

## مقایسه روش های سرولوژیک آگلوتیناسیون مستقیم (DAT)، ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم (IFAT) و ELISA در تشخیص لیشمانیوز احشایی

محمود محامی<sup>۱</sup>، دکتر مهدی محبعلی<sup>۲</sup>، دکتر حسین کشاورز<sup>۲</sup>، ذبیح الله زارعی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> نویسنده مسئول: کارشناس ارشد انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز E-mail: mahmood\_mahamiy@yahoo.com  
<sup>۲</sup> استاد انگل شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران  
<sup>۳</sup> کارشناس ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر

### چکیده

**زمینه و هدف:** لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) بیماری عفونی خطرناکی است که در بیشتر مناطق ایران به صورت اسپورادیک و در بعضی از مناطق استان های اردبیل، آذربایجان شرقی، بوشهر و فارس به صورت آندمیک دیده می شود. این مطالعه با هدف ارزیابی و مقایسه روش های سرولوژی IFAT، DAT، ELISA در تشخیص لیشمانیوز احشایی به دنبال یک بررسی سروایدمیولوژیک در شهرستان گرمی از استان اردبیل انجام گرفته است.

**روش کار:** روش نمونه برداری به شکل خوشه ای و گروه های تحت مطالعه شامل بچه های زیر ۱۲ سال و ۱۰٪ بزرگسالان بوده است. در مجموع ۱۱۵۵ نمونه خون از افراد مذکور تهیه شد که با روش های سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT)، IFAT و ELISA به منظور اندازه گیری آنتی بادی ضد لیشمانیائی مورد آزمایش قرار گرفتند.

**یافته ها:** با استفاده از روش DAT، ۳۲ نفر (۲/۸٪) دارای آنتی بادی اختصاصی ضد لیشمانیا با عیار  $1:800 \geq$  بوده و در کل نمونه ها ۷ نفر (۰/۶٪) با عیار  $1:3200 \geq$  از نظر سرولوژی مثبت بودند. در تست IFA نیز ۳۲ نفر (۲/۸٪) دارای عیار  $1:40 \geq$  بوده و در کل نمونه ها ۶ نفر (۰/۵۲٪) با عیار  $1:320 \geq$  از نظر سرولوژی مثبت بودند. در تست ELISA ۸ نمونه مثبت و بقیه منفی شدند.

**نتیجه گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که هر چند آزمون های IFAT و ELISA جهت تشخیص بیماران مبتلا به کالاآزار از کارایی خوبی برخوردارند ولی نیازمند آزمایشگاه مجهز و پرسنل ورزیده می باشند در صورتی که DAT یک روش ساده، ارزان، بدون نیاز به تجهیزات پیچیده و قابل اجرا در مناطق آندمیک برای تشخیص لیشمانیوز احشایی و مطالعات سروایدمیولوژی بوده و می تواند جایگزین مطمئنی برای روش های پرهزینه IFAT و ELISA باشد.

**واژه های کلیدی:** لیشمانیوز احشایی، کالاآزار، DAT، IFAT، ELISA

پذیرش: ۸۷/۲/۲۰

دریافت: ۸۵/۱۰/۲۵

### مقدمه

لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) بیماری عفونی خطرناکی است که اگر به موقع تشخیص و درمان نشود میزان مرگ و میر بالایی خواهد داشت [۱]. کالاآزار در ایران از نوع مدیترانه ای بوده و عامل آن لیشمانیا اینفانتوم، ناقل آن گونه های به خصوصی از پشه خاکی های جنس فلبوتوموس و مخزن انگل سگ و

سگ سانان می باشد [۲]. در حال حاضر کالاآزار در بعضی از مناطق استان های اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر به شکل آندمیک و در سایر مناطق به صورت اسپورادیک دیده می شود [۳]. روش های سرولوژیک مختلفی از جمله IFAT، DAT، ELISA، CIEP، CF، Dipstick rk39 و لاتکس آگلوتیناسیون در تشخیص بیماری کالاآزار به کار می روند که هر کدام دارای مزایا

و معایبی هستند [۵،۴]. هدف از این مطالعه مقایسه روشهای سرولوژیک IFAT، DAT، ELISA و به منظور دستیابی به یک آزمون ویژه، آسان، ارزان و قابل اجرا در مناطق آندمیک می باشد تا موارد مثبت کاذب و واکنش متقاطع را کم و یا حذف نموده و به تشخیص زودرس کالآزار کمک نماید.

## روش کار

این مطالعه به صورت مقطعی و به دنبال یک بررسی سرواپیدمیولوژی در شهرستان گرمی از استان اردبیل برای تعیین ارزش تشخیصی و مقایسه روشهای سرولوژیک [۶] IFAT، DAT، ELISA در تشخیص لیشمانیوز احشایی انجام گرفته است. روش نمونه برداری به شکل خوشه ای، 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 درصد کل حجم نمونه به خود شهرستان گرمی اختصاص داده شد که این تعداد نمونه از مناطق سه گانه بهداشتی این شهرستان اخذ گردیدند. در تمام روستاهای انتخاب شده از افراد زیر ۱۲ سال به صورت توتال نمونه گیری 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 نمونه گیری شد.

در این بررسی تمامی نمونه ها در داخل لوله های میکروهماتوکریت هپارینه از نوک انگشت وسطی دست چپ افراد مورد مطالعه به میزان ۳ لوله میکروهماتوکریت برای هر نفر تهیه گردید. در نوزادان و بچه های زیر یکسال از پاشنه پا و یا انگشت شست پا یا

دست نمونه گیری می شد. نمونه ها همراه با پرسشنامه هایی که برای هر یک از افراد جداگانه تهیه می گردید در شرایط مطلوب به آزمایشگاه بیمارستان گرمی منتقل و توسط سانتریفوژ میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می شد و پس از قرائت میزان هماتوکریت، پلاسما آنها جدا گردیده و فریز می شدند. سپس تمام نمونه های پلاسما در شرایط فریز به آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت انجام آزمایشات لازم حمل گردیده و به روشهای سرولوژی IFAT، DAT و ELISA مورد آزمایش قرار می گرفتند. داده ها پس از جمع آوری، توسط آزمون آماری کای دو (Chi-square) و با استفاده از نرم افزار SPSS 9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

## تست آگلوتیناسیون مستقیم (DAT)

آنتی ژن تست DA در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بر اساس روش دکتر هریت تهیه گردید [۷]. در این روش آنتی ژن در مجاورت رقت های مختلف سرم یا پلاسما فرد مشکوک قرار داده می شد که در صورت حضور آنتی بادی اختصاصی در سرم بیمار پس از گذشت ۱۸ ساعت آگلوتیناسیون صورت می گرفت. ابتدا به کمک محلول رقیق کننده و میکروپلیت های V شکل (ساخت شرکت DYNATECH) رقت های مورد نیاز از پلاسما بیمار تهیه شد و پس از افزودن آنتی ژن در رقت های ۳۲۰۰: ۱ و ۸۰۰: ۱ میکروپلیت ها 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 حفره ای که آنتی ژن ریخته شده بود انگلها بصورت یک دگمه کوچک آبی رنگ با حاشیه کاملاً مشخص جمع شده و در وسط حفره میکروپلیت ته نشین شده بودند دال بر عدم وجود آگلوتیناسیون و نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانیا منفی بحساب می آمد. اگر انگلها بحالت کلوئیدی ابری شکل آبی رنگ یکنواخت در تمام

### تست الیزا (ELISA)

در این بررسی، آنتی ژن مصرفی پلیت‌های پوشانده شده با آنتی ژن فیگوره فرم پروماستیگوت لیثمانیا اینفانتوم بود [۱۱]. ابتدا رقت مورد نیاز از نمونه، کنترل مثبت و کنترل منفی به کمک PBS (Phosphate Buffered Saline) حاوی Tween 20 تهیه و به یکی از حفره‌های میکروپلیت ته صاف ELISA (ساخت شرکت NUNC) به مقدار لازم اضافه می‌شد. در حفره بلانک فقط PBS (Phosphate Buffered Saline) حاوی Tween 20 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 (۱:۱۰۰۰) برای هر حفره اضافه و دوباره مراحل انکوباسیون و شستشو انجام می‌شد. سپس سوبسترای PNP (P-Nitrophenyl Phosphate) رقیق شده با بفر 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 حفرات اضافه شده و نتایج به کمک دستگاه ELISA-reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند [۱۲].

### یافته ها

در این مطالعه تعداد ۱۱۵۵ نمونه سرم از گروه‌های سنی مختلف تهیه شد که با روش‌های سرولوژی IFAT، DAT و ELISA در آزمایشگاه لیثمانیوز واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به همراه سرم کنترل‌های مثبت و منفی آن مرکز مورد آزمایش قرار گرفتند.

جهت ارزیابی نتایج سه روش IFAT، DAT و ELISA از جداول توافقی استفاده گردید (جدول یک، دو و سه).

در تست DA کلاً ۳۲ نفر (۲/۸٪) با تیتراژ  $\geq 1:800$  بودند. از این تعداد یک نفر با تیتراژ  $1:102400$ ، یک نفر با تیتراژ  $1:6400$ ، ۵ نفر با تیتراژ  $1:3200$  و ۲۵ نفر با

مایع موجود در حفره پراکنده شده یا به اصطلاح آگلوتینه شده بودند نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیثمانیا مثبت محسوب می‌گردید. 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 [۸].

### تست ایمنوفلورسانس غیرمستقیم (IFAT)

آنتی ژن فیگوره این تست در آزمایشگاه لیثمانیوز واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به روش دکتر ادیسیان و همکاران تهیه گردید [۹]. ابتدا به کمک PBS (Phosphate Buffered Saline) با  $pH = 7.2$  رقت‌های لازم از نمونه‌های مورد آزمایش و کنترل مثبت و منفی تهیه شدند. لامهای حاوی آنتی ژن کت شده از فریزر  $70^{\circ}C$  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 (Phosphate Buffered Saline)، 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 فلورسانس بررسی شدند [۱۰]. عیارهای  $1:160 \geq$  از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیثمانیا مثبت، عیارهای  $1:80$  مشکوک و عیارهای  $1:40 <$  منفی تلقی شدند.

در تست DA تیتراژ ۱:۸۰۰ داشته و یک مورد که در تست الیزا منفی ولی در تست DA با تیتراژ ۱:۳۲۰۰ بوده است، در بقیه موارد این دو تست کاملاً همخوانی داشته‌اند (جدول ۲). همچنین به غیر از یک مورد که در تست IFA تیتراژ ۱:۳۲۰ ولی در تست ELISA منفی و سه مورد که در تست ELISA مثبت ولی در تست IFA تیتراژ ۱:۴۰ را نشان داده است در بقیه موارد این دو تست نیز کاملاً همخوانی داشته‌اند (جدول ۳). در این بررسی با استفاده از نرم افزار SPSS 9 اختلاف معنی داری بین جنس مذکر (۲/۷٪) و مؤنث (۲/۸٪) در ابتلاء به لیشرمانیوز احشایی مشاهده نشد ( $P = ۰/۸$ ) و موارد عفونت ناشی از فرم احشایی لیشرمانیا در کودکان زیر ۴ سال بیشتر بود ( $P < ۰/۰۵$ ).

### بحث

در تشخیص بیماریهای انگلی قطعی‌ترین روش بر پایه مشاهده انگل استوار است. در بیماری لیشرمانیوز احشایی نیز روش تشخیص قطعی مشاهده آماستیگوتها در بیوپسی یا آسپیره تهیه شده از ارگانهای احشایی از

تیتراژ ۱:۸۰۰ بوده‌اند. بنابراین در تست DA از مجموع ۱۱۵۵ نمونه اخذ شده ۷ مورد (۰/۶٪) با عیار ۱:۳۲۰۰ و بالاتر بودند.

در تست IFA نیز ۳۲ نفر (۲/۸٪) با تیتراژ ۱:۴۰  $\geq$  که از بین این افراد یک نفر با تیتراژ ۱:۱۰۲۴۰، یک نفر با تیتراژ ۱:۶۴۰، چهار نفر با تیتراژ ۱:۳۲۰، و ۲۶ نفر با تیتراژ ۱:۴۰ در تست IFA بودند. به غیر از یک مورد که در تست IFA تیتراژ ۱:۳۲۰ ولی در تست DA تیتراژ ۱:۸۰۰ و دو مورد که در تست DA تیتراژ ۱:۳۲۰۰ ولی در تست IFA تیتراژ ۱:۴۰ را نشان داده است در بقیه موارد این دو تست کاملاً همخوانی داشته‌اند (جدول ۱). لازم به ذکر است که بر اساس محاسبات انجام شده (Geometric Mean of Reciprocal Titers) GMRT برای تست DA در این بررسی ۱۲۳۰ و برای تست IFA ۵۸ به دست آمد. بالاترین GMRT مربوط به گروه سنی زیر یکسال و کمترین آن مربوط به گروه سنی ۱۲ سال و بالاتر می باشد.

در تست ELISA ۸ نمونه مثبت و بقیه منفی شدند. به غیر از دو مورد که در تست الیزا مثبت ولی

جدول ۱. جدول دویبعدی (توافقی) از فراوانی آنتی بادی لیشرمانیا در روش های DAT و IFAT

DAT IFAT	< ۱:۸۰۰	۱:۸۰۰	۱:۳۲۰۰	$\geq ۱:۶۴۰۰$	جمع
$\leq ۱:۱۰$	۱۱۲۳	۱	-	-	۱۱۲۴
۱:۲۰	-	۱۵	-	-	۵
۱:۴۰	-	۱۸	۲	-	۲۰
۱:۳۲۰	-	۱	۳	-	۴
$\geq ۱:۶۴۰$	-	-	-	۲	۲
جمع	۱۱۲۳	۲۵	۵	۲	۱۱۵۵

جدول ۲. جدول دویبعدی (توافقی) از فراوانی آنتی بادی لیشرمانیا در روش های DAT و ELLSA

DAT ELLSA	< ۱:۸۰۰	۱:۸۰۰	۱:۳۲۰۰	$\geq ۱:۶۴۰۰$	جمع
-	۱۱۲۳	۲۳	۱	-	۱۱۴۷
+	-	۲	۴	۲	۸
جمع	۱۱۲۳	۲۵	۵	۲	۱۱۵۵

جدول ۳. جدول دویبعدی (توافقی) از فراوانی آنتی بادی لیشرمانیا در روش های IFAT و ELLSA

IFAT ELLSA	$\leq ۱:۱۰$	۱:۲۰	۱:۴۰	۱:۳۲۰	$\geq ۱:۶۴۰$	جمع
-	۱۱۲۴	۵	۱۷	۱	-	۱۱۴۷
+	-	-	۳	۳	۲	۸
جمع	۱۱۲۴	۵	۲۰	۴	۲	۱۱۵۵

۹۲٪ و اعتبار این تست ۸۵/۴٪ می باشد. همچنین حساسیت تست IFA ۶۲/۵٪، ویژگی آن ۹۵/۶٪، قدرت پیشگویی مثبت ۸۳/۳٪، قدرت پیشگویی منفی ۸۸٪ و اعتبار تست IFA ۷۹٪ محاسبه گردید.

در مطالعه ای که توسط هریت و همکاران با روش DAT انجام شد، ویژگی و حساسیت به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۸/۹٪ گزارش گردید که حساسیت بالا شاید به خاطر انجام تغییراتی در روش DAT و خصوصاً رقت و یا غلظت آنتی ژن مورد نظر بوده است [۱۵]. همچنین مطالعات مختلف انجام شده در ایران ویژگی ۱۰۰-۷۲٪ و حساسیت ۱۰۰-۹۲٪ را برای روش DAT نشان داده است [۱۶].

با در نظر گرفتن تست DA به عنوان تست مبنا، حساسیت تست IFA برابر ۷۱/۴٪، ویژگی آن ۹۶٪، قدرت پیشگویی مثبت ۸۳/۴٪، قدرت پیشگویی منفی ۹۲/۳٪ و اعتبار این تست ۸۳/۷٪ می باشد. همچنین حساسیت تست ELISA برابر ۸۵/۷٪، ویژگی آن ۹۲٪، قدرت پیشگویی مثبت ۷۵٪، قدرت پیشگویی منفی ۹۵/۸٪ و اعتبار تست الیزا ۸۸/۸۵٪ محاسبه گردید.

بر اساس مطالعات مختلف انجام شده در ایران حساسیت و ویژگی های مختلفی برای تست های IFAT و ELISA ذکر گردیده است [۱۴، ۱۱]. طبق این مطالعات در مواردی واکنش متقاطع آنتی ژن لیشمانیا در هر دو تست IFAT و ELISA با بعضی از بیماریهای عفونی دیگر مانند مالاریا، تیفوئید و آبسه کبدی با عبارهای پائین وجود دارد ولی در لیشمانیوز احشایی معمولاً عیار پادتن لیشمانیا در اکثر موارد به اندازه کافی بالا است و در موارد نادری ممکن است واکنش متقاطع در تشخیص سرولوژی کالاآزار با تست های فوق الذکر ایجاد اشکال نماید [۳]. از آنجا که کالاآزار در ایران معمولاً در مناطق روستایی و دور افتاده ای شیوع دارد که فاقد امکانات لازم برای تشخیص آزمایشگاهی به روش های انگل شناسی یا سرولوژی اختصاصی IFAT و ELISA هستند، لذا سعی شده است که از یک روش سرولوژی قابل اعتماد که انجام آن در چنین مناطقی عملی باشد مثل روش آگلوتیناسیون مستقیم

جمله طحال، کبد، غدد لنفاوی و مغز استخوان می باشد. اما تمام این روشها تهاجمی بوده و بنابراین از نظر عملی فقط در موارد خاص کلینیکی و در شرایطی که از تمام روشهای دیگر نتیجه مطلوب به دست نیاید بهتر است از این روشها کمک گرفته شود. از طرف دیگر این روشها علاوه بر خطرانی که برای بیماران، به خصوص کودکان مبتلا در پی دارند از حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به روشهای سرولوژیک نیز برخوردار نمی باشند در مقایسه با این روشهای تهاجمی و خطرناک به نظر می رسد که روشهای سرولوژیک می توانند جایگزین مناسبی باشند [۱۳، ۱۴].

در مطالعات مختلف از آزمون های سرولوژیکی اختصاصی در تشخیص لیشمانیوز احشایی نظیر IFAT و ELISA با نتایج مطلوب استفاده شده است، اما روشهای مذکور هر کدام به نحوی به دستگاهها و وسایل تخصصی و گرانبه نیاز دارند و کار با آنها باید توسط افراد باتجربه انجام شود که اصولاً در مناطق آندمیک کالاآزار عملی نمی باشد [۱۴، ۱۱]. بنابراین در این مطالعه سعی شد روش سرولوژی DAT که یک روش ساده و اقتصادی در تشخیص لیشمانیوز احشایی می باشد مورد ارزیابی و مقایسه با روش های IFAT و ELISA قرار گیرد. لازم به ذکر است که به دلیل محدودیت های پژوهشی موجود در این بررسی تست خاصی به عنوان روش استاندارد طلایی مورد استفاده قرار نگرفته و فقط نتایج حاصله از هر سه روش مذکور با همدیگر مقایسه شدند.

با در نظر گرفتن تست IFA به عنوان تست مبنا، حساسیت تست DA برابر ۸۳/۴٪، ویژگی آن ۹۲/۳٪، قدرت پیشگویی مثبت ۷۱/۴٪، قدرت پیشگویی منفی ۹۶٪ و اعتبار تست DAT ۸۷/۸۵٪ می باشد. همچنین حساسیت تست ELISA برابر ۸۳/۴٪، ویژگی آن ۹۲٪، قدرت پیشگویی مثبت ۶۲/۵٪، قدرت پیشگویی منفی ۹۲٪ و اعتبار آن ۸۷/۷٪ محاسبه شد.

با در نظر گرفتن تست ELISA به عنوان تست مبنا، حساسیت تست DAT برابر ۷۵٪، ویژگی آن ۹۵/۸٪، قدرت پیشگویی مثبت ۸۵/۷٪، قدرت پیشگویی منفی

### تقدیر و تشکر

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 می‌دانیم که از راهنمایی‌های ارزشمند استاد محترم جناب آقای دکتر ادیسیان تشکر و قدردانی نمایم. همچنین از زحمات آقایان دکتر حسینقلی زاده مدیریت محترم شبکه بهداشت و درمان شهرستان گرمی، دکتر پورزارع مسئول محترم مرکز مبارزه با بیماری‌های شهرستان گرمی، دکتر علوی ریاست محترم بیمارستان گرمی، خانمها دکتر حجاران، آخوندی، چاره دار، مهاجری و گروهی 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 می‌گردد.

(DAT) که به وسیله هریث (Harith) و همکارانش برای تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی پیشنهاد گردید استفاده شود [۳، ۱۵].

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که هر چند آزمون‌های IFA و ELISA جهت تشخیص بیماران مبتلا به کالآزار از کارایی خوبی برخوردارند ولی نیازمند آزمایشگاه مجهز و پرسنل ورزیده می‌باشند در صورتی که DAT یک روش ساده، ارزان، بدون نیاز به تجهیزات پیچیده و قابل اجرا در مناطق آندمیک برای تشخیص لیشمانیوز احشایی و مطالعات سرواپیدمیولوژی بوده و می‌تواند جایگزین مطمئنی برای روش‌های پرهزینه IFAT و ELISA باشد.

### References

- 1- Pearson RD. Leishmania Species, Visceral Kala-azar, In: Mandell GL, Doug Las RG, Bennet JE(Eds), Principles and practice of infectious diseases, 5<sup>th</sup> ed, New york, Churchill Livingstone, 2005: 2068-71.
- 2- Nadim A, Navid-Hamidi A, Javadian E, Bidruni GT, Amini H. Present status of kala-azar in Iran. Am J Trop Med Hygi. 1978; 27: 25-8.
- ۳- ادیسیان غلامحسین. لیشمانیوز احشایی در ایران و نقش تست‌های سروولوژی در تشخیص و بررسی اپیدمیولوژی آن. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره سوم، شماره ۲، ۱۳۷۵، صفحات ۹۷ تا ۱۰۸.
- 4- Sinha R, Sehgal S. Comparative evaluation of serological tests in India . J Trop Med Hygiene. 1994; 97: 333-40.
- 5- Sendali G, Xiao-su H, Hoessli DC, Bordior C. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a leishmania donovani related circulating antigen. J Immunol Methods. 2001; 193: 9-15.
- ۶- محامی محمود، محبعلی مهدی، کشاورز حسین، حجاران هما، آخوندی بهناز، زارعی ذبیح الله، چاره دار سرور. بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی (کالآزار) در شهرستان گرمی از استان اردبیل. مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره چهارم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۴، صفحات ۴۵ تا ۵۵.
- 7- Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, Van Knapen F, De Korte P, Huigen E, et al. Application of a direct-agglutination test for detection of specific anti - leishmania antibodies in the canine reservoir, J Clin Microbiol. 1989; 27: 2252-7.
- 8- Edrissian GhH, Ahanchin AR, Gharachahi A, Ghorbani M, Nadim A, Ardehali S. Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars province, southern Iran. Irn J Med Sci. 1993; 18: 99-105.
- 9- Edrissian GhH, Akhavan E, Samar G. Immunofluorescence as a method of choice in diagnosis of visceral leishmaniasis. J Irn Med Council. 1977; 3: 185-90.

- 10- Voller A, Oneill P. Immuno-fluorescence method suitable for larg-scale application to malaria. *Bull World Health Org.* 1971; 45(4): 524-9.
- 11- Khorshidian S, Hajjaran H, Sarkissian MT, Edrissian GhH. Evaluation of ELISA, using intact promastigotes as antigen, for the diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Irn J Med Sci.* 1994; 19: 15-8.
- 12- Desjeux P. Manual on visceral leishmaniasis control. WHO. 1996 ; 40 : 1-79.
- 13- Zijlstra EE, Ali MS, El-hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar a comparative study of parasitological methods and direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992; 86(5): 505-7.
- ۱۴- درستکار مقدم داود، حجازی سید حسین، قاسمی مهدی. ارزیابی و مقایسه روش های سرولوژیکی ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم (IFAT) و آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) با استفاده از آنتی ژن استاندارد شده در تشخیص لیشمانیوز احشایی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. دوره پانزدهم، شماره ۴۹، آذر و دی سال ۱۳۸۴، صفحات ۱ تا ۸.
- 15- Harith A, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyge.* 1986; 80: 583-7.
- 16- Mohebalı M, Edrissian GhH, Nadim A, Hajjaran H, Akhoundi B, Hooshmand B, et al. Application of direct agglutination test (DAT) for the diagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis in Iran. *Iranian J Parasitol.* 2006; 1(1): 15-25