Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره پانزدهم شماره ۴۹ آذر و دی سال ۱۳۸۴ (۸-۱)

# ارزیابی و مقایسه روش‌های سرولوژیکی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFAT) و آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) با استفاده از آنتی ژن استاندارد شده در تشخیص لیشمانیوز احشایی

**داود درستکار مقدم** (Ph.D.)*+ **سید حسین حجازی** (Ph.D.)** **مهدی قاسمی**(M.Sc.)***

## چکیده

**سابقه و هدف** : لیشمانیوز احشایی انسانی (HVL) در استان های فارس و اردبیل به صورت آندمیک و در سایرمناطق کشور به شکل تک‌گیر (Sporadic) گزارش شده است. لیشمانیوز احشایی در ایران از نوع مدیترانه ای و عامل آن لیشمانیا اینفانتوم (L.infantum) و مخزن آن سگ می‌باشد. این بیماری در ایران بیشتر بچه‌ها را مبتلا می‌کند و در صورت عدم تشخیص زود هنگام، عوارض خطرناکی را پدید می آورد.

**مواد و روش‌ها** :در این مطالعه با استفاده از آنتی ژن استاندارد شده، روش آگلوتیناسیون مستقیم(DAT) با روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFAT)، مورد مقایسه قرار گرفت. آنتی ژن مورد نیاز, از پروماستیگوت‌های سویه L.infantum (MHO/TN/80/IPTi) در گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی تهیه, استاندارد و مورد استفاده قرار گرفت. به همین منظور پروماستیگوت‌های لیشمانیا در محیط های کشت N.N.N و RPMI1640 به مرحله تولید انبوه رسید. مراحل تهیه آنتی ژن DAT به طور کلی شامل تریپسینه شدن، فیکس با فرمالدئید و رنگ آمیزی با کوماسی بلو (Coomassie blue) می‌باشد. هم‌چنین آنتی ژن IFAT با استفاده از پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط RPMI 1640 ، پس از مراحل شست و شو و فرمالینه شدن، بر روی لام مخصوص میکروسکپ فلورسانس فیکس و آماده گردید. سپس سرم های تهیه شده (۷۰ نمونه) با دو روش DAT و IFAT مورد آزمایش قرار گرفت.

**یافته‌ها** : نتایج به‌دست آمده، در این مطالعه نشان داد که نسبت سرم‌های مثبت Sero-positive rate (SPR) در روش DAT در ترازهای ۱:۳۲۰۰ و بالاتر، ۹۱/٤ درصد و در روش IFAT در ترازهای ۱:۸۰ و بالاتر، ۹٤/۳ درصد می‌باشد. Geometric means of reciprocal titer (GMRT) برای روش DAT برابر ۶۳۰۹ و در روش IFAT برابر ۳۱۶ به‌دست آمد.

**استنتاج**: با توجه به ترازهای به‌دست آمده در هر دو روش، تراز ۱:۳۲۰۰ روش DAT ارزشی معادل تراز ۱:۸۰ روش IFAT دارا می‌باشد.نتایج حاصل از این بررسی نشان داد هر چند که آزمون IFAT جهت تشخیص بیماران مبتلا به کالا آزار از کارایی خوبی برخوردار است، نیاز به یک آزمایشگاه مجهز می‌باشد؛ در صورتی‌که روش DAT یک روش ساده، ارزان و قابل اجرا در مناطق روستایی (آندمیک) و جایگزین مطمئن برای روش پر هزینهٔ IFAT می‌باشد.

**واژه های کلیدی** : آنتی ژن - لیشمانیوز احشایی، آگلوتیناسیون مستقیم، ایمونوفلورسانس غیر مستقیم.

* متخصص گروه انگل شناسی و قارچ شناسی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

+ * اصفهان : خیابان هزار جریب - دانشگاه علوم پزشکی - دانشکده پزشکی



www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

** کارشناس ارشد انگل شناسی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
E تاریخ دریافت : ۱۳۸۳/۹/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۸۱/۱۱/٦ تاریخ تصویب : ۱۳۸٤/٤/۲۹

## مقدمه

لیشمانیوز به طیفی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که عامل آن گونه‌های مختلف لیشمانیا Leishmania می‌باشد. این بیماری در شمار بیماری های مشترک انسان و حیوان قرار داشته و بسته به گونهٔ انگل به اشکال مختلف بالینی ازجمله ضایعات پوستی، پوستی - مخاطی، جلدی منتشره و احشایی بروز می کند(۲،۱).

لیشمانیوز احشایی یک عفونت سیستمیک با علایم تب, کاهش وزن, بزرگ شدن طحال و کبد, کم خونی با کاهش تمام عناصر سلولی به ویژه گلبول‌های سفید و افزایش گاماگلوبولین های خون می باشد(٦). این بیماری در مناطق وسیعی از جهان گزارش شده است و در ٤٧ کشور دنیا به صورت آندمیک وجود دارد(۳،٤،٥ ).

کالاآزار در ایران در دو استان فارس و اردبیل به صورت آندمیک وجود دارد و در سایر مناطق به صورت تک‌گیر گزارش شده است(۷،۱۱،۱۵).

از آن‌جایی که لیشمانیوز احشایی بیماری خطرناکی می باشد و در صورت عدم تشخیص به موقع و درمان مناسب، می تواند منجر به موارد زیادی از مرگ و میر شود، تشخیص سریع آن می تواند عامل مؤثری در پیش آگهی بیماری به حساب آید.

روش های سرولوژیکی متعددی از جمله IFAT,ELISA,CF,CIEP,aldehyde test برای تشخیص بیماری کالاآزار در مناطق آندمیک و بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در انسان و مخازن حیوانی استفاده شده است، ولی این روش ها هر کدام دارای مزایا و معایبی هستند(۸ و ۹)، مثلاً با وجود این‌که روش Counter-immunoelectrophoresis(CIEP) یک آزمون با ارزش برای تشخیص کالاآزار می باشد، واکنش مثبت کاذب در مواردی همانند بیماری‌های مزمن کبدی، بیماری‌های بدخیم یا خود ایمنی مشاهده شده است(۱۰).

هدف از این مطالعه استفاده از آنتی‌ژن استاندارد شده جهت مقایسهٔ دو روش DAT و IFAT به منظور دست‌یابی به یک آزمون ویژه، آسان، ارزان و قابل اجرا درمناطق روستایی(آندمیک) است تا موارد مثبت کاذب و واکنش متقاطع را کم و یا حذف نموده و به تشخیص زودرس کالاآزار کمک نماید.

## مواد و روش ها

این مطالعه یک کارآزمایی بالینی است که در آن ۷۰ نمونه سرم (۳۵ نمونه سرم ا فراد مبتلا به کالاآزار از نظر بالینی از مناطق آندمیک و ۳۵ نمو نه شاهد) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

### *آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم(DAT)*

*الف)تهیه آنتی ژن DAT*

جهت تهیه آنتی ژن، پروماستیگوت های L.infantum (MHO/TN/80/IPTi) مورد استفاده قرار گرفت. بدین صورت که ابتدا سویه مذکور را درمحیط N.N.N کشت داده و جهت انبوه سازی ا نگل از محیط کشت RPMI 1640 استفاده شد و برای تهیه آنتی ژن به طریق زیر عمل شد:

۱- پروما ستیگوت ها با دورg٤۰۰۰ و دمای٤ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه با سانتریفوژ جدا شد.

۲- رسوب به‌دست آمده، پنج بار درمحلول Locke سرد شست و شو داده شده و با دور g۳۲۰۰ و دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد.


www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

۳- محلول تریپسین آماده شده به پروماستیگوت-های متراکم به نسبت یک حجم از پروماستیگوت ها به ۲۰ حجم از محلول تریپسین اضافه شد.

٤- محلول به خوبی مخلوط شد تا پروماستیگوت ها به‌صورت سوسپانسیون درآمده و سپس در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ٤٥ دقیقه قرار داده شد.

٥- محلول حاصل با دور ۳۲۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس همانند مرحلهٔ دوم, پنج بار با محلول Locke شست و شو داده شد.

٦- رسوب حاصل در محلول Locke سرد به غلظت تقریبی $۲\times۱۰^{۸}$ سلول در میلی لیتر رسانده شد.

۷- مقدار حجم مساوی از فرمالدئید دو درصد به محلول Locke اضافه شده و به مدت یک شب در حرارت ٤ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد.

۸- محلول حاصل با دور ۳۲۰۰g و دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب به دست آمده، با سالین سیترات سرد شست و شو داده شد.

۹-جهت رنگ آمیزی کوماسی بلو را با غلظت نهایی ۰/۱ درصد به آن اضافه کرده و به مدت ۹۰ دقیقه به همان حال قرار داده، و سپس با دور ۳۲۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و رسوب حاصل، دو مرتبه با سالین سیترات شست و شو داده شد تا رنگ اضافی از بین برود.

۱۰- پس از خالی‌کردن لایه رویی(supernatante) با استفاده از محلول نگهدارنده (سالین سیترات حاوی ۰/٤ درصد فرمالدئید) سوسپانسیون یکنواختی تهیه و در دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد و دور از نور تا زمان انجام آزمایش نگه‌داری گردید.

*ب - روش انجام آزمایش DAT*

در این روش از میکرو پلیت‌های V شکل استفاده گردید. ابتدا رقت های مورد نیاز از سرم بیمار تهیه گردید و پس از افزودن آنتی ژن به رقت‌های مختلف، میکروپلیت را در یک اطاقک مرطوب قرار داده و بعد از ۲۰ ساعت نتایج قرائت می‌گردید.

چنان‌چه انگل‌ها به صورت تکمه‌ای در وسط حفره جمع باشد دلیل بر عدم آگلوتیناسیون و نتیجه از نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانیا منفی محسوب می گردد، ولی در صورتی‌که انگل‌ها به صورت ابری شکل ویا به صورت آبی رنگ یکنواخت در تمام مایع در حفره پراکنده گردد و به اصطلاح آگلوتینه شده باشند، نتیجه مثبت محسوب می‌گردد.

***روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم(IFAT)***

*الف)تهیه آنتی ژن*

برای‌تهیه آنتی‌ژن,ازپروماستیگوت‌هایL.infantum استفاده گردید. بدین صورت که پس از کشت سویه مذکور در محیطN.N.N و تکثیر درمحیط RPMI 1640 پروماستیگوت‌های جمع آوری شده, سه مرتبه با فسفات بافرسالین P.B.S شست و شو داده شده و سوسپانسیون تهیه گردید. بعد از رسوب نهایی در P.B.S به میزان $۵\times۱۰^{۸}$ انگل در میلی لیتر سوسپانسیون تهیه شد و مقدار ۵ میکرو لیتر از این سوسپانسیون, در هر حفره لام های مخصوص میکروسکوپ IFAT انتقال داده شد و پس از خشک شدن لام‌ها, تا زمان انجام آزمایش در۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

*ب) روش انجام آزمون*

ابتدا لام‌های حاوی آنتی‌ژن coat شده از فریزر۲۰- سانتیگراد خارج شده و درون دسیکاتور گذاشته شد تا به حرارت آزمایشگاه برسد.

سپس سرم های مورد آزمایش, با رقت های مختلف تهیه و در مجاورت آنتی ژن بر روی لام ریخته شده و


www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

برای انجام واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

بعد از آنکوباسیون, لام ها ۳ مرتبه و به مدت ۵ دقیقه باP.B.S شسته شد. و مقدار۵ میکرولیتر آنتی‌هیومن

کنژوکه رقیق شده حاوی اوانس بلو به هر حفره, اضافه گردید و مجددا لام‌ها, داخل اطاقک مرطوب گذاشته, به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. و بعد از زمان آنکوباسیون لام ها, ۵ مرتبه و به مدت ۵ دقیقه در P.B.S شسته شده و در معرض هوا خشک گردیدند. سپس هر لام با محلول گلیسیرین مونته و در زیر میکروسکوپ فلوئورسانس و در اطاق تاریک مورد مطالعه قرار گرفت. جهت ارزیابی نتایج او روش مذکور از جدول توافقی استفاده گردید.

## یافته‌ها

در این مطالعه ۷۰ نمونه سرم شامل ۳۵ نمونه از سرم افراد مبتلا به کالاآزار و ۳۵ نمونه سرم شاهد با دو روش سرولوژیکی IFAT و DAT مورد آزمایش قرار گرفت.

از مجموع ۳۵ نمونهٔ افراد مبتلا به بیماری کالاآزار ۱۹ نمونهٔ مذکر(۵٤/۳ درصد) و ۱٦ نمونه مؤنث (٤۵/۷ درصد) بوده اند. همچنین تعداد ۲۷ نفر(۷۷/۱ درصد) در گروه سنی۹-۱ و۸ نفر(۲۲/۹درصد) درگروه سنی بالاتر از ۱۰ سال قرار داشتند.

در بررسی حاضر تراز ۱/۳۲۰۰ و بالاتر برای روش DAT و تراز ۱/۸۰ برای روش IFAT به عنوان تراز مثبت در نظر گرفته شد.

در روش IFAT از ۳۵ نمونهٔ مبتلا به کالاآزار ۳۳ نمونه (۹٤/۳ درصد) دارای تراز ۱/۸۰ و بالاتر و ۲ نمونه (۵/۷ درصد) دارای تراز ۱/٤۰ بودند، ولی در سایر نمونه‌های شاهد، پاسخ مثبتی مشاهده نشد. بنابراین در این روش ویژگی ۱۰۰درصد به‌دست آمد.

بیش‌ترین تراز آنتی بادی مثبت در گروه سنی ۵-۱ سال و کم‌ترین آن در گروه سنی ۱۵ سال و بالاتر بودند و بالاترین میزان GMRT در گروه سنی ۵-۱ سال برابر با ٦۹۰ و کمترین آن در گروه سنی ۱۵ سال برابر با ۳۱٦ به دست آمد (جدول شماره۱).

در روش DAT از ۳۵ نمونهٔ مبتلا به بیماری کالاآزار ۳۲ نمونه(۹۱/٤درصد) دارای تراز آنتی بادی ۱/۳۲۰۰ و بالاتر و ۳ نمونه(۸/٤درصد) دارای تراز ۱/۸۰۰ بودند. در صورتی که در سایر نمونه های شاهد، هیچ‌گونه تغییری در آن ها مشاهده نگردید. بنابراین ویژگی در این روش ۱۰۰ درصد به‌دست آمد.

هم‌چنین بیش‌ترین موارد تراز مثبت در گروه سنی ۵-۱ سال وکم‌ترین آن درگروه سنی بالاتر از۱۵سال به دست‌آمد،بالاترین‌میزانGMRT دراین روش‌درگروه‌سنی ۵-۱ سال (۳۱۰۲۲) وکم‌ترین مقدار آن در گروه سنی۱۵ سال و بالاتر (٦۳۰۹) به‌دست‌آمد (جدول شماره۲).

**جدول شماره۱**: توزیع فراوانی تراز آنتی بادی لیشمانیا در روش IFAT بر حسب سن

| فراوانی / سن | | ۱-۵ | ٦-۱۰ | ۱۱-۱٤ | ۱۵ سال و بالاتر | جمع افراد |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) |
| تراز آنتی بادی | ۱/٤۰ | ۲(۱۱/۱) | ۰(-) | ۰(-) | ۰(-) | ۲(%۵/۷) |
| | ۱/۸۰ | ۰(-) | ۱(۱۱/۱) | ۰(-) | ۱(۲۵) | ۲(%۵/۷) |
| | ۱/۱٦۰ | ۰(-) | ۰(-) | ۱(۲۵) | ۱(۲۵) | ۲(۵/۷) |
| | ۱/۳۲۰ | ۳(۱٦/٦) | ۲(۲۲/۲) | ۲(۵۰) | ۰(-) | ۷(۲۰) |
| | ۱/٦٤۰ | ۳(۱٦/٦) | ۵(۵۵/۵) | ۰(-) | ۱(۲۵) | ۹(۲۵/۷) |


www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ۱/۱۲۸۰ | ۷(۳۸/۸) | ۱(۱۱/۱) | ۱(۲۵) | ۱۰(۲۸/۶) |
| | ۱/۲۵۶۰ | ۳(۱۶/۶) | ۰(-) | ۰(-) | ۳(۸/۶) |
| | جمع افراد (درصد) | ۱۸ (۵۱/٤) | ۹ (۲۵/۷) | ٤ (۱۱/۳) | ۳۵(۱۰۰) |
| | GMRT | ٦۹۰ | | ۳۱٦ | |


www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

**جدول شماره۲**: توزیع فراوانی تراز آنتی بادی لیشمانیا در روش DAT بر حسب سن

| فراوانی / سن | | ۱-۵ | ۶-۱۰ | ۱۱-۱۴ | ۱۵ سال و بالاتر | جمع افراد |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) |
| تراز آنتی بادی | ۱/۸۰۰ | ۲(۱۱/۱) | ۰(-) | ۰(-) | ۱(۲۵) | ۳(۸/۶) |
| | ۱/۱۶۰۰ | ۰(-) | ۰(-) | ۰(-) | ۰(-) | ۰(-) |
| | ۱/۳۲۰۰ | ۰- | ۱(۱۱/۱) | ۰(-) | ۱(۲۵) | ۲(۵/۷) |
| | ۱/۶۴۰۰ | ۲(۱۱/۱) | ۱(۱۱/۱) | ۲(۵۰) | ۰(-) | ۵(۱۴/۳) |
| | ۱/۱۲۸۰۰ | ۲(۱۱/۱) | ٤(٤٤/٤) | ۱(۲۵) | ۱(۲۵) | ۸(۲۲/۹) |
| | ۱/۲۵۶۰۰ | ۱(۵/۶) | ۱(۱۱/۱) | ۰(-) | ۰(-) | ۲(۵/۷) |
| | ۱/۵۱۲۰۰ | ۱(۵/۶) | ۲(۲۲/۲) | ۰(-) | ۱(۲۵) | ٤(۱۱/٤) |
| | ۱/۱۰۲٤۰۰ | ۱۰(۵/۶) | ۰(-) | ۱(۲۵) | ۰(-) | ۱۱(۳۱/٤) |
| جمع افراد (درصد) | | ۱۸(۵۱/٤) | ۹ (۲۵/۷) | ٤(۱۱/۳) | ٤ (۱۱/۳) | ۳۵(۱۰۰) |
| GMRT | | ۳۱۰۲۲ | | | ٦۳۰۹ | |

جهت ارزیابی نتایج دو روش مذکور از جدول توافقی استفاده گردید. بر این اساس از مجموع ۳۵ نمونه مبتلا به بیماری کالاآزار، ۳۲ نمونه با هر دو روش دارای نتایج مثبت و ۲ نمونه با هر دو روش منفی بودند؛ در صورتی‌که یکی از نمو نه‌ها با روش DAT منفی ولی با روش IFAT مثبت به دست آمد (جدول شماره ۳).

**جدول شماره۳**: جدول دوبعدی(توافقی) ازفراوانی‌آنتی‌بادی لیشمانیا در روش های DAT و IFAT برمبنای ترازمثبت

| | | IFAT + | IFAT - | جمع |
|---|---|---|---|---|
| | | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) | تعداد(درصد) |
| DAT | + | ۳۲(۹۷) | ۰(۰) | ۳۲(۹۱/۵) |
| | - | ۱(۳) | ۲(۱۰۰) | ۳(۸/۵) |
| | جمع | ۳۳(۱۰۰) | ۲(۱۰۰) | ۳۵(۱۰۰) |

## بحث

روش‌های انگل‌شناسی جهت تشخیص‌آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی خصوصاً در برخی از مناطق آندمیک بیماری (مناطق روستایی) درکشورهای درحال توسعه که به طور معمول برای انجام چنین آزمایش‌هایی امکانات کافی وجود ندارد، همیشه یک روش عملی و قابل اجرا نمی‌باشد. به علاوه، انگل همیشه در آزمایش‌های میکروسکوپی نظیرگسترش مغز استخوان و یا حتی طحال بعضی ازمبتلایان کالاآزار یافت نمی‌شود؛ به طوری‌که در مناطق آندمیک کالاآزار اردبیل تنها در ۶۹ درصد گسترش تهیه شده مغزاستخوان بیماران مشکوک به کالاآزار که از نظر بالینی با روش DAT سرم مثبت بودند،آماستیگوت دیده شده‌است(۱۱).

هم‌چنین از آزمون‌های سرولوژیکی اختصاصی در تشخیص لیشمانیوز احشایی نظیر IFAT, ELISA با نتایج مطلوب استفاده شده است، اما کاربرد چنین روش‌های سرولوژی، نیاز به آزمایشگاه مجهز و تکنیسین‌های ماهر دارد که اصولاًدر مناطق آندمیک کالاآزار که عمدتاً مناطق روستایی می‌باشند، عملی نمی‌باشد(۱۲).

بنابراین در این مطالعه سعی شد روش سرولوژی DAT که یک روش ساده و اقتصادی در تشخیص بیماری لیشمانیوز احشایی انسانی (HVL) می باشد، مورد ارزیابی و مقایسه با روش IFAT قرار گیرد.


www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

در این مطالعه مجموعاً ۷۰ نمونه سرم (۳۵ مورد مبتلا به کالاآزار و ۳۵ نمونه سرم شاهد) مورد استفاده قرار گرفت. در مقایسه روش DAT و روش IFAT در تشخیص لیشمانیوز احشایی، Sero positive rate(SPR) با روش IFAT بالاتر از SPR با روش DAT بود و ضریب همبستگی هر دو روش ۹۲درصد به‌دست آمد. به نظر می‌رسد که روش IFAT، تمام موارد در معرض بیماری، اعم از آن‌هایی که علایم بالینی دارند و یا علایم بالینی ندارند را می تواند تشخیص دهد؛ در صورتی‌که با روش DAT زمانی که عفونت وجود دارد، نتیجه مثبت می‌شود. به علاوه در عفونت های غیر کالاآزاری، واکنش متقاطع با آنتی ژن لیشمانیا در IFAT بیش‌تر از DAT که خیلی اختصاصی است، دیده می شود(۱۶).

در بررسی با روش DAT نسبت سرم‌های مثبت (SPR) از ۳۵ نمونه بیمار کالاآزار، ۳۲ نمونه دارای تراز ۱:۳۲۰۰ و بالاتر و سه نمونه دارای تراز ۱:۸۰۰ بودند. هم‌چنین میزان GMRT برابر ۶۳۰۹ به دست آمد. تمام نمونه های سرم شاهد با این روش، واکنش منفی نشان دادند لذا با توجه به نتایج به‌دست آمده ویژگی ۱۰۰درصد و حساسیت ۹۱/۴درصد به‌دست آمد.

درمطالعه ای که توسط هریت[1] و همکاران (۱۹۸۶) با روش DAT انجام شد، ویژگی و حساسیت به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۸/۹درصدگزارش گردید. حساسیت بالا شاید به خاطر انجام تغییراتی در روش DAT و خصوصاً رقت و یا غلظت آنتی ژن مورد نظر بوده است(۱۳).

حساسیت و ویژگی روش IFAT در این مطالعه به ترتیب ۱۰۰درصد و ۹۴/۳درصد به‌دست آمدو میزان GMRT نیز در این روش ۶۹۲ بدست آمد.

در مطالعه‌ای توسط ایکبال[2] و همکاران(۲۰۰۱) با روش IFAT جهت تشخیص مبتلایان به کالاآزار انجام شد، ویژگی ۱۰۰درصد و حساسیت ۹۳ درصد را نشان داد(۱۷) که این نیز مؤید نتایج حاصله از این مطالعه می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده با دو روش DAT و IFAT دو نمونه سرم بیماران با روش IFAT دارای عیار ۱:۴۰ و سه نمونه سرم با روش DAT دارای تیتر ۱:۸۰۰ بودند که هر سه نمونه مربوط به مناطق غیر آندمیک بودند.

درمورد سه نمونه فوق باتوجه به این‌که سویه استفاده شده برای آنتی ژن از منطقه آندمیک تهیه شده بود، احتمالاً عدم تطابق بین سایت‌های آنتی ژن با این نمونه‌ها باعث واکنش های سرولوژیک ضعیف و کاهش تراز آنتی بادی اختصاصی شده است.

هم‌چنین مطالعه ای که در سال ۱۹۹۶ در کشور ایتالیا توسط نیگرو[3] و همکاران(۱۹۹۶) بر روی ۱۰۰ نفر ازمبتلایان به کالاآزار انجام شد، نشان دهندهٔ این است که هر دو روش IFAT و DAT از لحاظ ویژگی (Specificity) مشابه ولی آزمون IFAT از حساسیت بیش‌تری برخوردار می باشد(۱۴) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

سایر مطالعات سرولوژی انجام شده بر روی بیماران کالاآزار مناطق آندمیک کشور، بیانگر این است که بیش‌ترین موارد لیشمانیوز احشایی در این مناطق در بچه‌ها دیده می‌شود(۱۵).

نتایج بررسی حاضر نشان داد که برای تشخیص سرولوژی کالاآزار با روش DAT در مناطق روستایی آندمیک وجود یک آزمایشگاه محلی ساده با یک یا دو نفر تکنیسین کفایت می‌کند. هم‌چنین برطبق نتایج به

1. Harith

2. Iqbal
3. Nigro


www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

دست آمده به نظر می‌رسد که در مناطق آندمیک کالا آزار، علایم بالینی لیشمانیوز احشایی خصوصاً در بین بچه‌هایی که تراز آنتی‌بادی آن‌ها با روش DAT، ۱:۳۲۰۰ و یا بالاتر می‌باشد مورد خوبی برای درمان اختصاصی این بیماری است.

## فهرست منابع


1. Mandell G.L, Bennett J. E, Dolin R. ***Principles and Practice of infectious*** disease, Fifth edition, Philadelphia: Churchill Livingston.2000,5.2831-2836
2. Pearson RD, Dequeiroz Souza A, Jernomio SMB. Leishmania Species: Visceral (Kaka-Azar), ***Cutaneous, and, mucosal leishmaniasis: principles and practice of infectious disease***.5th ed, Philadelphia, Churchill linvingstone, 2000, 2837
3. W.H.O, Expert committee:Control of the lieshmaniasis, ***world Health Organ, tech. rep, ser.,***1990-793:1-158.
4. Desjeux.p:The increase in risk factors for leishmaniasis world wide, ***trans. R. soc. trop. med. hyge.*** 2001(95): 239-242.
5. Mahajen RC, Mohan K. Epidemiology of visceralleishmaniasis and control.in parasitology for 21st century by ***ozcel MA, Alkan MZ***:1996,63-67.
6. Boelaer T. M,criel. B, Leeuwinber. J, van Dammi.W,le Ray. D, and, Van derstuyft. p: Visceral leishmaniasis control:a public Health perspective. ***Trans. Roy.soc. Trop. Med. Hyge.*** 2000(94), 465-471
7. Edrisian,GH:visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in diagnosis ans epidemiological studies;in parasitology for the 21st century ***CAB international, ozcal MA,Alkan MZ***: 1996: 63-71.
8. Sendali. G, Xiao- su. H, Hoessli. D.C, and, Bordior. C. Serological Diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzame immunoassay for the detection of a leishmania donovani realated circulating antigrn. J***. immunol. methods.*** 2001, (193): 9-15.
9. Sinha. R, Sehgal. S. Compatative evaluation of serological tests in India: j.***Trop.Med.Hygine***. 1997: 333-340.
10. Mansvetos, Miceli. MD, Lacascia. C, Picore DM. Further observations on the use of Countercurrent electrophoresis (CIEP) on cellulose acstate membrane (cello gel) in the diagnosis of Visceral leishmaniasis. ***Qouad Sclavo Diagn.*** 1998, 16(3),258-266.
11. Soleiman- zadeh G, Edrissian GH, movahed AM: Epidemiological Aspect of kala-azar in Meshkin-shahr, Iran; Human infection bull, ***wld, Hlth, Org.*** 1993;71:459-462.
12. Khorshian S, Hajaran H, Sarkissian MT, etal: Evaluation of Elisa using intact promastigotes as antigen for diagnosis of Visceral leishmaniasis. ***Irn J Med Sci:*** 1994; 19: 15-18.



www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

13. Harith AE, Kolk AHJ, Kager PA, etal: A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of Visceral lrishmaniasis. ***Trans R soc. Trop Med. Hyge;***1986; (80);583-587.
14. Nigro l, Vinic, Romano F, etal: Comparison of indirect immunoflourecent antibody test and the agglutination test for serodiagnosis of Visceral leishmaniasis in HIV infected subjects; ***Microbiol infect*** Dis; 1996: 15(10) 832-834.
15. Edrissian GH, Ahanchi Ar, Gharachati Am, etal: Seroepidemiological studies of Visceral leishmaniasis and for animal reservoirs in Fars province, southern ***Iran. Iranian journal of Medical Sciences.*** 1993:18-19.
16. Harith AE,Kolk AHJ,Kager PA, etal: Evaluation of a newly developed direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of Visceral leishmaniasis,comparison with IFAT and Elisa. ***Trans R Soc trop Med Hyg.*** 1987; 81: 603-606.
17. Iqbal. J, Porstam. R, Hira, grover saroj, etal: Visceral leishmaniasis. diagnostic and comparative analysis of three assay. ***JCM***; 2001, 40(2), 745-749.


www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com