

بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی (کالآزار) در شهرستان گرمی از استان اردبیل

محمود محامی: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر مهدی محبعلی: استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران - نویسنده رابط mmohebali@hotmail.com
دکتر حسین کشاورز: استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر هما حجاران: استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
بهناز آخوندی: کارشناس آزمایشگاه گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
ذبیح‌الله زارعی: کارشناس آزمایشگاه ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر
سرور چاره دار: کارمند گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دریافت: ۸۳/۱۲/۱۹ پذیرش: ۸۴/۳/۲

چکیده:

زمینه و هدف: لیشمانیوز احشایی یا کالآزار در بعضی از نقاط ایران از جمله مناطقی از استان های اردبیل، آذربایجان شرقی، بوشهر و فارس به صورت آندمیک دیده می‌شود. این بیماری در سایر استان های کشور به شکل پراکنده و اسپورادیک گزارش شده است. با توجه به گزارش موارد متعدد بیماری کالآزار از شهرستان گرمی به مراکز بهداشتی استان اردبیل، انجام مطالعه بر روی بیماری مذکور در این منطقه ضروری به نظر می‌رسید لذا این بررسی با هدف تعیین وضعیت لیشمانیوز احشایی در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳ به انجام رسید.

روش کار: روش نمونه‌برداری به شکل خوشه ای و گروههای تحت مطالعه شامل کودکان زیر ۱۲ سال و ۱۰٪ بزرگسالان بوده است. در مجموع ۱۱۵۵ نمونه خون از افراد مذکور تهیه شد که با روش سروولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) به منظور اندازه گیری آنتی‌بادی ضد لیشمانیائی مورد آزمایش قرار گرفت. در نهایت با استفاده از روش DA، ۳۲ نفر (۲/۸٪) دارای آنتی‌بادی اختصاصی ضد لیشمانیا با عیار $\geq 1:800$ بوده و در کل نمونه‌ها ۷ نفر (۰/۶٪) با عیار $\geq 1:3200$ از نظر سروولوژی مثبت بودند. نمونه‌های مثبت و مشکوک DAT با دو تست IFA و ELISA نیز بررسی شدند. همچنین از بین سگ های صاحبدار، ۲۲ قلابه (۲/۶٪) سگ علایم دار در این مطالعه مورد آزمایش سروولوژی قرار گرفتند که ۳ قلابه (۱۳/۷٪) سگ دارای آنتی بادی ضد لیشمانیا با استفاده از تست های DAT ($\geq 1:3200$) و Dipstick rk39 بودند.

نتایج: پس از کالبد گشایی این سه قلابه سگ، آزمایش پارازیتولوژی یکی از سگ ها مثبت بود. جداسازی و کشت همین ایزوله نیز موفقیت آمیز بوده که با استفاده از روش RAPD-PCR گونه انگل *L. infantum* تعیین شد. در این بررسی اختلاف معنی داری بین جنس مذکر (۲/۷٪) و مؤنث (۲/۸٪) در ابتلاء به لیشمانیوز احشایی مشاهده نشد ($p = 0/8$) ولی موارد بیماری در کودکان زیر ۴ سال بیشتر بود ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیماری کالآزار یکی از مشکلات بهداشتی شهرستان گرمی بوده و این بررسی ضرورت انجام مطالعات تکمیلی و توسعه امکانات بهداشتی، درمانی و تشخیصی را در منطقه بیان می‌کند.

واژگان کلیدی: لیشمانیوز احشایی، سرواپیدمیولوژی، ایران

مقدمه:

علایم بالینی بارز آن تب، کاهش وزن، بزرگ شدن طحال و کبد و در نتیجه بزرگی شکم، کم خونی با کاهش تمام عناصر سلولی به ویژه گلبولهای سفید و افزایش میزان

لیشمانیوز احشایی یا کالآزار (بیماری سیاه) یک عفونت سیستمیک ناشی از انگل های لیشمانیا است که از

بیماری به کار می‌رود (سازمان بهداشت جهانی ۱۳۷۸). بر اساس مطالعه ای که توسط دکتر ادریسیان و همکاران در استان آذربایجان شرقی انجام گرفته است، از بین ۸۳۸ نمونه خون تهیه شده از کودکان ساکن ۵ روستا در شهرستان های مغان و اهر، ۱۲ مورد (۱/۴٪) با استفاده از تست IFA از نظر وجود پادتن لیشمینیا مثبت بوده اند (ادریسیان و همکاران ۱۳۶۹). با توجه به این که به طور مکرر موارد بیماری از شهرستان گرمی گزارش می‌شود و میزان بروز آن در این شهرستان طی سالهای اخیر افزایش چشمگیری داشته است (محمدی خیرآبادی و همکاران ۱۳۸۲)، انجام یک مطالعه سرواپیدمیولوژی در مورد این بیماری یکی از اولویت‌های بهداشتی شهرستان گرمی به نظر می‌رسید. لذا این بررسی با هدف تعیین وضعیت لیشمینوز احشایی در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳ به انجام رسید.

روش کار:

موقعیت جغرافیایی شهرستان گرمی: شهرستان گرمی در ناحیه شمالی استان اردبیل در ۴۸ درجه و ۳ دقیقه طول شرقی و ۳۹ درجه و ۱ دقیقه عرض شمالی واقع شده است. این شهرستان از طرف شمال به شهرستان های بيله‌سوار و پارس‌آباد، از طرف شرق به کشور جمهوری آذربایجان، از طرف جنوب به شهرستان مشکین شهر و از طرف غرب به شهرستان های اهر و کلیبر از استان آذربایجان شرقی محدود می‌شود. فاصله گرمی تا اردبیل ۹۷ کیلومتر است. ارتفاع این شهرستان از سطح دریا ۱۱۰۰ متر می‌باشد و مساحت آن ۱۷۲۵/۲ کیلومتر مربع است. میزان بارندگی متوسط سالیانه آن ۳۵۰-۲۵۰ میلی‌متر می‌باشد. کمترین متوسط حداقل درجه حرارت ماهیانه هوا در شهرستان گرمی ۷/۱- درجه سانتی‌گراد در دی ماه و بیشترین متوسط حداکثر درجه حرارت ماهیانه هوا ۳۲/۵ درجه سانتی‌گراد در تیر ماه بوده است. طبق آمارگیری سال ۱۳۸۰، جمعیت شهرستان گرمی ۹۸۴۸۹ نفر، تعداد خانوار آن ۱۷۲۳۰، ۵۰/۵٪ کل

گاما گلوبولین‌های خون است (Pearson R.K. ۱۹۹۰). کالآزار در ایران از نوع مدیترانه‌ای بوده و عامل آن لیشمینیا اینفانتوم، ناقل آن گونه‌های به خصوصی از پشه خاکی‌های جنس فلبوتوموس و مخزن انگل سگ و سگ‌سانان می‌باشد (ادریسیان ۱۳۷۵، Nadim A. et al. ۱۹۷۸). در ایران اولین مورد لیشمینوز احشایی انسان در سال ۱۳۲۸ توسط دکتر یحیی پویا در یک پسر بچه از استان مازندران گزارش شد (پویا ۱۳۲۸). بعد از آن موارد دیگری از سایر مناطق کشور تشخیص داده شد و تا پایان سال ۱۳۵۴ جمعاً ۱۲۰ مورد تأیید شده با آزمایش انگل‌شناسی از سراسر کشور به جز منطقه جنوب شرقی گزارش گردید (Nadim A. et al. ۱۹۷۸). از سال ۱۳۵۵ که روش‌های سروولوژی اختصاصی به ویژه تست ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) در تشخیص لیشمینوز احشایی در ایران مورد استفاده قرار گرفت تعداد موارد کشف شده کالآزار به سرعت افزایش یافت. در حال حاضر کالآزار در بعضی از مناطق استان های اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر به شکل آندمیک دیده می‌شود (ادریسیان ۱۳۷۵). تا سال ۱۳۷۶ حدود ۵۲۴۴ مورد کالآزار در ایران تشخیص داده شده است که ۲۲۸۰ مورد مربوط به استان اردبیل ۲۰۲۰ مورد مربوط به استان فارس و ۱۷۵ مورد مربوط به استان آذربایجان شرقی بوده است (Mohebbi M. et al. ۲۰۰۰). میرصمدی و همکاران (۱۳۸۲). کانون اصلی بیماری در استان اردبیل، شهرستان های مشکین شهر و مغان (گرمی، بيله‌سوار، پارس‌آباد) بوده است (ادریسیان ۱۳۷۵). روش های سروولوژیک مختلفی در تشخیص بیماری کالآزار به کار می‌روند که از بین آنها می‌توان به تست‌های IFA، DAT، ELISA، لاتکس آگلوتیناسیون و Dipstick tk۳۹ اشاره نمود. از مجموع تست‌های فوق که همگی در بیماران کالآزاری استان اردبیل مورد آزمون قرار گرفته‌اند تست DAT از حساسیت و ویژگی بالایی برای مطالعات سرواپیدمیولوژیک برخوردار بوده و با توجه به سهولت انجام به عنوان یکی از تست‌های انتخابی در تشخیص

پزشکی تهران جهت انجام آزمایشات لازم حمل گردیده و به روشهای سروولوژی IFA, DAT و ELISA مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. همچنین در این بررسی به هنگام اخذ نمونه، در مورد داشتن سگ و دارا بودن علایم و نشانه های بالینی کالآزار در آن (ریزش مو، درازشدن ناخن ها، ضعف و لاغری) از افراد سؤال می‌شد که در صورت وجود سگ‌های علایم دار در هر روستا بعد از اتمام کار نمونه‌گیری از افراد، برای گرفتن نمونه خون از سگ‌های مزبور مراجعه کرده و در صورت مثبت بودن تست سروولوژی، هماهنگی‌ها و برنامه‌ریزی‌های لازم برای کالبدگشایی سگ مورد نظر پس از توجیه و کسب اجازه از صاحب سگ به عمل می‌آمد.

تست آگلوتیناسیون مستقیم (DAT): آنتی‌ژن تست DA در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بر اساس روش دکتر هریت تهیه گردید (Harith A. et al. ۱۹۸۹). در این روش آنتی‌ژن در مجاورت رقت‌های مختلف سرم یا پلاسما ی 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 پلاسما ی بیمار تهیه شد و پس از افزودن آنتی‌ژن در رقت های ۳۲۰۰: ۱ و ۸۰۰: ۱ میکروپلیت‌ها در داخل اتاقک 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 به صورت یک تکه کوچک آبی رنگ با حاشیه کاملاً مشخص و در وسط حفره میکروپلیت ته‌نشین شده بودند دال بر فقدان آگلوتیناسیون بوده و نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا منفی به حساب می‌آمد. اگر انگل‌ها به حالت کلونیدی ابری شکل آبی رنگ یکنواخت در تمام مایع موجود در حفره پراکنده شده یا به اصطلاح آگلوتینه شده بودند

جمعیت مذکر و ۴۹/۵٪ مؤنث بوده است (سازمان برنامه و بودجه استان اردبیل ۱۳۸۰).

روش تهیه نمونه: این بررسی از نوع توصیفی و به روش مقطعی انجام شده است. روش نمونه‌برداری به شکل خوشه‌ای، حجم نمونه محاسبه شده ۱۱۵۵ نفر و به این صورت بوده که پس از دریافت اطلاعات مربوط به تعداد موارد بیماری کالآزار در روستاهای شهرستان گرمی طی سالهای اخیر، با توجه به نقشه شهرستان تعداد ۸ روستا، از روستاهای دارای موارد و ۴ روستا از روستاهای فاقد گزارش مربوط به کالآزار طوری انتخاب گردیدند که کل شهرستان را از شمال، جنوب، شرق و غرب تحت پوشش قرار دهد. همچنین حدود ۱۵٪ کل حجم نمونه به خود شهرستان گرمی اختصاص داده شد که این تعداد نمونه از مناطق سه‌گانه بهداشتی این شهرستان اخذ گردید. 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 اضافه 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 لوله میکروهماتوکریت برای هر نفر تهیه گردید. در نوزادان و بچه‌های زیر یک سال از پاشنه 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، پلاسما ی آنها جداگردیده و فریز می‌شدند. سپس تمام نمونه‌های پلاسما در شرایط فریز به آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم

نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیثمانیا مثبت محسوب می‌گردد. بالاترین رقت از نمونه سرمی که آگلوتیناسیون در آن ایجاد شده به عنوان حداکثر عیار مثبت تست آگلوتیناسیون مستقیم در نظر گرفته شد. در این صورت برای تعیین عیار، نمونه‌ها مجدداً در رقت‌های بالاتری آزمایش شدند. با هر سری از نمونه‌های مورد آزمایش یک سرم یا پلاسما مثبت به عنوان شاهد مثبت و یک سرم یا پلاسما منفی به عنوان شاهد منفی به همان ترتیب آزمایش شدند. عیارهای $1:3200 \geq$ از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیثمانیا مثبت و عیارهای $1:1600$ مشکوک و $1:800 <$ منفی تلقی شدند (Edrissian Gh.H. et al. 1993).

تست ایمنو فلورسانس غیرمستقیم (IFAT): آنتی‌ژن فیگوره این تست در آزمایشگاه لیثمانیوز واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به روش دکتر ادرسیان و همکاران تهیه گردید (Edrissian Gh.H. et al. 1977). ابتدا به کمک PBS (pH=7.2) رقت‌های لازم از نمونه‌های مورد آزمایش و کنترل مثبت و منفی تهیه شدند. لام‌های حاوی آنتی‌ژن کت شده از فریزر 70°C خارج و پس از اینکه به حرارت آزمایشگاه رسیدند در مجاورت رقت‌های مختلف سرم یا پلاسما قرار می‌گرفتند و پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب و طی مراحل شستشو با PBS، کونژوگه (fluorescent-whole IgG anti-human) ساخت شرکت حاب تک، رقیق شده ($1:40$) و حاوی اوانس بلو اضافه و دوباره انکوباسیون و مراحل شستشو به طریق گفته شده انجام می‌گردید. سپس به کمک محلول گلیسرین - تامپون مونته شده و در زیر میکروسکوپ فلئورسانس بررسی شدند (Voller A. and Oneill P. 1971). عیارهای $1:160 \geq$ از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیثمانیا مثبت، عیارهای $1:80$ مشکوک و عیارهای $1:80 <$ منفی تلقی شدند.

تست الیزا (ELISA): در این بررسی، آنتی‌ژن مصرفی پلیت‌های پوشانده شده با آنتی‌ژن فیگوره فرم پروماستیگوت لیثمانیا اینفانتوم بود (Khorshidian S. et al. 1994). ابتدا رقت مورد نیاز از نمونه، کنترل مثبت و کنترل منفی به کمک PBS حاوی Tween ۲۰ تهیه و به یکی از حفره‌های میکروپلیت ته صاف ELISA (ساخت شرکت NUNC) به مقدار لازم اضافه می‌شد. در حفره بلانک فقط PBS-T ریخته می‌شد. پس از انکوباسیون ۵۵ دقیقه‌ای در دمای آزمایشگاه و اتاقت مرطوب مراحل شستشو انجام و سپس کونژوگه Alkaline phosphatase conjugate anti-human IgG (whole molecule) ساخت کارخانه سیگما، با رقت ($1:1000$) برای هر حفره اضافه و دوباره مراحل انکوباسیون و شستشو انجام می‌شد. سپس سوبسترای PNP رقیق شده با بافر دی‌اتانول آمین به هر حفره اضافه و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در محل تاریک و اتاقت مرطوب، جهت جلوگیری از ادامه واکنش سود ۳ نرمال به هر یک از حفره‌ها اضافه شده و نتایج به کمک دستگاه ELISA-reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند (Desjuex P. 1996).

تست Dipstick rk39: در این مطالعه تست‌های نواری Dipstick rk39 ساخت شرکت (Cypress Diagnostic) بلژیک مورد استفاده گرفت. این تست در حقیقت یک آزمایش کیفی ایمنو کروماتوگرافی است که آنتی‌بادی‌های ضد لیثمانیوز احشایی را در سرم نشان می‌دهد. در این روش آنتی‌ژن rk39 بر روی خط تست، Chicken anti protein A بر روی خط کنترل و کونژوگه رنگی در قسمت پایین کاغذ نیترو سلولز کت می‌شود. در اثر تماس یک قطره خون یا سرم با قسمت پایین کاغذ نیترو سلولز و اضافه نمودن ۲-۳ قطره بافر مخصوص (PBS+FCS)، مخلوط سرم و کونژوگه رنگی بر اساس خاصیت کروماتوگرافی و موینگی بر روی استریپ حرکت کرده و پس از ۴-۱ دقیقه در صورت

در این بررسی تعداد ۱۱۵۵ نمونه خون از گروه های سنی مختلف تهیه گردید (جدول ۱) که پس از تعیین میزان هماتوکریت، پلاسماي تمامی نمونه ها با روش DAT در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران به همراه سرم کنترل های مثبت و منفی آن مرکز مورد بررسی سروولوژیکی قرار گرفتند. موارد دارای آنتی بادی با تیترا $1:800 \geq$ و موارد مشکوک در تست DA به همراه تعدادی از نمونه های منفی به جهت تأیید تشخیص با دو تست IFA و ELISA نیز آزمایش شدند. از کل افراد بررسی شده، ۶۰۰ نفر (۵۱/۸۴٪) مؤنث و ۵۵۵ نفر (۴۸/۱۶٪) مذکر بودند (جدول ۱). ۱۱۲۲ نفر (۹۷/۱٪) بدون سابقه ابتلاء قبلی و ۳۳ نفر (۲/۹٪) با سابقه قبلی ابتلا به کالآزار بوده اند. همچنین ۱۱۱۲ نفر (۹۶/۲٪) بدون سابقه ابتلا در افراد خانواده و ۴۳ نفر (۳/۸٪) دارای سابقه ابتلا به کالآزار در افراد خانواده بودند.

در تست DA کلاً ۳۲ نفر (۲/۸٪) دارای تیترا $1:800 \geq$ بودند (نمودار ۱). که از این تعداد یک نفر (۳/۱٪) با تیترا $1:102400$ و یک نفر (۳/۱٪) با تیترا $1:6400$ ، ۵ نفر (۱۵/۷٪) با تیترا $1:3200$ و ۲۵ نفر (۷۸/۱٪) با تیترا $1:800$ بوده اند. بنابراین از مجموع ۱۱۵۵ نمونه اخذ شده ۷ مورد (۰/۶٪) با عیار $1:3200$ و بالاتر بودند که در بین آنها ۲ نفر (۲۸/۶٪) دارای علائم بالینی کالآزار (تب، کم خونی و بزرگی شکم) و در کل افراد با تیترا $1:800 \geq$ ۴ نفر (۱۲/۵٪) علائم فوق را داشتند.

از کل افراد با سابقه قبلی کالآزار ۷ نفر (۲۱/۲٪) دارای تیترا آنتی بادی $1:800 \geq$ و از کل افراد بدون سابقه قبلی کالآزار ۲۵ نفر (۲/۳٪) دارای تیترا آنتی بادی $1:800 \geq$ در تست DA بوده اند. همچنین از کل افراد دارای سابقه بیماری در افراد خانواده ۳ نفر (۷٪) و از کل افراد بدون سابقه بیماری در افراد خانواده ۲۹ نفر (۲/۶٪) دارای تیترا آنتی بادی $1:800 \geq$ در تست DA بوده اند.

وجود آنتی بادی های ضد لیشمانیوز احشایی در سرم و واکنش آنها با آنتی ژن rk39 خط قرمز رنگی در ناحیه تست و به منظور کنترل صحت آزمایش خط قرمز رنگ دومی نیز در ناحیه خط کنترل (بالای خط تست) ایجاد خواهد شد (Mohebbali M. et al. ۲۰۰۴).

روش RAPD-PCR: استخراج DNA با حداقل تعداد 10^6 عدد پروماستیگوت کشت داده شده در هر میلی لیتر محیط کشت شنايدر به اضافه ۱۰ درصد FCS به روش پروتیناز K و فنل کلروفورم و با استفاده از متد Kelly (Kelly J.M. ۱۹۹۳) انجام گردید. مقدار ۲۰ نانوگرم DNA ایزوله مورد بررسی در کنار DNA سوش های استاندارد لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم با استفاده از پرایمر AB1-Ov و روش RAPD-PCR تعیین گونه گردید (Mauricio I. et al. ۲۰۰۱، حجاران ۱۳۸۳).

بررسی مخازن حیوانی (سگ): سگ های دارای علائم و نشانه های بالینی کالآزار (ریزش مو، دراز شدن ناخن ها، ضعف و لاغری) بعد از انجام تست DAT و Dipstick rk39 در صورت مثبت بودن پس از توجیه و کسب اجازه از صاحبشان برای کالبدگشایی و جداسازی انگل انتخاب می شدند. این سگ ها ابتدا با داروی بیهوشی اسپرومازین (Acepromazine: ۰.۳-۰.۵ ml / ۱۰kg) بیهوش گشته و پس از انتقال به منطقه بیابانی و دور از روستا کالبد گشایی می شدند. سپس بلافاصله با رعایت شرایط استریل و در کنار شعله از طحال و کبد سگ مزبور نمونه گیری کرده و به محیط های کشت Sloppy و RPMI ۱۶۴۰، NNN، Schneider و Evans منتقل می گردید. همچنین از بافت طحال و کبد چندین لام به روش Impression smear جهت بررسی پارازیتولوژیک تهیه می شد. پس از انجام عملیات کالبدگشای و کشت، اجساد سگ ها سوزانده می شد.

نتایج:

کالبدگشایی، آزمایش پارازیتولوژی یکی از سگ‌ها مثبت بود. کشت و جداسازی همین ایزوله نیز موفقیت آمیز بوده که با استفاده از روش RAPD-PCR گونه انگل *L. infantum* تعیین شد.

بحث :

این بررسی با هدف تعیین وضعیت لیشمانیوز احشایی در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳ به انجام رسید. در این مطالعه موارد عفونت ناشی از فرم احشایی لیشمانیا در کودکان زیر ۴ سال بیشتر بود ($p < 0/05$). در گروه سنی بیش از ۱۲ سال درصد افراد با تیتراژ آنتی بادی $1:800 \geq$ نسبت به گروه‌های سنی دیگر کاهش داشته است که شاید به دلیل ابتلای قبلی، درمان و یا موارد تحت کلینیکی باشد، زیرا آنتی‌بادی‌های علیه لیشمانیا که توسط تست DA شناسایی می‌شوند مدت ۳ تا ۴ سال و حتی بیشتر در خون باقی می‌مانند. بنابراین کاهش تیتراژ آنتی‌بادی در افرادی که در سنین پایین مبتلا شده‌اند در سن ۹ سالگی و بالاتر مشاهده خواهد شد (خادم عرفان ۱۳۷۷). نتایج حاصل از این بررسی با مطالعات انجام شده در مناطق اندمیک سایر مناطق ایران تا حدود زیادی همخوانی دارد. مطالعه‌ای که توسط دکتر ادرسیان و همکاران در مشکین‌شهر از استان اردبیل انجام شده نشانگر این است که در حدود ۹۷٪ موارد کالآزار در کودکان زیر ۹ سال و در بیش از ۵۰٪ موارد در کودکان زیر ۴ سال دیده می‌شود (Edrissian Gh.H. et al. ۱۹۸۸).

در مطالعه حاضر در شهرستان گرمی، تمامی موارد کالآزار در کودکان زیر ۹ سال بوده است. ۸۵/۷٪ موارد فوق در کودکان زیر ۴ سال و ۷۱/۴٪ موارد بیماری در کودکان زیر ۲ سال دیده شد. در بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک انجام شده در کانونهای آذربایجان شرقی و فارس درصد موارد مثبت سرولوژی در جنس مؤنث بیشتر از جنس مذکر بوده است ولی از ۴۹۳ مورد کالآزار تشخیص داده شده در کانونهای آندمیک

از نظر سنی تمامی موارد کالآزار در کودکان زیر ۹ سال بوده است. ۸۵/۷٪ موارد فوق در کودکان زیر ۴ سال و ۷۱/۴٪ موارد بیماری در کودکان زیر ۲ سال دیده شد. لازم به ذکر است که بر اساس محاسبات انجام شده، (Geometric Meand of Reciprocal) GMRT (Titers) برای تست DA در این بررسی ۱۲۳۰ به دست آمد. بالاترین GMRT مربوط به گروه سنی زیر یک سال و برابر با ۴۴۶۷ می‌باشد (جدول ۱).

در این بررسی میانگین هماتوکریت افراد سالم در جنس مذکر ۵۱/۶٪ و در جنس مؤنث ۴۶/۴٪ ولی میانگین هماتوکریت افراد مبتلا به کالآزار در جنس مذکر ۴۲/۵٪ و در جنس مؤنث ۳۸/۸٪ محاسبه گردید.

مقایسه نتایج به دست آمده از دو تست DA و IFA نشان می‌دهد که این دو تست تقریباً با هم همخوانی دارند. به طوریکه ۹۶ درصد موارد منفی در تست DA با تست IFA نیز منفی و ۷۱/۴ درصد موارد مثبت در تست DA با تست IFA نیز مثبت گردیدند. همچنین مقایسه نتایج به دست آمده از دو تست DA و ELISA نشان می‌دهد که این دو تست نیز تقریباً با هم همخوانی دارند. به طوری که ۹۲٪ موارد منفی در تست DA با تست الایزا نیز منفی و ۸۵/۷٪ موارد مثبت در تست DA با تست الایزا نیز مثبت شدند.

مخازن حیوانی (سگ): در این مطالعه از بین ۱۱۵۵ فرد مورد بررسی ۸۴۰ نفر (۷۳٪) دارای سگ و ۳۱۵ نفر (۲۷٪) فاقد سگ بودند. از بین حدود ۲۲ قلاده (۲/۶٪) سگ صاحبدار و دارای علائم و نشانه‌های بالینی کالآزار (ریزش مو، دراز شدن ناخن‌ها، ضعف و لاغری) گزارش شده توسط مردم از منطقه که با تست rk39 Dipstick و DAT مورد آزمایش قرار گرفتند، سه قلاده سگ با تست Dipstick rk39 مثبت گردید که از این سه مورد نیز دو مورد با تیتراژ $20480:1$ و یک مورد با تیتراژ $1280:1$ در تست DA بودند. بنابراین با توجه و کسب اجازه از صاحبان سگ‌ها اقدامات لازم برای کالبدگشایی این سه قلاده سگ به عمل آمد. پس از

خیرآبادی (محمدی خیرآبادی و همکاران ۱۳۸۲) از نظر شایع ترین علایم بالینی که شامل تب، آنمی و بزرگی شکم می باشد نیز مطابقت دارد.

در این مطالعه برای اولین بار سگ های این منطقه نیز مورد بررسی قرار گرفتند . با توجه به این که عامل بیماری از سگ ها جدا گردید و با روش مولکولی RAPD-PCR گونه انگل *L.infantum* تعیین شد (تصویر ۱) که احتمالاً با گونه غالب منطقه نیز همخوانی دارد (Mohebbali M. et al. ۲۰۰۵).

نتیجه گیری :

بنابراین می توان نتیجه گرفت که بیماری کالآزار یکی از مشکلات بهداشتی شهرستان گرمی می باشد. این بررسی ضرورت انجام مطالعات تکمیلی و توسعه امکانات بهداشتی، درمانی و تشخیصی را در منطقه بیان می کند.

تشکر و قدردانی :

این مطالعه با همکاری مالی انستیتو تحقیقات بهداشتی (طرح شماره ط - ۵۴/۶ / ۸۲ / ۲۴۱) در شهرستان گرمی و با پشتیبانی ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر انجام گرفته است. بر خود لازم می دانیم که از راهنمایی های ارزشمند استاد محترم جناب آقای دکتر ادریسیان تشکر و قدردانی نمایم. همچنین از زحمات آقایان دکتر حسینقلی زاده مدیریت محترم شبکه بهداشت و درمان شهرستان گرمی، دکتر پورزارع مسؤول محترم مرکز مبارزه با بیماریهای شهرستان گرمی، دکتر علوی ریاست محترم بیمارستان گرمی، خانم ها مهاجری و گروسی در آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران و سایر عزیزانی که ما را در اجرای این طرح یاری کردند تشکر و قدردانی می گردد.

مشکین شهر و گرمی طی سالهای ۶۸-۱۳۵۹، ۵۷/۲٪ جنس مذکر و ۴۲/۸٪ جنس مؤنث بوده اند (ادریسیان ۱۳۷۵، میرصمدی و همکاران ۱۳۸۲).

در این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS اختلاف معنی داری بین جنس مذکر (۲/۷٪) و مؤنث (۲/۸٪) در ابتلای به لیشمانیوز احشایی مشاهده نشد ($p = ۰/۸$) و از بین موارد دارای آنتی بادی ضد لیشمانیا با تیتراژ $\geq 1:800$ ، ۵۳/۲٪ مؤنث و ۴۶/۸٪ مذکر و با تیتراژ $\geq 1:3200$ ، ۷۱/۴٪ مؤنث و ۲۸/۶٪ مذکر بودند. علی رغم شیوع بالاتر موارد ابتلا به کالآزار در جنس مذکر، شیوع سرواپیدمیولوژیک عفونت بدون علایم کلینیکی در جنس مؤنث بالاتر بوده و شاید بتوان گفت که این به علت شیوع موارد ساب کلینیکال در جنس مؤنث باشد (ادریسیان ۱۳۷۵؛ عرشی و همکاران ۱۳۸۱).

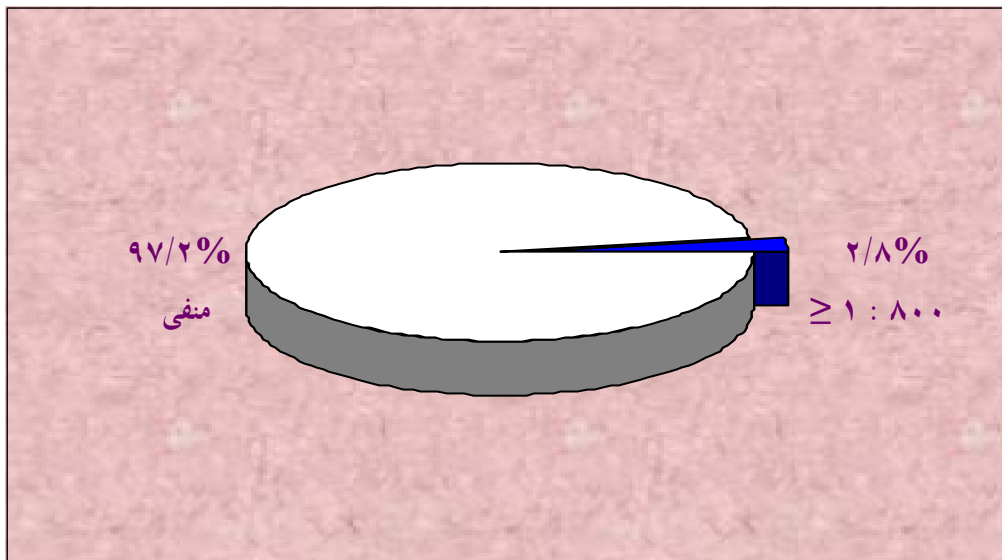
در مطالعه ای که در هندوستان انجام گرفته است، Sharma و همکارانش نیز اظهار داشته اند که بروز کالآزار در سنین قبل از بلوغ اختلاف معنی داری در دو جنس نداشته ولی بعد از بلوغ بروز بیماری در افراد مذکر بیشتر بوده است و محققین مذکور علت این اختلاف را به نقش حفاظتی هورمونهای جنسی زنانه از ابتلا به بیماری منسوب نموده اند (Sharma M.C. et al. ۱۹۹۰).

از نظر علایم بالینی تب، آنمی و بزرگی شکم شایع ترین علایم بالینی در بیماران مبتلا به کالآزار در این منطقه می باشد. مقایسه میانگین هماتوکریت افراد سالم با میانگین هماتوکریت افراد مبتلا به کالآزار در این بررسی نشان دهنده وجود کم خونی در افراد مبتلا به کالآزار می باشد. همچنین بر خلاف وجود گزارش هایی مبنی بر وجود علایم بالینی غیر متعارفی مثل علایم تنفسی در بیماران کالآزاری این منطقه، در این مطالعه موردی از این گونه علایم در مبتلایان به کالآزار مشاهده نشد.

این بررسی با مطالعه دکتر سلیمان زاده (Soleimanzadeh G. et al ۱۹۹۳)، دکتر ادریسیان (Edrissian Gh.H. et al. ۱۹۸۸) دکتر مجبعلی (Mohebbali M. et al. ۲۰۰۱) و دکتر محمدی

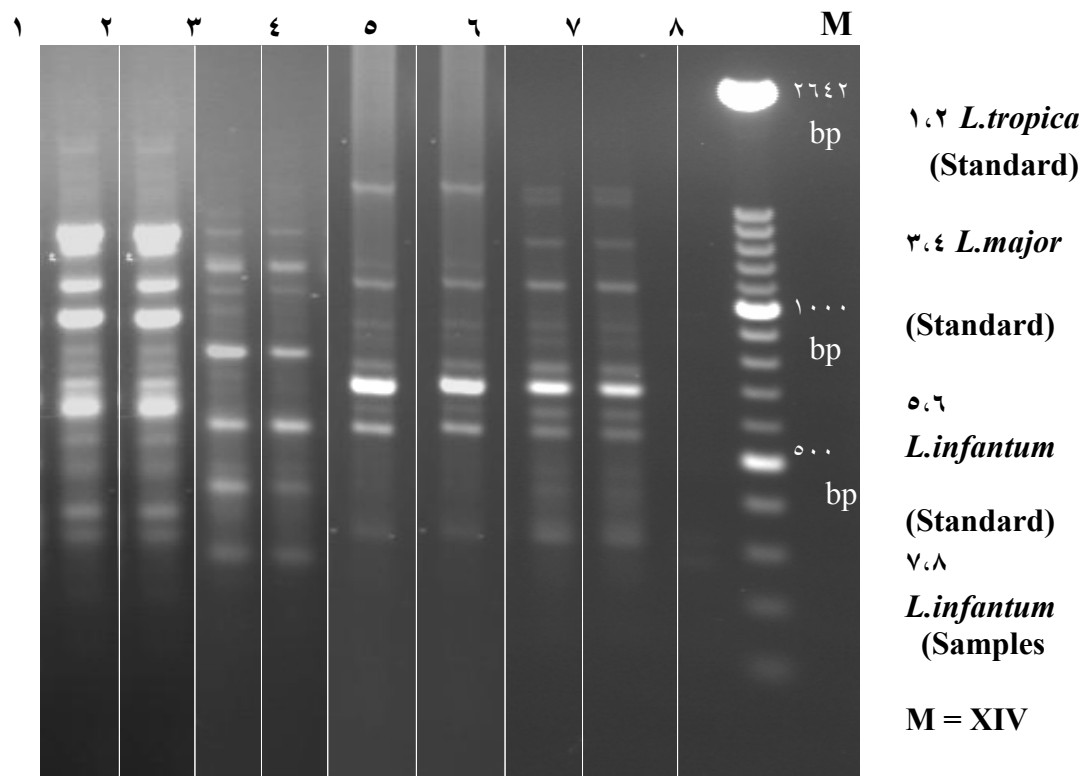
جدول ۱- نتایج آزمایش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) برحسب سن و جنس در افراد تحت مطالعه در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳

GMRT	موارد سرم مثبت (عیار ۱:۳۲۰۰ و بیشتر)			موارد سرم مثبت (عیار ۱:۸۰۰ و بیشتر)			تعداد نمونه		گروه های سنی	
	جمع (درصد)	مذکر		جمع (درصد)	مذکر		جمع (درصد)	مذکر (درصد)		
		مونت	مونت		مونت	مونت				
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)				
۴۴۶۷	۲ (۴/۴)	۰ (۰)	۲ (۷/۱۴)	۲ (۴/۴)	۰ (۰)	۲ (۷/۱۴)	۴۵ (۳/۹)	۱۷ (۳)	۲۸ (۴/۷)	زیر یک سال
۳۷۱۶	۳ (۳)	۱ (۱/۹۶)	۲ (۴/۲۵)	۵ (۵/۱)	۱ (۱/۹۶)	۴ (۸/۵۱)	۹۸ (۸/۵۳)	۵۱ (۹/۲)	۴۷ (۷/۸)	۱-۲ سال
۱۰۰۰	۱ (۰/۷)	۰ (۰)	۱ (۱/۵۶)	۶ (۴/۴)	۳ (۴/۲)	۳ (۴/۶۸)	۱۳۵ (۱۱/۷۵)	۷۱ (۱۲/۸)	۶۴ (۱۰/۷)	۳-۴ سال
۹۱۲	۱ (۰/۲۴)	۱ (۰/۴۹)	۰ (۰)	۱۱ (۲/۶۵)	۵ (۲/۴۵)	۶ (۲/۸۵)	۴۱۴ (۳۵/۸)	۲۰۴ (۳۶/۸)	۲۱۰ (۳۵)	۵-۸ سال
۷۹۵	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۷ (۲/۲)	۵ (۳/۱۸)	۲ (۱/۲)	۳۲۳ (۲۷/۹)	۱۵۷ (۲۸/۳)	۱۶۶ (۲۷/۶)	۹-۱۲ سال
۷۹۵	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۰/۷۲)	۱ (۱/۸۱)	۰ (۰)	۱۴۰ (۱۲/۱۲)	۵۵ (۹/۹)	۸۵ (۱۴/۲)	بیشتر از ۱۲ سال
۱۲۳۰	۷ (۰/۶)	۲ (۰/۳۶)	۵ (۰/۸۳)	۳۲ (۲/۸)	۱۵ (۲/۷)	۱۷ (۲/۸)	۱۱۵۵ (۱۰۰)	۵۵۵ (۴۸/۱۶)	۶۰۰ (۵۱/۸۴)	جمع کل



نمودار ۱ - توزیع فراوانی تیتراژ آنتی بادی ضد لیشمانیا با تست DA و عیار ۱:۸۰۰ در افراد

تحت بررسی سرولوژی کالآزار در شهرستان گرمی از استان اردبیل سال ۱۳۸۳



تصویر ۱: نتایج روش مولکولی RAPD-PCR با پرایمر AB1-OV و ایزوله مربوط به سگ منطقه گرمی استان اردبیل سال ۱۳۸۳

منابع:

- ادریسیان، غلامحسین (۱۳۷۵). لیشمانیوز احشایی در ایران و نقش تست‌های سروولوژی در تشخیص و بررسی اپیدمیولوژی آن، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره سوم، شماره ۲، ص ۹۷-۱۰۸.
- ادریسیان، غلامحسین. سلیمانزاده، قشم. حفیظی، عباس. افشار، عباس. عطائیان، علی. سرکیسیان، ماریاتر. کنعانی، اصغر. موحد دانش، عبدالمجید. قربانی، مهدی (۱۳۶۹). کالآزار و بررسی سرواپیدمیولوژی آن به روش ایمونوفلوئورسانس در شهرستان مشکین شهر، استان آذربایجان شرقی، مجله علمی سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران، دوره دهم، شماره ۲، ص ۷۱-۸۵.
- پویا، یحیی (۱۳۲۸). مطالعه لیشمانیوز احشایی در استانهای ۱ و ۲، نامه ماهانه دانشکده پزشکی تهران، سال هفتم، شماره ۷، ص ۶۱-۳۵۹.
- حجاران، هما (۱۳۸۳) جداسازی انگلهای لیشمانیا از انسان و مخازن حیوانی مناطق اندمیک لیشمانیوز شمال غرب و شمال شرق ایران به منظور تعیین گونه و بررسی پلی مرفیسم ژنتیکی آنها با روش مولکولی RAPD-PCR. پایان‌نامه جهت اخذ درجه دکترا تخصصی (Ph.D) انگل شناسی پزشکی از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران.

- Alborzi A. and Ardehali S. (۱۹۹۸) Visceral Leishmaniasis the Iranian experience. *Arch Irn Med.* ۱(۱): ۲۲-۶.
- Desjeux P. (۱۹۹۶) Manual on visceral Leishmaniasis control. *WHO.* ۴۰: ۱-۷۹.
- Edrissian Gh.H., Nadim A., Edrissian Gh.H., Akhavan E. and Samar G., (۱۹۷۷) Immunofluorescence as a method of choice in diagnosis of visceral leishmaniasis, *J Irn Med Council.* ۳: ۱۸۵-۱۹۰ [In Persian]
- Edrissian Gh. H., Ahanchin A.R., Gharachahi A., Ghorbani M., Nadim A. and Ardehali S. (۱۹۹۳) Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars province, southern Iran. *Irn J Med Sci.* ۱۸: ۹۹-۱۰۵.
- Edrissian Gh.H., Hafizi A., Afshar A., Soleiman-Zadeh G., Movahhed-Danesh A.M. and Garoussi A., (۱۹۸۸) An endemic focus of visceral Leishmaniasis in Meshkinshahr East Azarbaijan Province North West part of Iran, *Bull Soc Path EX.* ۸۱: ۲۳۸-۴۸.
- Harith A., Slappendel R.J., Reiter I., Van Knapen F., De Korte P., Huigen E. and Kolk A.H. (۱۹۸۹) Application of a direct-agglutination test for detection of specific anti - leishmania antibodies in the canine reservoir, *J Clin Microbiol.* ۲۷: ۲۲۵۲-۵۷.
- Kelly J.M. (۱۹۹۳) Isolation of RNA and DNA from *Leishmania*, In: Methods in molecular biology, *Humana press, New Jersey .USA.* ۱۲۳-۱۳۱.
- Khorshidian S., Hajjaran H., Sarkissian M.T. and Edrissian Gh.H. (۱۹۹۴) Evaluation of ELISA, using intact promastigotes as antigen, for the خادام عرفان، محمدباقر (۱۳۷۷). بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در شهرستان کلیبر، استان آذربایجان شرقی با روش DAT، پایان نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره پایان نامه ۲۶۲۵.
- سازمان برنامه و بودجه استان اردبیل. آمارنامه استان اردبیل (۱۳۸۰).
- سازمان بهداشت جهانی (۱۳۷۸). روش های اجرایی کنترل لیشمانیوز احشایی، ترجمه دکتر ستاره ممیشی، انتشارات وزارت بهداشت و درمان.
- عرشی، شهنام. محبعلی، مهدی. آخوندی، بهناز. صادقی بازرگانی، همایون. سپهرام، وحید. زارعی، ذبیح الله. حاجی خانی، سارا. سزاوار، هاشم (۱۳۸۱). معرفی یک کانون آندمیک جدید کالآزار در استان اردبیل و بررسی سرواپیدمیولوژیک عفونت لیشمانیایی احشایی در این منطقه، مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، سال اول، شماره دوم، ص ۹-۱۸.
- محمدی خیرآبادی، کریم. محبعلی، مهدی. ممیشی، ستاره. عرشی، شهنام (۱۳۸۲). خصوصیات اپیدمیولوژیک کالآزار در بیماران بستری در بیمارستان های استان اردبیل، مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، سال دوم، شماره دوم، ص ۱۱-۲۴.
- میرصمدی، نسرین. محبعلی، مهدی. عطاری، محمدرضا. ادیسیان، غلامحسین (۱۳۸۲). سروولوژی لیشمانیوز احشایی (کالآزار) در آذرشهر، آذربایجان شرقی، مجله حکیم، دوره ششم، شماره اول، ص ۱۷-۲۲.

- Nadim A., Navid-Hamidi A., Javadian E., Bidruni G.T. and Amini H. (۱۹۷۸) Present status of kala-azar in Iran, *Am J Trop Med Hygi.* ۲۷: ۲۵-۸.
- Pearson R.K. (۱۹۹۰) *Leishmania Species, Visceral Kala-azar*, In: Mandell GL, Doug Las RG, Bennet JE(Eds), Principles and practice of infectious diseases, ۳rd ed, New york, Churchill Livingstone. ۲۰۶۸-۷۱.
- Sharma M.C., Gupta A.K., Saran R. and Sinha S.P. (۱۹۹۰) The effect of age and sex on incidence of kala-azar, *J Commun Dis.* ۲۲(۴): ۲۷۷-۸.
- Soleiman-Zadeh G., Edrissian Gh. H., Movahhed-Danesh AM. and Nadim A. (۱۹۹۳) Epidemiological aspects of Kala-azar in Meshkinshahr, Iran : Human Infection, *Bull world Health Organ.* ۷۱(۶): ۷۵۹-۶۲.
- Voller A. and Oneill P. (۱۹۷۱) Immunofluorescence method suitable for large-scale application to malaria, *Bull World Health Organ.* ۴۵(۴): ۵۲۴-۹.
- diagnosis of visceral Leishmaniasis, *Irn J Med Sci.* ۱۹: ۱۵-۸.
- Mauricio I.L., Gaunt M.W., Stothard J.R. and Miles M.A. (۲۰۰۱) Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp۳۳ interjenic region, *Parasitology.* ۱۲۲: ۳۹۳-۴۰۳.
- Mohebali M., Hajjarian H., Hamzavi Y., mobedi I., Arshi S., Zarei Z., Akhouni B., Manouchehri-Naeini K., Avizeh R. and Fakhar M. (۲۰۰۵) Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran, *Vet Parasitol.* ۱۲۹(۳-۴): ۲۴۳-۵۱.
- Mohebali M., Hamzavi Y., Edrissian Gh.H. and Forouzani A. (۲۰۰۱) Seroepidemiological study of visceral leishmaniasis among humans and animal reservoirs in Bushehr province, Islamic Republic of Iran, *East Mediterr Health J.* ۷(۶): ۹۱۲-۷.
- Mohebali M., Taran M. and Zarei Z. (۲۰۰۴) Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk۳۹ test and direct agglutination, *Vet Parasitol.* ۲۶: ۱۲۱(۳-۴): ۲۳۹-۴۵.