مجلـه علمـی پـژوهشـی دانشگـاه علـوم پزشکـی اردبیـل

دوره هشتم، شماره اول، بهار ۱۳۸۷، صفحات ۷۷ الی ۸۳

مقایسه روش های سرولوژیک آگلوتیناسیون مستقیم (DAT)، ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم (IFAT) و ELISA در تشخیص لیشمانیوز احشایی

محمود محامی[۱]، دکتر مهدی محبعلی[۲]، دکتر حسین کشاورز[۲]، ذبیح‌الله زارعی[۳]

[۱] نویسنده مسئول: کارشناس ارشد انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز **E-mail:** mahmood_mahamiy@yahoo.com

[۲] استاد انگل شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران [۳] کارشناس ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین‌شهر

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) بیماری عفونی خطرناکی است که در بیشتر مناطق ایران به صورت اسپورادیک و در بعضی از مناطق استان های اردبیل، آذربایجان شرقی، بوشهر و فارس به صورت آندمیک دیده می‌شود. این مطالعه با هدف ارزیابی و مقایسهٔ روشهای سرولوژی DAT ، IFAT و ELISA در تشخیص لیشمانیوز احشایی به دنبال یک بررسی سرواپیدمیولوژیک در شهرستان گرمی از استان اردبیل انجام گرفته است.

روش کار: روش نمونه‌برداری به شکل خوشه ای و گروههای تحت مطالعه شامل بچه‌های زیر ۱۲ سال و ۱۰٪ بزرگسالان بوده است. در مجموع ۱۱۵۵ نمونهٔ خون از افراد مذکور تهیه شد که با روش های سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) ، IFAT و ELISA به منظور اندازه گیری آنتی‌بادی ضد لیشمانیائی مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته ها: با استفاده از روش DAT، ۳۲ نفر (۲/۸٪) دارای آنتی‌بادی اختصاصی ضد لیشمانیا با عیار ۸۰۰ : ۱ ≤ بوده و در کل نمونه‌ها ۷ نفر (۰/۶٪) با عیار ۳۲۰۰ : ۱ ≤ از نظر سرولوژی مثبت بودند. در تست IFA نیز ۳۲ نفر (۲/۸٪) دارای عیار ۴۰ : ۱ ≤ بوده و در کل نمونه‌ها ۶ نفر (۰/۵۲٪) با عیار ۳۲۰ : ۱ ≤ از نظر سرولوژی مثبت بودند. در تست ELISA ۸ نمونه مثبت و بقیه منفی شدند.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که هر چند آزمونهای IFAT و ELISA جهت تشخیص بیماران مبتلا به کالاآزار از کارایی خوبی برخوردارند ولی نیازمند آزمایشگاه مجهز و پرسنل ورزیده می باشند در صورتی که DAT یک روش ساده، ارزان، بدون نیاز به تجهیزات پیچیده و قابل اجرا در مناطق آندمیک برای تشخیص لیشمانیوز احشایی و مطالعات سرواپیدمیولوژی بوده و می تواند جایگزین مطمئنی برای روشهای پرهزینهٔ IFAT و ELISA باشد.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز احشایی، کالاآزار، DAT، IFAT، ELISA

دریافت: ۸۵/۱۰/۲۵ **پذیرش:** ۸۷/۲/۲۰

مقدمه

لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) بیماری عفونی خطرناکی است که اگر به موقع تشخیص و درمان نشود میزان مرگ و میر بالایی خواهد داشت[۱]. کالاآزار در ایران از نوع مدیترانه‌ای بوده وعامل آن لیشمانیا اینفانتوم، ناقل آن گونه‌های به خصوصی از پشه خاکی‌های جنس فلبوتوموس ومخزن انگل سگ و سگ‌سانان می‌باشد[۲]. در حال حاضر کالاآزار در بعضی از مناطق استانهای اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر به شکل آندمیک و در سایر مناطق به صورت اسپورادیک دیده می‌شود[۳]. روشهای سرولوژیک مختلفی از جمله IFAT، DAT، ELISA، CF، CIEP، Dipstick rk39 و لاتکس آگلوتیناسیون در تشخیص بیماری کالاآزار به کار می‌روند که هر کدام دارای مزایا

و معایبی هستند [۵،٤]. هدف از این مطالعه مقایسهٔ روشهای سرولوژیک DAT، IFAT و ELISA به منظور دستیابی به یک آزمون ویژه، آسان، ارزان و قابل اجرا در مناطق آندمیک می باشد تا موارد مثبت کاذب و واکنش متقاطع را کم و یا حذف نموده و به تشخیص زودرس کالاآزار کمک نماید.

روش کار

این مطالعه به صورت مقطعی و به دنبال یک بررسی سرواپیدمیولوژی در شهرستان گرمی از استان اردبیل برای تعیین ارزش تشخیصی و مقایسهٔ روشهای سرولوژیک [۶] DAT ، IFAT و ELISA در تشخیص لیشمانیوز احشایی انجام گرفته است. روش نمونه‌برداری به شکل خوشه ای، حجم نمونهٔ محاسبه شده ۱۱۵۵ نفر و به این صورت بوده که پس از دریافت اطلاعات مربوط به تعداد موارد بیماری کالاآزار در روستاهای شهرستان گرمی طی سالهای اخیر، با توجه به نقشهٔ شهرستان تعداد ۸ روستا از روستاهای دارای موارد و ٤ روستا از روستاهای فاقد گزارش مربوط به کالاآزار طوری انتخاب گردیدند که کل شهرستان را از شمال ، جنوب، شرق و غرب تحت پوشش قرار دهد. همچنین حدود ۱۵ درصد کل حجم نمونه به خود شهرستان گرمی اختصاص داده شد که این تعداد نمونه از مناطق سه گانهٔ بهداشتی این شهرستان اخذ گردیدند. در تمام روستاهای انتخاب شده از افراد زیر ۱۲ سال به صورت توتال نمونه‌گیری به عمل آمد و در هر روستا ۱۰٪ حجم نمونه به افراد بالای ۱۲ سال اختصاص داده شد. در خود شهرستان گرمی نیز افراد زیر ۱۲ سال به اضافهٔ ۱۰٪ افراد بزرگسال به میزان ۱۵٪ کل حجم نمونه انتخاب و نمونه‌گیری شد.

در این بررسی تمامی نمونه‌ها در داخل لوله‌های میکروهماتوکریت هپارینه از نوک انگشت وسطی دست چپ افراد مورد مطالعه به میزان ۳ لولهٔ میکروهماتوکریت برای هر نفر تهیه گردید. در نوزادان و بچه‌های زیر یکسال از پاشنهٔ پا و یا انگشت شست پا یا دست نمونه‌گیری می‌شد. نمونه‌ها همراه با پرسشنامه‌هایی که برای هر یک از افراد جداگانه تهیه می‌گردید در شرایط مطلوب به آزمایشگاه بیمارستان گرمی منتقل و توسط سانتریفوژ میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شد و پس از قرائت میزان هماتوکریت، پلاسمای آنها جداگردیده و فریز می شدند. سپس تمام نمونه های پلاسما در شرایط فریز به آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکدهٔ بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت انجام آزمایشات لازم حمل گردیده و به روشهای سرولوژی DAT، IFAT و ELISA مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. داده ها پس از جمع آوری ، توسط آزمون آماری کای دو (Chi-square) و با استفاده از نرم افزار SPSS 9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تست آگلوتیناسیون مستقیم(DAT)

آنتی‌ژن تست DA در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک‌یاخته شناسی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بر اساس روش دکتر هریت تهیه گردید[۷]. در این روش آنتی‌ژن در مجاورت رقت‌های مختلف سرم یا پلاسمای فرد مشکوک قرار داده می‌شد که در صورت حضور آنتی‌بادی اختصاصی در سرم بیمار پس از گذشت ۱۸ ساعت آگلوتیناسیون صورت می‌گرفت. ابتدا به کمک محلول رقیق‌کننده و میکروپلیت‌های V شکل (ساخت شرکت DYNATECH) رقت‌های مورد نیاز از پلاسمای بیمار تهیه شد و پس از افزودن آنتی‌ژن در رقت های ۳۲۰۰: ۱ و ۸۰۰ : ۱ میکروپلیت‌ها در داخل اطاقک مرطوب قرار داده شدند و در یک سطح افقی در حرارت آزمایشگاه تا روز بعد (حداقل ۱۸ ساعت) باقی ماندند. در تفسیر آزمایش چنانچه حفره‌ای که آنتی‌ژن ریخته شده بود انگلها بصورت یک دگمه کوچک آبی رنگ با حاشیه کاملاً مشخص جمع شده و در وسط حفرهٔ میکروپلیت ته‌نشین شده بودند دال بر عدم وجود آگلوتیناسیون و نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا منفی بحساب می‌آمد. اگر انگلها بحالت کلوئیدی ابری شکل آبی رنگ یکنواخت در تمام

مـایع موجـود در حفـره پراکنـده شـده یـا بـه اصـطلاح آگلوتینه شده بودند نتیجه آزمـایش از نظـر تـشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا مثبت محسوب مـی‌گردیـد. بـالاترین رقت از نمونه سـرمی کـه آگلوتیناسـیون در آن ایجـاد شده به عنوان حداکثر عیار مثبت تـست آگلوتیناسـیون مستقیم در نظر گرفته شد. در این صورت بـرای تعیـین عیار، نمونه‌ها مجـدداً در رقـت‌هـای بـالاتری آزمـایش شدند. با هر سری از نمونـه‌هـای مـورد آزمـایش یـک سرم یا پلاسمای مثبت به عنوان شاهد مثبت و یک سرم یا پلاسمای منفی به عنوان شاهد منفی به همـان ترتیـب آزمایش شدند. عیارهای ۳۲۰۰ : ۱ ≤ از نظـر تـشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا مثبت و عیارهـای ۱۶۰۰ : ۱ مـشکوک و ۸۰۰ : ۱ > منفی تلقی شدند[۸].

تست ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم(IFAT)

آنتی‌ژن فیگورۀ این تست در آزمایـشگاه لیـشمانیوز واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکدۀ بهداشت دانـشگاه علـوم پزشکی تهران به روش دکتر ادریسیان و همکـاران تهیـه گردید[۹]. ابتدا به کمک PBS (Phosphate Buffered Saline) با pH =۷/۲ رقت‌های لازم از نمونه‌های مـورد آزمایش و کنتـرل مثبـت و منفـی تهیـه شـدند. لامهـای حاوی آنتی‌ژن کت شده از فریزر $-۷۰^{o}C$ خـارج و پـس از اینکـه بـه حـرارت آزمایـشگاه رسـیدند در مجـاورت رقت‌های مختلف سرم یا پلاسما قرار می‌گرفتند و پـس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در محفظۀ مرطوب و طی مراحل شستـشو بـا PBS (Phosphate Buffered Saline)، کونژوگـۀ fluorescent-whole IgG anti– human) ساخت شرکت حاب تک ، رقیق شـده(۴۰ : ۱) وحاوی اوانس بلو اضافه و دوباره انکوباسـیون و مراحـل شستشو به طریق گفته شده انجام می گردید. سپس بـه کمک محلول گلیسیرین ـ تامپون مونته شـده و در زیـر میکروسـکوپ فلوئورسـانس بررسـی شـدند[۱۰]. عیارهای ۱۶۰: ۱ ≤ از نظر تشخیص آنتی‌بـادی لیـشمانیا مثبـت، عیارهـای ۸۰ : ۱ مـشکوک و عیارهـای ۴۰ : ۱ > منفی تلقی شدند.

تست الایزا(ELISA)

در این بررسی ، آنتی‌ژن مـصرفی پلیـت‌هـای پوشـانده شده با آنتـی‌ژن فیگـورۀ فـرم پروماسـتیگوت لیـشمانیا اینفانتوم بود[۱۱]. ابتدا رقت مورد نیاز از نمونه ، کنترل مثبـت و کنتـرل منفـی بـه کمـک PBS (Phosphate Buffered Saline) حاوی Tween 20 تهیه و بـه یکـی از حفره‌هـای میکروپلیـت تـه صـاف ELISA (سـاخت شرکت NUNC)به مقدار لازم اضافه می شد. در حفرۀ بلانـک فقـط PBS (Phosphate Buffered Saline) حاوی Tween 20 ریخته می‌شد. پس از انکوباسیون ۵۵ دقیقه‌ای در دمای آزمایشگاه و اتاقک مرطـوب مراحـل شستـــــشو انجـــــام و ســـــپس کونژوگـــــه Alkaline phosphatase conjugate anti-human IgG (whole molecule) ساخت کارخانـه سـیگما ، بـا رقت (۱۰۰۰ : ۱) برای هر حفره اضافه و دوباره مراحل انکوباسیون و شستشو انجام می شد. سـپس سوبـسترای PNP (P-Nitrophenyl Phosphate) رقیق شده با بافر دی‌اتانول آمین به هر حفره اضـافه و پـس از ۲۰ دقیقـه انکوباسـیون در محـل تاریـک و اتاقـک مرطـوب، جهـت جلوگیری از ادامه واکنش سود ۳ نرمال بـه هـر یـک از حفرات اضافه شده و نتایج به کمـک دسـتگاه ELISA-reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند[۱۲].

یافته ها

در این مطالعه تعداد ۱۱۵۵ نمونۀ سرم از گروههای سنی مختلـف تهیـه شـد کـه بـا روش هـای سـرولوژی DAT، IFA و ELISA در آزمایشگاه لیـشمانیوز واحـد تک‌یاخته‌شناسی دانشکدۀ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به همـراه سـرم کنتـرل‌هـای مثبـت و منفـی آن مرکز مورد آزمایش قرار گرفتند.

جهـت ارزیـابی نتـایج سـه روش DAT، IFAT و ELISA از جداول توافقی استفاده گردیـد(جـداول یـک، دو ه و سه).

در تست DA کلاً ۳۲ نفر (۲/۸٪) بـا تیتـر ۸۰۰ : ۱ ≤ بودند. از این تعداد یک نفر با تیتر ۱۰۲۴۰۰ : ۱ ، یک نفر با تیتر ۶۴۰۰ : ۱، ۵ نفر بـا تیتـر ۳۲۰۰: ۱ و ۲۵ نفـر بـا

تیتر ۸۰۰ : ۱ بوده‌اند. بنابراین در تست DA از مجموع ۱۱۵۵ نمونه اخذ شده ۷ مورد (۰/۶٪) با عیار ۳۲۰۰ : ۱ و بالاتر بودند.

در تست IFA نیز ۳۲ نفر (۲/۸٪) با تیتر ۴۰ : ۱ ≤ که از بین این افراد یک نفر با تیتر ۱۰۲۴۰ : ۱، یک نفر با تیتر ۶۴۰ : ۱، چهار نفر با تیتر ۳۲۰ : ۱، و ۲۶ نفر با تیتر ۴۰: ۱ در تست IFA بودند. به غیر از یک مورد که در تست IFA تیتر ۳۲۰ : ۱ ولی در تست DA تیتر ۸۰۰ : ۱ و دو مورد که در تست DA تیتر ۳۲۰۰ : ۱ ولی در تست IFA تیتر ۴۰ : ۱ را نشان داده است در بقیهٔ موارد این دو تست کاملاً همخوانی داشته‌اند (جدول ۱).

لازم به ذکر است که بر اساس محاسبات انجام شده، (Geometric Mean of Reciprocal Titers) GMRT برای تست DA در این بررسی ۱۲۳۰ و برای تست IFA ۵۸ به دست آمد. بالاترین GMRT مربوط به گروه سنی زیر یکسال و کمترین آن مربوط به گروه سنی ۱۲ سال و بالاتر می باشد.

در تست ELISA ۸ نمونه مثبت و بقیه منفی شدند. به غیر از دو مورد که در تست الایزا مثبت ولی در تست DA تیتر ۸۰۰ : ۱ داشته و یک مورد که در تست الایزا منفی ولی در تست DA با تیتر ۳۲۰۰ : ۱ بوده است، در بقیهٔ موارد این دو تست کاملا همخوانی داشته‌اند (جدول ۲). همچنین به غیر از یک مورد که در تست IFA تیتر ۳۲۰ : ۱ ولی در تست ELISA منفی و سه مورد که در تست ELISA مثبت ولی در تست IFA تیتر ۴۰ : ۱ را نشان داده است در بقیهٔ موارد این دو تست نیز کاملاً همخوانی داشته‌اند (جدول ۳).

در این بررسی با استفاده از نرم افزار SPSS 9 اختلاف معنی داری بین جنس مذکر (۲/۷ ٪) و مؤنث(۲/۸ ٪) در ابتلاء به لیشمانیوز احشایی مشاهده نشد($P = ۰/۸$) و موارد عفونت ناشی از فرم احشایی لیشمانیا درکودکان زیر ٤ سال بیشتر بود (P< ۰/۰۵).

بحث

در تشخیص بیماریهای انگلی قطعی‌ترین روش بر پایهٔ مشاهدهٔ انگل استوار است. در بیماری لیشمانیوز احشائی نیز روش تشخیص قطعی مشاهدهٔ آماستیگوتها در بیوپسی یا آسپیرهٔ تهیه شده از ارگانهای احشائی از

جدول ۱. جدول دو بعدی (توافقی) از فراوانی آنتی بادی لیشمانیا در روش های DAT و IFAT

DAT / IFAT	< ۱ : ۸۰۰	۱ : ۸۰۰	۱ : ۳۲۰۰	≥ ۱ : ۶۴۰۰	جمع
≤ ۱ : ۱۰	۱۱۲۳	۱	-	-	۱۱۲٤
۱:۲۰	-	۱۵	-	-	۵
۱:٤۰	-	۱۸	۲	-	۲۰
۱:۳۲۰	-	۱	۳	-	٤
≥ ۱ : ۶٤۰	-	-	-	۲	۲
جمع	۱۱۲۳	۲۵	۵	۲	۱۱۵۵

جدول ۲. جدول دوبعدی (توافقی) از فراوانی آنتی بادی لیشمانیا در روش های DAT و ELLSA

DAT / ELLSA	< ۱ : ۸۰۰	۱ : ۸۰۰	۱ : ۳۲۰۰	≥ ۱ : ۶٤۰۰	جمع
-	۱۱۲۳	۲۳	۱	-	۱۱٤۷
+	-	۲	٤	۲	۸
جمع	۱۱۲۳	۲۵	۵	۲	۱۱۵۵

جدول ۳. جدول دوبعدی (توافقی) از فراوانی آنتی بادی لیشمانیا در روش های IFAT و ELLSA

IFAT / ELLSA	≤ ۱ : ۱۰	۱ : ۲۰	۱ : ٤۰	۱ : ۳۲۰	≥ ۱ : ۶٤۰	جمع
-	۱۱۲٤	۵	۱۷	۱	-	۱۱٤۷
+	-	-	۳	۳	۲	۸
جمع	۱۱۲٤	۵	۲۰	٤	۲	۱۱۵۵

جمله طحال، کبد، غدد لنفاوی و مغز استخوان می‌باشد. اما تمام این روشها تهاجمی بوده و بنابراین از نظر عملی فقط در موارد خاص کلینیکی و در شرایطی که از تمام روشهای دیگر نتیجهٔ مطلوب به دست نیاید بهتر است از این روشها کمک گرفته شود. از طرف دیگر این روشها علاوه بر خطراتی که برای بیماران، به خصوص کودکان مبتلا در پی دارند از حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به روشهای سرولوژیک نیز برخوردار نمی‌باشند در مقایسه با این روشهای تهاجمی و خطرناک به نظر می‌رسد که روشهای سرولوژیک می‌توانند جایگزین مناسبی باشند[۱۳,۱٤].

در مطالعات مختلف از آزمون های سرولوژیکی اختصاصی در تشخیص لیشمانیوز احشایی نظیر IFAT و ELISA با نتایج مطلوب استفاده شده است، اما روشهای مذکور هر کدام به نحوی به دستگاهها و وسایل تخصصی و گرانقیمت نیاز دارند و کار با آنها باید توسط افراد باتجربه انجام شود که اصولاً در مناطق آندمیک کالاآزار عملی نمی باشد [۱٤،۱۱]. بنابراین در این مطالعه سعی شد روش سرولوژی DAT که یک روش ساده و اقتصادی در تشخیص لیشمانیوز احشایی می باشد مورد ارزیابی و مقایسه با روش های IFAT و ELISA قرار گیرد. لازم به ذکر است که به دلیل محدودیت های پژوهشی موجود در این بررسی تست خاصی به عنوان روش استاندارد طلایی مورد استفاده قرار نگرفته و فقط نتایج حاصله از هر سه روش مذکور با همدیگر مقایسه شدند.

با در نظر گرفتن تست IFA به عنوان تست مبنا، حساسیت تست DA برابر ۸۳/٤٪، ویژگی آن ۹۲/۳٪، قدرت پیشگویی مثبت ۷۱/٤٪، قدرت پیشگویی منفی ۹۶٪ و اعتبار تست DAT ۸۷/۸۵٪ می‌باشد. همچنین حساسیت تست ELISA برابر ۸۳/٤٪، ویژگی آن ۹۲٪، قدرت پیشگویی مثبت ۶۲/۵٪، قدرت پیشگویی منفی ۹۲٪ و اعتبار آن ۸۷/۷٪ محاسبه شد.

با در نظر گرفتن تست ELISA به عنوان تست مبنا، حساسیت تست DAT برابر ۷۵٪، ویژگی آن ۹۵/۸٪، قدرت پیشگویی مثبت ۸۵/۷٪، قدرت پیشگویی منفی ۹۲٪ و اعتبار این تست ۸۵/٤٪ می‌باشد. همچنین حساسیت تست IFA ۶۲/۵٪، ویژگی آن ۹۵/۶٪، قدرت پیشگویی مثبت ۸۳/۳٪، قدرت پیشگویی منفی ۸۸٪ و اعتبار تست IFA ۷۹٪ محاسبه گردید.

در مطالعه ای که توسط هریت و همکاران با روش DAT انجام شد، ویژگی و حساسیت به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۸/۹٪ گزارش گردید که حساسیت بالا شاید به خاطر انجام تغییراتی در روش DAT و خصوصاً رقت و یا غلظت آنتی ژن مورد نظر بوده است[۱۵]. همچنین مطالعات مختلف انجام شده در ایران ویژگی ۱۰۰-۷۲٪ و حساسیت ۱۰۰-۹۲٪ را برای روش DAT نشان داده است[۱۶].

با در نظر گرفتن تست DA به عنوان تست مبنا، حساسیت تست IFA برابر ۷۱/٤٪، ویژگی آن ۹۶٪، قدرت پیشگویی مثبت ۸۳/٤٪، قدرت پیشگویی منفی ۹۲/۳٪ و اعتبار این تست ۸۳/۷٪ می‌باشد. همچنین حساسیت تست ELISA برابر ۸۵/۷٪، ویژگی آن ۹۲٪، قدرت پیشگویی مثبت ۷۵٪، قدرت پیشگویی منفی ۹۵/۸٪ و اعتبار تست الایزا ۸۸/۸۵٪ محاسبه گردید.

بر اساس مطالعات مختلف انجام شده در ایران حساسیت و ویژگی های مختلفی برای تست های IFAT و ELISA ذکر گردیده است [۱٤،۱۱]. طبق این مطالعات در مواردی واکنش متقاطع آنتی ژن لیشمانیا در هر دو تست IFAT و ELISA با بعضی از بیماریهای عفونی دیگر مانند مالاریا، تیفوئید و آبسهٔ کبدی با عیارهای پائین وجود دارد ولی در لیشمانیوز احشایی معمولاً عیار پادتن لیشمانیا در اکثر موارد به اندازهٔ کافی بالا است و در موارد نادری ممکن است واکنش متقاطع در تشخیص سرولوژی کالاآزار با تست های فوق الذکر ایجاد اشکال نماید[۳]. از آنجا که کالاآزار در ایران معمولا در مناطق روستایی و دور افتاده ای شیوع دارد که فاقد امکانات لازم برای تشخیص آزمایشگاهی به روش های انگل شناسی یا سرولوژی اختصاصی IFAT و ELISA هستند ، لذا سعی شده است که از یک روش سرولوژی قابل اعتماد که انجام آن در چنین مناطقی عملی باشد مثل روش آگلوتیناسیون مستقیم

(DAT) کـه بـه وسـیلهٔ هریـت (Harith) و همکـارانش برای تشخیص و بررسـی سـرواپیدمیولوژی لیـشمانیوز احشایی پیشنهاد گردید استفاده شود[۳,۱۵].

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که هر چند آزمون های IFA و ELISA جهـت تـشخیص بیمـاران مبـتلا بـه کـالاآزار از کـارائی خـوبی برخوردارنـد ولـی نیازمند آزمایشگاه مجهز و پرسنل ورزیده مـی باشـند در صورتی که DAT یک روش ساده، ارزان، بدون نیـاز به تجهیزات پیچیـده و قابـل اجـرا در منـاطق آنـدمیک بـــرای تـــشخیص لیـــشمانیوز احـــشایی و مطالعـــات سرواپیدمیولوژی بوده و می توانـد جـایگزین مطمئنـی برای روش های پرهزینهٔ IFAT و ELISA باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با همکاری مالی انستیتو تحقیقات بهداشتی (طـرح شـمارهٔ ط- ۵٤/۶ / ۸۲ / ۲٤۱) در شهرسـتان گرمی و با پشتیبانی ایستگاه تحقیقـات بهداشـتی مـشکین شهر انجام گرفته است. بـر خـود لازم مـی‌دانـیم کـه از راهنمایی های ارزشمند استاد محترم جناب آقای دکتـر ادریسیان تشکر و قدردانی نمـاییم. همچنـین از زحمـات آقایـان دکتـر حـسینقلی زاده مـدیریت محتـرم شـبکهٔ بهداشـت و درمـان شهرسـتان گرمـی، دکتـر پـورزارع مسئول محترم مرکز مبارزه با بیماری هـای شهرسـتان گرمی، دکتر علوی ریاسـت محتـرم بیمارسـتان گرمـی، خانمها دکتـر حجـاران، آخونـدی، چـاره دار، مهـاجری و گروسی در آزمایشگاه لیـشمانیوز دانـشکدهٔ بهداشـت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران و سایر عزیزانی که ما را در اجرای این طرح یاری کردنـد تشکر و قدردانی می گردد.

References

1- Pearson RD. Leishmania Species, Visceral Kala-azar, In: Mandell GL, Doug Las RG, Bennet JE(Eds), Principles and practice of infectious diseases, 5th ed, New york, Churchill Livingstone, 2005: 2068-71.

2- Nadim A, Navid-Hamidi A, Javadian E, Bidruni GT, Amini H. Present status of kala-azar in Iran. Am J Trop Med Hygi. 1978; 27: 25-8.

۳- ادریسیان غلامحسین. لیشمانیوز احشایی در ایران و نقش تست‌های سرولوژی درتشخیص و بررسی اپیـدمیولوژی آن. مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ سوم، شمارهٔ ۲، ۱۳۷۵ ، صفحات ۹۷ تا ۱۰۸.

4- Sinha R, Sehgal S. Comparative evaluation of serological tests in India . J Trop Med Hygine. 1994; 97: 333-40.

5- Sendali G, Xiao-su H, Hoessli DC, Bordior C. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a leishmania donovaani realated circulating antigen. J Immunol Methods. 2001; 193: 9-15.

۶- محامی محمود، محبعلی مهدی، کشاورز حسین، حجاران هما، آخوندی بهناز، زارعی ذبیح الله، چاره دار سرور. بررسـی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی(کالاآزار) در شهرستان گرمی از استان اردبیـل. مجلـهٔ دانـشکدهٔ بهداشـت و انـستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دورهٔ چهارم، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۸٤، صفحات ٤۵ تا ۵۵ .

7- Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, Van Knapen F, De Korte P, Huigen E, et al. Application of a direct-agglutination test for detection of specific anti - leishmania antibodies in the canine reservoir, J Clin Microbiol. 1989; 27: 2252-7.

8- Edrissian GhH, Ahanchin AR, Gharachahi A, Ghorbani M, Nadim A, Ardehali S. Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars province, southern Iran. Irn J Med Sci. 1993; 18: 99-105.

9- Edrissian GhH, Akhavan E, Samar G. Immunofluorescence as a method of choice in diagnosis of visceral leishmaniasis. J Irn Med Council. 1977; 3: 185-90.

10- Voller A, Oneill P. Immuno-fluorescence method suitable for larg-scale application to malaria. Bull World Health Org. 1971; 45(4): 524-9.
11- Khorshidian S, Hajjaran H, Sarkissian MT, Edrissian GhH. Evaluation of ELISA, using intact promastigotes as antigen, for the diagnosis of visceral Leishmaniasis. Irn J Med Sci. 1994; 19: 15-8.
12- Desjeux P. Manual on visceral leishmaniasis control. WHO. 1996 ; 40 : 1-79.
13- Zijlstra EE, Ali MS, El-hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar a comparative study of parasitological methods and direct agglutination test in diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992; 86(5): 505-7.
۱٤- درستکار مقدم داود، حجازی سید حسین، قاسمی مهدی. ارزیابی و مقایسهٔ روش های سرولوژیکی ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم (IFAT) و آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) بـا اسـتفاده از آنتـی ژن اسـتاندارد شـده در تـشخیص لیـشمانیوز احشایی. مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دوره پانزدهم، شماره ٤۹، آذر و دی سال ۱۳۸٤، صفحات ۱ تا ۸ .
15- Harith A, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyge. 1986; 80: 583-7.
16- Mohebali M, Edrissian GhH, 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 J Parasitol. 2006; 1(1): 15-25