

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

مهدی قاسمی (M.Sc.)***

سید حسین حجازی (Ph.D.)**

داود درستکار مقدم (Ph.D.)*

چکیده

سابقه و هدف: لیشرمانیوز احشایی انسانی (HVL) در استان‌های فارس و اردبیل به صورت آندمیک و در سایر مناطق کشور به شکل تک‌گیر (Sporadic) گزارش شده است. لیشرمانیوز احشایی در ایران از نوع مدیترانه‌ای و عامل آن لیشرمانیا 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 لیشرمانیا در محیط‌های کشت N.N.N و RPMI1640 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 به‌دست آمده، در این مطالعه نشان داد که نسبت سرم‌های مثبت (SPR) Sero-positive rate 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. Geometric means of reciprocal titer (GMRT) برای روش DAT برابر ۶۳۰۹ و در روش IFAT برابر ۳۱۶ به‌دست آمد. **استنتاج:** با توجه به ترازهای به‌دست آمده در هر دو روش، تراز ۱:۳۲۰۰ روش DAT ارزشی معادل تراز ۱:۸۰ روش IFAT دارد. 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 - لیشرمانیوز احشایی، آگلوتیناسیون مستقیم، ایمونوفلورسانس غیر مستقیم.

* اصفهان: خیابان هزار جریب - دانشگاه علوم پزشکی - دانشکده پزشکی

* متخصص گروه انگل شناسی و قارچ شناسی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

مقدمه

لیشمانیوز به طیفی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که عامل آن گونه‌های مختلف لیشمانیا 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 (۲،۱).

لیشمانیوز احشایی یک عفونت سیستمیک با علائم تب، کاهش وزن، بزرگ شدن طحال و کبد، کم خونی با کاهش تمام عناصر سلولی به ویژه گلبول‌های 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 (۵،۴،۳).

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 (۱۵،۱۱،۷).

از آنجایی که لیشمانیوز 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 برای تشخیص بیماری کالاآزار در مناطق آندمیک و بررسی سروایدمولوژی لیشمانیوز 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 Counter-immunoelectrophoresis (CIEP) یک آزمون با ارزش برای تشخیص کالاآزار می‌باشد، واکنش مثبت کاذب در مواردی همانند بیماری‌های

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

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

مواد و روش‌ها

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، پروماستیگوت‌های 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 RPMI 1640 استفاده شد و برای تهیه آنتی ژن به طریق زیر عمل شد:

- ۱- پروماستیگوت‌ها با دور ۴۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه با سانتریفوژ جدا شد.
- ۲- رسوب به دست آمده، پنج بار در محلول Locke سرد شست و شو داده شده و با دور ۳۲۰g و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد.

گردید و پس از افزودن آنتی ژن به رقت‌های مختلف، میکروپلیت را در یک اتاقک مرطوب قرار داده و بعد از ۲۰ ساعت نتایج قرائت می‌گردید.

چنانچه انگل‌ها به صورت تکه‌ای در وسط حفره جمع باشد دلیل بر عدم آگلوتیناسیون و نتیجه از نظر تشخیص آنتی بادی لیسمانیا منفی محسوب می‌گردد، ولی در صورتی که انگل‌ها به صورت ابری شکل و یا به صورت آبی رنگ یکنواخت در تمام مایع در حفره پراکنده گردد و به اصطلاح آگلوتینه شده باشند، نتیجه مثبت محسوب می‌گردد.

روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFAT)

الف) تهیه آنتی ژن

برای تهیه آنتی ژن، از پروماستیگوت‌های *L. infantum* استفاده گردید. بدین صورت که پس از کشت سویه مذکور در محیط N.N.N و تکثیر در محیط RPMI 1640 پروماستیگوت‌های جمع آوری شده، سه مرتبه با فسفات بافرسالین P.B.S شست و شو داده شده و سوسپانسیون تهیه گردید. بعد از رسوب نهایی در P.B.S به میزان 5×10^8 انگل در میلی لیتر سوسپانسیون تهیه شد و مقدار ۵ میکرو لیتر از این سوسپانسیون، در هر حفره لام‌های مخصوص میکروسکوپ IFAT انتقال داده شد و پس از خشک شدن لام‌ها، تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ب) روش انجام آزمون

ابتدا لام‌های حاوی آنتی ژن coat شده از فریزر ۲۰- سانتیگراد خارج شده و درون دسیکاتور گذاشته شد تا به حرارت آزمایشگاه برسد.

سپس سرم‌های مورد آزمایش، با رقت‌های مختلف تهیه و در مجاورت آنتی ژن بر روی لام ریخته شده و

۳- محلول تریپسین آماده شده به پروماستیگوت‌های متراکم به نسبت یک حجم از پروماستیگوت‌ها به ۲۰ حجم از محلول تریپسین اضافه شد.

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

۵- محلول حاصل با دور $3200g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ 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 2×10^8 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 $3200g$ و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ 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 ۰/۱ درصد به آن اضافه کرده و به مدت ۹۰ دقیقه به همان حال قرار داده، و سپس با دور $3200g$ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ 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 ۰/۴ درصد فرمالدئید) سوسپانسیون یکنواختی تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور از نور تا زمان انجام آزمایش نگهداری گردید.

ب - روش انجام آزمایش DAT

در این روش از میکرو پلیت‌های V شکل استفاده گردید. ابتدا رقت‌های مورد نیاز از سرم بیمار تهیه

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 هیومن

کنژوکه رقیق شده حاوی اوانس بلو به هر حفره، اضافه گردید و مجدداً لام ها، داخل اطاقک مرطوب گذاشته، به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری 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 گلیسرین 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 کالآزار و ۳۵ نمونه سرم شاهد با دو روش سرولوژیکی IFAT و DAT مورد آزمایش قرار گرفت. از مجموع ۳۵ نمونه افراد مبتلا به بیماری کالآزار ۱۹ نمونه مذکر (۵۴/۳ درصد) و ۱۶ نمونه مؤنث (۴۵/۷ درصد) بوده اند. همچنین تعداد ۲۷ نفر (۷۷/۱ درصد) در گروه سنی ۱-۹ و ۸ نفر (۲۲/۹ درصد) در گروه سنی بالاتر از ۱۰ سال قرار داشتند.

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 کالآزار ۳۳ نمونه (۹۴/۳ درصد) دارای تراز ۱/۸۰ و بالاتر و ۲ نمونه (۵/۷ 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 کالآزار ۳۲ نمونه (۹۱/۴ درصد) دارای تراز آنتی بادی ۱/۳۲۰۰ و بالاتر و ۳ نمونه (۸/۴ درصد) دارای تراز ۱/۸۰۰ 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.

همچنین 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).

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

فراوانی	سن	۱-۵	۶-۱۰	۱۱-۱۴	۱۵ سال و بالاتر	جمع افراد
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
۱/۴۰	۲ (۱۱/۱)	۰ (-)	۰ (-)	۰ (-)	۲ (۵/۷)	۲ (۵/۷)
۱/۸۰	۰ (-)	۱ (۱۱/۱)	۰ (-)	۱ (۲۵)	۲ (۵/۷)	۲ (۵/۷)
۱/۱۶۰	۰ (-)	۰ (-)	۰ (-)	۱ (۲۵)	۲ (۵/۷)	۲ (۵/۷)
۱/۳۲۰	۳ (۱۶/۶)	۲ (۲۲/۲)	۲ (۵۰)	۰ (-)	۷ (۲۰)	۷ (۲۰)
۱/۶۴۰	۳ (۱۶/۶)	۵ (۵۵/۵)	۰ (-)	۱ (۲۵)	۹ (۲۵/۷)	۹ (۲۵/۷)

۱۰(۲۸/۶)	۱(۲۵)	۱(۲۵)	۱(۱۱/۱)	۷(۳۸/۸)	۱/۱۲۸۰
۳(۸/۶)	۰(-)	۰(-)	۰(-)	۳(۱۶/۶)	۱/۲۵۶۰
۳۵(۱۰۰)	۴(۱۱/۳)	۴(۱۱/۳)	۹(۲۵/۷)	۱۸(۵۱/۴)	جمع افراد (درصد)
	۳۱۶			۶۹۰	GMRT

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

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

جهت ارزیابی نتایج دو روش مذکور از جدول توافقی استفاده گردید. بر این اساس از مجموع ۳۵ نمونه مبتلا به بیماری کالآزار، 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 دوبعدی (توافقی) از فراوانی آنتی بادی لیشمانیا در روش های DAT و IFAT بر مبنای تراز مثبت

	IFAT		
	+	-	جمع
DAT	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
	۳۲(۹۷)	۰(۰)	۳۲(۹۱/۵)
+	۱(۳)	۲(۱۰۰)	۳(۸/۵)
	جمع	۲(۱۰۰)	۳۵(۱۰۰)

بحث

روش های انگل شناسی جهت تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی خصوصاً در برخی از مناطق آندمیک بیماری (مناطق روستایی) در کشورهای در حال توسعه

که به طور معمول برای انجام چنین آزمایش هایی امکانات کافی وجود ندارد، همیشه یک روش عملی و قابل اجرا نمی باشد. به علاوه، انگل همیشه در آزمایش های میکروسکوپی نظیر گسترش مغز استخوان و یا حتی طحال بعضی از مبتلایان کالآزار یافت نمی شود؛ به طوری که در مناطق آندمیک کالآزار اردبیل تنها در ۶۹ درصد گسترش تهیه شده مغز استخوان بیماران مشکوک به کالآزار که از نظر بالینی با روش DAT سرم مثبت بودند، آماسیگوت دیده شده است (۱۱).

هم چنین از آزمون های سرولوژیکی اختصاصی در تشخیص لیشمانیوز احشایی نظیر ELISA, IFAT با نتایج مطلوب استفاده شده است، اما کاربرد چنین روش های سرولوژی، نیاز به آزمایشگاه مجهز و تکنیسین های ماهر دارد که اصولاً در مناطق آندمیک کالآزار که عمدتاً مناطق روستایی می باشند، عملی نمی باشد (۱۲).

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

در این مطالعه مجموعاً ۷۰ نمونه سرم (۳۵ مورد مبتلا به کالآزار و ۳۵ نمونه سرم شاهد) مورد استفاده قرار گرفت. در مقایسه روش DAT و روش IFAT تشخیص لیشمایوز احشایی، 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 علایم بالینی دارند و یا علایم 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 کالآزاری، واکنش متقاطع با آنتی ژن لیشمایا 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 کالآزار، ۳۲ نمونه دارای تراز ۱:۳۲۰۰ و بالاتر و سه نمونه دارای تراز ۱:۸۰۰ بودند. 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 مطالعه ای که توسط هریث^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.

در مطالعه‌ای توسط ایکبال^۲ و همکاران (۲۰۰۱) با روش IFAT جهت تشخیص مبتلایان به کالآزار 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 تیتراژ ۱:۸۰۰ بودند که هر سه نمونه مربوط به مناطق غیر آندمیک بودند.

در مورد سه نمونه فوق با توجه 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 مطالعه ای که در سال ۱۹۹۶ در کشور ایتالیا توسط نیگرو^۳ و همکاران (۱۹۹۶) بر روی ۱۰۰ نفر از مبتلایان به کالآزار انجام شد، نشان دهنده این است که هر دو روش IFAT و DAT از لحاظ ویژگی (Specificity) مشابه ولی آزمون IFAT از حساسیت بیش‌تری برخوردار می‌باشد (۱۴) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

سایر مطالعات سرولوژی انجام شده بر روی بیماران کالآزار مناطق آندمیک کشور، بیانگر این است که بیش‌ترین موارد لیشمایوز احشایی در این مناطق در بچه‌ها دیده می‌شود (۱۵).

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

2. Iqbal
3. Nigro

1. Harith

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

دست آمده به نظر می‌رسد که در مناطق آندمیک کالا آزار، علایم بالینی لیشمانیوز احشایی خصوصاً در بین بچه‌هایی که تراز آنتی‌بادی آن‌ها با روش DAT، ۱:۳۲۰۰

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. Mahajen 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 and epidemiological studies; in parasitology for the 21st century **CAB international, ozcal 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-enzyme immunoassay for the detection of a leishmania donovani related circulating antigen. **J. immunol. methods**. 2001, (193): 9-15.
9. Sinha. R, Sehgal. S. Compative 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 acetate 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, Sarkissian MT, et al: Evaluation of Elisa using intact promastigotes as antigen for diagnosis of Visceral leishmaniasis. **Irn 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 l, 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.