

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

مهرداد قاسمی (M.Sc.)

سید حسین حجازی (Ph.D.)

داود درستکار مقدم (Ph.D.)⁺

چکیده

سابقه و هدف: لیشمانیوز احشایی انسانی (HVL) در استان‌های فارس و اردبیل به صورت آندمیک و در سایر مناطق کشور به شکل تک گیر (Sporadic) گزارش شده است. لیشمانیوز احشایی در ایران از نوع مدیرانه‌ای و عامل آن لیشمانا اینفانتوم (L.infantum) و مخزن آن سگ می‌باشد. این بیماری در ایران بیشتر بچه‌ها را مبتلا می‌کند و در صورت عدم تشخیص زود هنگام، عوارض خطرناکی را پدید می‌آورد.

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

یافته‌ها: نتایج بدست آمده، در این مطالعه نشان داد که نسبت سرم‌های مثبت (SPR) در روش DAT در تراز‌های ۱:۳۲۰۰ و بالاتر، ۹۱/۴ درصد و در روش IFAT در تراز‌های ۱:۸۰ و بالاتر، ۹۴/۳ درصد می‌باشد. برای روش DAT (GMRT) Geometric means of reciprocal titer برابر ۶۳۰۹ و در روش IFAT برابر ۳۱۶ بود. نتایج بدست آمده در هر دو روش، تراز ۱:۳۲۰۰ روش DAT ارزشی معادل تراز ۱:۸۰ روش IFAT می‌باشد.

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

واژه‌های کلیدی: آنتی ژن - لیشمانیوز احشایی، آگلوتیناسیون مستقیم، ایمونوفلورسانس غیر مستقیم.

* متخصص گروه انگل شناسی و قارچ شناسی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان + اصفهان: خیابان هزار جریب - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان - دانشکده پزشکی

** کارشناس ارشد انگل شناسی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۳۸۳/۹/۱۷ E تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۸۱/۱۱/۶

تاریخ تصویب: ۱۳۸۴/۴/۲۹

مقدمه

مزمن کبدی، بیماری‌های بدخیم یا خود اینمنی مشاهده شده است (۱۰).

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

مواد و روش ها

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

آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT)

الف) تهیه آنتی ژن DAT

جهت تهیه آنتی ژن، پروماستیگوت های L.infantum (MHO/TN/80/IPTi) مورد استفاده قرار گرفت. بدین صورت که ابتدا سویه مذکور را در محیط N.N.N کشت داده و جهت انبوه سازی انگل از محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI استفاده شد و برای تهیه آنتی ژن به طریق زیر عمل شد:

- ۱- پروماستیگوت ها با دور ۴۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه با سانتریفیوژ جدا شد.
- ۲- رسوب به دست آمده، پنج بار در محلول Locke سرد شست و شو داده شده و با دور ۳۲۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

لیشمانیوza به طیفی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که عامل آن گونه‌های مختلف لیشمانیa Leishmania می‌باشد. این بیماری در شمار بیماری‌های مشترک انسان و حیوان قرار داشته و بسته به گونه انگل به اشکال مختلف بالینی از جمله ضایعات پوستی، پوستی- مخاطی، جلدی منتشره و احشایی بروز می‌کند (۱،۲).

لیشمانیوza احشایی یک عفونت سیستمیک با علایم تب، کاهش وزن، بزرگ شدن طحال و کبد، کم خونی با کاهش تمام عناصر سلولی به ویژه گلوبول‌های سفید و افزایش گاماگلوبولین‌های خون می‌باشد (۶). این بیماری در مناطق وسیعی از جهان گزارش شده است و در ۴۷ کشور دنیا به صورت آندمیک وجود دارد (۳،۴،۵).

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

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

روش‌های سرولوژیکی متعددی از جمله IFAT,ELISA,CF,CIEP,aldehyde test بیماری کالاآزار در مناطق آندمیک و بررسی سروپیدمیولوژی لیشمانیوza احشایی در انسان و مخازن حیوانی استفاده شده است، ولی این روش‌ها هر کدام دارای مزایا و معایبی هستند (۸ و ۹)، مثلاً با وجود این که روش CIEP (Counter-immunoelectrophoresis) یک آزمون با ارزش برای تشخیص کالاآزار می‌باشد، واکنش مثبت کاذب در مواردی همانند بیماری‌های

گردید و پس از افزودن آنتی ژن به رقت های مختلف، میکروپلیت را در یک اطاکچ مرطوب قرار داده و بعد از ۲۰ ساعت نتایج قرائت می گردید.

چنان چه انگل ها به صورت تکمیلی در وسط حفره جمع باشد دلیل بر عدم آگلوتیناسیون و نتیجه از نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانا منفی محسوب می گردد، ولی در صورتی که انگل ها به صورت ابری شکل ویا به صورت آبی رنگ یکنواخت در تمام مایع در حفره پراکنده گردد و به اصطلاح آگلوتینه شده باشند، نتیجه مثبت محسوب می گردد.

روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFAT) الف) تهیه آنتی ژن

برای تهیه آنتی ژن، از پروماستیگوت های L.infantum استفاده گردید. بدین صورت که پس از کشت سویه مذکور در محیط N.N. RPMI 1640 و تکثیر در محیط P.B.S شست و شو داده شده و سوسپانسیون با فسفات بافرسالین P.B.S ۱۰^۸ انگل در میلی لیتر سوسپانسیون تهیه شد و مقدار تهیه گردید. بعد از رسوب نهایی در P.B.S به میزان ۵ میکرو لیتر از این سوسپانسیون، در هر حفره لام های ۵ مخصوص میکروسکوپ IFAT انتقال داده شد و پس از خشک شدن لام ها، تا زمان انجام آزمایش در -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ب) روشن انجام آزمون

- ابتدا لام های حاوی آنتی ژن coat شده از فریزر -۲۰ سانتی گراد خارج شده و درون دیسکاتور گذاشته شد تا به حرارت آزمایشگاه برسد.

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

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

۴- محلول به خوبی مخلوط شد تا پروماستیگوت ها به صورت سوسپانسیون درآمده و سپس در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد.

۵- محلول حاصل با دور ۳۲۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس همانند مرحله دوم، پنج بار با محلول Locke شست و شو داده شد.

۶- رسوب حاصل در محلول Locke سرد به غلظت تقریبی ۱۰^۸ سلول در میلی لیتر رسانده شد.

۷- مقدار حجم مساوی از فرمالدئید دو درصد به محلول Locke اضافه شده و به مدت یک شب در حرارت ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۸- محلول حاصل با دور ۳۲۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب به دست آمده، با سالین سیترات سرد شست و شو داده شد.

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

۱۰- پس از خالی کردن لایه رویی (supernatante) با استفاده از محلول نگهدارنده (سالین سیترات حاوی ۴٪ درصد فرمالدئید) سوسپانسیون یکنواختی تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور از نور تا زمان انجام آزمایش نگهداری گردید.

ب - روشن انجام آزمایش DAT
در این روشن از میکرو پلیت های ۷ شکل استفاده گردید. ابتدا رقت های مورد نیاز از سرم بیمار تهیه

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

در روش IFAT از ۳۵ نمونه مبتلا به کالا آزار ۳۳ نمونه (۹۴/۳ درصد) دارای تراز ۱/۸۰ و بالاتر و ۲ نمونه (۷/۵ درصد) دارای تراز ۱/۴۰ بودند، ولی در سایر نمونه های شاهد، پاسخ مثبتی مشاهده نشد. بنابراین در این روش ویژگی ۱۰۰ درصد به دست آمد.

بیشترین تراز آنتی بادی مثبت در گروه سنی ۱-۵ سال و کمترین آن در گروه سنی ۱۵ سال و بالاتر بودند و بالاترین میزان GMRT در گروه سنی ۱-۵ سال برابر با ۶۹۰ و کمترین آن در گروه سنی ۱۵ سال برابر با ۳۱۶ به دست آمد (جدول شماره ۱).

در روش DAT از ۳۵ نمونه مبتلا به بیماری کالا آزار ۳۲ نمونه (۹۱/۴ درصد) دارای تراز آنتی بادی ۱/۳۲۰۰ و بالاتر و ۳ نمونه (۴/۴ درصد) دارای تراز ۱/۸۰ بودند. در صورتی که در سایر نمونه های شاهد، هیچ گونه تغییری در آن ها مشاهده نگردید. بنابراین ویژگی در این روش ۱۰۰ درصد به دست آمد.

هم چنین بیشترین موارد تراز مثبت در گروه سنی ۱-۵ سال و کمترین آن در گروه سنی بالاتر از ۱۵ سال به دست آمد، بالاترین میزان GMRT در این روش در گروه سنی ۱-۵ سال (۳۱۰۲۲) و کمترین مقدار آن در گروه سنی ۱۵ سال و بالاتر (۶۳۰۹) به دست آمد (جدول شماره ۲).

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

بعد از آنکوباسیون، لام ها ۳ مرتبه و به مدت ۵ دقیقه با P.B.S شسته شد. و مقدار ۵ میکرولیتر آنتی هیوم

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

یافته ها

در این مطالعه ۷۰ نمونه سرم شامل ۳۵ نمونه از سرم افراد مبتلا به کالا آزار و ۳۵ نمونه سرم شاهد با دو روش سرولوژیکی IFAT و DAT مورد آزمایش قرار گرفت. از مجموع ۳۵ نمونه افراد مبتلا به بیماری کالا آزار نمونه مذکور (۹۴/۳ درصد) و ۱۶ نمونه مؤنث (۷/۵) درصد) بوده اند. همچنین تعداد ۲۷ نفر (۷/۷ درصد) در گروه سنی ۱-۹ و ۸ نفر (۹/۲۲ درصد) در گروه سنی بالاتر از ۱۰ سال قرار داشتند.

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی تراز آنتی بادی لیشماییا در روش IFAT بر حسب سن

سن	فراوانی	جمع افراد					
		۱-۱۰	۱۱-۱۴	۱۵ سال و بالاتر	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
۱/۴۰	۱/۴۰	۲(۱/۱)	۰(-)	۰(-)	۲(۱۱/۷)	۰(-)	۰(-)
۱/۸۰	۱/۸۰	۰(-)	۱(۱/۱)	۱(۲۵)	۱(۹۵/۷)	۰(-)	۱(۲۵)
۱/۱۶۰	۱/۱۶۰	۰(-)	۰(-)	۱(۲۵)	۱(۵/۷)	۰(-)	۱(۲۵)
۱/۳۲۰	۱/۳۲۰	۳(۱۷/۶)	۲(۲۲/۲)	۲(۵۰)	۷(۲۰)	۲(۵۰)	۰(-)
۱/۶۴۰	۱/۶۴۰	۳(۱۷/۶)	۵(۵۵/۵)	۰(-)	۹(۲۵/۷)	۱(۲۵)	۱(۲۵)



۱۰(۲۸/۶)	۱(۲۵)	۱(۲۵)	۱(۱۱/۱)	۷(۳۸/۸)	۱/۱۲۸۰
۲(۸/۶)	·(-)	·(-)	·(-)	۳(۱۶/۶)	۱/۲۵۶۰
۳۵(۱۰۰)	۴(۱۱/۴)	۴(۱۱/۴)	۹(۲۵/۷)	۱۸(۵۱/۴)	جمع افراد (درصد)
	۳۱۶			۶۹۰	GMRT

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی تراز آنتی بادی لیشماینیا در روش DAT بر حسب سن

سن	فراوانی	جمع افراد				
		۱-۵	۶-۱۰	۱۱-۱۴	۱۵ سال و بالاتر	تعداد (درصد)
۱/۸۰۰	از آنتی بادی	۲(۱۱/۱)	۰(-)	۰(-)	۱(۲۵)	۳(۸/۶)
۱/۱۶۰۰	از آنتی بادی	۰(-)	۰(-)	۰(-)	۰(-)	۰(-)
۱/۳۲۰۰	از آنتی بادی	۰-	۱(۱۱/۱)	۰(-)	۱(۲۵)	۲(۵/۷)
۱/۶۴۰۰	از آنتی بادی	۲(۱۱/۱)	۱(۱۱/۱)	۲(۵۰)	۰(-)	۵(۱۴/۲)
۱/۱۲۸۰۰	از آنتی بادی	۲(۱۱/۱)	۴(۴۴/۴)	۱(۲۵)	۱(۲۵)	۸(۲۲/۹)
۱/۲۵۶۰۰	از آنتی بادی	۱(۵/۶)	۱(۱۱/۱)	۰(-)	۰(-)	۲(۵/۷)
۱/۵۱۲۰۰	از آنتی بادی	۱(۵/۶)	۲(۲۲/۲)	۰(-)	۱(۲۵)	۴(۱۱/۴)
۱/۱۰۲۴۰۰	از آنتی بادی	۱۰(۵/۶)	۰(-)	۱(۲۵)	۰(-)	۱۱(۳۱/۴)
جمع افراد (درصد)		۱۸(۵۱/۴)	۹ (۲۵/۷)	۴(۱۱/۳)	۴ (۱۱/۲)	۳۵(۱۰۰)
GMRT		۳۱۰۲۲	۶۳۰۹			

که به طور معمول برای انجام چنین آزمایش‌هایی امکانات کافی وجود ندارد، همیشه یک روش عملی و قابل اجرا نمی‌باشد. به علاوه، انگل همیشه در آزمایش‌های میکروسکوپی نظری گسترش مغز استخوان و یا حتی طحال بعضی از مبتلایان کالا آزار یافت نمی‌شود؛ به طوری که در مناطق آندمیک کالا آزار اردیل تنها در ۶۹ درصد گسترش تهیه شده مغز استخوان بیماران مشکوک به کالا آزار که از نظر بالینی با روش DAT سرم مثبت بودند، آماتیگوت دیده شده است (۱۱). هم‌چنین از آزمون‌های سرولوژیکی اختصاصی در تشخیص لیشماینیوز احشایی نظری IFAT، ELISA با نتایج مطلوب استفاده شده است، اما کاربرد چنین روش‌های سرولوژی، نیاز به آزمایشگاه مجهز و تکنیسین‌های ماهر دارد که اصولاً در مناطق آندمیک کالا آزار که عمدهاً مناطق روستایی می‌باشند، عملی نمی‌باشد (۱۲).

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

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

جدول شماره ۳: جدول دو بعدی (توافقی) از فراوانی آنتی بادی لیشماینیا در روش‌های DAT و IFAT بر مبنای تراز مثبت

IFAT		
	-	+
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
۳۲(۹۱/۵)	۰(.)	۳۲(۹۱/۵)
۳(۷/۵)	۲(۱۰۰)	۱(۳)
۳۵(۱۰۰)	۲(۱۰۰)	۳۳(۱۰۰)
		جمع

بحث

روش‌های انگل‌شناسی جهت تشخیص آزمایشگاهی لیشماینیوز احشایی خصوصاً در برخی از مناطق آندمیک بیماری (منطق روستایی) در کشورهای در حال توسعه

در مطالعه‌ای توسط ایکبال^۲ و همکاران(۲۰۰۱) با روش IFAT جهت تشخیص مبتلایان به کالا آزار انجام شد، ویژگی ۱۰۰ درصد و حساسیت ۹۳ درصد را نشان داد(۱۷) که این نیز مؤید نتایج حاصله از این مطالعه می‌باشد.

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

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

هم‌چنین مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۶ در کشور ایتالیا توسط نیگرو^۳ و همکاران(۱۹۹۶) بر روی ۱۰۰ نفر از مبتلایان به کالا آزار انجام شد، نشان دهنده این است که هر دو روش DAT و IFAT از لحاظ ویژگی (Specificity) مشابه ولی آزمون IFAT از حساسیت بیش تری برخوردار می‌باشد(۱۴) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم خوانی دارد.

سایر مطالعات سرولوژی انجام شده بر روی بیماران کالا آزار مناطق آندمیک کشور، یانگر این است که بیشترین موارد لیشمانیوز احتشایی در این مناطق در بچه‌ها دیده می‌شود(۱۵).

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

در این مطالعه مجموعاً ۷۰ نمونه سرم (۳۵ مورد مبتلا به کالا آزار و ۳۵ نمونه سرم شاهد) مورد استفاده قرار گرفت. در مقایسه روش DAT و روش IFAT در تشخیص لیشمانیوز احتشایی، Sero positive rate(SPR)،

با روش IFAT بالاتر از SPR با روش DAT بود و ضریب همبستگی هر دو روش ۹۲ درصد به دست آمد. به نظر می‌رسد که روش IFAT، تمام موارد در معرض بیماری، اعم از آن‌هایی که عالیم بالینی دارند و یا عالیم بالینی ندارند را می‌تواند تشخیص دهد؛ در صورتی که با روش DAT زمانی که عفونت وجود دارد، نتیجه مثبت می‌شود. به علاوه در عفونت‌های غیر کالا آزاری، واکنش متقاطع با آنتی ژن لیشمانیا در IFAT بیشتر از DAT که خیلی اختصاصی است، دیده می‌شود(۱۶).

در بررسی با روش DAT نسبت سرم‌های مثبت (SPR) از ۳۵ نمونه بیمار کالا آزار، ۳۲ نمونه دارای تراز ۱:۳۲۰۰ و بالاتر و سه نمونه دارای تراز ۱:۸۰۰ هم‌چنین میزان GMRT برابر ۶۳۰۹ به دست آمد. تمام نمونه‌های سرم شاهد با این روش، واکنش منفی نشان دادند لذا با توجه به نتایج به دست آمده ویژگی ۱۰۰ درصد و حساسیت ۹۱/۴ درصد به دست آمد. در مطالعه‌ای که توسط هریت^۱ و همکاران(۱۹۸۶) با روش DAT انجام شد، ویژگی و حساسیت به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۸/۹ درصد گزارش گردید. حساسیت بالا شاید به خاطر انجام تغییراتی در روش DAT و خصوصاً رقت و یا غلظت آنتی ژن مورد نظر بوده است(۱۳).

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

2. Iqbal
3. Nigro

1. Harith

و یا بالاتر می باشد مورد خوبی برای درمان اختصاصی این بیماری است.

دست آمده به نظر می رسد که در مناطق آندمیک کالا آزار، علایم بالینی لیشماینیوز احشایی خصوصاً در بین ۱۳۲۰۰ بچه هایی که تراز آنتی بادی آنها با روش DAT،

فهرست منابع

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

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