دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

مروری بر روش های تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی (کالاآزار)

مهدی فخار
استادیار انگل شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران،ساری،ایران

احسان احمدپور
دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران،ساری،ایران

نویسنده مسئول: مهدی فخار

تلفن:۰۹۱۲۲۵۲۲۷۸۲

پست الکترونیک:mahdif53@yahoo.com

آدرس:ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد،مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص) ،دانشکده پزشکی، صندوق پستی:۱۶۶۵-۴۸۱۷۵

چکیده

لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) نوعی بیماری عفونی سیستمیک است که روش های تهاجمی بیوپسی طحال، کبد ویا آسپیراسیون مغز استخوان بعنوان روش استاندارد طلایی برای تشخیص آن تعیین شده اند. در حال حاضر روشهای تشخیصی غیر تهاجمی مختلفی با ویژگی و حساسیت های متفاوت برای تشخیص کالاآزار وجود دارد. دراین میان روش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) به شرط تهیه آنتی ژن مطلوب، روش مناسبی بوده و به آسانی و در شرایط فیلد انجام پذیر می باشد. همچنین تست نواری و سریع rK39 (به منظور شناسایی آنتی بادی)که برای تشخیص اشکال حاد بیماری کالاآزار کاربرد دارد، در شرایط میدانی قابل انجام است. از روش های دیگری که اخیرا" برای تشخیص و برآورد پیش آگهی بیماری لیشمانیوز احشایی طراحی شده اند می توان به تست نواری KATEX(به منظور شناسایی آنتی ژن) و روش های ملکولی ساده، ارزان و قابل دسترس در فیلد اشاره نمود. در این مقاله مروری به انواع روش های تشخیصی رایج و نوین لیشمانیوز احشایی اشاره شده است.

واژه های کلیدی: تشخیص آزمایشگاهی ،لیشمانیوز احشایی، کالاآزار ، rk39، KATEX ، PCR

وصول مقاله:۹۱/۵/۲۵
اصلاح نهایی:۹۱/۸/۲۹
پذیرش مقاله:۹۱/۹/٦

آدرس مقاله:
فخار م، احمدپور ا" مروری بر روش های تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی (کالاآزار)".مجله علوم آزمایشگاهی بهار ۱۳۹۲،دوره هفتم(شماره ۱):۵۴-۴۵

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیوز یکی از بیماری های عفونی مهم انگلی است که توسط تک یاخته جنس لیشمانیا ایجاد می شود و به سه شکل عمده جلدی، جلدی- مخاطی و احشایی در انسان دیده می شود. نوع احشایی بیماری یا کالاآزار در بیشتر مناطق ایران به صورت تک گیر و در مناطق مشکین شهر، دشت مغان، کلیبر، برازجان، خورموج، فیروزآباد، جهرم، نور آباد، داراب و قم به صورت بومی دیده می شود (۱-۶). عامل اصلی بیماری کالاآزار در منطقه وسیع حوزه مدیترانه از جمله ایران، لیشمانیا اینفانتوم (Leishmania infantum) می باشد. کالاآزار در ایران اغلب در کودکان زیر ۱۲ سال و بیشتر در عشایر و روستاییان گزارش می شود (۱و۲و۷). لیشمانیوز احشایی ممکن است از عفونت فاقد علامت تا بیماری با بروز علایم متغیر باشد به طوری که در برخی از مناطق عفونت بدون علایم بسیار شایع تر از بیماری بالینی است. علایم اصلی بیماری شامل تب، اسپلنومگالی و کم خونی بوده و یافته های آزمایشگاهی غیر طبیعی مانند پان سایتوپنی، هیپرگاماگلوبینمی و هیپوآلبومینمی نیز ممکن است در بیماران مشاهده شود (۱،۷). مخازن این بیماری در ایران شامل سگ و سگ سانان (روباه ، شغال و گرگ) بوده و ناقلین آن گونه های مختلف پشه خاکی جنس فلبوتوموس می باشد که گونه غالب ناقل در ایران فلبوتوموس ماژور است (۲،۶،۷). در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع بیماری در انسان، ممکن است تا ۹۸درصد باعث مرگ و میر بیماران بویژه در کودکان گردد. بنابراین تشخیص دقیق و به موقع بیماری و در نهایت درمان بیماران از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۲،۵،۶). همچنین با توجه به شیوع بیماری ایدز در جوامع بشری و از جمله ایران و گزارش های متعدد عفونت توام ایدز و لیشمانیوز احشایی از دنیا به خصوص جنوب اروپا، به نظر می رسد استفاده از روش های تشخیص سریع، آسان و غیر تهاجمی از جایگاه خاصی برخوردار بوده وآشنایی با آنها امری ضروری است (۸-۱۰). انواع روش های تشخیصی و تعیین هویت عوامل ایجاد کننده بیماری کالاآزار در این مقاله مرور شده است که شامل روش های پارازیتولوژی، ایمونولوژی، سرولوژی، ملکولی، بیوشیمیایی و سایر روش ها می باشند.

روش های پارازیتولوژی:

الف- روش تهیه گسترش مستقیم (Direct Smear): در این روش از نمونه های آسپیراسیون مغز استخوان، طحال و کبد گسترش های تماسی یا (Impression smear) تهیه می شود و پس از تثبیت با متانول توسط رنگ های گیمسا و رایت، رنگ آمیزی می گردد. حساسیت روش تهیه اسمیر از مغز استخوان ۶۰ تا ۸۵ درصد و طحال بیش از ۹۵ درصد می باشد (۱۰-۱۲). البته با وجود حساسیت بالای آسپیراسیون طحال، به علت اسپلنومگالی ناشی از بیماری و در نتیجه احتمال پارگی طحال و ایجاد خونریزی شدید، در حال حاضر از این روش استفاده نمی شود. نمونه های بیوپسی کبد و طحال را می توان با رنگ های روتین بافت شناسی مانند هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی نمود. در روش مستقیم، آماستیگوت های انگل لیشمانیا را می توان در داخل ماکروفاژها یا خارج از آنها مشاهده نمود که دارای یک هسته و یک کینتوپلاست مشخص می باشند.

ب - روش کشت (Culture Method): برای کشت انگل لیشمانیا، مقداری از نمونه حاصل از آسپیراسیون را که قبلا" در گسترش مستقیم توضیح داده شد، می توان وارد محیط های کشت نمود. محیط های کشت مورد استفاده معمول شامل M199, Schneider's, Evans, RPMI 1640 ، N.N.N ،Grace's و غیره می باشند. دمای مناسب جهت نگهداری انگل لیشمانیا در محیط کشت، ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتیگراد می باشد. بعضی از محیط های کشت فوق الذکر از جمله M199, RPMI, Schneider's و Grace's تک فازی بوده و بیشتر به منظور کشت انبوه انگل از آنها استفاده می شود و برخی دیگر مانند NNN و Evans جزو محیط های کشت دو فازی بوده و برای جداسازی اولیه و حمل انگل از نقطه ای به نقطه دیگر مورد استفاده قرار می گیرد (۱۰). همچنین Allahverdiyev و همکارانش روش کشت میکروکالچر را درکشور ترکیه با استفاده از لوله های

Archive of SID

www.SID.ir

میکروهماتوکریت حاوی محیط کشت، در نمونه های اخذ شده از مغز استخوان و خون محیطی، مورد بررسی قرار داده و حساسیت این روش را ۷۷/۸- ۱۰۰ درصد گزارش نمودند (۱۳).

ج - روش تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی: این روش به طور معمول به عنوان یک روش تشخیصی نبوده و بیشتر در کارهای تحقیقاتی از آن بهره می برند، زیرا رشد و تکثیر انگل در بدن حیوان ممکن است چندین هفته یا ماه طول بکشد، اما به هرحال از حیواناتی نظیر هامستر، موش و خوکچه هندی برای این منظور می توان استفاده نمود. هامستر طلایی بهترین حیوان آزمایشگاهی برای حفظ و نگهداری انگل های کمپلکس لیشمانیا دنووانی (L.infantum, L.donovani, L.chagasi) می باشد. برای انجام این روش نمونه های مشکوک آلوده به انگل (مانند مغز استخوان بیمار و یا نمونه های آسپیراسیون از کبد) تحت شرایط استریل و از طریق داخل صفاقی یا داخل قلبی به حیوان حساس تزریق می گردند. لازم به ذکر است که هر دو فرم آماستیگوت و پروماستیگوت انگل برای حیوان حساس آزمایشگاهی، آلوده کننده می باشد، به همین سبب از محیط های کشت حاوی انگل (پروماستیگوت) نیز می توان به حیوان حساس تزریق کرده و عفونت زائی و بیماریزایی انگل را مورد بررسی قرار داد. در این روش به طور معمول یک ماه پس از تلقیح، علایم بیماری از جمله ضعف، لاغری، گوشه گیری و ژولیده شدن موهای حیوان ظاهر می گردد که پس از آن می توان حیوان آلوده را با روش اخلاقی کشته و از اندام های مختلف، انگل را جداسازی نمود (۱۲،۱۰).

روش‌های تشخیص ایمونولوژی (Immunodiagnosis):

الف- شناسایی آنتی ژن(Antigen detection) : این روش از روش های شناسایی آنتی بادی اختصاصی تر بوده و از دلایل برتری آن می توان به عدم وجود واکنش متقاطع، پیگیری بیماران پس از درمان و استفاده از آن در تشخیص بیماری در افراد با نقص ایمنی مانند بیماران ایدز که دچار نقص در تولید آنتی بادی هستند، اشاره نمود.

De Colmenares دو بخش پلی پپتیدی شامل ۷۲-۷۵ کیلو دالتون و ۱۲۳ کیلو دالتون را در ادرار بیماران کالاآزاری گزارش نموده است که حساسیت و ویژگی بخش ۷۵-۷۲ کیلو دالتونی به ترتیب ۹۶ درصد و ۱۰۰درصد بود. از طرف دیگر با توجه به اینکه این آنتی ژن ها، در مدت سه هفته پس از درمان بیمار، از ادرار حذف می شوند، لذا آزمون بسیار مناسبی برای ارزیابی روند درمان در بیماران می باشد (۱۴). یک آزمون بر مبنای آگلوتیناسیون لاتکس برای شناسایی آنتی ژن لیشمانیایی در ادرار بیماران کالاآزاری با حساسیت بین ۶۸ تا ۱۰۰ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد معرفی شده است. در این روش آنتی ژن ۱۵- ۵ کیلو دالتونی موجود در ادرار بیماران کالاآزاری با استفاده از روش Capture-ELISA و کاربرد آنتی بادی مونوکلونال علیه این آنتی ژن، ردیابی می گردد (۱۵).

ب- شناسایی آنتی بادی (Antibody detection): روش های غیر اختصاصی تشخیص کالاآزار بر اساس شناسایی آنتی بادی موجود در سرم، چندین دهه مورد استفاده قرار گرفته که Napier's formol gel یا Aldehyde test و Chopra antimony نمونه هایی از این روش ها می باشد. پایین بودن ویژگی و حساسیت این آزمایش ها آنها را تا حد زیادی غیر قابل اعتماد می کند، البته چندین روش شناسایی آنتی بادی با ویژگی و حساسیت بالا نیز وجود دارد (۱۶). در فرد بیمار با فعال شدن لنفوسیت های B، سطوح بالایی از آنتی بادی های IgG و IgM علیه هاپتن و پروتئین های غیراختصاصی مختلف تولید می گردد که وجود سطوح بالای آنتی بادی علیه آنتی ژن های انگل، تشخیص کالاآزار را آسان می کند. روش های سرولوژیکی متنوعی برای تشخیص آنتی بادی های سرمی وجود دارد که بر اساس اختصاصی بودن واکنش آنتی بادی علیه آنتی ژن و یا اپی‌توپ طراحی شده اند. حساسیت این آزمایش ها به روش آزمایش و ویژگی آن فقط به آنتی ژن بستگی دارد، از این روش های تشخیصی می توان به: ژل دیفیوژن، ثبوت مکمل، هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA)، ایمنوفلورسنت آنتی بادی (IFA) و کانترکارنت ایمونوالکتروفورز (CCIE) اشاره نمود که به جز آزمایش IFA بقیه آزمایش ها به

Archive of SID

www.SID.ir

ندرت برای تشخیص روزمره بیماری کالاآزار استفاده می شوند (۱۶-۲۰). در سال ۱۹۸۸ آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) اصلاح شده ای برای تشخیص کالاآزار در چندین کشور بومی مورد استفاده قرار گرفت. جهت انجام این آزمایش پروماستیگوت های انگل با تریپسین مخلوط و سپس در فرمالین تثبیت شده و با رنگ آبی کوماسی رنگ آمیزی و در پایان سرم بیمار در مجاورت آنتی ژن قرار گرفته و روز بعد، در صورت وجود بیماری آگلوتیناسیون مشاهده می گردد. بر اساس مطالعات گسترده در کشورهای مختلف آزمایش DAT دارای حساسیت ۱۰۰-۹۱ درصد و ویژگی ۷۲-۱۰۰درصد می باشد (۲۱-۲۵). در مطالعه متاآنالیز پس از بررسی ۳۰ مطالعه انجام شده با استفاده از روش DAT حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب ۹۴/۸ و ۸۵/۹ درصد برآورد گردیده است(۲۲). از معایب این آزمایش می توان به شکنندگی آنتی ژن، نیاز به زنجیره سرما برای حمل آنتی ژن و گوناگونی دسته های آنتی ژنی (Batch-to-batch variations) اشاره نمود (۲۲). روش الایزا به عنوان یک آزمایش سرولوژیک تقریباً برای تشخیص همه بیماری های عفونی از جمله لیشمانیوز کاربرد دارد. این آزمایش دارای حساسیت بالایی است اما ویژگی آن به آنتی ژن مورد استفاده بستگی دارد که به طور معمول آنتی ژن محلول خالص می باشد. این آنتی ژن از انجماد و ذوب مکرر (۶-۴ بار) سوسپانسیون پروماستیگوت ها در بافر فسفات سالین (PBS) و به دنبال آن سانتریفیوژ سرد با دورg۲۰۰۰۰-۱۰۰۰۰ به دست می آید. مایع رویی به عنوان آنتی ژن محلول استفاده می شود و در چاهک های الایزا بعد از تخمین میزان پروتئین (۵۰۰۰ng/ml - ۱۰۰) پوشانده می‌شود. حساسیت این آزمایش با استفاده از این غلظت از آنتی ژن محلول خالص ۸۰-۱۰۰ درصد است اما واکنش های متقاطع با سرم بیماران تریپانوزومیازیس، توبرکلوزیس و توکسوپلاسموز گزارش شده است (۱۷)، از سوی دیگر با استفاده از سایر آنتی ژن ها(116KDa-72KDa -66KDa) ویژگی ۱۰۰درصد بدست می آید، اما حساسیت آزمایش ۳۷/۵درصد می باشد(۱۷،۱۹). براساس گزارش Palatnik-de-Souza و همکاران، استفاده از اتصال مانوز-فوکوز که یک گلیکوپروتئین 36 KDa بیان شده در سراسر چرخه زندگی لیشمانیا (آماستیگوت و پروماستیگوت) است به عنوان آنتی ژن در آزمایش الایزا، حساسیت آزمایش را به ۱۰۰ درصد و ویژگی آن را به ۹۶درصد می رساند (۲۶). همچنین در مطالعه ای دیگر گزارش شده است که حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا با استفاده از آنتی ژن های محلول بدست آمده از پروماستیگوت های کشت داده شده در محیط فاقد پروتئین افزایش می یابد (۲۰). در مطالعه میکائیلی و همکاران در ایران حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا با استفاده از آنتی ژن های محلول به ترتیب ۸۳/۶ و ۹۰/۵ درصد بدست آمد (۲۰).

آنتی ژن نوترکیب rK39 که در ژن ناحیه Kinesin انگل محفوظ است، برای آنتی بادی های بیماران مبتلا به کالاآزار با عوامل L. donovani complex اختصاصی و بسیار حساس بوده و نشان دهنده شروع بیماری حاد می باشد (۲۷،۲۸). ویژگی و حساسیت این آنتی ژن در تشخیص کالاآزار و PKDL در آزمایش الایزا ۱۰۰درصد است (۲۷). میزان آنتی بادی علیه rK39 به طور مستقیم با فعالیت بیماری در ارتباط است و برای پیگیری بیماران پس از درمان مناسب است به طوری که با درمان موفق، میزان آن به سرعت پائین آمده و با بازگشت بیماری این میزان به سرعت دوباره افزایش می یابد(۲۹،۳۰). به خاطر موقعیت های خاص جغرافیایی که در مناطق بومی وجود دارد و عدم امکان دسترسی و استفاده گسترده از روش های پیچیده تشخیص، نیازمند بکارگیری روش تشخیصی مناسب، سریع و ساده با حساسیت و ویژگی بالا می باشد. لذا آزمایش ایمونوکروماتوگرافی بر اساس آنتی ژن rK39 در موقعیت‌های مشکل میدانی استفاده می شود، به این صورت که آنتی ژن نوترکیب بر روی نوار کاغذی نیتروسلولزی مستطیل شکلی به صورت باندی از قبل پوشانده می شود و آنتی پروتئین A نیز در بالای باند آنتی‌ژنی روی کاغذ اضافه می‌شود، سپس از نوک انگشت بیمار به اندازه نیمی از یک قطره خون، سرم یا پلاسما در نوک نوار قرار داده می شود

1-Recombinant kinesin 39
2-Post Kala azar Dermal Leishmaniasis
3- Delayed-Type Hypersensitivity

www.SID.ir

پس از آن نوک نوار را در ۵-۴ قطره PBS غوطه ور کرده روی اسلاید شیشه ای تمیزی قرار داده می شود. در صورت وجود آنتی بادی در نمونه بیمار با کونژوگه (پروتئین A کلوئیدال طلایی) واکنش داده و با حرکت توسط خاصیت موئینگی و واکنش با آنتی ژن rK39 باند صورتی رنگی را ایجاد می نماید. باید توجه کرد که در نوار فرد بیمار، دو باند صورتی رنگ ایجاد می شود که یک باند مربوط به شاهد و باند دیگر مربوط به آنتی‌بادی بیمار است. حساسیت این آزمایش۱۰۰درصد و ویژگی آن ۹۸درصد می باشد (۱۱،۲۷،۳۱). طبق مطالعه ای در سودان همه بیماران مبتلا به کالاآزار که آزمایش نواری rK39 آنها منفی بود IgG علیه rK39 را توسط میکروالایزا نشان دادند (در تیتر های پائین)، همچنین در مطالعه دیگری در جنوب اروپا آزمایش نواری rK39 فقط در ۷۱/۴ درصد بیماران مثبت بود، که این تفاوت در حساسیت آزمایش احتمالاً به علت تفاوت در پاسخ های آنتی بادی در نژادهای مختلف است (۲۴،۲۵). از آنجایی که IgG ضد rK39 در سرم بیماران مدتی بعد از درمان هم وجود دارد، این آزمایش برای تشخیص بیمارانی با عود کالاآزار که تاریخچه ای هم از بیماری دارند، نباید استفاده شود. مشکل دیگر آزمایش نواری rK39، نتایج مثبت کاذبی است که ممکن است در مبتلایان به بیماری های دیگر از جمله مالاریا، تب تیفوئید و توبرکلوزیس دیده شود. با وجود این محدودیت ها، مناسب بودن این آزمایش برای تشخیص آلودگی های حاد لیشمانیوز به اثبات رسیده و تنها روش تشخیصی موجود برای کالاآزار است که دارای ویژگی و حساسیت قابل قبولی بوده و همچنین در هر شرایطی به سادگی قابل انجام و کم هزینه می باشد (۳۱،۲۶).آنتی بادی های اختصاصی توسط روش وسترن بلات نیز می‌توانند ردیابی شوند، به طوری که در این آزمایش پروماستیگوت های *L. donovani* را پس از رشد و رسیدن به فاز لگاریتمی لیز و پروتئین محلول را بر روی ژل دودسیل سولفات پلی آکریلامید الکتروفورز نموده و پروتئین های جدا شده را بر روی نوار نیتروسلولز قرار می دهند و با سرم بیمار مجاور می نمایند، حساسیت این روش در صورت استفاده از آنتی بادی نشاندار افزایش می یابد، اما این روش وقت گیر، پر هزینه و از نظر تکنیکی سخت می باشد (۳۲).

ج- آزمون پوستی(Skin testing): واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری (DTH) یا ایمنی بواسطه لنفوسیت های T، یک پاسخ ایمنی اختصاصی است. آزمون پوستی مونته نگرو (آزمایش پوستی لیشمانین) نوعی روش تشخیصی بر اساس واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری ویژه لیشمانیوز است، اما استفاده از این آزمایش دارای محدودیت هایی است (۱۰،۱۱،۳۳). در این روش ۰/۵ سی سی از پروماستیگوت های *L.major* کشته شده توسط فنول (حدود ۵*۱۰۷ پروماستیگوت) را در داخل پوست ساعد بیمار تزریق و بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت، قطر تورم ایجاد شده اندازه گیری می‌گردد، به عنوان شاهد در ساعد دیگر بیمار سرم فیزیولوژی به همراه فنول تزریق می شود. این آزمایش در موارد حاد کالاآزار به خاطر عدم واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری منفی است و تنها در مواردی که کالاآزار بهبود یافته است، مثبت می شود که مهمترین محدودیت و اشکال آن به حساب می آید ولی می تواند برای مطالعات اپیدمیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد (۱۱،۳۳).

روش های ملکولی:

از سال ۱۹۸۰ به بعد تکنیک های جدید برای شناسایی انگل ها از جمله روش هیبریداسیون DNA، واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) و غیره توسعه یافت (۳۴،۳۵). انجام روش PCR برای تشخیص و تعیین هویت عوامل ایجاد کننده لیشمانیوز احشایی از سال ۱۹۹۰ به بعد آغاز و بر روی نمونه های خون، مغز استخوان، طحال و غدد لنفاوی بیماران انجام گرفته است (۳۴-۳۸). محققین با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی های ثابت موجود در حلقه های کوچک DNA کینتوپلاست گونه های مختلف انگل لیشمانیا در بافت های مختلف بیمار به این نتیجه رسیدند که استفاده از DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا برای تشخیص و بررسی های ملکولی لیشمانیا بسیار مناسب است. در مطالعه ای در سودان، روش PCR نسبت به روش میکروسکوپی برای شناسایی انگل در غدد لنفاوی و مغز استخوان

Archive of SID

www.SID.ir

حساس تر گزارش شده است (۳۴). همچنین مطالعات فراوانی به منظور تشخیص کالاآزار و تعیین هویت انگل در خون محیطی بیماران با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفته است که نتایج مطلوبی را به همراه داشته است. در مجموع حساسیت و ویژگی روش PCR بر روی خون محیطی در نقاط مختلف دنیا به ترتیب ۷۰-۱۰۰ درصد و ۱۰۰درصد و در ایران ۸۲-۸۵ درصد و ۱۰۰درصد گزارش شده است، که این تفاوت به عوامل مختلفی از جمله نوع پرایمر مورد استفاده، گونه انگل، میزان تراکم انگل در خون و غیره بستگی دارد (۳۴-۳۸). در استفاده از روش خون محیطی برای بررسی های ملکولی، بهتر است از بافی کوت استفاده شود، چرا که حساسیت روش را تا ده برابر افزایش خواهد داد، همچنین می توان از خون محیطی جمع آوری شده با استفاده از کاغذ صافی نیز در این روش استفاده نمود (۳۷). تکنیک PCR-ELISA روش بسیار حساسی است که علاوه بر تشخیص کالاآزار، می توان با استفاده از آن سوش های L.donovani complex را نیز شناسایی نمود، این روش توانایی شناسایی ۰/۱ پروماستیگوت یا ۱ فمتوگرم (fg) از مواد حاوی ژنوم انگل را دارد (۳۹). تکنیک دیگر Fluorogenic-PCR (F-PCR) می باشد. اساس این روش استفاده از پروب فلورسنت DNA می باشد که ویژه نواحی ثابت واحدهای کوچک RNA ریبوزومی (rRNA) انگل لیشمانیا و استفاده از یک جفت پرایمر می باشد. این روش با حساسیت و ویژگی بالا و بسیار سریع در طی کمتر از ۲۴ ساعت انجام می شود (۴۰). تکنیک بعدی RFLP-PCR است که می توان از این روش در تعیین هویت انگل های جدا شده از بیماران و همچنین جهت تفکیک عود (Relapse) و عفونت مجدد (Re-infection) در بیماران بهبود یافته از کالاآزار استفاده نمود (۳۵). از جمله مزایای PCR در تشخیص کالاآزار، می‌توان به مواردی از قبیل تشخیص زودرس بیماری به خصوص در افراد بدون علامت بالینی و دارای عفونت مخفی، حساسیت و ویژگی بسیار بالا، غیر تهاجمی بودن روش جهت تشخیص بیماری در افراد دچار نقص سیستم ایمنی، ارزیابی درمان پس از دارو درمانی و تعیین گونه انگل اشاره نمود از معایب روش PCR نیز می توان نیاز به امکانات و تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی و افراد با تجربه اشاره نمود، شاید مهمترین محدودیت روش PCR استفاده آن در مناطق بومی باشد. در این نواحی گاهی نتیجه آزمایش افراد سالم نیز به صورت کاذب مثبت می شود. ممکن است چنین مواردی به اشتباه کالاآزار تشخیص داده شوند. به همین دلیل توصیه می شود که در مناطق بومی بیماری، جهت تشخیص نهایی از هر دو روش سرولوژی و مولکولی به طور همزمان استفاده شود (۴۱). تنوع ژنتیکی در میان کمپلکس لیشمانیا دونووانی به موضوع جالبی تبدیل شده که به دنبال آن بسیاری از روش های ملکولی از جمله RAPD-PCR, RFLP-PCR، آنالیز Microsatellite، تعیین توالی ITS2, ITS1، جایگاه های mini- exon (mRNA) و چندین ژن کد کننده پروتئین به کار گرفته شده اند (۳۴،۴۱). نتایج مطالعه فخار و همکاران نشان می دهد که در میان روش های تایپینگ انگل های لیشمانیا (فنوتیپی و ژنوتیپی) روش تایپینگ ریزماهواره (Microsatellite) که برای اولین بار بر روی نمونه های ایران و برای اولین بار در جهان بر روی اسلایدهای میکروسکوپی انجام گرفت ابزاری ارزشمند، دقیق، سریع و قابل اعتماد برای مطالعات ژنتیک جهت اپیدمیولوژی ملکولی می باشد(۴۲). اخیرا" روش ملکولی جدیدی به نام LAMP برای تشخیص بیماری های عفونی از جمله لیشمانیوز احشایی مورد استفاده قرار گرفته است(۴۳). از مزایای این روش نسبت به سایر روش های ملکولی نظیر PCR، انجام تمامی واکنش ها در داخل یک میکروتیوب و عدم نیاز به دستگاه ترمو سایکلر و الکتروفورز می باشد. در صورت انجام واکنش و تکثیر ژن مورد نظر در دمای ۶۰-۶۵ درجه سانتی گراد، ماده‌ای رنگی ایجاد شده که مثبت یا منفی بودن واکنش را نشان می‌دهد (۴۳).

روش های بیوشیمیایی: این روش بر اساس الکتروفورز لیشمانیا ایزو آنزیم های MDH, PGM, NH1, NH2, 6PGD,GPI بر روی ژل های استات سلولز، پلی آکریلامید

Archive of SID

www.SID.ir

و یا نشاسته و تعیین زایمودم های انگل می باشد. ابتدا انگل را در محیط های کشت به تولید انبوه رسانده و سپس با جمع آوری انگل الکتروفوز انجام می شود. روش های بیوشیمیایی هنوز روش استاندارد و قابل قبول جهت تعیین هویت انگل لیشمانیا و تعیین سوش های آن می باشد (۴۵،۴۴). وجود تظاهرات بالینی غیر معمول کالاآزار در بیماران ایدزی و همچنین افراد دچار نقص سیستم ایمنی یک چالش تشخیص در این بیماران می باشد. تب، اسپلنومگالی و هپاتومگالی در کمتر از نیمی از این بیماران دیده شده است. در این افراد، لیشمانیوز به همراه درگیری معده-روده‌ای، آب آوردگی شکم، جنب یا پریکارد، ابتلاء ریه ها، لوزه ها، پوست و حتی به صورت بیماری منتشره وجود دارد. اصول تشخیصی برای این بیماران همانند روش هایی است که برای بیماران کالاآزار غیر آلوده به ایدز به کار می رود، آماستیگوت ها ممکن است درمحل های غیر معمول از جمله در نمونه هایی از شستشوی مایع برونش-آلوئولار (BAL)، مایع جنب و یا بیوپسی نمونه هایی از دستگاه گوارش و بافی کوت خون محیطی دیده شوند. باید توجه کرد که حساسیت آزمایش های ایمونولوژیکی مثل IFA و ELISA برای بیماران ایدزی مبتلا به کالاآزار به دلیل کاهش سطح ایمنی پائین است، از این روی PCR خون و یا بافی کوت روش تشخیصی مفیدی برای این بیماران می تواند باشد (۴۶-۴۹).

نتیجه گیری

بطورکلی تشخیص بیماری لیشمانیوز احشایی یا کالاآزار پیچیده است چرا که تظاهرات بالینی آن با سایر بیماری های شایع از قبیل مالاریا، تیفوئید و سل مشابه بوده و گاهی این بیماری ها بطور هم زمان به عنوان عفونت توأم در شخص مبتلا به کالاآزار دیده می شوند. از سوی دیگر به دلیل وجود هایپرسلولاریتی و معکوس شدن رده میلوئید به اریتروئید، پلاسماسیتوز، مگاکاریوسیت ها، نکروز و فیبروز در آسپیراسیون و بیوپسی مغز استخوان در بسیاری از موارد بیماری کالاآزار با انواع لوکمی ها، لمفوما، آنمی ها (همولیتیک، مگالوبلاستیک)، اختلالات میلوپرولیفراتیو و هموگلوبینوپاتی ها، اشتباه شده و منجر به تشخیص نادرست و در نتیجه درمان اشتباه و نامناسب می گردد که در بسیاری از این موارد، تشخیص نادرست منجر به مرگ بیمار خواهد شد(۵۰). با توجه به اینکه عدم تشخیص و درمان به موقع ممکن است تا ۱۰۰ درصد باعث مرگ و میر بیماران به ویژه کودکان گردد، لذا تشخیص دقیق و زودرس بیماری از اهمیت ویژه ای برخوردار است. بنابراین دستیابی به روش یا روش های کارآمد، دقیق، آسان، کم هزینه و در عین حال سریع در خصوص تشخیص و شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری امری ضروری است(جدول۱). لذا توصیه می کنیم در مناطق بومی بیماری کالاآزار در موارد مشکوک به لوکمی علاوه بر آزمایش مغز استخوان و جستجوی دقیق از نظر اجسام لیشمن، از آزمون های سرولوژی و PCR جهت رد یا تایید نمودن بیماری کالاآزار استفاده گردد، تا تشخیص به تاخیر نیافتد زیرا آزمایش مغز استخوان از حساسیت پایینی برخوردار است و شانس مشاهده آماستیگوت کم است. همچنین به منظور جلوگیری از آسپیراسیون و بیوپسی های متعدد مغز استخوان جهت ارزیابی درمان و بررسی پیش آگهی بیماری، از روش PCR اختصاصی بر روی خون محیطی (۵۱) و یا روش PCR کمی (Real-time PCR) استفاده گردد. همچنین در میان روش های سرولوژی، روش IFA دارای بیشترین حساسیت و روش DAT دارای بیشترین ویژگی است. اما در حال حاضر برای غربالگری جمعیت های انسانی و مخازن حیوانی در مطالعات سرواپیدمیولوژیک کالاآزار در مناطق بومی ایران از روش DAT استفاده می‌شود که روشی موثر در پایش بیماران به صورت فعال و پاسیو می‌باشد(۲۱،۴۱،۵۱و۵۲).

روش PCR اختصاصی جنس، ابزاری ارزشمند در تشخیص زودرس بیماری، تائید موارد مشکوک به بیماری، شناسایی موارد بدون علامت (۵۲،۴۸،۳۸)و دارای علامت بیماری و غـربالگری جمعیت انسانی(۵۱) و مخازن حیوانی بویژه سگ های اهلی مناطق بومی(۵۲) در مطالعات اپیدمیولوژی می باشد. همچنین می توان این روش را به طور مستقیم بر روی نمونه های مختلف بالینی (خون، سرم، ادرار، مغز

Archive of SID

www.SID.ir

استخوان) بکار برد. برای تایید تشخیص موارد مشکوک به بیماری کالاآزار، استفاده هم زمان از دو آزمون IFA و PCR از کارآیی بسیار بالایی برخوردار است(۵۱). روش PCR اختصاصی گونه، روش دقیق، سریع و آسان برای تعیین گونه انگل های لیشمانیا با استفاده از نمونه های بافتی (مغز استخوان، کبد و روده) می باشد و همچنین حساسیت آن از روش های انگل شناسی(کشت، تلقیح به حیوان حساسیت آزمایشگاهی و روش مستقیم) بیشتر است و علاوه بر آن نیاز به کشت انگل ندارد. روش تایپینگ میکروستلایت نیز ابزاری دقیق، سریع و قابل اعتماد برای مطالعات اپیدمیولوژی و ژنتیک جمعیت گونه های مختلف لیشمانیا بوده و جایگزین بسیار مناسبی برای روش الکتروفورز ایزوآنزیم ها در طبقه بندی و تعیین سوش این انگل ها می باشد. البته اخیرا" از روش پروتئومیکس نیز جهت بررسی تقابل بین لیشمانیا ومیزبان، تفاوتهای پروتئین ها در بین گونه های مختلف و نیز مکانیسم های مقاومت دارویی استفاده شده است (۵۲).

در پایان پیشنهاد می کنیم مطالعاتی در مورد انتخاب روش PCR به عنوان روش استاندارد طلایی در تشخیص، ارزیابی درمان و پیش آگهی کالاآزار در مناطق بومی ایران صورت گیرد. همچنین اطلاع رسانی مناسبی برای پزشکان در زمینه روش های مختلف تشخیصی به منظور جلوگیری از تشخیص اشتباه بیماری کالاآزار و تفریق آن از سایر بیماری ها انجام گیرد.

جدول شماره ۱- حساسیت و ویژگی روش های مختلف تشخیص کالاآزار

انواع روش ها	نوع آزمون	حساسیت (٪)	ویژگی (٪)	منبع
روش های تشخیص ایمنی:	کانترکارنت ایمونوالکتروفورز	۷۰ – ۷۵	۹۰–۹۵	۱۶و۳۱
۱- شناسایی آنتی بادی	ایمونوفلورسانت غیرمستقیم	۷۳ – ۷۵	۸۰ – ۹۰	۱۶و۲۰و۲۴
	آگلوتیناسیون مستقیم	۹۱-۱۰۰	۷۲-۱۰۰	۱۲و۱۶و۲۰و۲۲ و۲۴
	الایزا با آنتی ژن rk39	۱۰۰	۷۲ – ۹۵	۱۶-۲۰و۲۴ ۲۷و۲۹و۳۰
	تست نواری سریع با rk39	۱۰۰	۸۸ – ۹۸	
۲-شناسایی آنتی ژن	KATEX	۶۸ – ۱۰۰	۱۰۰	۱۵
۳- شناسایی DNA	PCR با پرایمرهای عمومی RV1/RV2	۸۲-۸۵ (خون)	۱۰۰	۱۱و۳۱و۳۴و۳۶- ۳۸و۵۱
	PCR با پرایمرهای عمومی RV1/RV2	۱۰۰(مغز استخوان)	۱۰۰	۱۱و۳۱و۳۴و۳۶-۳۸
	PCR با پرایمرهای عمومی RV1/RV2	۹۶.۸(ادرار)		۱۱و۳۱و۳۶ ۴۷
پارازیتولوژی	اسمیر مغزاستخوان	۶۰-۸۵	۱۰۰	۱۱و۱۲و۵۱
	اسمیر طحال	>۹۵	۱۰۰	۱۱و۱۲

References

1. Fakhar M, Rahmati B. *Visceral leishmaniasis in Mazandaran Province and review on its current situation in Iran. JBUMS*. 2011; 13(2): 68-75.[Persian]

2. Motazedian H, Noyes H, Maingon R. *Leishmania and Sauroleishmania: the use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates*. Exp Parasitol. 1996; 83(1):150-154.

3. Fakhar M , Mohebali M, Barani M. *Identification of endemic focus of Kakla-azar and seroepidemiologcal study of visceral leishmania infection in human and canine in Qom Province*. Armaghan-danesh. 2004; 9(3): 43-52.[Persian]

4. Fakhar M, Motazedian MH, Asgari Q , Mohebali M, Mehrabani D. *A New Endemic Focus of Visceral Leishmaniosis in Southern Iran*. Armaghane-Danesh. 2006; 11(2): 104-110. [Persian]

5. Sarkari B, Fakhar M, Ebrahimi S, Motazedian MH, Hatam GH, Kalantari M, et al. *Characterization of Leishmania parasites isolated from Kala- azar patients in Kohgiloyeh and BoyerAhmad, using semi-nested PCR.* Armaghan-Danesh. 2006; 11(1): 27-32. [Persian]

6. Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. *Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran*. Vet Parasitol. 2005; 129(3-4): 243-251.

7. Alborzi AAV, Pouladfar GHR, Aalami MH. *Visceral leishmaniasis; literature review and Iranian experience*. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2007; 2(2): 99-108.

8. Albrecht H. *Leishmaniasis: new perspectives on an underappreciated opportunistic infection*. AIDS. 1998; 12(16): 2225–2226.

9. Sundar S, Pai K, Kumar R, Pathak-Tripathi K, Gam AA, Ray M, et al. *Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from Northeast India*. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65(3): 193-196.

10. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. *Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control*? Nat Rev Microbiol. 2007; 5(11): 873-82.

11. Sundar S, Rai M. *Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis* . Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9(5): 951-958.

12. 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 the direct agglutination test in diagnosis*. Trans R SocTrop Med Hyg. 1992; 86(5): 505–507.

13. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabas E, et al. *The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood*. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73(2): 276–280.

14. De Colmenares M, Portus M, Riera C, Gallego M, Aisa MJ, Torras S, et al. *Detection of 72–75 kD and 123 kD fractions of leishmania antigen in urine of*

15. Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, et al. *Latex agglutination test for the detection of Urinary antigens in visceral leishmaniasis*. Acta Trop. 2001; 78(1): 11–16

16. Sinha R, Sehgal S. *Comparative evaluation of serological tests in Indian kala-azar*. J Trop Med Hyg. 1994; 97(6): 333–340.

17. Choudhry A, Guru PY, Saxena RP, Tandon A, Saxena KC. *Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Bhadohi (Varanasi), India*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990; 84(3): 363–366.

18 . Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. *Enzyme-linked immunosorbentassay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis*. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8(6): 1220–1224.

19. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. *Enzyme-linked immunosorbent assay based On soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis*. J Clin Microbiol. 2002; 40(3): 1037–1043.

20. Mikaeili F, Fakhar M, Sarkari B, Motazedian MH, Hatam G. *Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain*. Iranian Journal of Immunology. 2007; 4(2): 116-21.

21. Harith AE, Kolk AH, Leewenburg J, Muigai R, Huigen E, Jelsma T,et al. *Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis*. J Clin Microbiol. 1988; 26(7): 1321–1325.

22. 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 Journal of Parasitology. 2006; 1(1): 15-25.

23. Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. *Direct agglutination test for diagnosis and seroepidemiological survey of kala-azar in the Sudan*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991; 85(4): 474–476.

24. Sunder S, Singh GS, Singh VP, Singla N, Kumar K, Vinayak VK. *Comparative evaluation of DAT, IFAT and micro-ELISA in the serodiagnosis of Indian kala-azar*. J Parasitic Dis. 1996; 20(1): 41–43.

25. Eddrissian GH, Hajaran H, Mohebali M, *et al. Application and evaluation of direct agglutination test in serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in man and canine reservoir in Iran*. Iran J Med Sci. 1996; 21: 119-24.

26. De-Sousa CBP, Gomes EM, De-Souza EP, Palatnik M, Luz K, Borojevic R. *Leishmania donovani: titration of the antibodies to the fucose mannose ligand as an aid in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis*. Elsevier. 1995; 89(4): 390–393.

27. Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG. *Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis*. J Parasitol. 1995; 81(6): 1000–1003.

Archive of SID

www.SID.ir

leishmaniasis in southern Iran. Comp Clin Pathol. 2012; 21(5): 801–807.

28. Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PCK, Murray HW. *Rapid accurate field diagnosis of visceral leishmaniasis* .Lancet 1998; 351(9102): 563–565.

29. Zijlstra EE, Nur Y AM, Groen J. *Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan*. Trop Med Int Health. 2001; 6(2): 108–113.

30. Jelinek T, Eichenlaub S, Loscher T. *Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18(9): 669–670.

31. Singh S. *New developments in diagnosis of leishmaniasis*. Indian J Med Res. 2006; 123(3): 311-330.

32. Singh S. *Recent advances in the laboratory diagnosis of leishmaniasis*. Indian kala-azar. Khandelwal Offsets, Varanasi, India. 1996; 39–56.

33. Haldar JP, Ghose S, Saha KC, Ghose AC. *Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis*. Infect Immun. 1983; 42(2): 702–707.

34. Andresen K, Gasim S, Elhassan AM, Khalil EA, Barker DC, Theander TG, et al. *Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymphnode samples from patients from the Sudan*. Trop Med Int Health. 1997; 2(5): 440–444.

35. Morales MA, Chicharro C, Ares M, Canavate C, Barker DC, Alvar J. *Molecular tracking of infections by Leishmania infantum*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95(1): 104–107.

36. Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, et al. *Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis*. J Clin Microbiol. 1997; 35(10): 2454–2457.

37. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastein P. *Comparison of various sample preparation methods of PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood*. J Clin Microbiol. 2001; 39(2): 613–617.

38. Fakhar M, Motazedian MH, Asgari Q, kalantari M, Hatam GR, Akbarpoor MA, et al. *Efficacy of PCR for early diagnosis and detection of asymptomatic cases of visceral leishmaniasis in human and dog*. J Jahrom Univ Med Sci. 2010; 8(2): 1-7. [In Persian]

39. Martin Sanchez J, Lopez-Lopez MC, Acedo-Sanchez C, Castro- Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Marquez F. *Diagnosis of infection with Leishmania infantum using PCR-ELISA*. Parasitology. 2001; 122: 607–615.

40. Wortmann G, Sweeney C, Houng HS, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, et al. *Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction*. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65(5): 583–587.

41. Mohebali M, Edrissian GH, Shirzadi MR, Akhoundi B, Hajjaran H, Zarei Z, et al. *An observational study on the current distribution of visceral leishmaniasis in different geographical zones of Iran and implication to health policy*. Travel Med Infect Dis. 2011; 9(2): 67-74.

patientswith visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1995; 52(5):427–428.

41. De Colmenares M, Portus M, Riera C, Gallego M, Aisa MJ, Torras S, et al. *Detection of 72–75 kD and 123 kD fractions of leishmania antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg. 1995; 52(5):427–428.

42. Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, Lowe C, Noyes HA. *An integrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for Leishmania donovani complex, Leishmania braziliensis and Leishmania major*. Parasitol. 2008; 135(5): 567-74.

43. Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Ekram AR, Hashighuchi Y, et al. *Sensitive, Specific, and Rapid Detection of Leishmania donovani DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification*. Am J Trop Med Hyg. 2009; 81(4): 578–582.

44. Hatam GR, Riyad M, Bichichi M, Hejazi SH, Guessous-Idrissi N, Ardehali S. *Isoenzyme characterization of Iranian Leishmania isolates from cutaneons Leishmaniasis*. Iranian J Sci Trans. 2005; 29(A1): 65-70.

45. Fakhar M, Mikaeili F, Motazedian MH, Hatam GR, Motazedian MH, Habibi P, et al. *Application of superior enzymatic systems for characterization of causative agents of visceral leishmaniasis (kala-azar) using Isoenzyme electrophoresis in Iran*. J Mazandaran Univ Med Sci. 2009; 19(70): 41-48.[In Persian]

46. Rosenthal E, Marty P, Poizot-Martin I, Reynes J, Pratlong F, Lafeuillade A, et al. *Visceral leishmaniasis and HIV co-infection in Southern France*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995; 89(2): 159–162.

47. Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. *A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients*.Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 60(2): 151-154.

48. Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Asgari Q, Kalantari M, Mohebali M. *Asymptomatic human carriers of Leishmania infantum: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran*. Ann Trop Med Parasitol. 2008; 102(7): 577-83.

49. Geramizadeh B, Fakhar M, Motazedian MH. *Visceral leishmaniasis with duodenal involvement: three immunocompetent cases from Southern Iran*. Ann Trop Med Parasitol. 2006; 100(7): 637-40.

50. Fakhar M, Asgari Q, Motazedian MH, Monabati A. *Mediterranean Visceral Leishmaniasis Associated with Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)*. Parasitol Res. 2008; 103(2): 473-5.

51.Fakhar M, Motazedian M H, Hatam Gh R, Asgari Q, Monabati A , Keighobadi M. *Comparative performance of DAT, IFAT, PCR and bone marrow aspiration methods for diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis (MVL)*. African J Microbiol Res. 2012; 6(28): 5777-5781.

52.Fakhar M, Motazedian M H, Asgari Q, Kalantari M. *Asymptomatic domestic dogs are carriers of Leishmania infantum: possible reservoirs host for human visceral*

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir