

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

مهدی فخار<sup>۱</sup>، فتنه میکائیلی<sup>۲</sup>، غلامرضا حاتم<sup>۳</sup>، حمد حسین معتضدیان<sup>۴</sup>، پروانه حبیبی<sup>۵</sup>، اسماعیل فلاح<sup>۶</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری لیشمانیوز احشائی (کالا آزار) از جمله بیماری های انگلی قابل انتقال بین انسان و حیوان است که توسط انگل های کمپلکس لیشمانیا دونوانی ایجاد می شود. هدف از این مطالعه کاربرد سیستم های مختلف آنزیمی در تفکیک گونه ها و سویه های عامل لیشمانیوز احشائی می باشد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، سویه مرجع لیشمانیا اینفانتوم، سویه مرجع لیشمانیا ماژور و سویه لیشمانیا تروپیکا به همراه انگل های لیشمانیا جدا شده از مغز استخوان بیماران مبتلا به کالا آزار و انگل های 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 انبوه سازی و بعد از جمع آوری از محیط کشت، عصاره گیری شد و سپس با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی آکرلامید به روش غیر پیوسته، شش سیستم آنزیمی گلوکز فسفات ایزومراز، فسفوگلوکوموتاز، مالات دهیدروژناز، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز، ۶ فسفو گلوکونات دهیدروژناز و نوکلئوزید هیدرولاز ۲ به منظور تفکیک گونه و سوش انگل های بدست آمده و یافتن سیستم های مناسب تر جهت تفکیک آنها در مقایسه با سویه های مرجع مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته ها:** پروفیل ایزوآنزیم های ۶ سیستم آنزیمی معرفی شده برای نمونه های جدا شده از بیماران و مخازن لیشمانیوز احشائی با یکدیگر و سویه مرجع مقایسه شدند و مهاجرت نسبی کلیه باندهای ایزوآنزیمی هرنمونه در سیستم های مورد بررسی محاسبه گردید و مشخص شد که تنها پنج سیستم آنزیمی توانایی تفکیک گونه های مختلف انگل را از یکدیگر می باشند.

**استنتاج:** در مطالعه حاضر، آنزیم های گلوکز فسفات ایزومراز و گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز بیشترین هتروژنیته و نوکلئوزید هیدرولاز ۲ بیشترین هموژنیته را داشتند و همچنین آنزیم های فسفوگلوکوموتاز و گلوکز فسفات ایزومراز و مالات دهیدروژناز از آنزیم های بسیار فعال بودند.

**واژه های کلیدی:** لیشمانیوز احشائی، الکتروفورز ایزوآنزیم، ژل پلی آکرلامید

## مقدمه

بیماری لیشمانیوز از جمله بیماری های انگلی قابل انتقال بین انسان و حیوان است که توسط تک یاخته ای از جنس

لیشمانیا ایجاد می شود. سه نوع اصلی بیماری شامل لیشمانیوز پوستی (سالک)، لیشمانیوز احشائی (کالا آزار) و لیشمانیوز

**مؤلف مسئول:** دکتر مهدی فخار - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی

E-mail: mahdif53@yahoo.com

۱. دکتری انگل شناسی پزشکی، استادیار دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. دانشجوی دکتری انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل شناسی

۳. دکتری انگل شناسی، دانشیار دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۴. دکتری 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. دکتری 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

گوناگون آنزیمی (۹) از دقیق ترین روش های مورد استفاده در این زمینه است و در این میان استفاده از روش مقایسه ایزوآنزیم ها، به علت توان بسیار بالا در تشخیص گونه ها و حتی سویه های گوناگون یک گونه، از اهمیت زیادی برخوردار است (۵).

بنابراین به منظور صرفه جویی در وقت و هزینه تلاش شده است تا سیستم های آنزیمی مناسب تر برای تشخیص گونه ها و سویه های گوناگون منطقه شناسایی و معرفی شوند لذا هدف از این مطالعه کاربرد سیستم های مختلف آنزیمی برای تفکیک گونه ها و سویه های عامل لیشمانیوز احشائی و معرفی سیستم های برتر به منظور صرفه جویی در وقت و هزینه می باشد.

## 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 انگل های لیشمانیا جدا شده از مغز استخوان بیماران مبتلا به کالازار از استان های فارس (۲ مورد)، کهگیلویه و بویراحمد (۱ مورد) و آذربایجان شرقی (۱ مورد) و انگل های جدا شده از احشاء 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 محیط های کشت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد جهت رشد انگل تا میزان مورد نیاز نگهداری شدند و پس از رسیدن حجم کشت ها به اندازه مورد نظر و قرار گرفتن پروماستیگوت ها در پایان مرحله رشد لگاریتمی، به منظور تهیه رسوب از انگل ها، آنها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد و با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ نموده و پس از حذف مایع رویی، رسوب بدست آمده ۳ بار با بفر نمکی فسفات سرد شستشو شد. سپس ماده پایدارکننده آنزیم (۱ میلی مولار آمینو کاپرویک اسید،

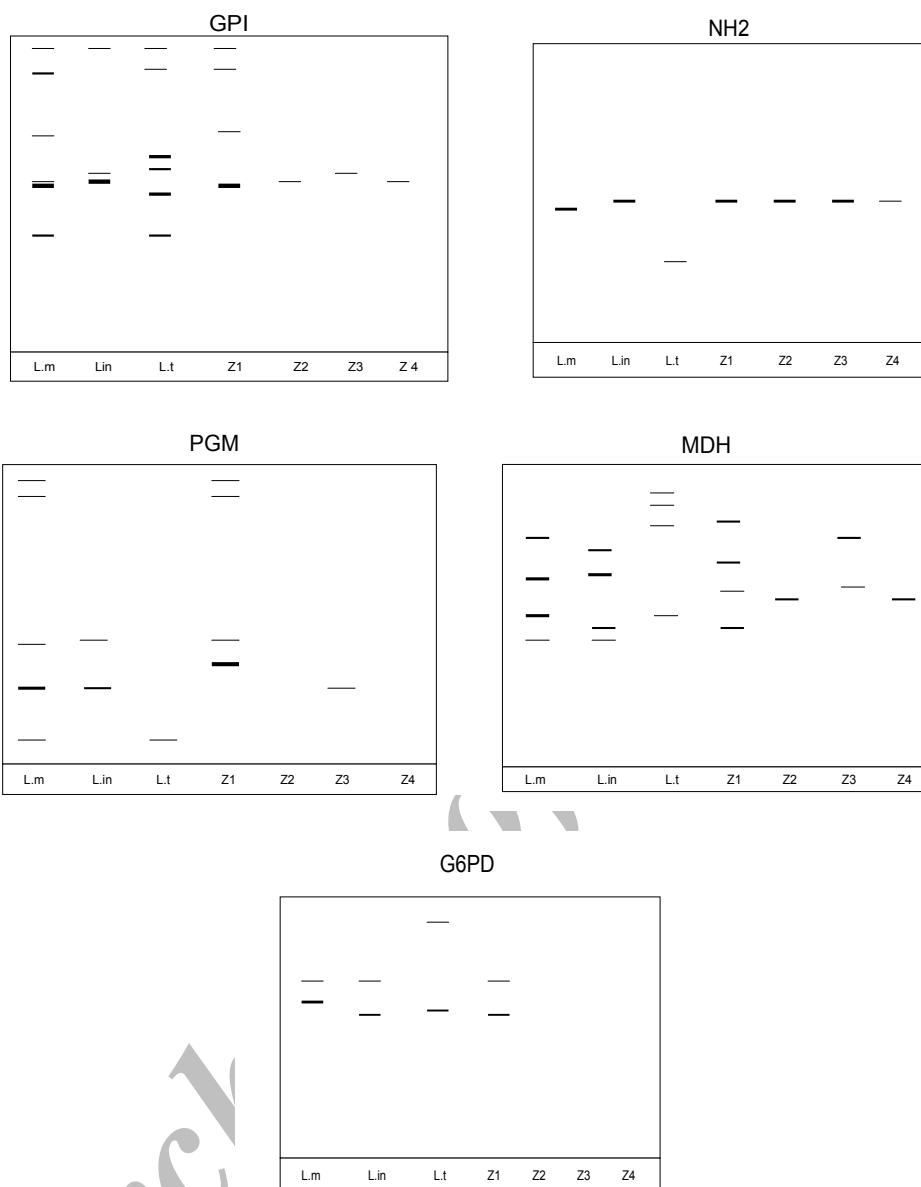
جلدی مخاطی است) (۱). نوع احشایی بیماری یا کالازار در بیشتر مناطق ایران بصورت اسپورادیک (تک گیر) و در مناطقی از استان های اردبیل (مشکین شهر، دشت مغان)، آذربایجان شرقی (اهر و کلیبر)، فارس (فیروزآباد، جهرم و نورآباد)، بوشهر (بrazجان و خورموج)، قم (بخش خلیجستان) بصورت آندمیک دیده می شود (۲). لیشمانیوز احشایی (کالازار) در حدود ۶۶ کشور جهان شیوع دارد و میزان بروز سالانه آن در دنیا ۵۰۰ هزار نفر تخمین زده می شود (۳). عامل اصلی بیماری کالازار در منطقه وسیع حوزه مدیترانه و از جمله ایران لیشمانیا اینفانتوم (*Leishmania infantum*) است. کالازار در ایران اغلب در کودکان و بیشتر در بین روستائیان دیده می شود. مخازن این بیماری در ایران شامل سگ و سگ سانان (روپاه و شغال) بوده و ناقلین آنرا گونه های مختلف پشه خاکی از جمله گونه غالب در ایران فلوتوموس ماژور (*Phlebotomus major*) تشکیل می دهد. علائم اصلی بیماری شامل تب، اسپنومگالی و کم خونی است و یافته های آزمایشگاهی غیر طبیعی بیماری عبارتند از پان سائتوپنی، 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 محیط کشت به شکل تاژک دار یا پروماستیگوت دیده می شود. 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 سویه ها جهت انجام هر گونه برنامه ریزی برای کنترل و پیشگیری، مبارزه با مخازن و ناقلین، ساخت واکسن و فراهم کردن پادتن برای تشخیص و درمان (۵، ۶)، استفاده از پادتن های تک دودمانی (*Monoclonal Antibodies*) (۷)، واکنش زنجیره ای پلیمرز (*Polymerase Chain Reaction*) (۸) و مقایسه ایزوآنزیم های انگل با بهره جویی از سیستم های

۱ میلی مولار دی تیوتریتول و ۱ میلی مولار اتیلن دی آمین تترا 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 ۳۰۰۰ g 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 غیر پیوسته 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 جدا کننده 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 هیدرولاز ۲ (NH2) E.C.3.2.2.1، ۶ فسفو گلو کونات دهیدروژناز (6PGD) E.C.1.1.1.44 و فسفو گلو کو 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 رنگ آمیزی اختصاصی هر سیستم بر پایه روش اوانس (۱۹۸۹) انجام گرفت (۱۱،۱۰).

## یافته ها

پروفیل ایزوآنزیم‌های ۶ سیستم آنزیمی گلوکز فسفات ایزومراز، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز، مالات دهیدروژناز، نوکلئوزید هیدرولاز ۲، ۶ فسفو گلو کونات دهیدروژناز و فسفو گلو کو موتاز برای نمونه‌های جدا شده از بیماران و مخازن مبتلا به لیشمائیوز احشایی

مقایسه شد و مهاجرت نسبی کلیه باندهای ایزوآنزیمی هر نمونه در سیستم‌های مورد بررسی، محاسبه شد. در سیستم گلوکز فسفات ایزومراز، سویه مرجع لیشمائیا ماژور ۶ باند با مهاجرت نسبی ۰/۰۴، ۰/۱۲، ۰/۳۲، ۰/۴۸، ۰/۵، ۰/۶۶ و سویه لیشمائیا 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 لیشمائیا اینفانتوم ۳ باند با مهاجرت نسبی ۰/۰۴، ۰/۴۶ و ۰/۴۸ مشاهده شد. در سیستم گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز، در لیشمائیا ماژور دو باند با مهاجرت نسبی ۰/۳۴ و ۰/۴ و در لیشمائیا تروپیکا دو باند با مهاجرت نسبی ۰/۱ و ۰/۴۴ ملاحظه گردید و در لیشمائیا اینفانتوم دو باند ۰/۳۴ و ۰/۴۶ ملاحظه شد. در بررسی سیستم آنزیمی مالات دهیدروژناز سویه مرجع لیشمائیا ماژور چهار باند به ترتیب با مهاجرت نسبی ۰/۲۵، ۰/۳۸، ۰/۵ و ۰/۵۸ و سویه لیشمائیا تروپیکا چهار باند با مهاجرت نسبی ۰/۱، ۰/۱۳، ۰/۲۱ و ۰/۵ را نشان دادند، در حالیکه باندهای سویه مرجع لیشمائیا اینفانتوم مهاجرت نسبی ۰/۲۸، ۰/۳۶، ۰/۵۳ و ۰/۵۸ را نشان دادند. در سیستم نوکلئوزید هیدرولاز ۲ در لیشمائیا ماژور یک باند با مهاجرت نسبی ۰/۵۳ و در لیشمائیا تروپیکا یک باند با مهاجرت نسبی ۰/۷ ملاحظه شد و در لیشمائیا اینفانتوم یک باند ۰/۵ ملاحظه شد. در بررسی سیستم آنزیمی فسفو گلو کو موتاز، سویه مرجع لیشمائیا ماژور پنج باند به ترتیب با مهاجرت نسبی ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۶، ۰/۷۵ و ۰/۹۱ و سویه لیشمائیا تروپیکا یک باند با مهاجرت نسبی ۰/۹۱ را نشان دادند و در لیشمائیا اینفانتوم دو باند با مهاجرت نسبی ۰/۵۸ و ۰/۷۵ ملاحظه شد (شکل شماره ۱). لازم به ذکر است که در این مطالعه سیستم آنزیمی ۶ فسفو گلو کونات دهیدروژناز بدلیل نامناسب بودن باندهای ایجاد شده و عدم تفسیر و مقایسه آن با سویه مرجع، بعنوان آنزیم نامناسب در شرایط این مطالعه معرفی می گردد. بطور کلی در این مطالعه ۴ پروفیل زایمومدی برای انگل‌های لیشمائیا اینفانتوم بدست آمده از انسان و سگ در مقایسه با گونه مرجع مشخص شدند.



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

### بحث

از آنجاییکه جنس لیشمانیا هموزن تر از جنس تریپانوزوم می باشد، لذا استفاده از تکنیکی با قدرت تفکیک بالا برای تجزیه و تحلیل فیلوژنی گونه های لیشمانیا مورد نیاز است، بنابراین استفاده از روش الکتروفورز ایزوآنزیم ضروری بنظر می رسد. استفاده از الکتروفورز ایزوآنزیم ها در سال ۱۹۷۰ میلادی معرفی و

در مطالعه حاضر، آنزیم های گلوکز فسفات ایزومراز و گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز دارای بیشترین هتروژنیته و نوکلئوزید هیدرولاز دارای بیشترین هموزنیته بودند و همچنین آنزیم های فسفوگلوکوموتاز و گلوکز فسفات ایزومراز و مالات دهیدروژناز فعالیت بسیار بالایی از خود نشان داده و قوی تر ظاهر شدند.

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 در تفکیک سویه‌های مزبور رد کردند (۱۸). مطالعه ما نیز سیستم آنزیمی ۶ 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 MDH, G6PD, 6PGD, GPI, PGM, 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 در سال ۱۹۸۹ 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 از نوع سیستم به کار رفته (پیوسته یا غیر پیوسته) و یا نوع ژل (ژل استات سلولز و یا ژل پلی آکریلامید) باشد که در اغلب مطالعات محققین مذکور، از ژل استات سلولز به علت ارزان‌تر و آسان‌تر بودن آن استفاده شده است، اما در مطالعه ما از ژل پلی آکریلامید استفاده شده است که گران‌تر بوده و در عین حال از قدرت تفکیک بیشتری برخوردار است. کورتادا (Cortada) و همکاران در سال ۲۰۰۴ در آنالیز زایموم‌های سویه‌های لیشمانیا شاگاسی در تعدادی از سنگ‌های منطقه‌ای در برزیل از ۸ سیستم آنزیمی GPI, MDH, G6PD, 6PGD, NH, ME5, PEPD4 و IDHNADP با موفقیت استفاده کردند (۲۱). در مورد

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 زایموم از لیشمانیا اینفانتوم توسط محققین شرح داده شده و توانسته است ارتباط محدودی بین زایموم‌ها و آسیب‌شناسی انگل مشاهده نمایند (۱۳، ۱۴). زایموم Mon-1 لیشمانیا اینفانتوم شایع‌ترین زایموم 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 زایموم Mon-1 و Lon-49 برای لیشمانیا اینفانتوم شناسایی شده است، که زایموم Lon-49 معادل Mon-1 می‌باشد و در حقیقت این دو زایموم با یکدیگر یکسان هستند (۱۶). گونه‌های مختلف لیشمانیا و حتی زایموم‌های یک گونه می‌توانند طیف وسیعی از علایم بالینی را از خود نشان دهند، از جمله زایموم Mon-1 لیشمانیا اینفانتوم که عامل اصلی و شایع کالآزار در منطقه مدیترانه و جنوب آمریکا است، در موارد زیادی از ضایعات پوستی جدا شده است (۱۲)، بنابراین زایموم‌های مختلف یک گونه می‌توانند پاتوژنیسیته (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 زایموم‌های 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 پراکنندگی جغرافیایی

آزمینه می تواند راهگشایی در یافتن هدف های مناسب جهت طراحی داروهای مناسب به منظور اختلال در فعالیت حیاتی انگل و در نهایت از بین بردن انگل باشد. همچنین شناسایی زایمومد غالب یک منطقه می تواند در تهیه واکسن مناسب جهت کنترل بیماری در یک منطقه راهگشا باشد (۱۳، ۱۴). لازم به ذکر است که مطالعه حاضر، زمینه مناسب جهت بررسی خصوصیات فنوتیپی عوامل ایجاد کننده بیماری لیشمانیوز احشائی در انسان، ناقلین و مخازن حیوانی را فراهم آورده است چرا که مطالعات قبلی که روی زایمومد های لیشمانیا اینفانتوم در شمال غرب کشور انجام گرفته است در کشورهای انگلستان (لندن) و فرانسه (مونت پلیر) بوده است و در کشور ما چنین مطالعه ای تاکنون انجام نشده است.

در مطالعه حاضر، آنزیم های گلوکز فسفات ایزومراز و گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز بیشترین هتروژنیته و نوکلئوزید هیدرولاز ۲ بیشترین هموزنیته را داشتند و همچنین آنزیم های فسفو گلو کوموتاز و گلوکز فسفات ایزومراز و ملات دهیدروژناز از آنزیم های بسیار فعال بودند. بطور کلی ۵ سیستم نامبرده را به عنوان سیستم های مناسب و برتر جهت تعیین هویت انگل های مولد لیشمانیوز احشائی و تفکیک سوش های مختلف لیشمانیا اینفانتوم در مناطق آندمیک ایران معرفی می نمایم.

## سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری آقایان دکتر بهادر سرکاری، دکتر مهدی مجعلی، دکتر اسماعیل فلاح و دکتر عبدالصمد مظلومی بخاطر در اختیار گذاشتن بعضی از نمونه های انسان و حیوان از مناطق آندمیک کشور و آقای دکتر منبئی بخاطر بیو پسی 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.

انگل های لیشمانیا حدود ۳۰ آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته و از میان آنها آنزیم های 6PGD, MDH, ME به علت سهولت رنگ آمیزی، (GOT), ALAT, ASAT به علت تنوع و GPI و PGM به علت فعالیت قویتر، شاخص تر بوده اند و محققین بیشتر، این آنزیم ها را انتخاب نموده اند (۲۲). در مطالعه حاضر، آنزیم های GPI و G6PD بیشترین هتروژنیته و آنزیم NH2 بیشترین هموزنیته را در بین ایزوله های انسانی و حیوانی داشتند و لذا آنها را بعنوان آنزیم های اساسی در تفکیک سوش های متفاوت لیشمانیا اینفانتوم معرفی می نمایم و همچنین آنزیم MDH, PGM, GPI از آنزیم های بسیار فعال بودند که دارای قدرت بالایی در تفکیک سوش های لیشمانیا اینفانتوم مناطق جغرافیایی این مطالعه داشت. در سال ۱۹۹۹ در ایران، حاتم و همکاران با مطالعه ای 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 گونه های 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 میلی لیتر محیط کشت احتیاج است و این امر در شناسایی بعضی سویه های کند رشد و تا حدی کم رشد مشکل ایجاد می کند (۲۵). یکی از مسیرهای متابولیکی در چرخه زندگی انگل لیشمانیا، مسیر گلیکولیز است که آنزیم های 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

## References

- Ardehali S, Rezaei H.R, Nadim A. Leishmania parasite and leishmaniosis. 2 ed. Tehran: Academic Publication Center; 1994. P 3-11. (Persian).
- Fakhar M, Mohebbali 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).
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005; 97: 1-12.
- 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.
- WHO Expert Committee: Control of leishmaniasis. WHO Technical Report Series 793, WHO, Geneva Switzerland, 1990.
- Klaus S, Frankenburg S. Cutaneous leishmaniasis in the Middle East. *Clin Dermatol* 1999; 17: 137-141.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hatam G.R, Hosseini S.M.H, Ardehali S. Isoenzyme studies in characterization of Leishmania isolated in Iran. *Iranian J Med Sci* 1999; 240(1&2): 8-13.
- Evans DA. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) Geneva, Switzerland; 1989.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol* 2001; 48: 1-55.
- 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.
- 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.
- 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 zymodemes in the old world. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 269-271.
- Mazloumi Gavgani AS, Mohite H, Edrissian Gh, Mohebbali 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.
- Awadalla HN, Mansour NS, Mohareb EW. Further characterization of Leishmania isolated from children with Visceral infection in

- 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 leishmaniasis 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, Sosalima 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.