خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۸ شماره ۳ پاییز ۹۰ (۱۷۳-۱۶۵)

مقاله پژوهشی

غربالگری مالاریا در اهداکنندگان خون زاهدان

اسماعیل صانعی مقدم[۱]، سهیلا خسروی[۲]، مریم پورشریفی[۳]، فرشته جعفری[۳]، مینا مقتدایی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

مالاریای منتقله از طریق خون، در مناطق آندمیک آن، تهدید واقعی برای سلامت خون می‌باشد. لذا وجود یک روش غربالگری مؤثر برای اهداکنندگان و بهبود معیارهای حذف اهداکنندگان، برای هر کشوری ضروری است. در این مطالعه، فواید غربالگری مالاریا به روش الایزا برای بررسی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، لام خون محیطی و PCR در اهداکنندگان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی، تعداد ۳۸۴ اهدا کننده در زاهدان در سال ۱۳۸۸، برای بررسی وجود انگل با روش گسترش نازک و ضخیم خون محیطی، آزمایش الایزا برای بررسی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی و روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. یافته‌ها توسط آزمون‌های کای‌دو و فیشر و نرم‌افزار SPSS ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

فراوانی آنتی‌بادی به طور کلی ۴/۷٪ و در اهداکنندگانی با سابقه سکونت در مناطقی که انتقال محلی مالاریا در آن گزارش شده بود، ۷/۹٪ بود. نتایج آزمایش آنتی‌ژن و گسترش خون محیطی نازک و ضخیم و PCR منفی بود.

نتیجه گیری

سیستم حذف اهداکنندگان در حال حاضر روش ایده آلی است و خطر باقیمانده کمی برای انتقال مالاریا از طریق خون باقی می‌ماند. در مناطق آندمیک مالاریا از جمله قسمت‌هایی از استان سیستان و بلوچستان، روش الایزا برای بررسی آنتی‌بادی مالاریا به منظور غربالگری، روش مناسبی محسوب می‌شود.

کلمات کلیدی: مالاریا، غربالگری، الایزا، اهداکنندگان خون، PCR

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۲
تاریخ پذیرش: ۹۰/ ۵/۲۴

۱ـ مؤلف مسؤول: دکترای علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون زاهدان ـ ایران ـ صندوق پستی: ۶۱۷-۹۸۱۳۵
۲ـ پزشک عمومی و MPH ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون زاهدان ـ ایران
۳- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون زاهدان ـ ایران
۴ـ کارشناس ارشد انگل‌شناسی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

عوامل عفونی متعددی از طریق خون منتقل می‌شوند که مالاریا نیز از این جمله می‌باشد و احتمال انتقال آن از طریق خون یکی از نگرانی‌های مسؤولین انتقال خون در دنیا است(۱). با وجود فعالیت‌های وسیعی که در طی نیم قرن اخیر در راه مبارزه با مالاریا و ریشه‌کنی آن در دنیا انجام شده است، هنوز هر ساله ۵۰۰-۳۰۰ میلیون نفر به این بیماری مبتلا و ۲/۷ -۱/۱ میلیون نفر جان خود را از دست می‌دهند(۳، ۲). در ایران بر اثر اجرای برنامه های مبارزه با مالاریا در طی ۵۰ سال اخیر، قسمت وسیعی از مناطق مالاریا خیز کم شده است و شیوع بیماری به میزان قابل توجهی کاهش پیدا کرده است. در حال حاضر انتقال محلی آن فقط در جنوب و جنوب شرقی کشور در سه استان سیستان و بلوچستان، هرمزگان و بخش جنوبی کرمان گزارش شده است(۵، ۴).

مالاریای منتقله از طریق انتقال خون، چنانچه به موقع تشخیص و درمان نگردد، ممکن است سبب مرگ گیرنده خون شود(۶). در ایران در طی دو مطالعه در سال‌های ۱۳۶۲-۱۳۵۲ و ۱۳۷۴-۱۳۶۴، در مجموع ۳۴۴ مورد مالاریای ناشی از انتقال خون گزارش شده که اکثراً این موارد پلاسمودیوم مالاریه بوده‌اند(۸، ۷).

در اکثر کشورها از جمله در ایران، روش آزمایشگاهی ثابت شده‌ای جهت غربالگری اهداکنندگان در مورد مالاریا وجود ندارد و پیشگیری از انتقال مالاریا فقط از طریق معاف کردن اهداکنندگان با توجه به مصاحبه مشخص می‌شود. اما وجود حاملین بدون علامت در مناطق مالاریاخیز و هم چنین اهداکنندگانی که سابقه عفونت و مسافرت به مناطق جغرافیایی مالاریاخیز چه به صورت عمدی و چه به صورت سهوی را به خاطر نمی‌آورند، هنوز خطری برای انتقال خون محسوب می‌شود.

در پایگاه انتقال خون زاهدان مطالعه‌های مختلفی در این زمینه تاکنون انجام شده است؛ در سال ۱۳۸۵-۱۳۸۴ ، کلیه نمونه‌های خون اهداکنندگان با روش اسمیر خون محیطی از جهت وجود مالاریا مورد آزمایش قرار گرفتند که همه موارد منفی گزارش شد اما روش الایزا برای بررسی آنتی‌بادی استفاده شد و ۵٪ آنتی‌بادی مثبت در بین اهداکنندگان دیده شد. هم چنین روش‌های مولکولی (PCR) که در سال ۱۳۸۱ در مراجعین به انتقال خون ایرانشهر به منظور غربالگری مالاریا استفاده شده بود، در همه موارد منفی گزارش شد(۹).

با توجه به اهمیت فراوان سلامت خون، این مطالعه به منظور بررسی فراوانی مالاریا در اهداکنندگان خون و ارزیابی روش‌های مختلف غربالگری طراحی شد و هدف دست یافتن به معیار و استاندارد مناسب جهت غربالگری اهداکنندگان خون بود تا بتوانیم با کاهش خطر انتقال مالاریا و افزایش سلامت خون، قادر به حذف کمتر اهداکنندگان غیرآلوده شویم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی در سال ۱۳۸۸ بر روی ۳۸۴ نفر از داوطلبین اهدای خون پایگاه زاهدان انجام شد(حجم نمونه با در نظر گرفتن ۵۰٪ =p محاسبه شد). افراد مورد مطالعه با توجه به جدول اعداد تصادفی از روی شماره سریال اهداکنندگان انتخاب شدند. ابتدا برای هر نفر یک پرسشنامه حاوی اطلاعات دموگرافیک، سابقه مالاریا، تاریخ ابتلا، سابقه درمان، سابقه پیشگیری و مسافرت به کشورهای اطراف تکمیل شد و محل سکونت افراد به دو گروه طبقه‌بندی شد. سکونت در شهرستان‌های زاهدان و خاش که بر طبق گزارش مرکز بهداشت دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، آلودگی در آن منطقه وجود نداشت و شهرستان‌های ایرانشهر، چابهار، نیکشهر و سراوان که آلودگی مالاریا در آن شهرها وجود داشت.

از کلیه اهداکنندگانی که برای آن‌ها فرم بررسی پر شده بود، دو نمونه خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شد که یکی جهت آزمایش PCR و دیگری برای بررسی آنتی‌ژن بود. هم چنین برای هر اهداکننده بلافاصله دو عدد لام خون محیطی به صورت گسترش نازک وگسترش ضخیم گرفته شد. یک نمونه خون به صورت اضافی از کیسه جانبی در لوله‌های خلاء جهت جداسازی سرم و انجام آزمایش الایزا نیز گرفته شد.

نمونه‌های PCR در فریزر ۷۰ ºC- نگهداری و جهت استخراج DNA و آزمایش PCR، به آزمایشگاه تشخیص

Archive of SID
www.SID.ir

مولکولی تهران ارسال شدند. لام خون محیطی بلافاصله بدون فیکس شدن توسط تکنسین آزمایشگاه، رنگ‌آمیزی گیمسا گردید و بر روی هر کدام شماره مخصوص حک شد. نمونه‌های مربوط به آزمایش آنتی‌بادی به روش الایزا در آزمایشگاه سانتریفوژ شد و سرم جهت بررسی الایزا به بخش مربوطه ارسال گردید. جهت بررسی آزمایش آنتی‌ژن(Optimal Rapid Malaria test)، نیز از نمونه‌های EDTA دار استفاده گردید.

دو عدد لام، یکی به صورت گسترش نازک و دیگری به صورت گسترش ضخیم از بیمار تهیه و پس از رنگ‌آمیزی مخصوص با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون مورد بررسی قرار گرفت. در هر مرحله کاری جهت کنترل، یک لام مثبت نیز رنگ‌آمیزی شد و زیر میکروسکوپ مشاهده گردید. در این روش در صورت مثبت بودن لام خون محیطی و یا نمونه کنترل مثبت، تعداد انگل در هر شان در مقابل WBC شمرده شد برای مثال اگر در یک شان میکروسکوپیک تعداد WBC سه عدد و تعداد انگل ۴ عدد بود، با محاسبه از فرمول تعداد انگل در میلی‌متر مکعب نیز استفاده گردید. بدین ترتیب کلیه نمونه‌ها به صورت کنترل شده و با کنترل کیفی مناسب اسکرین و نتایج درج شد.

در روش آزمایش Optimal Rapid Malaria antigen test، از کیت‌های شرکت دیامد به شماره سریال B710000-11.03-46050 استفاده شد. این روش جهت شناسایی گونه پلاسمودیوم است و بر طبق دستورالعمل کیت با اندازه‌گیری plasmodium lactate dehydrogenase (PLDH) که یک آنزیم است انجام می‌گیرد. این آنزیم در هر دو فاز جنسی و غیر جنسی انگل وجود دارد. در این روش از یک آنتی‌بادی مونوکلونال علیه ایزوفرم‌های آنزیم استفاده می‌گردد و بر طبق ادعای کمپانی سازنده، با LDH انسانی هیچ گونه تداخلی ندارد. در این روش حساسیت آزمایش زمانی است که تعداد انگل ۲۰۰-۱۰۰ عدد در میلی‌متر مکعب باشد و یا به عبارتی با توجه به این که در هر میلی‌متر مکعب پنج میلیون گلبول قرمز وجود دارد، پس حساسیت آزمایش در حقیقت $\frac{۱۰۰}{۵۰۰۰۰۰۰}$ و یا $\frac{۲۰۰}{۵۰۰۰۰۰۰}$ یعنی ۰/۰۰۲٪ تا ۰/۰۰۴٪ آلودگی گلبول قرمز می‌باشد. این روش آزمایش فقط در چند روز اولیه آلودگی(۵-۴ روز اولیه) مثبت است و بلافاصله بعد از درمان موفقیت‌آمیز، آزمایش منفی می‌شود. هر کدام از این کیت‌ها دارای کنترل‌های مثبت و منفی می‌باشند. در این روش برای هر اهداکننده یک Dipstick در نظر گرفته شد و شماره اهداکننده بر روی آن نوشته شد، سپس برای هر بیمار دو چاهک یکی برای کونژوگه و دیگری برای شستشو در نظر گرفته شد. با استفاده از سمپلر، ۲۰ لاندا از بافر در قسمت کونژوگه و ۸۰ لاندا در قسمت شستشو ریخته شد و یک دقیقه فرصت داده شد. سپس ۱۰ لاندا از خون کامل را در قسمت کونژوگه ریخته و به مدت یک دقیقه حرکت دورانی داده شد. سپس Dipstick را به صورت عمودی در چاهک مربوط به کونژوگه قرار داده و ۱۰ دقیقه صبر کردیم. در این مدت زمان، خون به همراه کونژوگه در این Dipstick به سمت بالا نفوذ می‌کند و بافرهای مربوط به کنترل و آزمایش را آغشته می‌کند. سپس این Dipstick در چاهک مربوط به شستشو که حاوی ۸۰ لاندا بافر بود به مدت ۱۰-۵ دقیقه گذاشته شد. Dipstick را از چاهک شستشو بیرون آورده و نتیجه طبق دستورالعمل کیت خوانده شد.

در روش Elisa-Malaria antibody از کیت شرکت دیامد به شماره ۴۶۴۶۰ و بافر به شماره سریال ۴۳۵۳۰ استفاده شد. اساس این آزمایش بدین صورت بود که چند روز پس از هر آلودگی با مالاریا، آنتی‌بادی اختصاصی ایجاد می‌شود که می‌توان این آنتی‌بادی را شناسایی کرد. مبنای این روش، با شناسایی آنتی‌بادی IgG و IgM موجود در سرم خون بوده و به هیچ عنوان نمی‌تواند تفاوت بین IgG و IgM و مرحله حاد و مزمن بیماری را شناسایی نماید. این آنتی‌بادی در سرم خون افراد آلوده به مالاریا مشاهده می‌شود و شدت آن بستگی به شدت بیماری و طول دوره بیماری دارد.

اساساً این آزمایش در کشورهای دیگر از چهار جهت کاربرد دارد:

۱- غربالگری مالاریا در اهداکنندگان خونی که از مناطق آندمیک آمده‌اند.

Archive of SID
www.SID.ir

۲- بیمارانی که دارای تب ناشناخته هستند و از مناطق تروپیک آمده‌اند.
۳- افرادی که دارای علامت نیستند ولی دارای طحال بزرگ بوده و شک به مالاریا در آن‌ها وجود دارد.
۴- مطالعه‌های اپیدمیولوژیک در فیلد و در یک منطقه.

در این آزمایش با اندازه‌گیری جذب نوری(OD) و تقسیم آن بر حد برش(Cut Off)، اگر نتیجه آزمون بالاتر از ۱ باشد نتیجه مثبت و اگر پایین‌تر از ۰/۸ باشد نتیجه منفی می‌باشد.

برای انجام PCR از روش شلکس(chelex) استفاده شد. در روش شلکس، ۳ میکرولیتر خون به ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۵٪ شلکس اضافه شده و پس از ورتکس و یکنواخت کردن مخلوط این دو و قرارگرفتن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه(جوشاندن به منظور لیز شدن)، عمل سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm صورت گرفت. مایع‌رویی جهت عمل تکثیر در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در روش سیلیکا، ۵۰ میکرولیتر خون به ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (۸ M Tris-HCl ، GITC با pH= ۶/۴ ، ۳۶ mM EDTA ، pH= ۸ ، ۰/۲ ٪ ۱۰۰- Triton ® X)، افزوده و ورتکس شد. به مخلوط فوق پس از قرار گرفتن در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ میکرولیتر جاذب اضافه و بعد با عمل ورتکس مخلوط گردید. پس از ۲۰ دقیقه روتاتور(۲۰ rpm) و ۱۵ ثانیه سانتریفوژ کردن(۸۰۰۰ rpm) و تخلیه مایع‌رویی، رسوب ته میکروتیوب دو مرتبه با بافر شستشو به میزان ۵۰۰ میکرولیتر(۴ M GITC ، ۱۰۰ mM Tris-HCl با pH= ۶/۴) و سه مرتبه با اتانول ۷۰٪ به تعداد ۱۰۰۰ میکرولیتر شستشو داده شد. سپس عمل خشک شدن رسوب ته میکروتیوب و تبخیر الکل باقیمانده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد، ۵۰ میکرولیتر از بافر جداکننده(آب مقطر استریل عاری از نوکلئاز) به رسوب اضافه و ورتکس شد و پس از انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سانتریفوژ شدن به مدت ۳۰ ثانیه در ۱۰۰۰۰ rpm ، مایع‌رویی برداشته و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد جهت تکثیر ذخیره شد. در این مرحله، مقدار ۳ میکرولیتر از مخلوط اصلی شماره ۱ (الیگونوکلئوتیدها یا dNTP باغلظت نهایی ۲۰۰ µM ، آغازگرها با غلظت نهایی ۰/۲ میکرومول ساخته شده در بخش کیت‌سازی سازمان انتقال خون) در انتهای میکروتیوب ریخته شد و بعد به میزان ۳۰ میکرولیتر از روغن Din-Oil (سیگما) روی آن قرار گرفت. سپس ۱۷/۵ میکرولیتر از مخلوط شماره ۲، (۱۲/۸۷۵ µM ddH_2O و گلیسرول ۱۰٪ و ۱/۵ mµ $MgCl_2$ و بافر x ۱۰ با غلظت نهایی x ۱ که شامل Tris-HCl 100 mM با pH= ۹ ، ۵۰۰ mµ KCl و ۱٪ Triton®X-100 و تک DNA پلیمراز با غلظت نهایی U/mL ۰/۰۲۵ بود) و ۵ میکرولیتر از DNA به آن افزوده شد. آغازگرهای مورد استفاده در بخش کیت‌سازی سازمان انتقال خون جهت PCR عبارت بودند از:

برای پلاسمودیوم فالسیپارم
K114-P1:5'-CGC TAC ATA TGC TAG TTG CCA GAC
K114-P2:5'-CGT GTA CCA TAC ATC CTA CCA AC

برای پلاسمودیوم ویواکس
P.V-1:5' CGT GAA AAT CGA AGC TAT CGA
P.V-PCR PV-2:5' TCC CTG CTG CCC CGC TGT TGC

DNA پلاسمودیوم‌های ویواکس و فالسیپاروم به عنوان شاهد با کنترل مثبت و آب مقطر استریل عاری از نوکلئاز ($dd\ H_2O$) به عنوان شاهد با کنترل منفی در مرحله تکثیر در نظر گرفته شد.

تکثیر در شرایط جداسازی ابتدایی در ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه، یک دور جداسازی در ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۰ دور اتصال آغازگرها به رشته‌های هدف در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۴۰ دور طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۶۰ ثانیه ، ۴۰ دور طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه و یک دور در ترمال سایکلر(مدل Hybaide) اجرا شد.

محصولات PCR توسط الکتروفورز آنالیزور آشکار شدند. یک ژل آگاروز ۲٪ استاندارد سیگما به این منظور استفاده شد و رنگ‌آمیزی DNA با استفاده از یک محصول اتیدیوم بروماید(مرک) با غلظت ۰/۵ mg/mL صورت گرفت. هر ژل با نور ماوراء بنفش مرئی و سپس با دوربین

Archive of SID
www.SID.ir

پولارویـد عکـس‌بـرداری شـد. قطعـه bp ۲۰۶(base pair) حضـور پلاسـمودیوم فالسـیپاروم و قطعـه bp ۱۸۳ وجـود پلاسمودیوم ویواکس را در ژل نشان می‌دادند.

لازم به توضیح است که عدم حضور ممانعت کننـده‌هـا در PCR با آنالیز و آشکارسـازی ژن HLA-DR مشـخص شد و سپس کلیه اطلاعات جمع‌آوری شده توسط نرم‌افـزار آماری SPSS ۱۶ مورد تجزیـه و تحلیـل قـرار گرفـت و از آزمون‌های مجذور کا و دقیـق فیشـر بـرای تحلیـل داده‌هـا استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۳۸۴ نفـر بـا میـانگین سـنی ۹/۷ ± ۳۱/۷ سال شرکت کردند(جدول ۱).

جدول ۱ : خصوصیات دموگرافیک جمعیت مورد مطالعه

شاخص مورد بررسی		تعداد	درصد
جنسیت	مرد	۳۴۴	٪۸۹/۶
	زن	۴۰	٪۱۰/۴
سابقه مالاریا		۵	٪۱/۳
سابقه درمان مالاریا		۵	٪۱/۳
سابقه پیشگیری از مالاریا		۲	٪۰/۵
سابقه سکونت	در مناطقی که انتقال محلی مالاریا در آن وجود دارد	۶۵	٪۱۶/۹
	در مناطقی که انتقال محلی مالاریا در آن وجود ندارد	۳۱۹	٪۸۳/۱

آزمایش میکروسکوپی گسترش نـازک و ضـخیم خـون محیطی تمام ۳۸۴ داوطلب اهدای خون، نتیجه منفی داشت. (٪۴/۷) ۱۸ نفر از نظر وجود آنتی‌بادی مالاریا مثبت بودنـد. همه موارد از نظر آنتی‌ژن مالاریـا منفـی بودنـد و آزمـایش PCR با آغازگرهـای اختصاصـی پلاسـمودیوم ویـواکس و فالسیپارم برای همه افراد مورد مطالعه نتیجه منفـی داشـت. فراوانـی آنتـی‌بـادی انگـل مالاریـا در دو منطقـه از اسـتان سیستـان و بلوچستان که انتقال مالاریا در آن گزارش شـده

جدول ۲: فراوانی آنتی‌بادی و آنتی‌ژن انگل مالاریا در اسمیر خون محیطی و PCR در دو منطقه از استان که انتقال مالاریا در آن گزارش شده و مناطق که انتقال مالاریا وجود ندارد.

شاخص مورد بررسی	تعداد کل	آنتی‌بادی مثبت	آنتی‌ژن مثبت
در مناطق که انتقال مالاریا در آن گزارش نشده است	۳۲۱	(۴)۱۳	۰
در مناطق که انتقال مالاریا در آن گزارش شده است	۶۳	(۷/۹)۵	۰
جمع کل	۳۸۴	(۴/۷)۱۸	۰

جدول ۳ : وضعیت آنتی‌بادی در اهداکنندگان بار اول، مستمر و با سابقه

آنتی‌بادی / اهداکنندگان	بار اول	اهداکنندگان مستمر	با سابقه
آنتی‌بادی منفی	(۹۴/۷)۱۲۶	(۴۴/۷)۱۶۳	(۲۰/۸)۷۷
آنتی‌بادی مثبت	(۵/۳)۷	(۳)۵	(۷/۲)۶
جمع کل	(۱۰۰)۱۳۳	(۱۰۰)۱۶۸	(۱۰۰)۸۳

جدول ۴: وضعیت آنتی‌بادی در گروه‌های خونی مختلف

آنتی‌بادی / گروه خون	A	O	B	AB
آنتی‌بادی منفی	۹۹ (۹۳/۴)	۱۳۸ (۹۶/۵)	۱۰۴ (۹۶/۳)	۲۵ (۹۲/۶)
آنتی‌بادی مثبت	۷ (۶/۶)	۵ (۳/۵)	۴ (۳/۷)	۲ (۷/۴)
جمع کل	۱۰۶ (۱۰۰)	۱۴۳ (۱۰۰)	۱۰۸ (۱۰۰)	۲۷ (۱۰۰)

و مناطقی که انتقال مالاریـا وجـود نـدارد در جـدول آمـده است(جدول ۲). از نظر وجود آنتی‌ژن مالاریا، نتایج اسـمیر خون محیطی و PCR منفـی بـود. آنتـی‌بـادی مالاریـا در ۵ (٪۷/۹) نفر با سابقه سکونت در مناطقی از استان که انتقـال

Archive of SID
www.SID.ir

مالاریا در آن مناطق گزارش شده بود، در مقابل ۱۳(۴٪) نفر از افرادی که در بقیه استان ساکن بودند دیده شد، ولی این اختلاف از نظر آماری معنادار نبود. از ۱۸ نفری که آنتی‌بادی مالاریا در آن‌ها مثبت بود، (۸۸/۹٪) ۱۶ نفر مرد بودند ومیانگین سنی ۳۵ سال داشتند و از نظر آماری اختلافی بین زنان و مردان وجود نداشت. سابقه مالاریا در ۱ نفر از افرادی که آنتی‌بادی در وی مثبت بود وجود داشت و سال ابتلا را ۱۳۸۱ یعنی ۷ سال قبل از مطالعه اعلام نمود. آنتی‌بادی مثبت در بین اهداکنندگان خون با سابقه(۷/۲٪) از اهداکنندگان مستمر(۵/۳٪) و بار اول(۳٪) بالاتر بود ولی اختلاف بین این سه گروه با توجه به درصد اهداکنندگان به تفکیک بار اول، مستمر و با سابقه معنادار نبود(جدول ۳).

آنتی‌بادی مثبت در گروه خونی AB نسبت به بقیه گروه‌های خونی بیشتر بود ولی از لحاظ آماری اختلاف معناداری نداشت(جدول ۴).

بحث

انتقال بیماری‌های قابل انتقال از طریق خون از جمله مالاریا در کشورهای غیرآندمیک، مشکل زیاد جدی نیست و به ندرت اتفاق می‌افتد، ولی در مناطق جغرافیایی خاص (مناطق آندمیک) یک تهدید جدی است اما امروزه با وجود نگرانی‌های بزرگی هم چون انتقال هپاتیت و ایدز، کمتر به آن‌ها پرداخته شده است. در صورتی که مالاریای پس از تزریق خون، یک خطر جدی است چون علاوه بر مشکلات بهداشتی و بیماری که برای گیرنده ایجاد می‌کند، در بعضی از موارد می‌تواند کشنده هم باشد(۱۰).

استان سیستان و بلوچستان با توجه به شرایط جغرافیایی خاص، وسعت زیاد حدود ۱۸۷۵۰۲ کیلومتر مربع که ۱۱/۵٪ مساحت کل کشور را به خود اختصاص داده و هم‌جواری با شهرستان‌های کرمان و هرمزگان و کشورهای پاکستان و افغانستان که از نظر مالاریا شیوع بالایی دارند، هم چنین شرایط زندگی که ۵۱٪ دارای زندگی عشایری و روستایی هستند، مسافرت و ترددهای مکرر داخل استان و وجود مناطق تفریحی چابهار و ایرانشهر، ییلاق و قشلاق کردن عشایر، مسافرت به کشورهای پاکستان و افغانستان(بر اساس آمار منتشره از قسمت آمار سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی استان، تعداد مسافرت‌ها در درون استان، ۵۶۷۳۵۷۳ مورد در یک سال که بیانگر تعداد جابه‌جایی به طور متوسط ۲/۸۳ بار برای هر نفر در سال در این استان است و جابه‌جایی خارج استانی ۴۸۶۸۰۰ نفر از طریق مرزهای هوایی، زمینی) از نظر مالاریا در معرض خطر جدی قرار دارد(۱۳-۱۱، ۴).

اصولاً وقتی خطر انتقال مالاریا و انتقال خون را بررسی نماییم، دو جنبه را باید در نظر داشته باشیم:

اول خطر مالاریا در ارتباط با شخص اهداکننده و دوم خطر برای سیستم انتقال خون از جمله تشخیص و مدیریت اهداکنندگان(۱۴). در این جا اساساً خط و مشی‌های متفاوتی در سرویس‌های انتقال خون وجود دارد و این خط و مشی در بین کشورهای آندمیک و غیر آندمیک متفاوت است.

در بسیاری از کشورها غربالگری اهداکنندگان به وسیله پرسشنامه، اولین و تنها قدم در پیشگیری از بیماری‌های منتقله از طریق خون از جمله مالاریا است. دستور العمل‌های حذف اهداکنندگان، راه‌کار اولیه غربالگری اهداکنندگان است که بر اساس تاریخچه و شرح حال، خطر انتقال مالاریا در رابطه با سکونت و یا مسافرت به مناطق مالاریاخیز را مشخص می‌کند. سؤال‌های مهمی که در این ارتباط باید پرسیده شود، منطقه جغرافیایی(مناطقی که خطر بالقوه انتقال در این مناطق وجود دارد)، طول مدت اقامت، سابقه ابتلا، که برطبق دستور العمل‌های AABB (American Association of Blood Banks) و FDA (Food and Drug Administration) و استانداردهای سازمان انتقال خون ایران، سابقه ابتلا به مالاریا باعث می‌شود که اهداکننده به طور دایم از اهدای خون معاف شود و افرادی که سابقه سکونت و اقامت داشتند، ۳ سال و مسافرت به مناطق مالاریاخیز به مدت حداقل ۶ ماه تا یک سال از اهدای خون معاف می‌شوند(۱۵، ۱۴). به هر حال گرچه پرسشنامه یکی از قابل اعتمادترین روش‌های غربالگری است، اما اهداکنندگان semi-immune ، اهداکنندگانی که متولد مناطق مالاریاخیز هستند و یا مدت طولانی در این مناطق زندگی می‌کردند و به طور مکرر در معرض نیش

Archive of SID
www.SID.ir

پشه بودند و یا اهداکنندگانی که در هنگام مصاحبه، سابقه مالاریا را به خاطر نمی‌آورند و یا به علت عدم درک مفهوم سؤال، پاسخ درستی نمی‌دهند خطری برای سلامت خون در این روش غربالگری می‌باشند(۱۷، ۱۶).

مطابق نتایج این تحقیق، میزان کلی فراوانی آنتی‌بادی مالاریا ۴/۷٪ بود و در افرادی که سابقه سکونت در قسمت‌های جنوبی استان را داشتند، این میزان ۷/۷٪ به دست آمد. در مطالعه انجام شده در عربستان، که وضعیت اپیدمیولوژیکی مشابه ایران دارد، ۷/۶٪ از اهداکنندگان آنتی‌بادی مثبت داشتند(۱۸). در مقابل فراوانی آنتی‌بادی مالاریا، در میان اهداکنندگان انگلستان که یک منطقه غیرآندمیک است ۰/۱٪ بود(۱۹). نتایج این مطالعه نشان داد که فقط یک نفر از ۱۸ فرد آنتی‌بادی مثبت، سابقه مالاریا در ۷ سال گذشته داشته است. در این روش غربالگری، تعداد زیادی از اهداکنندگانی که واکنش آنتی‌بادی مثبت داشتند، از چرخه اهدا خارج می‌شوند که این امر، منجر به کمبود خون از یک طرف و مشکلاتی که برای مدیریت و مشاوره اهداکنندگانی که بدین ترتیب کنار گذاشته می‌شوند به وجود می‌آید، خواهد شد. از آن جایی که آنتی‌بادی مالاریا تا سال‌ها بعد از بهبودی در بدن باقی می‌ماند و موارد آنتی‌بادی مثبت، دلیل حضور فعلی انگل نبوده و نشانه semi-immune می‌باشد، می‌توان با بررسی آنتی‌ژن، باعث شد تا تعداد کمتری از خون‌های اهدایی از چرخه مصرف خارج شوند. همان طور که قبلاً نیز گفته شد در مطالعه حاضر، فراوانی اهداکنندگان آنتی‌ژن مثبت صفر گزارش شد و PCR نمونه‌ها منفی بود. اما در مطالعه مشابهی که در عربستان انجام شده بود، ۰/۲٪ گزارش گردید(۱۷).

در مطالعه‌های مختلف از روش ترکیبی آزمایش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، برای تشخیص استفاده شده است و مشاهده شده دوره تغییرات سرمی از ۱/۶ ± ۱۱/۴ روز به ۱/۱ ± ۵/۳ روز کوتاه‌تر شده است(p= ۰/۰۰۱)(۲۰).

در مطالعه اپیدمیولوژیکی که در مورد وضعیت مالاریا در ایران در طی سال‌های ۱۳۵۴-۱۳۵۳ انجام شده، در قسمت‌هایی از کشور از جمله در استان‌های هرمزگان، سیستان و بلوچستان و کرمان، بیماری به صورت اپیدمی بوده است و به ادعای نگارندگان، حدود صد هزار نفر از ساکنان روستاها و شهرهای منطقه جنوب شرق به مالاریا مبتلا شده بودند(۲۱، ۸). در مطالعه ادریسیان، مواردی از انتقال مالاریا از طریق خون گزارش شده، که بیشتر هم از نوع مالاریه بوده است(۷). در حالی که برای اثبات این ادعا، می‌بایست اهداکننده خون نیز آزمایش شود و در صورتی که مبتلا به مالاریا باشد، انتقال از طریق خون اثبات می‌گردد و در غیر این صورت به صرف داشتن سابقه تزریق خون، نمی‌توان انتقال مالاریا از طریق خون را اثبات نمود. مضاف بر این در شرایط اپیدمی، افرادی که خون دریافت نموده بودند ساکن همان مناطقی بودند که در آن اپیدمی مالاریا وجود داشت. اما امروزه با توجه به امکان ردیابی اهداکننده خون و وجود روش‌های پیشرفته هم چون PCR ، امکان مطالعه‌های دقیق‌تری فراهم شده است. لازم به ذکر است که در آن مطالعه‌ها، روش تشخیص مالاریا بررسی انگل در لام خون محیطی بوده است.

در بررسی روند بیماری مالاریا در سال‌های ۸۶-۸۱، بیشترین نوع انگل از نوع ویواکس با شیوع ۹۱٪، فالسیپارم با ۸/۵٪ و اندک باقیمانده مالاریه یا میکس(فالسیپارم و ویواکس) بوده است(۴). در مطالعه‌های اپیدمیولوژی که در طی سال‌های ۸۷-۸۴ در مورد بررسی روند مالاریا در استان سیستان و بلوچستان انجام شده است، عفونت ناشی از گونه مالاریه اصلاً گزارش نشده است(۲۲). به همین سبب در این مطالعه نیز به بررسی گونه فالسیپارم و ویواکس در روش PCR پرداخته شد که نتایج آزمایش PCR کلیه اهداکنندگان منفی بود. روش PCR حساس‌تر و اختصاصی‌تر از بقیه روش‌های غربالگری است و مزیت بزرگ آن قابلیت شناسایی و تعیین عفونت در مقادیر کم انگل در خون است. این روش قادر است در هر میکرولیتر خون، ۰/۰۴-۰/۰۰۴ انگل را شناسایی کند و در صورتی که از آن به عنوان یک روش مکمل با روش‌های دیگر استفاده شود، می‌توان از محرومیت افراد سالم از اهدای خون پیشگیری کرد. اما با توجه به پیچیدگی‌های روش و هزینه بالای آزمایش، به نظر می‌رسد برای غربالگری به صرفه نباشد.

گسترش نازک و ضخیم خون محیطی از نظر وجود انگل در مطالعه حاضر منفی بود ، اگر چه این روش را به

Archive of SID
www.SID.ir

عنوان روش انتخابی در تشخیص مالاریا می‌دانند و در واقع روشی به ظاهر ارزان و مناسب است، اما پر زحمت و وقت‌گیر است و هم چنین در سطح پایین پارازیتمی، ممکن است قادر به ارزیابی وجود انگل نباشد.

نتیجه‌گیری

ارزیابی روش‌های مختلف غربالگری مالاریا نشان می‌دهد که غربالگری توسط پرسشنامه، باید به عنوان خط اول با دقت مورد بازنگری و تاکید قرار گیرد. گر چه در این روش، ۲٪ اهداکنندگان را ممکن است به علت سابقه مالاریا یا سابقه مسافرت به مناطق مالاریاخیر از دست بدهیم، ولی نظر به اهمیت سلامت خون، می‌توان در مناطق آندمیک، روش بررسی آنتی‌بادی را در کنار این روش به کار گرفت تا افرادی که سابقه مالاریا را فراموش کرده و یا ممکن است شرح حال درستی را ارایه ندهند، نادیده گرفته نشوند. بدین ترتیب می‌توان خطر انتقال مالاریا را به حداقل رساند و سلامت خون را افزایش داد.

References :

1- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Infection agent transmitted by transfusion. In: Blood transfusion in clinical Medicine .10th ed. Oxford, UK: Blackwell Science; 1997. p. 509-70.
2- Edrissan GH, Nateghpour M, Afshar A , Mohsseni GH. In vivo monitoring of the response of falciparum and vivax plasmodia to chloroquine in Bandar-Abbas and Kahnouj , South-East Iran ,1997-1999. Med J Iran Hosp 2001 ; 3(2); 30-3.
3- World Health Organization, World Malaria Report 2008. 1th ed. Geneva, Switzerland: chapter 3. p. 9-15
4- Raeisi A , Nikpoor F , Ranjbar Kahkha M, Faraji L. The trend of malaria in I.R. Iran. rom 2002 to 2007. Hakim Research Journal 2009 ; 12(1): 35-41.
5- Salehi M, Amirmajdi MM, Mashhadi IE , Hakemi Y, Mashhadi AE, Mirinezhad A. Analysis of malaria epidemic features in Sistan and Baluchistan province, southeast of Iran, 2005 - 2008. IRCMJ 2010 ; 12 (3): 247-53.
6- Ali MSM, Yousif Kadaru AM, Mustafa MS. Screening blood donors for malaria parasite in Suden. Ethiop J Health Dev 2004; 18(2).
7- Edrisian GH. Transfusion transmitted malaria in Iran. J Med Counc IR Iran1985; 9(5): 314-24.
8- Edrisian GH. Malari history and status in Iran. Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research 2002; 1(1) :50-61.
9- Moghtadaei M, Edrissian GH, Amini Kafiabad S, Samiei Sh, Keshavarz H, Nateghpoor M. Application and evaluation of PCR in detection of malaria in donors of transfusion centers in Sistan-Baloochestan province in 2002. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2005; 2(4): 105-114.
10- Uneke CJ , Ogbu O , Nwojiji V. Potential risk of induced malaria by blood transfusion in south-eastern Nigeria. Mcgill J Med 2006 Jan; 9(1): 8-13.
11- Statistical Yearbook of Sistan and Baluchistan Province 2008. Available at: http:// sbportal. ir/ sbportalsd_ content/ media/ image/ 2011/ 01/941 _ orig.pdf. [Article in Farsi]
12- Mostafa Ahmed Salah. Strategic plan for malaria control and elimination in the WHO Eastern Mediterranean Region 2006-2010. World Health Organization 2007. 1st ed . Chapter 2. P. 9,14,37,39.
13- Statistical Yearbook of Sistan and Baluchistan Province 2008. Available at: http://www.sb-ostan.ir/DesktopModules/OrgAmar/OrgAmar_813_73.pdf. [Atticle in Farsi]
14- Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. Vox sang 2006; 90(2): 77-84.
15- Kitchen AD, Barbara JA, Hewitt PE. Documented cases of post-transfusion malaria occurring in England: a review in relation to current and proposed donor-selection guidelines. Vox Sang 2005; 89(2): 77-80.
16- Louis M. Katz. Travel and Medical History:Malaria ,Transmissiable spongiform encephalopathies, and Others. In: Screening blood donors: Science, Reason, and the Donor History Questionnaire. 1ed. NY, USA: AABB; 2007. P. 168-80.
17- Slinger R, Giulivi A, Bodice-Collins M, Hindieh F, John RS, Sher G, *et al*. Transfusion-transmitted malaria in Canada. CMAJ 2001; 164(3): 377-9.
18- Saeed AA, Al Rasheed AM, Al Nasser I, Al Onaizi M, Al Kahtani S , Dubois L. Malaria Screening of blood donors in Saudi Arabia. Ann Saudi Med 2002; 22(5-6): 329-32.
19- Chiodini PL, Hartley S , Hewitt PE, Barbara JA, Lalloo K, Bligh J, Voller A. Evaluation of a malaria antibody ELISA and its value in reducing potential wastage of red cell donations from blood donors exposed to malaria with a note on a case of transfusion-transmitted malaria . Vox Sang 1997; 73(3): 143-8.
20- Silvie O, Thellier M, Rosenheim M, Datry A, Lavigne P, Danis M, *et al* . Potential value of plasmodium falciparum-associated antigen and antibody detection for screening of blood donors to prevent transfusion-transmitted malaria. Transfusion 2002; 42(3): 357-362.
21- Salehi M, Amirmajdi MM, Mashhadi IE , Hakemi Y, Mashhadi AE, Mirinezhad A. Analysis of Malaria Epidemic Feature in Sistan and Baluchistan Province southeast of Iran,2005-2008. IRCMJ 2010; 12(3) : 247-53.
22- Edrissian GH. Malaria In Iran: past and present Situation. Iranian J Parasitol 2006; 1(1): 1-14.

Archive of SID
www.SID.ir

Original Article

Malaria screening of blood donor in Zahedan

Sanei Moghaddam E.[1,2], Khosravi S.[1,2], Poursharifi M.[1,2], Jafari F.[1,2], Moghtadaei M.[1]

[1]*Blood Transfusion Research Center , High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[2]*Zahedan Regional Educational Blood Transfusion Center, Zahedan, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Transfusion transmitted malaria is an ever present risk in endemic areas and the real threat for blood safety. There is a need for an effective malaria screening program and development of donor deferral criteria for the country. We evaluated the potential usefulness of Elisa screening for malaria antibody and antigen, thick and thin blood film, and polymerase chain reaction (PCR) among Zahedan blood donors.

Materials and Methods

A total number of 384 blood donors in Zahedan in 2009 were screened for malaria parasite by thick and thin blood film using giemsa staining technique, Elisa antibody and antigen test, and PCR.

Results

The overall malaria antibody prevalence was 4.7%. In blood donors living in endemic regions, where there were reports for local Malaria transmission, the rate was 7.9%. The results of all antigen test, thick and thin blood films, and PCR were negative.

Conclusions

The present donor deferral system seems optimal at present; however, a small risk of transfusion transmitted malaria remains. In an endemic region like Sistan and Baluchestan the use of Elisa antibody test was an interesting alternative for the screening of blood donors.

Key words: Malaria, screening, Elisa, Blood Donors, PCR
Sci J Iran Blood Transfus Organ 2011; 8(3): 165-173

Received: 2 Jan 2011
Accepted: 15 Aug 2011

Correspondence: Sanei Moghaddam, DMT. Blood Transfusion Research Center , High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine and Zahedan Regional Educational Blood Transfusion Center .
P.O.Box: 98135-617, Zahedan, Iran. Tel: (+98541) 3220000; Fax : (+98541) 3239500
E-mail: *sasp1334@yahoo.com*

Archive of SID
www.SID.ir