

Case Series of Visceral Leishmaniasis (kala-azar) in Mazandaran and Golestan Provinces, North of Iran

Shabnam Asfaram¹,
Abdol Sattar Pagheh^{1,2},
Mahdi Fakhar³,
Fatemeh Gheraghali⁴,
Majid Derakhshani niya¹,
Mohammad Sadegh Rezai⁵

¹ PhD Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Parasitology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

⁵ Associate Professor, Infectious Diseases Research Center with focus on Nosocomial Infection, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 20, 2016 ; Accepted December 10, 2016)

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) or kala-azar is a parasitic disease caused by *Leishmania donovani* complex. Evidence suggests that visceral leishmaniasis is prevalent in some areas of Mazandaran and Golestan provinces. This study aimed to investigate the cases and also determining the causative agents of VL in these provinces. In this study, seven VL patients (mean age 1.5 years) admitted to the pediatric departments in Sari Bootali Sina and Gorgan Taleghani hospitals, 2013–2016, were examined. The most common clinical and laboratory findings included prolonged fever, hepatosplenomegaly, anemia, pancytopenia, and hypergammaglobulinemia. Blood and bone marrow (B.M) samples were taken. Direct agglutination test (DAT) and rapid rK39 strip test were used as serologic tests and B.M microscopic slides were checked by species-specific PCR to identify the parasite species. All patients had positive rK39 and DAT tests. Examination of bone marrow smears demonstrated amastigotes of *Leishmania* (*Leishman* bodies) in the samples. The species of *Leishmania* in all B.M smears was *Leishmania infantum*. According to the identification of *L. infantum* as the major agent of VL in Mazandaran and Golestan provinces, increasing physician awareness (especially pediatric specialists) of the disease and conducting control programs in these areas are recommended.

Keywords: Visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, polymerase chain reaction, bone marrow, serology

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(144): 373-381 (Persian).

گزارش مواردی از بیماری لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) در استان های مازندران و گلستان، شمال ایران

شبلم اسفرم^۱
عبدالستار پقه^{۲،۱}
مهدی فخار^۳
فاطمه چراغعلی^۴
مجید درخشانی نیا^۱
محمد صادق رضایی^۵

چکیده

لیشمانیازیس احشایی یا کالاآزار، یک بیماری عفونی و انگلی است که توسط کمپلکس لیشمانیا دونووایی ایجاد می شود. شواهد نشان می دهد که لیشمانیوز احشایی در بعضی از مناطق استان مازندران و گلستان وجود دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی موارد گزارش شده بیماری و شناسایی عامل ایجاد کننده آن در این دو استان انجام گرفت. در مطالعه حاضر، ۷ کودک (با میانگین سنی ۱/۵ سال) مبتلا به کالاآزار بستری شده در بخش کودکان بیمارستان های بوعلی شهرستان ساری و طالقانی شهرستان گرگان در سال های ۱۳۹۲-۱۳۹۵ مورد بررسی قرار گرفتند. فراوان ترین یافته های بالینی و آزمایشگاهی به ترتیب شامل تب طولانی مدت، هپاتواسپلنومگالی، کم خونی، ترومبوسیتوپنی و هایپرگاماگلوبولینمی بود. نمونه گیری از خون محیطی و مغز استخوان بیماران انجام گرفت. روش های rK39 و DAT به عنوان روش سرولوژی جهت تشخیص بیماری استفاده شدند و از اسلایدهای میکروسکوپی، جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) اختصاصی گونه استفاده گردید. تمامی بیماران از نظر سرولوژی با استفاده از آزمون های سرولوژی مثبت شدند. هم چنین در بررسی میکروسکوپی اسمیرهای مغز استخوان تمام بیماران، آماستیگوت های انگل (اجسام لیشتمن) مشاهده شد. با انجام روش PCR، گونه انگل در تمامی بیماران لیشمانیا / یفانتوم بود. با توجه به این که لیشمانیا / یفانتوم عامل اصلی لیشمانیوز احشایی در بیماران دو استان مازندران و گلستان می باشد، افزایش آگاهی پزشکان به ویژه متخصصین کودکان با بیماری در این مناطق و نهایتاً اقدامات کنترلی در کاهش موارد بیماری توصیه می شود.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز احشایی، لیشمانیا / یفانتوم، مغز استخوان، واکنش زنجیره ای پلیمرز، سرولوژی

مقدمه

لیشمانیوز احشایی یا کالاآزار، یک بیماری انگلی سیستمیک است که به وسیله کمپلکس لیشمانیا دونووایی (*Leishmania donovani*) ایجاد شده و به وسیله گونه های مختلفی از پشه خاکی ها منتقل می شود. این بیماری به عنوان

مشکل اصلی سلامت عمومی مطرح بوده و امروزه خسارات ناشی از این بیماری در جهان رو به افزایش است (۱). بیماری لیشمانیوز از نظر بالینی به طور عمده دارای اشکال پوستی، پوستی - مخاطی و احشایی می باشد (۱).

E-mail: mahdif53@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدی فخار - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی دکتری انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات بپولوژی سلولی و مولکولی، گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان، گرگان، ایران

۵. دانشیار، مرکز تحقیقات عفونی با گرایش عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۰

تشخیصی تخصصی در دو استان شمالی گلستان و به ویژه مازندران و به دنبال آن عدم تشخیص به موقع بیماری، مطالعه حاضر با هدف بررسی موارد تایید شده بیماری و شناسایی عامل ایجاد کننده آن در این دو استان انجام گرفت.

معرفی بیمار

در این مطالعه، ۷ کودک مبتلا به کالآزار مراجعه کننده به بیمارستان های بوعلی سینا شهرستان ساری و طالقانی شهرستان گرگان در طی سال های ۱۳۹۲-۱۳۹۵، ابتدا به وسیله پزشک متخصص کودکان و فوق تخصص خون از نظر معاینات بالینی مورد بررسی قرار گرفتند. از میان بیماران مورد مطالعه، ۴ بیمار مذکر و ۳ بیمار دیگر مؤنث بوده و میانگین سنی آن ها ۱/۵ سال بود. ۶ نفر از این بیماران ساکن روستاهای مختلف استان گلستان از جمله روستاهای اطراف شهرستان های مراوه تپه، کلاله و کردکوی و ۱ نفر مربوط به روستای پشرت از توابع شهرستان کیاسر در استان مازندران بودند. عمده ترین شکایت بیماران، درد شکم، تب بالا و کاهش اشتها بود. علایم بالینی مشاهده شده در این بیماران عمدتاً شامل هپاتواسپلنومگالی و تب طولانی مدت بود. آزمایش های خون شناسی نشان دهنده کم خونی، لکوپنی، ترومبوسیتوپنی، هیپرگاماگلوبولینمی، هیپوآلبومینمی (برعکس شدن نسبت آلبومین به گلوبولین سرم) و طبیعی بودن آزمون های عملکرد کبد (Liver Function Test) بود.

پس از مشکوک شدن به این بیماری، سونوگرافی شکم، آزمایش های شمارش کامل سلول های خون (Cell Blood Count) و سِرولوژی به منظور تأیید اولیه یا رد بیماری درخواست و جهت تأیید نهایی، آسپیراسیون مغز استخوان درخواست گردید. اسمیرهای مستقیم مغز استخوان پس از ثابت نمودن با الکل متیلیک، توسط رنگ گیمسا رنگ آمیزی شدند. با بررسی اسمیرهای مستقیم مغز استخوان، آماسیتیکوت های انگل (اجسام

علی رغم اقدامات کنترلی متعدد و طولانی علیه بیماری لیشمانیوز، دلایل اصلی افزایش بروز این بیماری در سال های اخیر، تغییرات آب و هوایی، ضعف و یا نقص سیستم ایمنی، گسترش مقاومت ناقلین به حشره کش ها، مقاومت های دارویی و عدم وجود واکسن موثر علیه این بیماری می باشند. بروز سالانه لیشمانیوز احشایی حدود ۵۰۰ هزار مورد در سراسر جهان برآورد شده است و مرگ ناشی از آن ۴۸ هزار نفر تخمین زده می شود (۲). به طور عمده علائم و نشانه های بالینی این بیماری شامل تب های طولانی مدت، هپاتواسپلنومگالی، کاهش وزن و آنمی بوده است که در صورت عدم درمان به موقع، موجب مرگ می شود (۲). کالآزار در ایران یکی از بیماری های انگلی مهم و زئونوز است که سالیانه تعداد زیادی از افراد در استان های مختلف کشور را مبتلا می نماید. این بیماری در ۸ استان کشور شامل استان های اردبیل (مشکین شهر و دشت مغان)، آذربایجان شرقی (اهر و کلیبر)، فارس (فیروزآباد، جهرم، نورآباد و داراب)، بوشهر (برازجان و خورموج)، خراسان شمالی (بجنورد و شیروان)، خوزستان (مسجد سلیمان و اینده)، گلستان (مراوه تپه و کلاله) به صورت آندمیک دیده می شود و از سایر مناطق کشور، موارد اسپورادیک گزارش شده است (۳). لیشمانیا اینفانتوم (*Leishmania infantum*) عامل ایجاد لیشمانیوز احشایی در میان کودکان در مناطق مدیترانه بوده و در ایران اغلب در کودکان زیر ده سال (۹۸ درصد) دیده می شود و سگ های صاحبدار به عنوان میزبان مخزن اصلی بیماری در نظر گرفته می شوند. این بیماری بیش تر در بین روستاییان شایع بوده و به طور کلی بیش ترین موارد بیماری مربوط به عشایر استان های مختلف کشور می باشد (۳-۵). اطلاعات گزارش شده توسط مراکز بهداشتی درمانی استان گلستان در سال های اخیر نشان دهنده افزایش نگران کننده بروز لیشمانیوز احشایی در منطقه شرق استان است (اطلاعات منتشر نشده). با توجه به عدم آشنایی کافی پزشکان با بیماری لیشمانیوز احشایی و عدم دسترسی مناسب به آزمایشات

لیشمن) به تعداد نسبتاً فراوان مشاهده شد و در یکی از بیماران Mott cell (پلاسماسل حاوی آنتی‌بادی) که مربوط به ضایعات پاتولوژیک در مغز استخوان است، مشاهده شد. به منظور شناسایی حضور آنتی‌بادی اختصاصی ضد لیشمانیا از آزمایش‌های سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) (3) و روش کیت نواری تشخیص سریع rK39 (DiaMed-IT LEISH, Switzerland) بر روی نمونه پلاسمای بیماران انجام شد. در روش rK39 ۱۰ میکرولیتر از پلاسماسل (از خون کامل و یا سرم هم می‌توان استفاده نمود) در نوک نوار قرار داده شد و سپس دو قطره بافر PBS موجود در کیت بر روی نوار نیتروسلولزی (روی این نوار آنتی‌ژن اختصاصی و نوترکیب مربوط به کمپلکس لیشمانیا دونوانی پوشیده شده است) قرار گرفت. پس از ده دقیقه، در صورت مثبت بودن دو باند مربوط به کنترل و تست (بیمار) ظاهر می‌شود و در غیر این صورت، تنها باند کنترل بایستی ظاهر شود. در تمام بیماران این تست نواری مثبت شد. با انجام روش DAT (3) نیز تمام بیماران دارای تیتراهای ۱:۳۲۰۰ و بالاتر (به عنوان تیترا مثبت) بودند. برای استخراج DNA از اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده مغز استخوان با روش فنل و کلروفرم استفاده شد (۶). DNA استخراج شده، جهت آزمایش PCR اختصاصی گونه مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور با استفاده از پرایمر LIN17 و LINR4، قطعه متغیر از حلقه‌های کوچک DNA (Minicircles) کیتوپلاستی انگل لیشمانیا در یک مرحله تکثیر داده شد (۷-۹). مواد لازم برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای هر یک نمونه، به حجم ۲۵ میکرولیتر به این قرار بود: مسترمیکس (سیناژن ایران) ۱۲/۵ میکرولیتر، از هر کدام از پرایمرهای LINR4(5-GGGGTTGGTGTAATAAGGG-3) و LIN17(5-TTTGAACGGGATTCTG-3)، ۱ میکرولیتر، آب مقطر ۵/۵ میکرولیتر و در نهایت DNA مورد نظر به میزان ۵ میکرولیتر اضافه شد. نمونه‌های آماده شده در دستگاه ترموسایکلر (Techen, Cambridge) (ساخت

انگلستان) با برنامه دمایی به این شرح قرار داده شدند: در مرحله اول، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در یک مرحله، در مرحله دوم، ۱- دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۲- دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۳- دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه که مرحله دوم، ۳۰ بار تکرار گردید. در مرحله سوم، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در یک مرحله انجام گرفت (۹). پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصول به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و با سایبرگرین رنگ‌آمیزی گردید. سپس بر روی دستگاه ترانس ایلومیناتور قرار داده شده و از ژل حاوی باندها عکس برداری گردید و با توجه به شاخص وزنی، گونه انگل مشخص شد. با انجام آزمایش PCR اختصاصی گونه بر روی DNA های استخراج شده از مغز استخوان بیماران در مقایسه با گونه‌های استاندارد لیشمانیا، گونه لیشمانیا / اینفاتوم شناسایی شد.

در نهایت برای درمان تمام بیماران از داروی مگلو مین آنتی‌مونات با نام تجاری گلوکانتیم (به عنوان خط اول درمان) با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم وزن بیماران به طور روزانه به مدت ۲۸ روز به صورت داخل عضلانی استفاده شد. در صورت عدم پاسخ به گلوکانتیم که تنها در یکی از بیماران اتفاق افتاد، از فرم لیپوزومی آمفوتریسین ب (Ambisome) به عنوان خط دوم درمان با دوز ۳ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم وزن بیمار به صورت داخل وریدی به مدت ۵ روز و سپس تکرار دوز در روزهای ۷ و ۱۴ استفاده شد.

بحث

در سال‌های اخیر میزان بروز بیماری کالآزار در استان‌های اردبیل و آذربایجان شرقی به دلیل پایش‌های منظم و برخی اقدامات کنترلی موثر، کاهش چشمگیری داشته است. اما در سایر کانون‌ها از جمله برخی از مناطق استان‌های فارس (نورآباد و داراب)، گلستان، خراسان

شمالی، خوزستان و غیره، موارد رو به افزایش می‌باشند (۳). به طوری که در حال حاضر استان فارس با بیش‌ترین موارد سالیانه، رتبه اول را به خود اختصاص می‌دهد، به طوری که بین سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۷، ۲۶۰ مورد از بیماری از این استان گزارش شده است (۱۰). به طور کلی در ایران سالیانه ۳۰۰ تا ۶۰۰ مورد بیماری کالایازار از کانون‌های آندمیک گزارش می‌شود و بروز سالیانه آن در سال ۱۳۹۲ در کل کشور به میزان ۰/۲ به ازای صد هزار نفر گزارش شده است (۱۰). بیش‌ترین موارد کالایازار در کانون‌های آندمیک کشور در گروه سنی ۱ تا ۲ سال و در موارد اسپورادیک در گروه سنی ۳ تا ۴ سال دیده شده است و در در مجموع بیش از ۹۵ درصد بیماران در ایران، زیر ۵ سال می‌باشند (۵-۸، ۷، ۳). از نظر توزیع مکانی و روند بروز، بیش از دو سوم موارد کالایازار در مناطق آندمیک کشور در جمعیت روستایی و عشایر نشین دیده می‌شود و بیش‌ترین موارد این بیماری در فصول پاییز و زمستان گزارش شده است (۵، ۳). اولین گزارش رسمی از بیماری کالایازار در ایران توسط یحیی پویا در سال ۱۳۲۸ هجری شمسی از تنکابن واقع در استان مازندران بود که در این گزارش، به سه مورد از بیماری مربوط به سال‌های ۱۳۲۸، ۱۳۲۱ و ۱۳۱۷ اشاره شده است و وجود بیماری از نظر پارازیتولوژی در این بیماران به اثبات رسیده است. هم‌چنین وی در همین سال موردی از بیماری لیشمانیوز احشایی سگ را از تنکابن گزارش نمود. پس از گزارش رسمی اولین موارد بیماری کالایازار در توابع استان مازندران، تا سال ۱۳۷۶ هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر وجود بیماری در استان وجود نداشت تا آن که در سال ۱۳۷۷، سوادکوهی وجود ۵ بیمار مبتلا به کالایازار را از این استان گزارش نمود (۳). در مطالعه‌ای که اخیراً در استان گلستان توسط فخار و همکاران (۷) بر روی کودکان زیر ده سال و سگ‌های اهلی منطقه مراوه تپه انجام شد، به طور کلی ۱/۳ درصد از نمونه‌های انسانی و ۳۲ درصد از نمونه‌های سگ‌ها از نظر تست DAT مثبت گزارش شدند و گونه به دست آمده لیشمانیا /ینفانتوم

شناسایی شد که این منطقه به عنوان یک کانون آندمیک و نوپدید بیماری مطرح شد. با توجه به این که در استان گلستان، این بیماری روز به روز رو به گسترش است، این محققان به طور جدی افزایش مراقبت‌های بهداشتی و برنامه‌های کنترل لیشمانیوز احشایی را مطرح نمودند. هم‌چنین بر اساس مطالعه انجام شده در خصوص بررسی مولکولی و سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در استان مازندران، گونه لیشمانیا /ینفانتوم از انسان و سگ مبتلا گزارش گزارش شد (۱۱) که در مطالعه مذکور، محققین معتقدند لیشمانیوز احشایی در استان مازندان تنها به صورت اسپورادیک می‌باشد که در مطالعه ما هم این گونه شناسایی شده و با سایر مطالعات انجام شده در ایران و کشورهای حوزه مدیترانه همخوانی دارد؛ از طرفی به دلیل شیوع بالای عفونت با لیشمانیا /ینفانتوم در مناطقی از استان گلستان، این مناطق به عنوان کانون آندمیک جدید در ایران به حساب آمده و این مسئله می‌تواند موجب نگرانی گردشگران و مهاجران به این استان شود. به طور کلی شایع‌ترین یافته آزمایشگاهی کالایازار، کم‌خونی است. کم‌خونی معمولاً از نوع نورموسیتیک و نورموکرومیک می‌باشد و در صورت کمبود آهن و اسید فولیک، کم‌خونی از نوع میکروسیتیک و یا ماکروسیتیک خواهد بود. تعداد رتیکلوسیت‌ها و گلبول‌های قرمز هسته دار در خون محیطی بیش‌تر بیماران بالا است. لکوپنی (نوتروپنی و ائوزینوپنی)، مونوسیتوز، لنفوسیتوز نسبی، ترومبوسیتوپنی و نهایتاً پان سایتوپنی (کاهش تمام رده‌های سلولی) شایع هستند (۳). لازم به ذکر است که اگرچه تابلوی بالینی تا حدی راهگشا است، اما تشخیص قطعی بر اساس مشاهده مستقیم انگل می‌باشد و یک روش آزمایشگاهی مثبت توام با علائم بالینی ملاک تشخیص قطعی بیماری است، بنابراین مثبت بودن یک روش آزمایشگاهی، بدون علائم بالینی، ارزش تشخیصی ندارد و به‌طور کلی در عفونت بالیشمانیا دونووانی، تظاهرات بالینی و فرم کلاسیک بیماری شایع‌تر از لیشمانیا /ینفانتوم است (۱۲، ۳).

در بسیاری از مناطق اندمیک، بیماری مالاریا شایع ترین عفونی است که تظاهرات بالینی مشابهی با لیشمانیوز احشایی دارد. در تمام کشورهای آندمیک، تشخیص افتراقی بیماری با تیفوئید (حصبه)، سل ارزنی، سپتی سمی (به خصوص آندوکاردیت)، بروسلوز، هپاتیت مزمن، هیستوپلاسموزیس، سیروز کبدی، سندرم اسپلینومگالی گرمسیری، لنفوما، لوسمی، هموگلوبینوپاتی‌ها و انواع آنمی (همولیتیک و مگالوبلاستیک) و غیره بایستی مورد توجه قرار گیرد (۱۵، ۱۳). بزرگی طحال ممکن است ناشی از افزایش فشارخون پورت (ناشی از سیروز و شیتوزومیازیس حاد) و مالاریا باشد. لازم به ذکر است که در صورت یافتن انگل مالاریا در خون محیطی، تشخیص لیشمانیوز احشایی به طور کامل رد نمی شود و یا در مورد سایر عفونت‌ها هم همین طور، زیرا عفونت‌های همزمان کالاآزار با بیماری‌های عفونی دیگر از قبیل سل، بیماری‌های قارچی و ایدز و یا انواع لوکمی‌ها گزارش شده است (۳).

در مطالعه حاضر، مشخصات عامل مولد بیماری لیشمانیوز احشایی در استان مازندران و گلستان به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تعیین گردید. به طور کلی تشخیص بیماری کالاآزار پیچیده است، چرا که تظاهرات بالینی آن با سایر بیماری‌های شایع از قبیل مالاریا، تیفوئید و سل مشابه بوده و گاهی این بیماری‌ها به عنوان عفونت توأم در شخص مبتلا به کالاآزار دیده می شوند. در بسیاری از موارد، بیماری کالاآزار با انواع لمفوما، لوکمی‌ها، آنمی‌ها، اختلالات میلوپرولیفراتیو و هموگلوبینوپاتی‌ها اشتباه شده است و منجر به تشخیص نادرست و در نهایت درمان اشتباهی می گردد که در اغلب این موارد، تشخیص نادرست منجر به مرگ بیمار خواهد شد، در نتیجه تشخیص دقیق و به موقع بیماری و نهایتاً درمان بیماران از اهمیت ویژه ای برخوردار است. امروزه چالش عمده در تشخیص کالاآزار، دستیابی به آزمون‌های قابل انجام در شرایط فیلد، دقیق، سریع و غیر تهاجمی می باشد.

روش‌های تشخیص به طور عمده به دو دسته روش‌های اختصاصی و غیر اختصاصی تقسیم می شوند. روش‌های غیر اختصاصی شامل یافته‌های هماتولوژی، معکوس شدن نسبت آلبومین به گلوبلین سرم و آزمون فرمل ژل می باشد و روش‌های اختصاصی شامل روش‌های پارازیتولوژی، سرولوژی و مولکولی می باشد (۳). در میان روش‌های پارازیتولوژی (انگل شناسی)، روش تهیه اسمیر مستقیم با استفاده از نمونه مغز استخوان روش رایج می باشد و سایر روش‌های پارازیتولوژی از قبیل کشت و تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی، بیش تر جنبه تحقیقاتی دارند. لازم به ذکر است که روش‌های پارازیتولوژی جزء روش‌های استاندارد طلایی برای تشخیص می باشند. در میان روش‌های سرولوژی، روش DAT (آزمون آگلوتیناسیون مستقیم) و IFA (ایمونوفلورسانس) و ELISA به طور معمول مورد استفاده قرار می گیرند که در این میان به روش DAT در مطالعات اپیدمیولوژیکی و غربالگری در مناطق اندمیک توصیه می شود. ضمناً علاوه بر روش‌های مذکور، روش سریع شناسایی آنتی بادی شامل تست نواری (rK39) نیز وجود دارد که حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۸ درصد گزارش شده است.

در میان روش‌های مختلف مولکولی، روش PCR بر روی نمونه‌های مختلف بالینی از جمله خون محیطی، ادرار، اسمیر خون محیطی، سرم، پلاسما و بزاق استفاده می شود که معمولاً از روش‌های مولکولی در مواردی که میزان پارازیتی و یا بار انگلی کم باشد و یا در مواقعی که انگل توسط روش‌های پارازیتولوژی قابل مشاهده نباشد و یا بیمار دچار ضعف سیستم یا نقص سیستم ایمنی بوده و آنتی بادی به اندازه کافی در بدن افزایش نیافته است و هم چنین در تعیین گونه انگل استفاده می شود.

حساسیت و ویژگی روش‌های مولکولی به عوامل مختلفی بستگی دارد؛ از جمله نوع PCR، پرایمر مناسب، نوع نمونه بالینی، نحوه استخراج DNA و غیره. اما به طور

کلی، روش‌های مولکولی بر خلاف روش‌های پارازیتولوژی، غیر تهاجمی بوده و حساسیت و ویژگی قابل قبولی دارند. استفاده از روش PCR معمولی با حساسیت ۷۰-۸۵ درصد و ویژگی بالا (۱۰۰ درصد) در قسمت‌های مختلف جهان صورت می‌گیرد (۹،۳). از مزایای انجام روش PCR در تشخیص کالآزار می‌توان به تشخیص زودرس، ویژگی و حساسیت بالا، توانایی کار با مقدار کمی از مواد مورد هدف، عدم نیاز به کشت انگل و استفاده از اسلایدهای تهیه شده بیماران، تشخیص بیماران با عفونت توام ایدز و لیشمانیا، پیگیری روند بهبود بیماری پس از درمان و به‌طور کلی انجام آن بر روی نمونه‌های بالینی به‌طور مستقیم اشاره نمود (۳). بر اساس مطالعه فخار و همکاران که در سال ۲۰۰۸ بر روی حاملین انسانی بدون علامت لیشمانیا/ینفانتوم و مخازن احتمالی لیشمانیوز احشایی در جنوب ایران صورت گرفت، روش PCR برای شناسایی انگل لیشمانیا مورد استفاده قرار گرفت که از پرایمرهای LIN17 و LINR4 برای تعیین گونه لیشمانیا استفاده شد و نشان داده شد که حساسیت و ویژگی روش به کار رفته بسیار مناسب می‌باشد. هم‌چنین در مطالعه دیگر فخار و همکاران (۲۰۰۸) بر روی اسلایدهای آسپیراسیون مغز استخوان تهیه شده از مناطق مختلف استان فارس، با روش‌های PCR و Microsatellite، گونه اصلی بیماری، لیشمانیا/ینفانتوم و عامل دوم بیماری سوش احشاء دوست لیشمانیا تروپیکا گزارش گردید (۱۶۸). هم‌چنین نتایج یک مطالعه مروری نظامند و متاآنالیز در ایران نشان داد که شیوع بیماری لیشمانیوز احشایی در میان جمعیت سگ‌های ایران، ۱۶ درصد بوده و این بیماری از ۱۷ استان کشور گزارش شده است؛ لذا بیماری مذکور در بیش از نیمی از استان‌های کشور

بومی هست (۱۷). به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که عامل مولد کالآزار در استان مازندران و گلستان، لیشمانیا/ینفانتوم می‌باشد. روند رو به رشد کالآزار و استقرار عشایر در بعضی از نواحی استان‌ها، حاکی از افزایش روز افزون این بیماری در این استان‌ها بوده و در حقیقت زنگ خطر بیماری در دو استان به ویژه مناطق شرقی استان گلستان به طور جدی به صدا درآمده است. از عوامل احتمالی مرتبط با افزایش بروز بیماری در این مناطق می‌توان به مواردی از قبیل جنگل زدایی، تغییرات آب و هوایی و محیطی، مهاجرت عشایر و وفور و تنوع ناقلین و مخازن حیوانی (از جمله شغال) و هم‌چنین عوامل خطر فردی مانند سوء تغذیه، ضعف سیستم ایمنی، عوامل ژنتیکی و غیره اشاره نمود (۱۸،۱۰،۷).

در پایان، انجام مطالعات جامع در خصوص جنبه‌های مختلف لیشمانیوز احشایی (از جمله مخازن و ناقلین) در استان مازندران و گلستان پیشنهاد می‌گردد. هم‌چنین برگزاری کارگاه‌های آموزشی برای پزشکان و کارکنان بهداشتی و درمانی به ویژه پزشکان خانواده شهری و روستایی توصیه می‌گردد، زیرا غفلت از این بیماری در استان‌های مذکور نه تنها عوارض جبران ناپذیری برای بیماران به همراه داشته است، بلکه عدم کنترل مناسب آن موجب گسترش بیماری خواهد شد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل بخشی از طرح‌های ۱۴۹-۹۰ و ۱۹۴۱ بوده است که بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به خاطر حمایت‌های مالی و هم‌چنین تمام پرستاران، بهورزان و کارکنان محترم خانه‌های بهداشت به خاطر همکاری در انجام این مطالعه، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniases: report of a meeting of

the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, WHO; 2010.

2. World Health Organization (WHO) First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases WHO/HTM/NTD/2010; 1, p. 91-96.
3. Fakhar M, Mohebal M, AhmadpoorE. Visceral Leishmaniosis (kala-azar). First ed. Gorgan, Iran: Nouroozi Publisher; 2014.
4. FakharM, Rahmati B. Visceral leishmaniasis in Mazandaran Province and review on its current situationin in Iran. JBUMS 2011; 13(2): 68-75 (Persian).
5. Asgari Q, Fakhar M, Motazedian H. Nomadic kala-azar in south of Iran. Iranian J Publ Health 2006; 35(3): 85-86 (Persian).
6. Ziaei Hezarjaribi H, Taghavi M, Fakhar M, Gholami S. Direct Diagnosis of Trichomonas vaginalis Infection on Archived Pap Smears Using Nested PCR. Acta Cytol 2015; 59(1): 104-108.
7. Fakhar M, Asadi kia A, Gohardehi Sh, Sharif M, Mohebal M, Akhoundi B, et al. Emergence of a new focus of visceral leishmaniasis due to Leishmania infantum in Golestan Province, north-eastern of Iran. J Parasit Dis 2014; 38(3): 255-259.
8. Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Asgari Q, Kalantari M, Mohebal M. Asymptomatic human carriers of Leishmania infantum: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. Ann Trop Med Parasitol 2008; 102(7): 577-583.
9. Fakhar M, Motazedian MH, Hatam Gh, Asgari Q, Monabati A, Keighobadi M. Comparative performance of direct agglutination test, indirect immunofluorescent antibody test, polymerase chain reaction and bone marrow aspiration method for diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. African J Microbiol Res 2012; 6(28): 5777-5781.
10. Available from: <http://www.gideononline.com/ebooks/disease/visceral-leishmaniasis-global-status/>. 2016.
11. Fakhar M, Rahmati B, Gohardehi S, Mohebal M, Akhoundi B, Sharif M, et al. Molecular and Seroepidemiological Survey of Visceral Leishmaniasis among Humans and Domestic Dogs in Mazandaran Province, North of Iran. Iran J Parasitol 2011; 6(4): 51-59.
12. Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 60(2): 151-154.
13. Geramizadeh B, Fakhar M, Motazedian MH. Visceral leishmaniasis with duodenal involvement: three immunocompetent cases from Southern Iran. AnnTrop Med Parasitol 2006; 100(7): 637-640.
14. Fakhar M, Asgari Q, Motazedian MH, Monabati A. Mediterranean Visceral Leishmaniasis Associated with Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL). Parasitol Res 2008; 103(2): 473-475.
15. Fakhar M, Banimostafavi E , Motazedian MH, Asgari Q. Co-infection of Leishmania infantum and Brucella spp in Iran. Com Clin Pathol 2009; 18(1): 93-94.
16. Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, Lowe C, Kemp SJ, Noyes HA. An integrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for Leishmania donovani complex, Leishmania braziliensis and Leishmania major. Parasitol 2008; 135(5): 567-574.
17. Shokri A, Fakhar M, Teshnizi SH. Canine visceral leishmaniasis in Iran: A systematic

- review and meta-analysis. Acta Trop 2017; 165:76-89.
18. Namroodi S. Serological survey of *Leishmania infantum* in jackals in Golestan Province, Iran (2011-2013). Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120): 25-29 (Persian).