامناسب بودن باندهای ایجاد شده و عدم تفسیر و مقایسه آن با سویه مرجع، بعنوان آنزیم نامناسب در شرایط این مطالعه معرفی می‌گردد. بطورکلی دراین مطالعه۴ پروفیل زایمودمی برای انگل‌های لیشمانیا اینفانتوم بدست آمده از انسان و سگ در مقایسه با گونه مرجع مشخص شدند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل شماره ۱ : پروفیل ایزوآنزیمی پنج سیستم آنزیمی برتر. L.t جای نمونه مرجع لیشمانیا ترویپکا، L.m جای نمونه مرجع لیشمانیا ماژور و L.in جای نمونه مرجع لیشمانیا اینفانتوم. Z1 : نمونه جدا شده از بیمارمبتلا به کالاآزار (کهگیلویه و بویراحمد) Z2 : نمونه جدا شده از بیمارمبتلا به کالاآزار (آذربایجان شرقی). Z3 : نمونه جدا شده از سگ (آذربایجان شرقی). Z4 نمونه جدا شده از سگ و انسان (فارس)

بحث

در مطالعه حاضر، آنزیم‌های گلوکز فسفات ایزومراز و گلوکز۶ فسفات دهیدروژناز دارای بیشترین هتروژنیتی و نوکلئوزید هیدرولاز دارای بیشترین هموژنیتی بودند و همچنین آنزیم‌های فسفوگلوکوموتاز و گلوکز فسفات ایزومراز و مالات دهیدروژناز فعالیت بسیار بالایی از خود نشان داده و قوی‌تر ظاهر شدند.

از آنجاییکه جنس لیشمانیا هموژن‌تر از جنس تریپانوزوم می‌باشد، لذا استفاده از تکنیکی با قدرت تفکیک بالا برای تجزیه و تحلیل فیلوژنی گونه‌های لیشمانیا مورد نیاز است، بنابراین استفاده از روش الکتروفورز ایزوآنزیم ضروری بنظر می‌رسد. استفاده از الکتروفورز ایزوآنزیم‌ها در سال ۱۹۷۰ میلادی معرفی و

www.SID.ir

بعنوان روش انتخابی جهت تعیین هویت گونه‌های لیشمانیا مطرح شد، بر خلاف استفاده از چگالی شناوری DNA، روش الکتروفورز ایزوآنزیم دارای قدرت تفکیک بالایی بوده و قادر است تنوع فراوان موجود در طیف گسترده گونه‌های لیشمانیا را مشخص نماید(۱۲). تاکنون بیش از ۲۰ زایمودم از لیشمانیا اینفانتوم توسط محققین شرح داده شده و توانسته است ارتباط محدودی بین زایمودم‌ها و آسیب‌شناسی انگل مشاهده نمایند(۱۳،۱۴). زایمودم Mon-1 لیشمانیا اینفانتوم شایعترین زایمودم با گسترش جهانی است و در بیش از ۳۰ کشور جهان (دنیای قدیم) گزارش شده است و نمایانگر حدود ۷۰ درصد سوش‌های طبقه‌بندی شده این گونه از انگل می‌باشد(۱۵). در مناطق آندمیک ایران نیز دو زایمودم Mon-1و Lon-49 برای لیشمانیا اینفانتوم شناسایی شده است،که زایمودم Lon-49 معادل Mon-1 می‌باشد و در حقیقت این دو زایمودم با یکدیگر یکسان هستند(۱۶). گونه‌های مختلف لیشمانیا و حتی زایمودم‌های یک گونه می‌توانند طیف وسیعی از علایم بالینی را از خود نشان دهند، از جمله زایمودم Mon-1 لیشمانیا اینفانتوم که عامل اصلی و شایع کالاآزار در منطقه مدیترانه و جنوب آمریکا است، درموارد زیادی از ضایعات پوستی جدا شده است(۱۲)، بنابراین زایمودم‌های مختلف یک گونه می‌توانند پاتوژنیسیتی (بیماریزایی) مختلفی را از خود نشان دهند و بروز علایم بالینی نیز متفاوت باشند. بطوریکه بعضی سوش‌ها تمایل به ایجاد ضایعات جلدی، بعضی ضایعات احشایی و بعضی قادر به ایجاد هر دو نوع ضایعه هستند. همچنین در این مطالعه بین تظاهرات بالینی بیماران تحت بررسی و زایمودم‌های مختلف ارتباط منطقی و معنی‌داری مشاهده نگردید و بنظر می‌رسد چنین ارتباطی بسیار محدود بوده و نقش موثری در ایجاد ضایعات و بروز علایم بالینی نداشته باشد. در نهایت پیشنهاد می‌شود جهت بررسی سیستم‌های آنزیمی روی اشکال مختلف بیماری با طیف بالینی گسترده و ارتباط سوش‌های مختلف با پراکندگی جغرافیایی متنوع‌تر مطالعات وسیعی در کشور انجام گیرد. در مصر آودالا (Awadalla) و همکارانش در سال ۱۹۸۷ ، چهار آنزیم MPI , MDH , GPI و NH را بعنوان آنزیم‌های مناسب برای تمایز نمونه‌های پوستی و احشایی معرفی کردند(۱۷). در کنیا، اکوت(Okot) و همکارانش، کارایی فوق‌العاده چهار آنزیم MPI , MDH , ME و PGM را در ایجاد تمایز بین سوش‌های ایجادکننده لیشمانیوز پوستی و احشایی معرفی نموده و قدرت آنزیم 6PGD را درتفکیک سویه‌های مزبور رد کردند(۱۸). در مطالعه ما نیزسیستم آنزیمی۶ فسفوگلوکونات دهیدروژناز توانایی لازم در تفکیک گونه‌های انگل را ندارد. در ایتالیا مطالعات گرامیسیا (Gramiccia) و همکارانش در سال ۱۹۹۲ ، با استفاده از ۱۴ سیستم آنزیمی از جمله PGM,GPI,6PGD,G6PD,MDH و NH و الکتروفورز روی استات سلولز، انگل‌های ایجادکننده لیشمانیوز احشایی در انسان و سگ را مورد بررسی قرار داد(۱۹)، که مطالعه حاضر با نتایج این محقق مطابقت دارد. با توجه به مطالعات اوانس درسال۱۹۸۹ و سایر محققین مانند حاتم و میراتو روی سیستم‌های آنزیمی مختلف، آنزیم‌های MDH , GPI , PGM و NH1 و NH2 برای مطالعه روی نمونه‌های پوستی ایران مناسبترند(۲۰) و اختلافاتی که در کاربرد آنزیم‌های مختلف مشاهده می‌شود، می‌تواند ناشی ازنوع سیستم به کار رفته (پیوسته یا غیر پیوسته) و یا نوع ژل (ژل استات سلولز و یا ژل پلی‌آکریلامید) باشد که در اغلب مطالعات محققین مذکور، از ژل استات سلولز به علت ارزان‌تر و آسان تر بودن آن استفاده شده است، اما در مطالعه ما از ژل پلی آکریلامید استفاده شده است که گران تر بوده و در عین حال از قدرت تفکیک بیشتری برخوردار است. کورتادا (Cortada) و همکاران درسال۲۰۰۴ درآنالیز زایمودم‌های سویه‌های لیشمانیا شاگاسی در تعدادی از سگ‌های منطقه‌ای در برزیل از ۸ سیستم آنزیمی GPI, MDH, G6PD, 6PGD, NH, ME5, PEPD4 و IDHNADP با موفقیت استفاده کردند(۲۱). در مورد

Archive of SID

www.SID.ir

انگل‌های لیشمانیا حدود ۳۰ آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته و از میان آنها آنزیم‌های ME , MDH , 6PGD به علت سهولت رنگ‌آمیزی،(ALAT,ASAT (GOT به علت تنوع و GPI و PGM به علت فعالیت قویتر، شاخص‌تر بوده‌اند و محققین بیشتر، این آنزیم‌ها را انتخاب نموده‌اند(۲۲). در مطالعه حاضر، آنزیم‌های GPI و G6PD بیشترین هتروژنتی و آنزیم NH2 بیشترین هموژنیتی را در بین ایزوله‌های انسانی و حیوانی داشتند و لذا آنها را بعنوان آنزیم‌های اساسی در تفکیک سوش‌های متفاوت لیشمانیا اینفانتوم معرفی می‌نماییم و همچنین آنزیم PGM , MDH و GPI از آنزیم‌های بسیار فعال بودند که دارای قدرت بالایی در تفکیک سوش‌های لیشمانیا اینفانتوم مناطق جغرافیایی این مطالعه داشت. در سال ۱۹۹۹ در ایران، حاتم و همکاران با مطالعه‌ای روی ۴۰۷ نمونه جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی و با استفاده از ۱۱ سیستم آنزیمی، یک مورد لیشمانیا اینفانتوم را بعنوان مولد لیشمانیوز پوستی برای اولین بار از ایران گزارش نمودند(۲۳). جواهری و همکاران در سال ۲۰۰۱ در شهر مشهد، ۶ سیستم آنزیمی MDH , PGM , GPI , G6PD, NH1, NH2 ، را برای تفکیک گونه‌های مولد لیشمانیوز پوستی بکار بردند(۲۴). این روش هر چند امروزه بعنوان روشی بسیار دقیق مطرح است، چرا که امکان بررسی و مقایسه تا بیش از ۲۰ سیستم آنزیمی وجود دارد، اما روشی طولانی است و برای بررسی سیستم آنزیمی هر سویه حداقل به تعداد ۱۰۱۰ انگل در میلی‌لیتر محیط کشت احتیاج است و این امر در شناسایی بعضی سویه‌های کند رشد و تا حدی کم رشد مشکل ایجاد می‌کند(۲۵). یکی از مسیرهای متابولیکی در چرخه زندگی انگل لیشمانیا، مسیر گلیکولیز است که آنزیم‌های مربوط به آن و محل انجام آن در داخل ارگانلی متصل به غشا انگل به نام گلیکوزوم وجود دارد. بنابراین آشنایی با مسیرهای متابولیکی انگل و نحوه متابولیسم گلوکز و اسیدهای آمینه می‌تواند راهگشایی در یافتن هدف‌های مناسب جهت طراحی داروهای مناسب به منظور اختلال در فعالیت حیاتی انگل و در نهایت از بین بردن انگل باشد. همچنین شناسایی زایمودم غالب یک منطقه می‌تواند در تهیه واکسن مناسب جهت کنترل بیماری در یک منطقه راهگشا باشد(۱۴،۱۳). لازم به ذکر است که مطالعه حاضر، زمینه مناسب جهت بررسی خصوصیات فنوتیپی عوامل ایجادکننده بیماری لیشمانیوز احشائی در انسان، ناقلین و مخازن حیوانی را فراهم آورده است چرا که مطالعات قبلی که روی زایمودم‌های لیشمانیا اینفانتوم در شمال غرب کشور انجام گرفته است در کشورهای انگلستان (لندن) و فرانسه(مونته پلیر) بوده است و در کشور ما چنین مطالعه‌ای تاکنون انجام نشده است.

در مطالعه حاضر، آنزیم‌های گلوکز فسفات ایزومراز و گلوکز۶ فسفات دهیدروژناز بیشترین هتروژنیتی و نوکلئوزید هیدرولاز۲ بیشترین هموژنیتی را داشتند و همچنین آنزیم‌های فسفوگلوکوموتاز و گلوکز فسفات ایزومراز و مالات دهیدروژناز از آنزیم‌های بسیار فعال بودند. بطور کلی ۵ سیستم نامبرده را به عنوان سیستم‌های مناسب و برتر جهت تعیین هویت انگل‌های مولد لیشمانیوز احشائی و تفکیک سوش‌های مختلف لیشمانیا اینفانتوم در مناطق آندمیک ایران معرفی می‌نماییم.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری آقایان دکتر بهادر سرکاری، دکتر مهدی محبعلی، دکتر اسماعیل فلاح و دکتر عبدالصمد مظلومی بخاطر در اختیار گذاشتن بعضی از نمونه‌های انسان و حیوان از مناطق آندمیک کشور و آقای دکتر منبتی بخاطر بیوپسی مغز استخوان بیماران و پرسنل محترم بخش اطفال بیمارستان نمازی کمال تشکر و قدردانی را داریم. منابع مالی طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تامین گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Ardehali S, Rezaei H.R, Nadim A. Leishmania parasite and leishmaniosis. 2 ed. Tehran: Academic Publication Center; 1994. P 3-11. (Persian).
2. Fakhar M, Mohebali M, Barani M. Identification of endemic focus of kala-azar and seroepidemiological study of visceral Leishmania infection in human and canine in Qom Province, Iran. Armaghan-e-Danesh J 2004; 33: 43-52. (Persian).
3. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. Int J Parasitol 2005; 97: 1-12.
4. Adhya S.M, Chatterjee M.Q, Hassan S, Mukherjee S, Sen S. Detection of leishmania in blood of early kala-azar patients with the aid of polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 622-624.
5. WHO Expert Committee: Control of leishmaniasis. WHO Technical Report Series 793, WHO, Geneva Switzerland, 1990.
6. Klaus S, Frankenburg S.Cutaneous leishmaniasis in the Middle East. Clin Dermatol 1999; 17: 137-141.
7. Ardehali S, Moattari A, Hatam G.R, Hosseini S.M.H,Sharifi I.Characterization of Leishmania isolated in Iran: 1.Serotyping with species specific monoclonal antibodies. Acta Trop 2000; 75: 301-307.
8. Noyes HA, Belli AA, Maingon R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction primers for Leishmania identification. Am J Trop Med Hyg 1996; 55: 98-105.
9. Mebrahtu YB, Lawyer PG, Pamba H, et al. Biochemical characterization and zymodeme classification of Leishmania isolates from patients, vectors and reservoir hosts in Kenya. AM J Trop Med Hyg 1992; 47(6): 852-892.
10. Hatam G.R, Hosseini S.MH, Ardehali S. Isoenzyme studies in characterization of Leishmania isolated in Iran. Iranian J Med Sci 1999; 240(1&2): 8-13.
11. Evans DA. Handbook on isolation, characterization and cryoperservation of Leishmania,UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases(TDR) Geneva, Switzerland; 1989.
12. Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W.The molecular evolution of Trypanosomatidae. Adv Parasitol 2001; 48: 1-55.
13. Clavopina M, Armijos RX, Marco JD, Uezato H, Kato H, Gomes EA, et al. Leishmania isoenzyme polymorphism in Ecuador: relationships with geographical distribution and clinical presentation. Bio Med Infect Disease 2006; 6(139): 1-9.
14. Riox JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastient P,Perieres J.Taxonomy of Leishmania. Use of Isoenzymes. Suggestions for a new classification. Annal De Parasitol Hum Et Comp 1990; 65: 111-125.
15. Gallego M, Pratlong F, Fisa R, Riera C, Rioux JA, Dedet JP, et al. The life-cycle of Leishmania infantum Mon-77 in the priorat (catalonia, spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of L. Infantum zymodems in the old world. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95: 269-271.
16. Mazloumi Gavgani AS, Mohite H, Edrissian Gh, Mohebali M, Davies Cliver R. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with Leishmania infantum. Am J Trop Med Hyg 2002; 67(5): 511-512.
17. Awadalla HN, Mansour NS, Mohareb EW. Further characterization of Leishmania isolated from children with Visceral infection in

Archive of SID

www.SID.ir

Alexandria area Egypt. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987; 81(6): 915-917.

18. Okot-Kotber B.M, Mutinga M.J, Kaddu J.B. Biochemical characterization of Leishmania spp isolated from man and wild animals in Kenya. Inter J Parasitol 1989; 19(6): 657-663.
19. Gramiccia M,Gradoni L,Di Martino L, Romano R, Ercolini D. Tow synoptic zymodemes of L. infantum cause human and canine VL in the Naples area Italy. Acta Trop 1992; 50: 357-359.
20. Rezanezhad H. Characterization of Leishmania parasites isolated from cutaneous leishmaiasis patients and its relation with parasite virulence rate via in vitro in Fars Province. MSc thesis, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, 2005. (Persian).
21. Cortada V.M.C.L, Doval M.E.C, Sousalima M.A.A.A, Oshiro E.T, Meneses C.R.V, Abreu-Silva A.L, et al. Canine visceral leishmaniasis in Anastacio, Mato Grosso do sul state, Brazil. Vet Research Communic 2004; 28: 365-374.
22. Hatam G.R. Characterization of Leishmania parasites using isoenzyme electrophoresis. Ph.D thesis, School of Medicine, Tarbiat-Modares University. 1996 (Persian).
23. Hatam G.R. Superior enzymatic systems for identification of causative agents of cutaneous leishmaniasis in Iran. Med Res J 2003; 1(9): 1-3 (Persian).
24. Javaheri A. Characterization of Leishmania parasites spp by isoenzyme electrophoresis. MSc thesis, School of Medicine, Mashad University of Medical Sciences, 2001 (Persian).
25. Mikhail EM, Mansour NS, Mohareb EW, Francies WM. Identification of a misleading trypanosomatid parasite from Gerbilus pyramidum and G. andersoni, in a Leishmania endemic area in North Sinai. J Parasitol 1996; 82: 400-404.

Archive of SID

www.SID.ir