جداسازی زایمودم I انتامبا دیسپار به روش ایزوآنزیم در ایران

*[1]دکترعلی حقیقی، [2] دکتر مصطفی رضائیان

تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۹
تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۰/۲۲

چکیده

هدف

تشخیص افتراقی دو تک یاخته کاملا مشابه انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار از نظر بهداشت عمومی و به منظور تصمیم گیری جهت درمان بیماران در تک یاخته شناسی پزشکی اهمیت بسیار دارد. در سالهای اخیر روش بیوشیمیایی ایزوآنزیم با استفاده از دو آنزیم هگزوکیناز و فسفوگلوکوموتاز به طور وسیعی جهت افتراق انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار استفاده شده است و همچنان به عنوان روش استاندارد مرجع برای تمایز این دوگونه مطرح است. این مطالعه با هدف تعیین الگوی ایزوآنزیمی ایزوله های انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار در ایران انجام گرفت.

مواد و روش کار

دو ایزوله آمیب از ایران با استفاده از چهار آنزیم: گلوکز فسفات ایزومراز(GPI)، فسفوگلوکوموتاز (PGM)، مالیک آنزیم (ME) و هگزوکیناز (HK) و در کنار چهار سویه استاندارد با الگوی مشخص ایزوآنزیم تعیین گونه شدند.

نتایج

هر دو سویه بر روی ژل الکتروفورز الگوی زایمودم I انتامبا دیسپار را نشان دادند. پس از اینکه سویه های گزنیک (همراه با باکتری) در محیط اختصاصی و غنی شده آگزنیک (خالص و عاری از باکتری) شدند، مجددا ایزوآنزیم شده و الگوی آنها بدون هیچگونه تغییری زایمودم I تعیین شد.

نتیجه گیری

این مطالعه وجود زایمودم I انتامبا دیسپار در ایران را اعلام می نماید. با توجه به نتیجه این مطالعه و مطالعه دیگری که بر روی ۸ نمونه دیگر صورت گرفت و همه الگوی زایمودم I داشتند، می توان پیش بینی نمود که به احتمال زیاد اغلب ایزوله های انتامبا دیسپار در ایران زایمودم I که الگوی غالب در جهان است، باشند.

کلمات کلیدی: ایزوآنزیم، زایمودم، انتامبا دیسپار، کشت گزنیک، کشت آگزنیک.

۱- استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۳۸۷۲۵٦٤، نمابر: ۲۲٤۰۰٦۸۱، alihaghi2000@yahoo.com
۲- استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تخمین زده می شود که قریب ۱۰٪ مردم جهان سالانه آلوده به دو تک یاخته انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار می شوند که از نظر شکل ظاهری با میکروسکوپ نوری کاملا مشابه یکدیگر می باشند. مطالعات انجام شده نشان داده است که اکثر افراد به گونه غیر بیماریزای انتامبا دیسپارمبتلا می باشند و آلودگی به گونه بیماریزای انتامبا هیستولیتیکا کمتر از ۱۰٪ از مبتلایان را شامل می شود (۱، ۲). در سالهای اخیر برای افتراق این دو گونه از یکدیگر روشهای متعدد ملکولی، سرولوژیکی و بیوشیمیایی ابداع و استفاده شده است. روش بیوشیمیایی ایزوآنزیم که اولین بار در سال ۱۹۶۸ برای انتامبا هیستولیتیکا به کار برده شد(۳) و از سال ۱۹۷۸ با مطالعات وسیع Sargeaunt و همکارانش در سراسر جهان و در طی دو دهه هزاران ایزوله آمیب مطالعه شد، به عنوان روش استاندارد مرجع افتراقی مطرح است (۴ ، ۵). روش آنالیز زایمودمها که مبنای اصلی و اساسی اعلام نهایی تفاوت بیولوژیک دو گونه مشابه انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار توسط Diamond و Clark در سال ۱۹۹۳ (۶) و سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۹۷ شد (۱)، به عنوان دقیقترین روش افتراق دوگونه و تنها روش جهت تعیین زایمودمهای مختلف هر دو گونه می باشد (۵). در این مطالعه برای اولین بار در ایران دو سویه از انتامباهیستولیتیکا/ انتامبا دیسپار، با استفاده از چهار آنزیم در کنار چند ایزوله استاندارد و با الگوی مشخص، آنالیز و تعیین زایمودم شدند.

مواد و روش کار

سویه های مورد بررسی: دو سویه آمیب با نام: AS 2 IR که از یک حامل کیست درکازرون جداشده بود و AS 16 IR که در نمونه مدفوع بیماری با علائم گوارشی در مرکز طبی کودکان مشاهده شد، ایزوآنزیم و تعیین گونه شدند. هر دو سویه ابتدا در محیط رابینسون کشت شدند (۷). در شرایط کشت گزنیک (همراه با باکتری) ، در کنار این دو سویه از چهار سویه استاندارد: SAW1734RclAR (زایمودم I انتامبا دیسپار از اسرائیل)، IWASAKI (زایمودم I انتامبا دیسپار از اندونزی)، SAW755CRclB (زایمودم XIV انتامبا هیستولیتیکا از مصر) و CYNO 09:TPC (زایمودم III انتامبا دیسپار از میمون) به عنوان کنترل استفاده شدند. پس از آنکه هر دو سویه در محیط YIGADHA-S بدون وجود هیچگونه ارگانیزم دیگری آگزنیک شدند (۸)، مجدداً در کنار سویه های استاندارد آگزنیک و با الگوی مشخص : HK-9 (زیمودم II انتامبا هیستولیتیکا از امریکا)، SAW1627 (زایمودم α II انتامبا هیستولیتیکا از هند) ، HM-1:IMSS cl6 (زایمودم II انتامبا هیستولیتیکا از مکزیک) و CYNO 16:TPC (زایمودم I انتامبا دیسپار از میمون) ایزوآنزیم شدند.

کشت آمیبها: نمونه های مدفوع حاوی کیست یا تروفوزوئیت آمیبهای مثبت و یا مشکوک به انتامبا هیستولیتیکا و یا انتامبا دیسپار در محیط گزنیک رابینسون کشت داده شدند (۷). پس از تکثیر تروفوزوئیت آمیبها در محیط کشت، با هفته ای ۳ بار پاساژ سویه های مثبت نگهداری می شدند. دوسویه AS 2 IR و AS 16 IR در محیط رابینسون به ژاپن منتقل و ابتدا در محیط YIGADHA-S در کنار کریتیدیا فاسیکولاتا منوگزنیک و سپس با حذف کریتیدیا آگزنیک شدند (۸). نمونه های آگزنیک انتامبا هیستولیتیکا در محیط TYI-S-33 (۹) ، نمونه های گزنیک انتامبا دیسپار در محیط رابینسون و نمونه های آگزنیک انتامبادیسپاردر محیط اختصاصی YIGADHA-S پاساژ و نگهداری می شدند.

لیز آمیب: محیط کشت حاوی ۵×۱۰^{۴} یا بیشترآمیب در هر میلی لیتر محیط کشت برای آزمایش مناسب است (۵). فاز مایع محیط کشت به لوله سانتریفوژ منتقل و در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می شود. مایع رویی را دور ریخته و به رسوب ۸ تا ۱۰ میکرولیتر مواد ثبات دهنده آنزیم (enzyme stabilizers) شامل: دی تیوتریتول (Dithiothritol) ، آمینوکاپروئیک اسید(e –aminocaproic acid) واتیلن دی آمینوترا استیک اسید (ethylene diaminotetra-acetic acid) با غلظت ۱ mM اضافه می شود. با چند بار انجماد و ذوب (Freeze & Thaw) سلولها لیزو آنزیمها آزاد می شوند. سپس نمونه در۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می شود و از مایع رویی جهت آزمایش استفاده می گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

آنزیمهای مورد بررسی: جهت تعیین الگوی ایزوآنزیمی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار از چهار آنزیم استفاده می شود (۵):

هگزوکیناز (hexokinase, HK)

فسفوگلوکوموتاز (phosphoglucomutase, PGM)

مالیک آنزیم (L-malate:NADP+ oxidoreductase, ME)

گلوکزفسفات ایزومراز (glucosephosphate isomerase, GPI)

بندهایی که در الکتروفورز این آنزیمها مشاهده می شود با علائم α ، β ، δ و γ نشان داده می شوند.

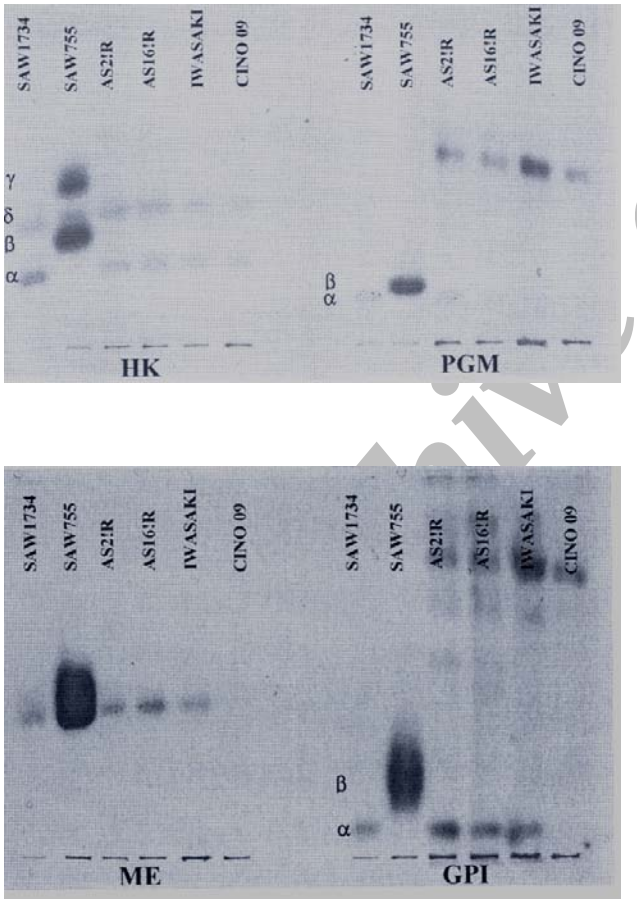
الکتروفورز آنزیمها: الکتروفورز با استفاده از پلیتهای حاوی ژل نشاسته (Starch gel) طبق روش سرژنت و همکارانش انجام گرفت و برای تعیین زایمودمهای سویه های مورد بررسی از الگوی استاندارد سرژنت استفاده شد (۵).

بر اساس الگوی سرژنت، همه سویه های انتامبا هیستولیتیکا با PGM باند β و سویه های انتامبا دیسپار باند α دارند. زایمودم XIV انتامباهیستولیتیکا در GPI باند β و زایمودم XIX باند α ، β و یک باند ما بین آن دو دارند و بقیه زایمودمها باند α دارند. هگزوکیناز(HK) در همه سویه های انتامبا هیستولیتیکا باند β و γ نشان می دهد، در حالی که در انتامبا دیسپار باند α و δ دارد. مالیک آنزیم (ME) در همه سویه های انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار یک باند یکسان دارد، ولی در بقیهٔ آمیبهای انسانی و حیوانی باند متفاوت نشان می دهد. لذا از روی حرکت آنزیمهای PGM و HK در روی ژل الکتروفورزیس اختلاف انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار و زایمودمهای مختلف انتامبا دیسپار مشخص می شود. با GPI زایمودمهای انتامبا هیستولیتیکا تعیین می گردند.

نتایج

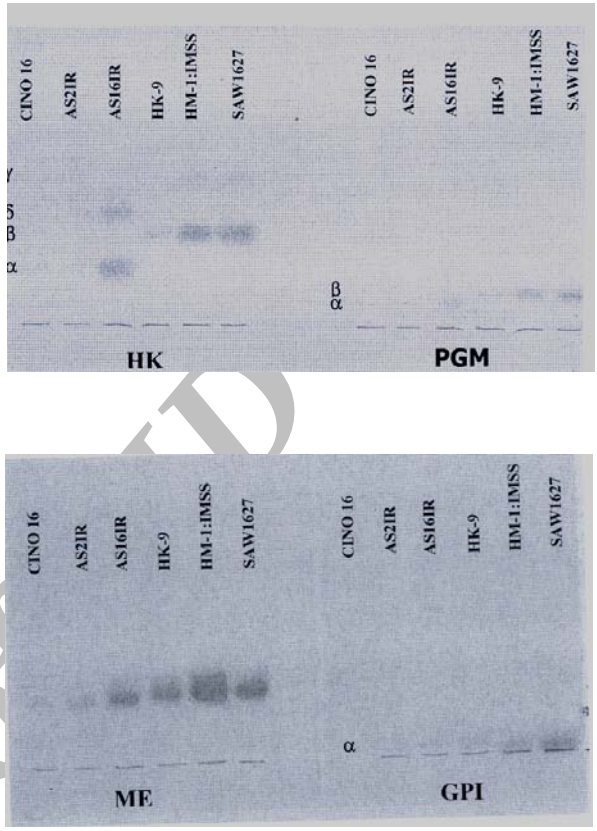
الگوی زایمودمی سویه های ایرانی AS 2 IR و AS 16 IR در شرایط کشت گزنیک (کشت آمیب توأم با باکتری ناشناخته) در محیط رابینسون، در کنار چهار سویه با الگوی ایزوآنزیمی مشخص تعیین شد (شکل ۱). برای هر دو سویه درآنزیم HK باند α و δ و در PGM باند α مشاهده شد. در گلوکز فسفات ایزومراز (GPI) همانند سویه های استاندارد انتامبا دیسپار باند α داشتند و با مالیک آنزیم در همه سویه ها یک باند یکسان دیده شد. لذا دو سویه ایرانی زایمودم I انتامبا دیسپار شناخته شدند.

با توجه به برخی نظریه ها که انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار پس از کشت آگزنیک (کشت خالص بدون حضور هیچ ارگانیزم دیگری)، از نظر ایزوآنزیم تغییر الگو می دهند، هر دو سویه در محیط اختصاصی YIGADHA-S آگزنیک شدند. زایمودمها پس از کشت آگزنیک در کنار چهار سویه استاندارد دیگر آنالیز و نتیجه کاملا مشابه و بدون هیچ تغییر همان زایمودم I تعیین شد (شکل ۲).



شکل ۱: الگوی الکتروفورتیکی دو سویه AS 2 IR و AS 16 IR در شرایط کشت گزنیک بر روی ژل نشاسته در کنار چهار سویه با الگوی مشخص و با استفاده از چهارآنزیم: هگزوکیناز(HK)، فسفوگلوکوموتاز(PGM) ، مالیک آنزیم (ME) و گلوکز فسفات ایزومراز (GPI).

www.SID.ir



شکل ۲: الگوی الکتروفورتیکی دو سویه AS 2 IR و AS 16 IR پس از کشت آگزنیک بر روی ژل نشاسته در کنار چهار سویه با الگوی مشخص با استفاده از چهار آنزیم: هگزوکیناز(HK)، فسفوگلوکوموتاز(PGM) ، مالیک آنزیم (ME) و گلوکز فسفات ایزومراز (GPI).

بحث و نتیجه گیری

با مشاهده خصوصیات حرکت ایزوآنزیمی زایمودمهای آمیبها می توان گونه های مختلف انتاماها را از هم متمایز نمود (۵). این روش به خصوص در افتراق دو گونه انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار اهمیت ویژه ای دارد. در حالی که یکی پاتوژن است و قادر است بیماری شدید روده ای توأم با اسهال خونی و آمیبیازیس خارج روده ای با مرگ و میر سالانه حدود ۵۰ تا ۱۰۰ هزار مورد در جهان ایجاد کند، دیگری (انتامبا دیسپار) با میزان شیوع تا ۱۰ برابر نسبت به انتامبا هیستولیتیکا غیر بیماریزا است و نباید درمان شود (۱، ۲، ۱۰).

بررسی الگوی ایزوآنزیمی جهت تعیین گونه های تک یاخته های مختلف یکی از روشهای دقیق در سطح جهان است که برای شناسایی و طبقه بندی تک یاخته ها ازجمله: لیشمانیاها، تریپانوزومها، تریکوموناسها و ژیاردیا کاربرد و اهمیت ویژه ای دارد (۵، ۱۱). تعیین الگوی ایزوآنزیمی گونه های تک یاخته ها در بسیاری از کشورهای جهان برای طبقه بندی و شناسایی فنوتیپهای تک یاخته ها انجام گرفته یا می گیرد. استفاده از این روش برای شناسایی گونه های لیشمانیا در ایران گزارش شده است (۱۱) و مطالعه حاضر وجود زایمودم I انتامبا دیسپار در ایران را اعلام می نماید. این مطالعه برای اولین بار جهت تعیین الگوی ایزوآنزیمی سویه های ایرانی انجام گرفت. هرچند ابتدا تنها ۲ ایزوله از آمیب آنالیز و زایمودم I انتامبا دیسپار شناسایی شدند، ولی با توجه به مطالعه ای که متعاقب این بررسی بر روی ۸ نمونه دیگر صورت گرفت و همه الگوی زایمودم I داشتند (۱۲)، می توان پیش بینی نمود که غالب ایزوله های انتامبا دیسپار در ایران زایمودم I که الگوی غالب در جهان است می باشند. در عین حال برخلاف گزارشات تأیید نشده برخی محققین مبنی بر تغییر در الگوی ایزوآنزیمی پس از کشت آگزنیک (۱۳،۱۴)، در این بررسی در حرکت آنزیمها در هر دو شرایط کشت گزنیک و آگزنیک ثبات مشاهده شد که تأییدی بر نظریه ثابت بودن حرکت آنزیمها در الکتروفورز پس از کشت آگزنیک است (۱۵) .

تشکر و قدردانی

شایسته است از زحمات دکتر سیکی کوبایاشی و پروفسور تسوتومو تاکئوچی از گروه بیماریهای گرمسیری دانشگاه کیو ژاپن که در آموزش روشها، کمک به انجام کشت آگزنیک دو سویه آمیب و همچنین اجرای روش ایزوآنزیم همکاری داشتند تشکر شود. همچنین از زحمات بی دریغ خانم شهره فرنیا از گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران در جداسازی ایزوله های آمیب و کمک در نگهداری آنها در محیط گزنیک سپاسگزاری می شود.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. WHO News and activities, 1997, Entamoeba taxonomy, Bulletin of the World Health Organization, 75(3), Report No. 5779, 291-292.
2. Clark C. G., 2000, The evaluation of Entamoeba, a cautionary tale, Res. Microbiol., 151: 599-603.
3. Reeves R. E., Bischoff J. M., 1968, Classification of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes, J. of Parasitology, 54: 594-600.
4. Sargeaunt P. G., Williams J. E., 1979, Electrophoretic isoenzyme pattern of pathogenic and nonpathogenic intestinal amoeba in man, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 13: 225-227.
5. Sargeaunt P. G., Zymodemes of *Entamoeba histolytica* In: Ravdin J. I. (ed). Amoebiasis, Human Infection by *Entamoeba Histolytica*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1988, 370-387.
6. Diamond L. S., Clark C. G., 1993, A rediscription of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from E. diaper Brumpt 1925, J. Euk. Microbiol., 40: 340-344.
7. Robinson G. L., 1968, The laboratory diagnosis of human parasitic amoeba, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 62: 285-294.
8. Kobayashi S., Imai E., Haghighi A., Tachibana H., Takeuchi T., 2000, Cultivation of *Entamoeba dispar*: growth-promoting effect of ferredoxin, Arch. Med. Res., 31(4 Suppl): S210-1.
9. Diamond L. S., Harlow D. R., Cunnick C. C., 1978, A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72: 430-432.
10. Gonin P., Trudel L., 2003, Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, J. Clin. Microbiol., 41: 237-241.
11. Hatam G. R., Hosseini S. M. H., Ardehali S., 1999, Isoenzyme studies in characterization of leishmania isolated in Iran, Iran. J. Med. Sci., 24: 8-13.
۱۲. هوشیار حسین، رضائیان مصطفی، کاظمی بهرام، حقیقی علی، تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار (ایزوله های تهران) با روش PCR-RFLP، نشریه پزشکی یاخته، سال چهارم، شماره ۱۳، ۱۳۸۱، ۱۵- ۱۱
13. Mirelman D., Bracha A., Wexler A., Chayen A., 1986, Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization, Infect. Immun, 54: 827-32.
14. Vargas M. A., Orozco E., 1993, *Entamoeba histolytica*: Changes in the zymodeme of cloned nonpathogenic trophozoites culture under different conditions, Parasitol. Res., 79: 535-536.
15. Jackson T. F., Suparsad S., 1997, Zymodeme stability of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*, Arch. Med. Res., 28: 304-5.

Archive of SID

www.SID.ir