جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دوره ۱/ شماره ی ۳ / بهار ۱۳۸۲

سیستم های آنزیمی برتر برای تشخیص عوامل ایجاد کننده لیشمانیوز پوستی در ایران

دکتر غلامرضا حاتم،
استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی،
دانشگاه علوم پزشکی شیراز

نویسنده مسوول:
دکتر غلامرضا حاتم
شیراز، دانشکده پزشکی شیراز،
گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
تلفن: ۰۷۱۱-۲۳۰۵۲۹۱
E-mail:
hatamghr@sums.ac.ir

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز پوستی از بیماری های بسیار مهم انگلی است، که در نقاط گوناگون جهان، چون منطقه هایی گسترده از ایران انتشار دارد و گونه هایی متعدد در ایجاد آن نقش دارند. در ایران، دو گونه ی لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا، که هر یک دارای سویه های متعددی هستند، عامل لیشمانیوز پوستی هستند. تشخیص گونه ها و سویه های لیشمانیا به صورت میکروسکوپی شدنی نیست و شواهد همه گیر شناختی و بالینی هم، به تنهایی ابزاری مناسب برای تعیین گونه ی انگل نیستند. بنابراین، بایسته است که در کنار این شواهد، از روش های دقیق مولکولی و زیست- شیمیایی برای تشخیص بهره گرفته شود. در میان این روش ها، روش ایزوآنزیم الکتروفورز، جایگاهی ویژه دارد و می توان با مقایسه ی ایزوآنزیم های سیستم های مختلف آنزیمی در گونه های ناشناخته و مقایسه ی آن با سویه ها و گونه های مرجع، گونه و سویه ی انگل را تعیین کرد. برای کاستن از هزینه ی انجام مکرر این روش پیشرفته، لازم است که سیستم های برتر آنزیمی در هر منطقه مشخص شوند. **روش کار:** تولید انبوه گونه های مرجع لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا و نمونه های جدا شده از بیماران، در محیط کشت مایع مناسب انجام پذیرفت. پس از گرد آوری انگل از محیط کشت در پایان مرحله ی رشد لگاریتمی و عصاره گیری در شرایط ویژه، ایزوآنزیم های ۱۳ سیستم آنزیمی آنها با روش سلولز استات الکتروفورز مورد مقایسه قرار گرفتند. **یافته ها :** مقایسه ی مهاجرت نسبی ایزو آنزیم ها درشش سیستم آنزیمی نوکلئوزید هیدرولاز ۱ و ۲ (NH_1، NH_2)، مالات دهیدروژناز (MDH)، فسفوگلوکوموتاز (PGM)، گلوکز فسفات ایزومراز (GPI) و شش- فسفوگلوکونات دهیدروژناز(6-PGDH) اختلاف هایی چشمگیر میان دو گونه ی مورد مطالعه را نشان داد. اختلاف ها، همچنین در شمار باندهای ایزوآنزیمی ایزوآنزیمی گونه ها در سیستم های بالا ملاحظه گردید . **نتیجه :** این

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی نشان داد که در بیشتر موارد استفاده از سیستم های یاد شده در شناسایی گونه ها و حتی سویه های گوناگون لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا کافی است و به کار بردن سیستم های بیشتر، هنگامی لازم است، که با سویه های پیچیده ای برخورد شود.

کلید واژه ها: لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور، لیشمانیوز پوستی، ایزوآنزیم الکتروفورز

مقدمه

لیشمانیوز پوستی از دشواری های مهم بهداشتی در جهان به شمار می رود، که پراکندگی گسترده در نقاط گوناگون جهان دارد[۱]. عوامل ایجاد این بیماری در جهان گوناگون هستند، که مهم ترین آن، گونه های لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اتیوپیکا در جهان کهن و مجموعه ی لیشمانیا مکزیکانا در جهان نوین است. ناقل بیماری گونه های پشه ی خاکی از جنس فلبوتوموس (Phlebotomus) در جهان کهن و لوتزومیا (Lutzomyia) در جهان نوین است که بسته به گونه، مخزن یا مخازن هر گونه، متفاوت است. برای نمونه، مخزن لیشمانیا تروپیکا، انسان و به ندرت سگ و مخزن لیشمانیا ماژور، جوندگان بزرگ هستند. انگل در بدن میزبان مهره دار به شکل بدون تاژک یا آماستیگوت (Amastigote) و در بدن پشه ی خاکی و محیط کشت به شکل تاژک دار یا پروماستیگوت (Promastigote) دیده می شود. گونه ی آسیب های بالینی ایجاد شده از سوی هر انگل، نیز تفاوت هایی را نشان می دهد. برای نمونه، آسیب های پوستی مربوط به لیشمانیا تروپیکا، خشک و دوره ی بیماری بلند مدت است، در صورتی که، آسیب های پوستی مربوط به لیشمانیا ماژور، مرطوب و دوره ی بیماری کوتاه تر است [۱،۲]. با وجود این تفاوت ها، شکل میکروسکوپی بدون تاژک انگل، که از زخم بیماران جدا می شود، همانند هم است و نمی توان از روی شکل ظاهری، به گونه و سویه ی انگل پی برد. تفاوت های همه گیر شناختی و بالینی بیماری هم، با وجود اهمیت، نمی توانند به تنهایی پایه ی تشخیص گونه و سویه باشند. از سویی، تشخیص دقیق سویه ها به لحاظ هر گونه برنامه ریزی برای مهار و پیشگیری، مبارزه با مخازن و ناقلان، ساخت واکسن، فراهم کردن پادتن برای تشخیص و درمان دارای اهمیت فراوان است[۳-۱]. در این راستا، سال هاست که پژوهشگران روش های دقیق مولکولی و زیست-شیمیایی را در کنار شواهد یاد شده به خدمت گرفته اند. استفاده از پادتن های تک دودمان (Monoclonal) [٤] واکنش زنجیره ی پلی مراز [٥] و مقایسه ی ایزوآنزیم های انگل با بهره جویی از سیستم های گوناگون آنزیمی [٨-٦] از دقیق ترین روش های مورد استفاده در این زمینه است. در این میان، بهره جستن از روش مقایسه ی ایزوآنزیم ها، به علت توان بسیار بالا در تشخیص

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

گونه ها و حتی سویه های گوناگون یک گونه، از اهمیت زیاد برخوردار است. پژوهشگران زیادی، هنوز از این روش، به عنوان یک روش بسیار مناسب در سراسر جهان، بهره می گیرند [۱،۷،۸] پژوهشگران در هر منطقه، بر آن امر کوشش کرده اند، که آنزیم های مناسب تر را برای تشخیص گونه ها و سویه های گوناگون منطقه ی خود شناسایی و معرفی کنند، تا با حذف سیستم های آنزیمی غیر لازم، در جهت صرفه جویی در وقت و هزینه این روش پیشرفته گام برداشته باشند[۸]. لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا عامل اصلی لیشمانیوز پوستی در ایران شناخته شده اند و سویه هایی گوناگون، نیز با روش ایزوآنزیم الکتروفورز و استفاده از پادتن های تک دودمانی برای هر یک معرفی شده است[۹،۱۰]. با توجه به این که، فعالیت برای ساخت واکسن مناسب از سوی پژوهشگران و با پشتیبانی سازمان بهداشت جهانی در ایران آغاز شده و ادامه دارد[۱۱] لزوم ادامه ی روش بالا، برای شناسایی هرچه دقیق تر کانون ها، مخازن و ناقلان انواع گوناگون لیشمانیوز پوستی در ایران به شدت احساس می شود. با توجه به کمبود منابع پژوهشی و لزوم صرفه جویی هر چه بیشتر، لازم است سیستم های آنزیمی برتر برای گونه ها و سویه های شایع در ایران معرفی گردند تا بتوان این روش ارزنده را بدون توقف انجام داد.

مواد و روش

سویه ی مرجع لیشمانیا ماژور (MHOM/Su/73/5ASKH) و سویه ی مرجع لیشمانیا تروپیکا (MHOM/Su/74/K27) به علت همانندی با سویه های ایران [۹] برگزیده شدند و به همراه شمار ٤٦ مورد از نمونه های جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی ساکن در کانون های مهم اندمیک لیشمانیا خیز ایران از جمله استان های اصفهان، کرمان و فارس، در محیط مایع RPMI به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گوساله کشت داده شدند (Gibco, Germany). ظرف های کشت، پیوسته بررسی می شدند و در مقاطع زمانی مشخص، محیط کشت تازه به آنها افزوده می شد. پس از رسیدن حجم کشت ها به اندازه ی مورد نظر و قرار گرفتن پروماستیگوت ها در پایان مرحله ی رشد لگاریتمی، گرد آوری انگل ها انجام شد. پس از شمارش در این مرحله، هر میلی لیتر از محیط دارای ده تا پانزده میلیون انگل بود. کشت ها در چهار درجه ی سانتی گراد و با دور g ۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از بیرون ریختن محلول بالایی، رسوب به دست آمده، سه بار با فسفات بافر نمکی سرد (PBS) شست و شو شد. در مرحله ی آخر، پس از دور ریختن محلول بالایی، ماده پایدارنده ی آنزیم به میزان هم حجم رسوب، افزوده شد، (یک میلی مولار آمینوکاپرویک اسید، یک میلی مولار دی تیوتریتول و یک میلی مولار اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) و پس از این که به

جدول ۱: بافر تانک، ولتاژ و مدت زمان الکتروفورز روی صفحات استات سلولز برای شش سیستم آنزیمی برتر

نام آنزیم و کد آن	ولتاژ V/cm	بافر *تانک	مدت زمان الکتروفورز (دقیقه)
MDH 1.1.1.37	۲۱	۱	۴۰
6-PGDH 1.1.1.44	۳۶	۲	۲۵
PGM 2.7.5.1	۳۶	۳	۳۵
GPI 5.3.1.9	۲۸	۴	۳۰
NH1 3.2.2.1	۳۶	۵	۳۰
NH2 3.2.2	۳۶	۵	۳۰

* **۱**- تریس باربیتال، سدیم باربیتال، به همراه یک میلی مولار استات منیزیم با pH=۹ و قدرت یونی ۰/۷۵ درصد. **۲**- ۰/۱ مولار تریس، ۰/۰۱۷۶ درصد مولار مالئیک اسید، ۰/۰۱ مولار Na2EDTA ، ۰/۰۱ مولار استات منیزیوم با pH=۷/۴. هنگام مصرف به نسبت یک به چهار با آب مقطر رقیق می شود. **۳**- ترکیب شماره ی۲ است، که هنگام مصرف، به نسبت یک به هفت رقیق می شود. **۴**- ۰/۰۱ مولار تریس، ۰/۰۰۵۷ مولار اسید سیتریک، ۰/۰۰۲ مولار Na2EDTA ، ۰/۰۰۲ مولار استات منیزیوم با pH=۸/۶. **۵**- ۰/۰۰۸ مولار NaH2PO4، ۰/۱۹۲ مولار Na2HPO4 با pH=۸. هنگام مصرف، به نسبت یک به دوازده رقیق می شود.

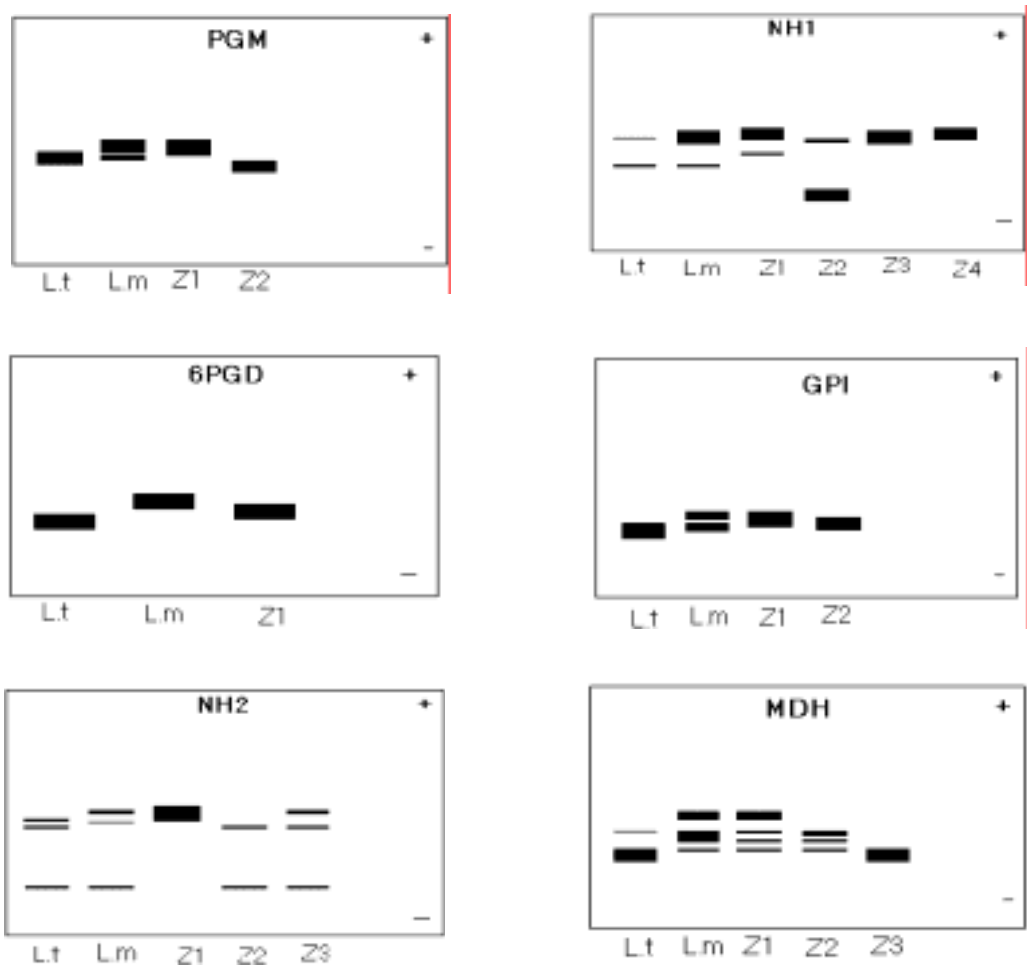
خوبی آمیخته شد، پنج بار در ازت مایع عمل انجماد و در آب ۲۵ درجه ی سانتی گراد عمل ذوب به طور متناوب انجام گردید و در پایان، سوسپانسیون به دست آمده با دور g ۳۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در چهار درجه ی سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول های بالایی، به عنوان عصاره ی دارای آنزیم در ازت مایع نگهداری شدند تا از آن ها در مرحله ی دیگر، برای الکتروفورز ایزوآنزیم ها استفاده شوند.

الکتروفورز عصاره های آنزیمی بر روی استات سلولز انجام پذیرفت. برای هر نمونه، ۱۳ سیستم آنزیمی بررسی شد، که عبارت بودند از: گلوکز فسفات ایزومراز (GPI)، گلوکز شش- فسفات دهیدروژناز (G6PDH)، ایزوسیترات دهیدروژناز (IDH)، مالات دهیدروژناز (MDH)، نوکلئوزید هیدرولاز ۱ و ۲ (NH1 , NH2)، شش- فسفوگلوکونات دهیدروژناز(6-PGDH)، آنزیم مالیک (ME) ، فسفوگلوکو موتاز (PGM) ، سوپراکسید دسموتاز (SOD)، استراز (ES)، آسپارتات آمینوترانسفراز (ASAT) و آلانین آمینوترانسفراز (ALAT). پس از نمونه گذاری بر روی صفحات استات سلولز و جا دادن صفحات در تانک الکتروفورز و اتصال دو انتهای آن به بافر تانک به وسیله ی پل های ارتباطی، نمونه ها به مدت معین و ولتاژ مشخص، بنا بر سیستم آنزیمی مورد بررسی، الکتروفورز شدند (جدول ۱). مهاجرت نسبی هر باند ایزوآنزیم در صفحه ی الکتروفورز از تقسیم فاصله ی طی شده ی باند از مبدأ به فاصله ی مبدأ تا انتهای ژل به دست آمد. مراحل رنگ آمیزی اختصاصی هر سیستم بر پایه ی روش اوانس(Evans)، در سال ۱۹۸۹، انجام گرفت [۷،۱۲-۹].

یافته ها

پس از مقایسه ی پروفیل ایزوآنزیم های ۱۳ سیستم آنزیمی گوناگون برای نمونه های مرجع و ناشناخته ی مورد بررسی، مهاجرت نسبی کلیه باندهای ایزوآنزیمی هر نمونه در سیستم های مورد بررسی محاسبه گردید. اندازه های به دست آمده برای نشان دادن تفاوت میان دوگونه ی لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور در سویه های جدا شده از ایران و نمونه های مرجع مقایسه شدند. در سیستم NH1، سویه های مرجع لیشمانیا ماژور دو باند را نشان دادند، که مهاجرت

شکل ۱ : پروفیل ایزوآنزیمی شش سیستم آنزیمی برتر : (-) علامت قطب منفی، (+) علامت قطب مثبت که جهت حرکت آنزیم ها به آن سمت است. L.t ، جای نمونه گذاری نمونه ی مرجع لیشمانیا تروپیکا و L.m جای نمونه گذاری نمونه ی مرجع لیشمانیا ماژور است. Z1-Z4، جمعیت های متفاوت با نمونه های مرجع است، که در این بررسی ملاحظه شده است. علامت اختصاری هر سیستم آنزیمی بالای تصویر مربوطه نوشته شده است.



نسبی باند سریع تر، ۰/٤٤ و مهاجرت نسبی باند کندتر، ۰/۲۵ بود. در لیشمانیا تروپیکا دو باند ملاحظه شده مهاجرت نسبی، ۰/٤ و ۰/۲۵ را نشان دادند (شکل ۱). در ضمن، فعالیت آنزیمی این سیستم مناسب بود و باندها، آشکارا دیده می شدند.

در سیستم NH2 در لیشمانیا ماژور، سه باند با مهاجرت های نسبی ۰/۲٤ ، ۰/۲۱ و ۰/۰۷ ملاحظه گردید و در لیشمانیا تروپیکا، دو باند۰/۲۲ و ۰/۰۷ ملاحظه شد. فعالیت آنزیمی به نسبت خوب بود (شکل۱).

در بررسی سیستم آنزیمی 6-PGDH، نمونه های مرجع لیشمانیا ماژور باندی به مهاجرت نسبی ۰/۳۱ و لیشمانیا تروپیکا یک باند به مهاجرت نسبی ۰/۲۸ را نشان دادند. فعالیت آنزیمی نیز مناسب بود (شکل ۱).

در سیستم آنزیمی PGM، سویه های مرجع لیشمانیا ماژور دو باند با مهاجرت نسبی ۰/٤۲ و ۰/۳۵ را نشان دادند، حال آن که، در لیشمانیا تروپیکا، تنها یک باند با مهاجرت نسبی ۰/۳۷ ملاحظه گردید (شکل ۱). فعالیت آنزیمی در این سیستم به نسبت مناسب ملاحظه شد.

در سیستم MDH، سویه های مرجع لیشمانیا ماژور سه باند اصلی، به ترتیب با مهاجرت ۰/٤۲، ۰/۳۸و ۰/۳۳ را نشان دادند. حال آن که، باند اصلی سویه ی مرجع لیشمانیا تروپیکا مهاجرت نسبی ۰/۲۷ را نشان داد و دیگر باندهای آن ضعیف تر ملاحظه شدند (شکل ۱). فعالیت ایزوآنزیم های این سیستم به نسبت مناسب بود. در سیستم آنزیمی GPI، واکنش آنزیمی بسیار قوی بود و در آن سویه های مرجع لیشمانیا ماژور، دو باند قوی با مهاجرت نسبی ۰/۲۵ و ۰/۲۱ را نشان دادند و در سویه های مرجع لیشمانیا تروپیکا، یک باند با مهاجرت نسبی ۰/۲۱ مشاهده شد (شکل ۱). دیگر سیستم های آنزیمی نیز، اختلافات سویه های مرجع را کم و بیش نشان دادند. البته، توان واکنش آنزیم ها در هفت سیستم دیگر تا اندازه ای کمتر و کار با آنها دشوار تر ملاحظه شد.

بحث

یافته ها نشان می دهد که برای تشخیص گونه ها و سویه های گوناگون انگل لیشمانیا در ایران در بیشتر موارد استفاده از چهار تا شش سیستم آنزیمی کافی است و در حالت عادی به استفاده ی گسترده از سیستم های آنزیمی گوناگون نیاز نیست. لازم است که برای صرفه جویی منطقی در وقت و هزینه، سیستم های برتر آنزیمی مشخص شوند. هنگامی باید از سیستم های دیگر بهره گرفت که با ایزولات هایی از انگل برخورد شود، که شش سیستم مورد نظر برای شناسایی آنها کافی نباشند و به سخن دیگر، با سویه ای تازه و پیچیده برخورد شود و نیز، در باره ی سویه ای از انگل، که برای کار مهم و گسترده ی پژوهشی در نظر گرفته شده باشد، بررسی هر چه بیشتر سیستم های آنزیمی پیشنهاد می شود. در این بررسی، شش سیستم آنزیمی NH2، NH1، GPI، MDH،

PGM و 6-PGDH توانـــی بســـیار بـــالا را در شناسـایی عوامل لیشمانیوز پوستی نشان دادند. این آزمایش ها بر روی ٤٦ ایزولات گوناگون به دست آمده از نقاط مختلف جغرافیایی ایران انجام گرفت و زایمـودم هایی گوناگون در مقایسه با نمونه های مرجع ملاحظه گردید.

در سیسـتم هـای آنزیمی مورد بررسی، سیستم NH1 از توانـی مناسب برخوردار است و پروفیل ایزوآنزیمـی لیشـمانیا مـاژور بـا لیشـمانیا تروپـیکا مـتفاوت اسـت، کـه همین تفاوت، باعث می شود کـه ایـن آنـزیم بـه عـنوان آنزیمـی مناسـب برای شناسـایی عوامـل لیشـمانیوز پوسـتی ایران معرفی گـردد. امتـیاز دیگـر این آنزیم، توان مناسب آن در ایجـاد باندهـای ایزوآنزیمـی نیرومـند است، که به راحتـی تشـخیص داده مـی شـدند. بررسـی هـای پژوهشـگران در گذشـته، مانند بررسی گسترده ای کـه مـبراتو (Mebrahtu) در سـال۱۹۹۲ در کنـیا انجام داد، موید برتری این سیستم است [۷،۸]. در سیســتم آنزیمــی NH2 نــیز، لیشــمانیا مــاژور و لیشـمانیا تروپـیکا دو بـاند مشترک نشان دادند، اما لیشـمانیا مـاژور، یـک باند سوم سریع با مهاجرت نسـبی ۰/۲٤ را نشان داد که باعث ایجاد تفاوت در میان عوامل لیشمانیوز پوستی می شود و از این رو، NH2، بـه عنوان سیستمی مناسب معرفی می شود (شـکل ۱). بـا بررسـی دو سیستم آنزیمی GPI و 6-PGDH نـیز، تفاوتـی آشـکار مـیان باندهـای عوامـل لیشـمانیوز پوسـتی ایران ملاحظه شد. این تفـاوت، بـه همـراه تـوان واکنش این دو آنزیم، به ویـژه GPI، باعث می شود، که هر دو سیستـم، به عـنوان آنـزیم هـای برتـر معرفـی شوند (شکل۱). کروتـزر در سـال ۱۹۸۷، ایـن دو آنزیم را به همراه آنــزیم مــانوز فســفات ایزومــراز (MPI)، بــرای شناسـایی گونـه هـا و زیرگونه های انواع لیشمانیا پیشـنهاد کـرد [۱۳]. دو سیستم آنزیمی MDH و PGM نـیز، بـا تـوان واکـنش به نسبت مناسب و باندهـای متفاوتـی کـه مـیان انواع گوناگون مرجع نشـان دادنـد، برتـر از هفـت سیسـتم دیگـر، برای شناسـایی عوامـل لیشمانیوز پوستی شناخته شدند. بررسـی هـای اوکوت (Okot) و همکارانش، در سـال ۱۹۸۹، در کنـیا، تـوان افـتراق این دو سیستم آنزیمـی را در شناسایی دو گونه ی پوستی لیشمانیا اتیوپـیکا و لیشمانیا ماژور از یکدیگر نشان می دهد [١٤]. گفتنـی اسـت که، دیگر سیستم های آنزیمی مـورد بررسی در این مقطع، همه از سوی سازمان بهداشـت جهانـی و دیگر پژوهشگران تایید شده و دارای تـوان شناسـایی گونـه های مختلف لیشمانیا معرفـی شـده اند [۱۲-۸] . در این بررسی نیز، این آنزیم ها برای شناسایی عوامل لیشمانیوز پوستی در ایـران مناسـب تشـخیص داده شـدند، امـا تأکـید مـی شـود، کـه اسـتفاده از سیستم های ALAT ، ASAT ، ES ، SOD ، ME ، IDH و G6PD تـنها در شـرایط ویـژه لازم است و آن زمانی است کـه، شـش سیستم برتر آنزیمی یافته های گوناگون را نشان دهند و برای تعیین هویت ایزولات با ابهام روبـرو شویم. در این صورت، از سیستم های بالا، یکـی پـس از دیگـری بهـره جویـی مـی شـود تـا

شناسایی پایانی با قاطعیت انجام پذیرد. گفتنی است که، در این بررسی شماری از نمونه های ناشناخته در برخی سیستم ها، باندهایی همانند سویه های مرجع داشتند و برخی اختلافات جزیی داشتند، که گویای توان این سیستم ها در مشخص کردن سویه ها ست [۷،۸،۹] زیرا، از روی همین اختلافات جزیی است که می توان به سویه های گوناگون موجود در یک گونه پی برد (شکل ۱).

این اختلافات در هر سیستم آنزیمی باعث معرفی جمعیت های متفاوت یا زایمودم می شود. در این بررسی، شماری از نمونه های ناشناخته، جمعیت های همانند با سویه مرجع را نشان دادند و در موارد ی اندک نیز، جمعیت های متفاوت ملاحظه شد که مبنای معرفی سویه ی تازه است (شکل ۱) و در بررسی های پیشین نیز آورده شده است[۹].

Superior Enzymatic Systems for Characterization of Causative Agents of Cutaneous Leishmaniasis in Iran

G.R. Hatam, Ph.D.
Assistant Professor of Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Correspondence:
G.R. Hatam
Department of Parasitology and Mycology, Shiraz University of Medical Sciences
Shiraz, Iran
Tel/Fax: *+98-711-2305291*
E-mail:
hatamghr@sums.ac.ir

Background: Cutaneous leishmaniasis is an important parasitic disease, which prevails worldwide. The etiological agents of this disease differ widely in different geographical areas. In Iran, *L. tropica* and *L. major* are the main causative agents. Microscopic diagnosis of Leishmania species and strains is not possible. Epidemiological and clinical findings accompanied by precise and sensitive molecular and biochemical methods are necessary to characterize various species and strains of Leishmania. Isoenzyme characterization using multiloci enzyme electrophoresis is one of the most suitable techniques which can differentiate unknown isolates in comparison with reference strains. For cost-effectivity of this advanced method, determining superior enzymatic systems in various regions is rational. **Materials and Methods:** Mass cultivation of reference strains and unknown isolates were carried out in suitable liquid medium. After harvesting in logarithmic phase of growth and extracting in special conditions, the isoenzyme profiles of 13 enzymatic systems were studied using cellulose acetate electrophoresis. **Results:** The comparison of isoenzyme relative factors, in nucleoside hydrolase 1 (NH1) and 2 (NH2), malate dehydrogenase (MDH), glucose phosphate isomerase (GPI), phosphoglucomutase (PGM) and 6-

phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH) showed considerable differences between *L. major* and *L. tropica* isolated in Iran. The numbers of isoenzymatic bands were also different in these systems. **Conclusion:** The above mentioned enzymatic systems are superior for characterization of species and strains of *L. tropica* and *L. major*. In order to minimize time consumption and costs related to isoenzyme electrophoresis, superior enzymatic systems should be used. Extra systems are useful in complex situations in which identification of unknown isolates are not possible using the above mentioned systems.

Keywords: *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, Cutaneous leishmaniasis, Isoenzyme electrophoresis

منابع

[1]WHO Expert Committee: Control of leishmaniasis. WHO Technical Reports Series 793, WHO, *Geneva, Switzerland*, 1990.

[2]Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi AG: Cutaneous leishmaniasis: Clinical features and diagnosis. ***Clin Dermatol*** 1999;17:291-6.

[3]Klaus S, Frankenburg S: Cutaneous leishmaniasis in the Middle East. ***Clin Dermatol*** 1999;17:137-41.

[4]McMahon Pratt D, David JR: Monoclonal antibodies that distinguish between new world species of Leishmania. ***Nature*** 1981;291:581-3.

[5]Noyes HA, Belli AA, Maingon R: Appraisal of various random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction primer for Leishmania identification . ***Am J Trop Med Hyg*** 1996;55:98-105.

[6]Krutzer RD, Christensen HA: Characterization of Leishmania spp. by isoenzyme electrophoresis. ***Am J Trop Med Hyg*** 1980;29(2):199-208.

[7]Le-Blancq SM, Peters W: Leishmania in the old world: 2. Heterogenity among *L. tropica* zymodems. ***Trans R Society Trop Med Hyg*** 1986;80:113-9.

[8]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):852-92.

[9]Hatam GR, Hosseini SMH, Ardehali S: Isoenzyme studies in characterization of Leishmania isolated in Iran. ***Irn J Med Sci*** 1999;24(1,2):8-13.

[10]Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, et al.: Characterization of Leishmania isolated in Iran: 1. Serotyping with species specific monoclonal antibodies. ***Acta Trop*** 2000;75:301-7.

[11]Sharifi I, Fekri A, Aflatonian MR, et al.: Randomized vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam. ***Lancet*** 1998;351:1540-3.

[12]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.

[13]Krutzer RD, Souraty N, Semko ME: Biochemical identities and differences among leishmania species and subspecies. ***Am J Trop Med Hyg*** 1987;36(1):22-32.

[14]Okot-Kotber BM, Mutinga MJ, Kaddu JB: Biochemical characterization of Leishmania spp. isolated from man and wild animals in Kenya. ***Inter J Parasitol*** 1989;19(6):657-63.