

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

محمود محامی : دانشجوی کارشناسی ارشد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انسستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر مهدی محبعلی : استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انسستیتو 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 انسستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر هما حجاران : استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انسستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

بهناز آخوندی : کارشناس آزمایشگاه گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انسستیتو 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 انسستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت: ۸۳/۱۲/۱۹ پذیرش: ۸۴/۳/۲

### چکیده:

**زمینه و هدف:** لیشمانيوز 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 مراسک بهداشتی استان اردبیل، انجام مطالعه بر روی بیماری مذکور در این منطقه ضروری به نظر می‌رسید لذا این بررسی با هدف تعیین وضعیت لیشمانيوز احشایی در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳ به انجام رسید.

**روش کار:** روش نمونه‌برداری به شکل خوش‌ای 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 سرولوژی آکلوتیناسیون مستقیم (DAT) به منظور اندازه گیری آنتی‌بادی ضد لیشمانيایی مورد آزمایش قرار گرفت. در نهایت با استفاده از روش DA، ۳۲ نفر (۲/۸٪) دارای آنتی‌بادی اختصاصی ضد لیشمانيایی با عیار ۸۰۰: ۱ بوده و در کل نمونه‌ها ۷ نفر (۰/۷٪) با عیار ۳۲۰۰: ۱ از نظر سرولوژی مثبت بودند. نمونه‌های مثبت و مشکوک DAT با دو تست ELISA و IFA نیز بررسی شدند. همچنین از بین سگ های صاحبدار، ۲۲ قلاده (۶/۲٪) سگ عالیم دار در این مطالعه مورد آزمایش سرولوژی قرار گرفتند که ۳ قلاده (۷/۱٪) سگ دارای آنتی‌بادی ضد لیشمانيایی با استفاده از تست های DAT Dipstick rk<sup>۳۹</sup> (۳۲۰: ۱) بودند.

**نتایج:** پس از کالبد گشایی این سه قلاده سگ، آزمایش پارازیتولوژی یکی از سگ ها مثبت بود. جداسازی و کشت همین ایزووله 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 مذکور (۷/۲٪) و مؤنث (۸/۲٪) در ابتلاء به لیشمانيوز 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:** لیشمانيوز احشایی، سرواپیدمیولوژی، ایران

عالیم 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

### مقدمه:

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

بیماری به کار می‌رود (سازمان بهداشت جهانی ۱۳۷۸). بر اساس مطالعه‌ای که توسط دکتر ادريسیان و همکاران در استان آذربایجان شرقی انجام گرفته است، از بین ۸۳۸ نمونه خون تهیه شده از کودکان ساکن ۵ روستا در شهرستان‌های معان و اهر، ۱۲ مورد (۱/۴٪) با استفاده از تست IFA از نظر وجود پادتن لیشمانيا مثبت بوده اند (ادريسیان 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 سروپایدمویلولژی در مورد این بیماری یکی از اولویت‌های بهداشتی شهرستان گرمی به نظر می‌رسید. لذا این بررسی با هدف تعیین وضعیت لیشمانياز 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 شهرستان‌های بیله‌سوار و پارس‌آباد، از طرف شرق به کشور جمهوری آذربایجان، از طرف جنوب به شهرستان مشکین شهر و از طرف غرب به شهرستان‌های 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 ۲۵۰-۳۵۰ میلی‌متر می‌باشد. کمترین متوسط حداقل درجه حرارت ماهیانه هوا در شهرستان گرمی -۷/۱ درجه سانتی‌گراد در دی ماه و بیشترین متوسط حداقل 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). کالا آزار در ایران از نوع مدیترانه‌ای بوده و عامل آن لیشمانيا اینفانتوم، ناقل آن گونه‌های به خصوصی از پشه خاکی‌های جنس فلبوتوموس و مخزن انگل سگ و سگ‌سانان می‌باشد (ادريسیان ۱۳۷۵، Nadim A. et al. ۱۹۷۸). در ایران اولین مورد لیشمانياز احشایی انسان در سال ۱۳۲۸ توسط دکتر یحیی پویا در یک پسرچه از استان مازندران گزارش شد (پویا ۱۳۲۸). بعد از آن موارد دیگری از سایر مناطق کشور تشخیص داده شد و تا پایان سال ۱۳۵۴ جمماً ۱۲۰ مورد تأیید شده با آزمایش انگل‌شناسی از سراسر کشور به جز منطقه Nadim A. et al. ۱۹۷۸) جنوب شرقی گزارش گردید (IFA) در سال ۱۳۵۵ که روش‌های سروولژی اختصاصی تشخیص لیشمانياز احشایی در ایران مورد استفاده قرار گرفت تعداد موارد کشف شده کالا آزار به سرعت افزایش یافت. در حال حاضر کالا آزار در بعضی از مناطق استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر به شکل آندمیک دیده می‌شود (ادريسیان ۱۳۷۵). تا سال ۱۳۷۶ حدود ۵۲۴۴ مورد کالا آزار 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 (Mohebali M. et al. ۲۰۰). میرصمدی و همکاران ۱۳۸۲). کانون اصلی بیماری در استان اردبیل، شهرستان‌های مشکین شهر و مغان (گرمی، بیله‌سوار، پارس‌آباد) بوده است (ادريسیان ۱۳۷۵). روش‌های سروولژیک مختلفی در تشخیص بیماری کالا آزار به IFA کار می‌روند که از بین آنها می‌توان به تست‌های Dipstick، ELISA، DAT ۱k۳۹ اشاره نمود. از مجموع تست‌های فوق که همگی در بیماران کالا آزاری استان اردبیل مورد آزمون قرار گرفته‌اند تست DAT از حساسیت و ویژگی بالایی برای مطالعات سروپایدمویلولژیک 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 سرولوزی DAT، IFA و ELISA مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. همچنین در این بررسی به هنگام اخذ نمونه، در مورد داشتن سگ و دارا بودن عالیم و نشانه‌های بالینی کالا آزار در آن (ریزش مو، درازشدن ناخن‌ها، ضعف و لاغری) از افراد سؤال می‌شد که در صورت وجود سگ‌های عالیم 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 سرولوزی، 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 تک‌یاخته شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بر اساس روش دکتر هربیت تهیه گردید (Harith A. et al. ۱۹۸۹). در این روش آنتی‌ژن در مجاورت رقت‌های مختلف سرم یا پلاسمای فرد مشکوک قرار داده می‌شد که در صورت حضور آنتی‌بادی اختصاصی در سرم بیمار پس از گذشت ۱۸ ساعت آگلوتیناسیون صورت می‌گرفت. ابتدا به کمک محلول رقیق‌کننده و میکروپلیت‌های V شکل (ساخت شرکت DYNATECH) رقت‌های مورد نیاز از پلاسمای بیمار تهیه شد و پس از افزودن آنتی‌ژن در رقت‌های ۳۲۰۰:۱ و ۸۰۰:۱ میکروپلیت‌ها در داخل اطاقک مرطوب قرار داده شدند و در یک سطح افقی در حرارت آزمایشگاه تا روز بعد (حداقل ۱۸ ساعت) باقی ماندند. در تفسیر آزمایش چنانچه حفره‌ای که آنتی‌ژن ریخته شده بود انگل‌ها به صورت یک تکمه کوچک آبی رنگ با حاشیه کاملاً مشخص و در وسط حفره میکروپلیت تهشین شده بودند دال بر فقدان آگلوتیناسیون بوده و نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا منفی به حساب می‌آمد. اگر انگل‌ها به حالت کلوئیدی ابری شکل آبی رنگ یکنواخت در تمام مایع موجود در حفره پراکنده شده یا به اصطلاح آگلوتینه شده بودند

جمعیت مذکور 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 خوش‌ای، حجم نمونه محاسبه شده ۱۱۵۵ نفر و به این صورت بوده که پس از دریافت اطلاعات مربوط به تعداد موارد بیماری کالا آزار 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 کالا آزار طوری انتخاب گردیدند که کل شهرستان را از شمال، جنوب، شرق و غرب تحت پوشش قرار دهد. همچنین حلود ۱۵٪ کل حجم نمونه به خود شهرستان گرمی اختصاص داده شد که این تعداد نمونه از مناطق سه گانه 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، پلاسمای آنها جداگردیده و فریز می‌شدند. سپس تمام نمونه‌های پلاسما در شرایط فریز به آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انسستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم

تست الایزا (ELISA) : در این بررسی ، آنتی زن مصروفی پلیت های پوشانده شده با آنتی زن فیگوره فرم Khorshidian پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم بود (S. et al. ۱۹۹۶). ابتدا رقت مورد نیاز از نمونه ، کترول Tween ۲۰ مثبت و کترول منفی به کمک PBS حاوی ۲۰٪ اضافه می شد. در حفره بلانک فقط PBS-T ریخته می شد. پس از انکوباسیون ۵۵ دقیقه ای در دمای آزمایشگاه و اتفاق مرطوب مراحل شستشو انجام و سپس Alkaline phosphatase conjugate anti-کونژوگه human IgG (whole molecule) ساخت کارخانه سیگما، با رقت (۱:۱۰۰۰) برای هر حفره اضافه و دوباره مراحل انکوباسیون و شستشو انجام می شد. سپس سویسترای PNP رقیق شده با بافر دی اتانول آمین به هر حفره اضافه و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در محل تاریک و اتفاق مرطوب، جهت جلوگیری از ادامه واکنش سود ۳ نرمال به هر یک از حفره ها اضافه شده و نتایج به کمک دستگاه ELISA-reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند (Desjuex P. ۱۹۹۶).

تست Dipstick rk۳۹ : در این مطالعه تست های نواری Dipstick rk۳۹ ساخت شرکت Cypress Diagnostic (بلژیک مورد استفاده گرفت. این تست در حقیقت یک آزمایش کیفی ایمونوکروماتوگرافی است که آنتی بادی های ضد لیشمانیوز احشایی را در سرم نشان می دهد. در این روش آنتی زن rk۳۹ بر روی خط تست ، Chicken anti protein A کونژوگه رنگی در قسمت پایین کاغذ نیترو سلولز کت می شود. در اثر تماس یک قطره خون یا سرم با قسمت پایین کاغذ نیترو سلولز و اضافه نمودن ۲-۳ قطره بافر مخصوص PBS+FCS (PBS+FCS) ، مخلوط سرم و کونژوگه رنگی بر اساس خاصیت کروماتوگرافی و مویینگی بر روی استریپ حرکت کرده و پس از ۱-۴ دقیقه در صورت

نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانیا مثبت محسوب می گردید. 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، نمونه ها مجدداً در رقت های بالاتری آزمایش شدند. با هر سری از نمونه های مورد آزمایش یک سرم یا پلاسمای منفی به عنوان شاهد منفی به یک سرم یا پلاسمای منفی به عنوان شاهد مثبت و همان ترتیب آزمایش شدند. عیارهای  $1:3200 \geq 1:1600 \geq 1:800 < 1:400$  مشکوک و Edrissian (Gh.H . et al. ۱۹۹۳).

تست ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم (IFAT): آنتی زن فیگوره این تست در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به روش دکتر ادریسیان و همکاران تهیه گردید (Edrissian Gh.H . et al. ۱۹۷۷). ابتدا به کمک PBS (pH = ۷/۲) رقت های لازم از نمونه های مورد آزمایش و کترول مثبت و منفی تهیه شدند. لام های حاوی آنتی زن کت شده از فریزر  $70^{\circ}\text{C}$ - خارج و پس از اینکه به حرارت آزمایشگاه رسیدند در مجاورت رقت های مختلف سرم یا پلاسما قرار می گرفتند و پس از ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب و طی مراحل شستشو با PBS ، کونژوگه (whole IgG anti-human fluorescent-، کونژوگه-) نتایج رقیق شده (۱:۴۰) و حاوی اوانس بلو اضافه و دوباره انکوباسیون و مراحل شستشو به طریق گفته شده انجام می گردید. سپس به کمک محلول گلیسیرین - تامپون مونته شده و در زیر میکروسکوپ فلئورسانس بررسی شدند (Voller A. and Oneill P. ۱۹۷۱). عیارهای  $1:160 \geq 1:80 < 1:40$  از نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانیا مثبت، عیارهای  $1:80 < 1:40$  مشکوک و عیارهای منفی تلقی شدند.

در این بررسی تعداد ۱۱۵۵ نمونه خون از گروه های سنی مختلف تهیه گردید (جدول ۱) که پس از تعیین میزان هماتوکربت، پلاسمای تمامی نمونه ها با روش DAT در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت و انسنیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران به همراه سرم کترل های مثبت و منفی آن مرکز مورد بررسی سروپیدمیولوژیکی قرار گرفتند. موارد دارای آنتی بادی با تیتر  $\geq 1:800$  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 ( $51/84\%$ ) مؤنث و ۵۵۵ نفر ( $48/16\%$ ) مذکور بودند (جدول ۱). از کل افراد  $1122$  نفر ( $97/1\%$ ) بدون سابقه ابتلاء قبلی و ۳۳ نفر ( $2/9\%$ ) با سابقه قبلی ابتلاء به کالا آزار بوده اند. همچنین ۱۱۱۲ نفر ( $96/2\%$ ) بدون سابقه ابتلاء در افراد خانواده و ۴۳ نفر ( $3/8\%$ ) دارای سابقه ابتلاء به کالا آزار در افراد خانواده بودند.

در تست DA کل  $32$  نفر ( $2/8\%$ ) دارای تیتر  $\geq 1:800$  بودند (نمودار ۱). که از این تعداد یک نفر ( $3/1\%$ ) با تیتر  $1:102400$  و یک نفر ( $3/1\%$ ) با تیتر  $1:6400$  با تیتر  $1:3200$  و ۲۵ نفر ( $78/1\%$ ) با تیتر  $1:800$  بوده اند. بنابراین از مجموع ۱۱۵۵ نمونه اخذ شده  $7$  مورد ( $0.6\%$ ) با عیار ( $28/6\%$ ) دارای علایم بالینی کالا آزار (تب، کم خونی و بزرگی شکم) و در کل افراد با تیتر  $\geq 1:4$  نفر ( $12/5\%$ ) علایم فوق را داشتند.

از کل افراد با سابقه قبلی کالا آزار  $7$  نفر ( $21/2\%$ ) دارای تیتر آنتی بادی  $\geq 1:800$  و از کل افراد بدون سابقه قبلی کالا آزار  $25$  نفر ( $2/3\%$ ) دارای تیتر آنتی بادی  $\geq 1:800$  در تست DA بوده اند. همچنین از کل افراد دارای سابقه بیماری در افراد خانواده  $3$  نفر ( $7/7\%$ ) و از کل افراد بدون سابقه بیماری در افراد خانواده  $29$  نفر ( $2/6\%$ ) دارای تیتر آنتی بادی  $\geq 1:800$  در تست DA بوده اند.

وجود آنتی بادی های ضد لیشمانیوز احشایی در سرم و واکنش آنها با آنتی زن rk<sup>۳۹</sup> 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 (Mohebali M. et al. ۲۰۰۴).

روش RAPD-PCR : استخراج DNA با حداقل تعداد  $10^7$  عدد پروماستیگوت کشت داده شده در هر میلی لیتر محیط کشت اشنایدر به اضافه  $10$  درصد FCS به روش پروتئیناز K و فنل کلروفورم و با استفاده از متدهای Kelly J.M. ۱۹۹۳ (Kelly ۱۹۹۳) DNA نانوگرم ایزوله مورد بررسی در کنار سوش های استاندارد لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم با استفاده از پرایمر AB1-OV7 و روش Mauricio I. RAPD-PCR تعیین گونه گردید (Mauricio I. et al. ۲۰۰۱، حجاران ۱۳۸۳).

بررسی مخازن حیوانی (سگ) : سگ های دارای علایم و نشانه های بالینی کالا آزار (ریزش مو، دراز شدن ناخن ها، ضعف و لاغری) بعد از انجام تست DAT و Dipstick rk<sup>۳۹</sup> در صورت مثبت بودن پس از توجیه و کسب اجرازه از صاحب شان برای کالبد گشایی و جداسازی انگل انتخاب می شدند. این سگ ها ابتدا با داروی Acepromazine بیهوشی اسپرومایزین ( $0.5-0.3$  ml /  $10\text{ kg}$ ) بیهوش گشته و پس از انتقال به منطقه بیابانی و دور از روستا کالبد گشایی می شدند. سپس بلا فاصله با رعایت شرایط استریل و در کنار شعله از طحال و کبد سگ مزبور نمونه گیری کرده و به محیط های کشت Sloppy RPMI ۱۶۴۰، NNN Schneider Evans متنقل می گردید. همچنین از بافت طحال و کبد چندین لام به روش Impression smear جهت بررسی پارازیتولوژیک تهیه می شد. پس از انجام عملیات کالبد گشایی و کشت، اجسام 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 تیتر آنتی بادی  $\geq 1:800$  نسبت به گروه‌های سنی دیگر کاهش داشته است که شاید به دلیل ابتلای قبلی، درمان و یا موارد تحت کلینیکی باشد، زیرا آنتی بادی‌های علیه لیشمانیا که توسط تست DA شناسایی می‌شوند مدت ۳ تا ۴ سال و حتی بیشتر در خون باقی می‌مانند. بنابراین کاهش تیتر آنتی بادی 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 انديمك سایر مناطق ايران تا حدود زیادی همخوانی دارد. مطالعه‌ای که توسط دکتر ادریسیان 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٪ موارد فوق در کودکان زیر ۴ سال و ۷۱٪ موارد بیماری در کودکان زیر ۲ سال دیده شده. در بررسی‌های سروپاپیتمیولوژیک انجام شده در کانونهای آذربایجان شرقی و فارس درصد موارد مثبت سرولوژی در جنس مؤنث بیشتر از جنس مذکور بوده است ولی از ۴۹۳ مورد کالآزار تشخیص داده شده در کانونهای آندیمک

از نظر سنی تمامی موارد کالآزار در کودکان زیر ۹ سال بوده است. ۸۵٪ موارد فوق در کودکان زیر ۴ سال و ۷۱٪ موارد بیماری در کودکان زیر ۲ سال دیده شده، لازم به ذکر است که بر اساس محاسبات انجام شده، Geometric Meand of Reciprocal (GMRT Titters) برای تست DA در این بررسی ۱۲۳۰ به دست آمد. بالاترین GMRT مربوط به گروه سنی زیر یک سال و برابر با ۴۶۷ می‌باشد (جدول ۱).

در این بررسی میانگین هماتوکریت افراد سالم در جنس مذکور ۵۱٪ و در جنس مؤنث ۴۶٪ ولی میانگین هماتوکریت افراد مبتلا به کالآزار در جنس مذکور ۴۲٪ و در جنس مؤنث ۳۸٪ 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٪ 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٪ 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 (۲۶٪) سگ صاحبدار و دارای علایم و نشانه‌های بالینی کالآزار (ریزش مو، دراز شدن ناخنها، ضعف و لاغری) گزارش شده توسط مردم از منطقه که با تست rk<sup>۳۹</sup> DAT و Dipstick مورد آزمایش قرار گرفتند، سه قلاده سگ با تست Dipstick rk<sup>۳۹</sup> مثبت گردید که از این سه مورد نیز دو مورد با تیتر ۱:۲۰۴۸۰ و یک مورد با تیتر ۱:۱۲۸۰ در تست DA بودند. بنابراین با توجیه 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 عالیم 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 RAPD- PCR گونه انگل *L.infantum* تعیین شد ( تصویر ۱ ) که احتمالاً با گونه غالب منطقه نیز همخوانی دارد ( Mohebali M. et al. ۲۰۰۵ ).

### نتیجه گیری :

بنابراین می توان نتیجه گرفت که بیماری کالا آزار 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 انسستیتو 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 ادريسیان تشکر و قدردانی نماییم. همچنین از زحمات آفایان 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 انسستیتو 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 ۱۳۵۹-۶۸٪/۵۷/۲ جنس مذکر و ۴۲/۸٪ جنس مؤنث بوده اند (ادریسیان ۱۳۷۵، میرصمدی و همکاران ۱۳۸۲).

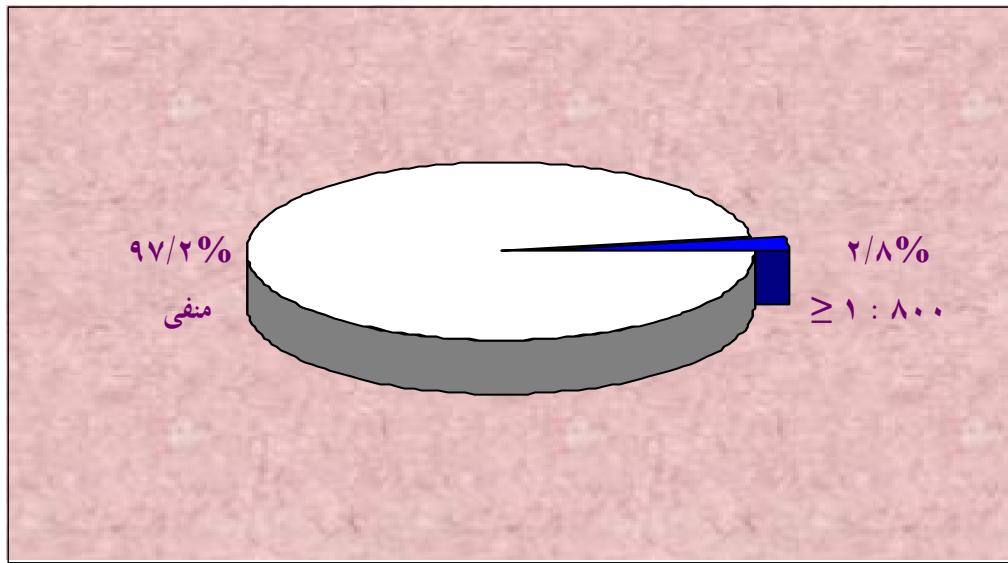
در این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS اختلاف معنی داری بین جنس مذکر (٪/۲/۷) و مؤنث (٪/۲/۸) در ابتلای به لیشمانیوز احشایی مشاهده نشد (  $p = ۰/۸$  ) و از موارد دارای آنتی بادی ضد لیشمانیا با تیتر  $800 : \geq ۱$ ،  $53/۲ : \geq ۱$ ،  $46/۸ : \geq ۱$ ،  $28/۶ : \geq ۱$ ،  $71/۴ : \geq ۱$ ٪ مؤنث و مذکر با تیتر  $3200$  علی رغم شیوع بالاتر موارد ابتلا به کالا آزار در جنس مذکر، شیوع سرواپیدمیولوژیک عفونت بدون عالیم 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 کالا آزار در سنین قبل از بلوغ اختلاف معنی داری در دو جنس نداشته ولی بعد از بلوغ بروز بیماری در افراد مذکور 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 عالیم بالینی تب، آنمی و بزرگی شکم شایع ترین عالیم بالینی در بیماران مبتلا به کالا آزار در این منطقه می باشد. مقایسه میانگین هماتوکریت افراد سالم با میانگین هماتوکریت افراد مبتلا به کالا آزار در این بررسی نشان دهنده وجود کم خونی در افراد مبتلا به کالا آزار می باشد. همچنین برخلاف وجود گزارش هایی مبنی بر وجود عالیم بالینی غیر متعارفی مثل عالیم تنفسی در بیماران کالا آزاری این منطقه، در این مطالعه موردی از این گونه عالیم در مبتلایان به کالا آزار مشاهده نشد. این بررسی با مطالعه دکتر سلیمان زاده ( Soleimanzadeh G. et al ۱۹۹۳ )، دکتر ادريسیان ( Edrissian Gh.H. et al. ۱۹۸۸ ) دکتر مجعلی ( Mohebali M. et al. ۲۰۰۱ ) و دکتر محمدی

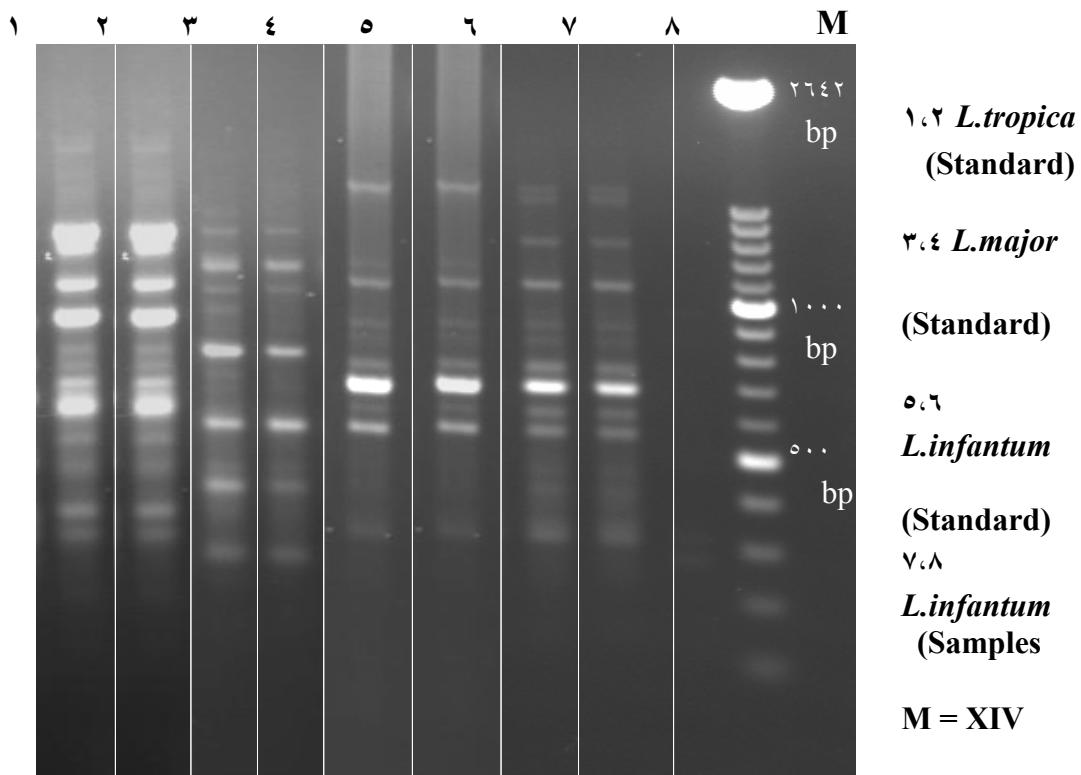
جدول ۱- نتایج آزمایش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) بر حسب سن و جنس در افراد تحت مطالعه در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳

GMRT	موارد سرم مثبت (عيار ۸۰۰ : ۱ و بيشتر)						موارد سرم مثبت (عيار ۳۲۰۰ : ۱ و بيشتر)			تعداد نمونه	گروه های سنی	
	جمع		ذکر		مونت		جمع		ذکر			
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۴۴۶۷	۲	۰	۲	۲	۰	۲	۴۵	۱۷	۲۸	۲۸	۴/۷	زیر یک سال
	(۴/۴)	(۰)	(۷/۱۴)	(۴/۴)	(۰)	(۷/۱۴)	(۳/۹)	(۳)	(۴/۷)			
۳۷۱۶	۳	۱	۲	۵	۱	۴	۹۸	۵۱	۴۷	۴۷	۱-۲ سال	
	(۳)	(۱/۹۶)	(۴/۲۵)	(۵/۱)	(۱/۹۶)	(۸/۵۱)	(۸/۵۳)	(۹/۲)	(۷/۸)			
۱۰۰۰	۱	۰	۱	۶	۳	۳	۱۳۵	۷۱	۶۴	۶۴	۳-۴ سال	
	(۰/۷)	(۰)	(۱/۵۶)	(۴/۴)	(۴/۲)	(۴/۶۸)	(۱۱/۷۵)	(۱۲/۸)	(۱۰/۷)			
۹۱۲	۱	۱	۰	۱۱	۵	۶	۴۱۴	۲۰۴	۲۱۰	۲۱۰	۵-۸ سال	
	(۰/۲۴)	(۰/۴۹)	(۰)	(۲/۶۵)	(۲/۴۵)	(۲/۸۵)	(۳۵/۸)	(۳۷/۸)	(۳۵)			
۷۹۵	۰	۰	۰	۷	۵	۲	۳۲۳	۱۵۷	۱۶۶	۹-۱۲ سال		
	(۰)	(۰)	(۰)	(۲/۲)	(۳/۱۸)	(۱/۲)	(۲۷/۹)	(۲۸/۳)	(۲۷/۶)			
۷۹۵	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۱۴۰	۵۵	۸۵	۸۵	بیشتر از ۱۲ سال	
	(۰)	(۰)	(۰)	(۰/۷۲)	(۱/۸۱)	(۰)	(۱۲/۱۲)	(۹/۹)	(۱۴/۲)			
۱۲۳۰	۷	۲	۵	۳۲	۱۵	۱۷	۱۱۵۵	۵۵۵	۶۰۰	۶۰۰	جمع کل	
	(۰/۶)	(۰/۳۶)	(۰/۸۳)	(۲/۸)	(۲/۷)	(۲/۸)	(۱۰۰)	(۴۸/۱۶)	(۵۱/۸۴)			



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

تحت بررسی سرولوژی کالا آزار در شهرستان گرمی از استان اردبیل سال ۱۳۸۳



تصویر ۱ : نتایج روش مولکولی RAPD-PCR با پرایمر AB-07 و ایزوله مربوط به سگ  
منطقه گرمی استان اردبیل سال ۱۳۸۳

### منابع:

پویا، یحیی (۱۳۲۸). مطالعه لیشمانیوز احشائی در استانهای ۱ و ۲، نامه ماهانه دانشکده پزشکی تهران، سال هفتم، شماره ۷، ص ۶۱-۳۵۹

حجاران، هما (۱۳۸۳) جداسازی انگل‌های لیشمانيا از انسان و مخازن حیوانی مناطق اندemic لیشمانیوز شمال غرب و شمال شرق ایران به منظور تعیین گونه و بررسی پلی مرفیسم RAPD-PCR. ژنتیکی آنها با روش مولکولی RAPD-PCR پایان‌نامه جهت اخذ درجه دکترای تخصصی (Ph.D) انجمن شناسی پزشکی از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران.

ادریسیان، غلامحسین (۱۳۷۵). لیشمانیوز احشایی در ایران و نقش تست‌های سرولوژی در تشخیص و بررسی اپیدمیولوژی آن، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره سوم، شماره ۲، ص ۱۰۸-۹۷.

ادریسیان، غلامحسین. سلیمانزاده ، قسم. حفیظی، عباس. افشار ، عباس . عطائیان ، علی .

سرکیسیان ، ماریناتر . کعنانی ، اصغر . موحد دانش، عبدالمجید . قربانی ، مهدی(۱۳۶۹). کالآزار و بررسی سرواپیدمیولوژی آن به روش ایمنوفلورسانس در شهرستان مشکین شهر ، استان آذربایجان شرقی ، مجله علمی سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران ، دوره دهم ، شماره ۲ ، ص ۸۵-۷۱.

- Alborzi A. and Ardehali S. (۱۹۹۸) Visceral Leishmaniasis the Iranian experience. *Arch Iran 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 Iran 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. *Iran 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 RJ., ReiterI., 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 Jersy .USA.* ۱۲۳-۱۳۱.
- Khoshidian S., Hajjaran H., Sarkissian M.T. and Edrissian Gh.H. (۱۹۹۴) Evaluation of ELISA, using intact promastigotes as antigen, for the خادم عرفان، محمدباقر(۱۳۷۷). بررسی سروایپدمیولوژی لیشمینیوز 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 لیشمینیوز 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 آدمیک جدید کالآزار در استان ادربیل و بررسی سروایپدمیولوژیک عفونت لیشمینیایی احشایی در این منطقه، مجله دانشکده بهداشت و انسنیتو 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 انسنیتو تحقیقات بهداشتی، سال دوم، شماره دوم ، ص ۱۱-۲۴.
- میرصمدی، نسرین. محبعلی، مهدی. عطاری، محمدرضا. ادربیسیان، غلامحسین (۱۳۸۲). سرولوژی لیشمینیوز احشایی (کالآزار) در 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, ۴<sup>th</sup> 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 O'Neill P. (۱۹۷۱) Immuno-fluorescence method suitable for large-scale application to malaria, *Bull World Health Organ.* ۴۵(۴): ۵۲۴-۹.

diagnosis of visceral Leishmaniasis, *Iran 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 gp۱۳ intergenic region, *Parasitology.* ۱۲۲: ۳۹۳-۴۰۳.

Mohebali M., Hajjaran 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(۱): 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.* ۱۲۱(۳-۴): ۲۳۹-۴۰.