

سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی (عفونت انسانی) با روش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) در منطقه میانکوه شرقی شهرستان پلدختر لرستان در سال ۸۳-۱۳۸۲

علی چگنی شرفی^۱، هرمزد اورمزدی^۲، مهدی محبعلی^۳، لامع اخلاقی^۴، محمد میرزا شرفی^۵، بهناز آخوندی^۶

۱- کارشناس ارشد علوم آزمایشگاهی، بیمارستان شهید مدنی خرم آباد لرستان

۲- استاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- استاد، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۵- پزشک عمومی

۶- مربی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

یافته / دوره هفتم / شماره ۱۳ و ۱۴ / پاییز و زمستان ۸۴ / مسلسل ۶۶

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۲/۲۱، پذیرش مقاله: ۸۴/۸/۱۷

*** مقدمه:** لیشمانیوز احشایی یکی از بیماریهای عفونی انگلی است که از نظر بهداشتی اهمیت زیادی دارد. این مطالعه در منطقه میانکوه شرقی شهرستان پلدختر از استان لرستان با هدف تعیین سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی (عفونت انسانی) در سال ۸۳-۱۳۸۲ انجام گرفته است.

*** مواد و روش ها:** مطالعه به شکل توصیفی - مقطعی بوده و روش نمونه برداری به شکل تصادفی چند مرحله ای و گروههای هدف بچه های زیر ۱۲ سال ساکن در منطقه و ۱۰٪ از بزرگسالان بود. در مجموع ۵۳۰ نمونه خون از افراد مذکور تهیه شد که بعد از تهیه پلاسما با روش سروولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) به منظور تشخیص آنتی بادی ضد لیشمانیایی مورد آزمایش قرار گرفتند. در تست DAT برای نمونه های انسانی تیترهای ۱:۳۲۰۰ و بالاتر مثبت و تیترهای ۱:۱۶۰۰ مشکوک در نظر گرفته شد.

*** یافته ها:** با استفاده از روش DAT، ۶ نفر (۱/۲۶٪) دارای تیتر ۱:۳۲۰۰ و بالاتر از نظر سروولوژی مثبت بودند و ۱ نفر (۰/۲۱٪) با تیتر ۱:۱۶۰۰ به عنوان تیتر مشکوک و ۶ نفر دارای تیترهای ۱:۸۰۰ مشاهده شد. این مطالعه در تمام روستاهای میانکوه شرقی انجام گرفت که موارد مثبت سرمی به ترتیب از روستاهای لتوند (امورد)، دارصافه (۲ مورد)، بن جو (۲ مورد) و عشایر کوچنده (۱ مورد) بودند. در سایر روستاهای مجاور موردی از بیماری مشاهده نگردید.

*** نتیجه گیری:** نتایج نشان می دهد که لیشمانیوز احشایی یک بیماری اسپورادیک در منطقه میانکوه شرقی پلدختر می باشد. این بررسی لزوم مطالعات تکمیلی جهت شناسایی ناقلین قطعی و مخازن احتمالی دیگر در منطقه را پیشنهاد می کند.

واژه های کلیدی: سروولوژی، لیشمانیوز احشایی، انسان و ایران

آدرس مکاتبه: خرم آباد، بیمارستان شهید مدنی، آزمایشگاه

مقدمه

لیشمانیوز احشایی (کالآزار)^۱ یکی از بیماریهای عفونی- انگلی است که از نظر بهداشتی اهمیت زیادی دارد. اگر چه میزان توجه به لیشمانیوز به عنوان یک مشکل بهداشت عمومی افزایش یافته؛ ولی فعالیتهای موجود برای کنترل کافی نیستند. تنوع زیادی که در فرمهای بالینی و موقعیتهای اپیدمیولوژیک بیماری وجود دارد، نشان دهنده این است که هر کانونی به اصول و روشهای کنترلی خاص خود نیاز دارد (۲،۱). لیشمانیوز جزء بیماریهای اندمیک ایران و بیش از ۸۰ کشور جهان محسوب می شود (۳). کالآزار در ایران از نوع مدیترانه ای بوده و عامل آن لیشمانیا اینفانتوم، ناقل آن گونه های بخصوصی از پشه خاکی های جنس فلبوتوموس و مخزن انگل سگ، سگ سانان وحشی است. این بیماری در بعضی از مناطق استانهای اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر به شکل اندمیک و در سایر مناطق به صورت اسپورادیک گزارش شده است (۴،۵). در منطقه مورد پژوهشی ما با توجه به اینکه در طی سالهای گذشته موارد تأیید شده ای از این بیماری در کودکان زیر ۱۲ سال به وقوع پیوسته، اما گزارش رسمی در منابع علمی مشاهده نشده است، از این رو تصمیم گرفته شد تا برای اولین بار با مطالعه ای پژوهشگرانه وضعیت کنونی بیماری را در این شهرستان به مدت یکسال از تاریخ ۸۲/۵/۱۰-۸۳/۵/۱۰ مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش ها

این بررسی از نوع توصیفی و به روش مقطعی بوده و روش نمونه برداری به شکل تصادفی چند مرحله ای بوده و گروههای هدف افراد زیر ۱۲ سال و کمتر و ۱۰٪ از بزرگسالان بوده اند (۵۳۰ نمونه). در این بررسی تمامی نمونه ها در داخل لوله های میکروهماتوکریت هپارینه از نوک انگشت مراجعه کنندگان تهیه شد. درنوزادان و بچه های زیر یکسال نمونه برداری از پاشنه پا و یا انگشت شست پا یا

دست انجام می شد. نمونه های خون در شرایط مطلوب به آزمایشگاه منتقل و توسط دستگاه میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ می شد. پس از جداسازی سرم یا پلاسما در شرایط مناسب به آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت انجام آزمایشات لازم منتقل شد و در فریزر ۲۰- نگهداری شده و به روش سروولوژی آگلوتیناسیون مستقیم مورد آزمایش قرار گرفتند.

تست آگلوتیناسیون مستقیم^۲: آنتی ژن تست آگلوتیناسیون مستقیم در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران بر اساس روش دکتر هریت^۳ تهیه شد (۶). در این روش آنتی ژن در مجاورت رقت های مختلف سرم یا پلاسمای فرد مشکوک قرار داده شد که در صورت حضور آنتی بادی اختصاصی در سرم بیمار پس از گذشت ۱۸ ساعت آگلو تیناسیون صورت گرفت. ابتدا به کمک محلول رقیق کننده و میکرو پلیت های وی^۴ شکل رقت های مورد نیاز از پلاسمای بیمار تهیه شد و پس از افزودن آنتی ژن در رقت های ۱:۳۲۰۰ و ۱:۸۰۰ میکروپلیت ها در داخل اطاقک مرطوب قرار گرفتند و در یک سطح افقی در اتو ۲۰ درجه سانتی گراد تا روز بعد (حداقل ۱۸ ساعت) باقی ماند. برای تفسیر آزمایش پلیت را روی سطح سفید قرار داده و از بالا به آن نگاه کرده چنانچه حفره ای که آنتی ژن در آن ریخته شده بود. انگلها به صورت یک تکه کوچک آبی رنگ با حاشیه کاملاً مشخص جمع شده و در وسط حفره میکروپلیت ته نشین شده بودند دال بر عدم آگلوتیناسیون و نتیجه آزمایش از

1. Kala azar
2. Direct Agglutination Test (DAT)
3. Harith
4. Plate v

نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانیا منفی به حساب می آمد. اگر به حالت کلونیدی ابری شکل آبی رنگ یکنواخت در تمام مایع موجود در حفره پراکنده شده یا به اصطلاح آگلوتینه شده بودند، نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانیا مثبت محسوب می شد. بالاترین رقت از نمونه سرمی که آگلو تیناسیون در آن ایجاد شده به عنوان حداکثر عیار مثبت تست آگلوتیناسیون مستقیم در نظر گرفته شد. در این صورت برای تعیین عیار، نمونه ها مجددا در رقت های بالاتری آزمایش شدند. عیارهای ۱:۳۲۰ و بیشتر از نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانیا مثبت و عیار های ۱:۱۶۰۰ مشکوک و کمتر از ۱:۱۶۰۰ منفی تلقی شدند. داده ها با استفاده از آزمون توصیفی و آزمون Z فیشر به کمک نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها

در این بررسی جمعا تعداد ۵۳۰ نمونه پلاسمای انسانی تهیه شد که تمام نمونه ها با روش آگلوتیناسیون مستقیم درآزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران با سرم کنترل های مثبت و منفی آن مرکز مورد آزمایش قرار گرفت. از ۵۳۰ نمونه پلاسمای انسانی ۴۷۵ نمونه (۸۹/۶٪) مربوط به گروه سنی زیر ۱۲ سال و ۵۵ نمونه (۱۰/۴٪) مربوط

به گروههای سنی بالاتر از ۱۲ سال بودند.

حداقل سن ۱/۵ ماه و حداکثر ۶۵ سال بوده است. از مجموع ۵۳۰ نمونه پلاسمای انسانی اخذ شده ۲۱۶ نفر (۴۰/۷۵٪) پسر زیر ۱۲ سال و ۲۵۹ نفر (۴۸/۸۷٪) دختر زیر ۱۲ سال و ۱۸ نفر (۳/۴٪) مرد بالای ۱۲ سال و ۳۷ نفر (۶/۹۸٪) زن بالای ۱۲ سال بودند.

پس از انجام آزمون آگلوتیناسیون مستقیم عفونت لیشمانیایی کلادر ۶ کودک با عیار برابر ۱:۳۲۰ و بالاتر از بچه های زیر ۱۲ سال تأیید گردید و شیوع بیماری در این گروه سنی (۱/۲۶٪) برآورد گردید. یک نمونه مشکوک با عیار ۱:۱۶۰۰ (۰/۲۱٪) که شخص مورد نظرفاقد علائم بالینی بیماری بود و در ۶ نمونه هم عیار ۱:۸۰۰ مشاهده شد که عیارهای کمتر از ۱:۱۶۰۰ را منفی تلقی گردید.

از تعداد کل نمونه های زیر ۱۲ سال ۲۱۶ نفر (۴۰/۷۵٪) مذکر بودند که تعداد ۴ نفر (۱/۶٪) مثبت بودند و از ۲۵۹ نفر (۴۸/۸۷٪) تعداد ۲ نفر (۰/۷۷٪) از دختران زیر ۱۲ سال سرم مثبت بودند که با انجام آزمون آماری تست فیشر مشاهده شد، بین دو جنس مذکر و مؤنث اختلاف معنی داری وجود ندارد؛ ولی نسبت افراد سرم مثبت با تست آگلوتیناسیون مستقیم درجنس مذکر دو برابر مؤنث بود (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- نتایج آزمایش سروولوژی آگلوتیناسیون مستقیم بر حسب سن و جنس و تعداد نمونه های مورد بررسی

گروههای سنی (سال)	تعداد نمونه ها		منفی و کمتر از ۱:۱۶۰۰		مورد مشکوک با عیار ۱:۱۶۰۰		موارد سرم مثبت با عیار ۱:۳۲۰ و بیشتر	
	مؤنث	مذکر	مؤنث	مذکر	مؤنث	مذکر	مؤنث	مذکر
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۰-۲	۳۲	۲۴	۳۱	۹۶/۸۷	۲۴	۱۰۰	-	-
۳-۴	۳۲	۲۶	۳۲	۱۰۰	۲۶	۱۰۰	-	-
۵-۶	۳۶	۳۰	۳۶	۱۰۰	۲۹	۹۶/۶۶	۱	۳/۳۳
۷-۸	۵۶	۴۹	۵۵	۹۸/۲	۴۷	۹۵/۹۱	۱	۴/۰۸
۹-۱۰	۴۱	۴۳	۴۱	۱۰۰	۴۱	۹۵/۳۵	-	۲/۳۳
۱۱-۱۲	۶۲	۴۴	۶۱	۹۸/۳۹	۴۲	۹۵/۴۵	-	-
>۱۲	۳۷	۱۸	۳۵	۹۴/۵۹	۱۷	۹۴/۴۴	-	-
جمع	۲۹۶	۲۳۴	۲۹۱		۲۲۶		۲	۴

بحث

در این بررسی موارد سرم مثبت از نظر کالآزارد در گروه‌های سنی زیر یک سال مشاهده نشد. این مسئله می‌تواند ناشی از طولانی بودن دوره نهفتگی بیماری، انتقال ایمنی اکتسابی از مادر به خصوص در مناطق اندمیک و یا احتمال تماس کمتر با پشه ناقل بدلیل پوشش بدن باشد. در گروه سنی ۱-۲ سال ۱ نفر (۳/۱۳٪) سرم مثبت بود که از لحاظ جنسی مؤنث و دارای علائم بالینی بیماری (آنمی، تب و اسپلنومگالی) بود که با مطالعه کریم خیرآبادی و همکاران (۱۳۸۲) همخوانی دارد (۲). بیشترین افراد سرم مثبت این مطالعه در گروه‌های سنی ۵-۹ سال بودند که این افراد دارای سابقه بیماری بوده چون آنتی بادی‌های علیه لیشمانیا که توسط تست آگلوتیناسیون مستقیم شناسایی می‌شوند، مدت ۳ تا ۴ سال وحتى بیشتر در خون می‌مانند. بنابراین کاهش تیتراژ آنتی بادی در افرادی که در سنین پایین مبتلا شده‌اند در سن ۹ سالگی و بالاتر دیده خواهد شد. در مطالعه ای که خانم میر صمدی (۱۳۷۹) انجام داده، عیار آنتی بادی با روش تست آگلوتیناسیون مستقیم دیرتر از IFA^۱ و الیزا^۲ پایین می‌آید (۷). در این مطالعه مشاهده شد که افراد سرم مثبت در گروه‌های بالاتر از ۱۰ سال در جنس مؤنث بیشتر از مذکر بوده که شاید به دلیل ابتلاء قبلی، درمان و یا موارد تحت کلینیکی باشد.

با توجه به نتایج حاصل در این پژوهش که مشاهده شد بیشترین افراد سرم مثبت زیر ۱۰ سال سن داشتند با مطالعه ای

که در سال ۱۹۸۸ توسط ادریسیان و همکاران در مشکین شهر از استان اردبیل انجام شده نیز نشانگر این است که در حدود ۹۷٪ موارد کالآزار در بچه‌های زیر ۹ سال و در بیش از ۵۰٪ موارد در بچه‌های زیر ۴ سال دیده می‌شود (۸).

همچنین در این مطالعه مشاهده شد افراد سرم مثبت در جنس مذکر دو برابر جنس مؤنث بودند که با انجام آزمون آماری اختلاف معنی داری بین جنس مذکر و مؤنث و مذکر مشاهده نشد که با مطالعات انجام شده در مناطق اسپورادیک مشابه مثل مطالعه انجام شده توسط منوچهری و همکاران در شهرکرد و مهدی فخار در منطقه قاهان قم همخوانی دارد (۹، ۱۰).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده و موارد تحت کلینیکی بنظر می‌رسد انتقال بیماری با سرعت پایین در منطقه صورت می‌گیرد. البته این بررسی ضرورت مطالعات تکمیلی جهت تعیین ناقلین و مخازن را در منطقه ایجاب می‌کند و می‌توان نتیجه گرفت به احتمال زیاد عفونت در روستاهای لتوند، دارصافه و بن جو به صورت اندمیک وجود داشته باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با پشتیبانی مالی دانشگاه علوم پزشکی ایران اجراء شده است. بدینوسیله از دانشگاه مذکور تشکر و قدردانی می‌گردد. از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران برای دراختیار قرار دادن آنتی ژن واز خانم چاره دار پرسنل این مرکز واز بهروزان محلی به خصوص آقای باقر تیموری و کارکنان درمانگاه چمشک تشکر و قدردانی می‌گردد.

1. Indirect Fluorescence Antibody (IFA)
2. Enzyme- Linked Immuno-Sorbent assay (ELISA)

References

1. World Health Organization. The leishmaniae. Report of a WHO Export committee World Health Organization. Geneva. 1990; No. 793
- ۲- محمدی خیرآبادی ک، محبعلی م، ممیشی س، عرشی ش. خصوصیات اپیدمیولوژیک کالآزار در بیماران بستری در بیمارستانهای اردبیل، مجله بهداشت، (۱۳۸۲)، دوره دو شماره دو، صص: ۱۱-۲۴
3. Godal T. New dimension for parasitology in the 21st century. In: Ozcel A. Alkan MZ(eds) parasitology for 21st century CAB International, 1996:1-13
4. Edrissian GH, Ahanchin AR, and Ghaarachahi AM. Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars Province, southern Iran. Iran.J.Med Sci. 1993; 18:99-105
5. Mohebbali M, Khamesipour A, Mobedi I, Zarei Z, Fesharki RH. Double – blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved leishmania major vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin – Shahr district, I.R.Iran. Vaccine, 2004; 22: 4097-4100
6. Harith AE, Kolk AHJ, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S and et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis. Trans. R. Soc. Trop. Hyg, J.J 1986; 8: 583 – 87
- ۷- میر صمدی ن، محبعلی م، عطاری م، ادریسیان غ ح. سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی (کالآزار) در آذرشهر، آذربایجان شرقی مجله پژوهشی حکیم بهار ۸۲ دوره هشتم شماره اول صص: ۱۷-۲۲
8. Edrissian GH, Hafizi A, Afshar A, Soleiman – zadehs G, Movahed Danesh, AM and Garoussi. An endemic of visceral leishmaniasis in Meshkin – shahr, East Azarbaijan province, North – west part of Iran Bulletin de la societe de pathologie exotique et des filiales, 1988; 81(2): 238 – 48
- ۹- فخار م. بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در انسان و مخازن حیوانی (سگ) در دهستان قاهان از استان قم. با استفاده از روش آگلوتیناسیون مستقیم. پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد علوم بهداشتی در رشته انگل شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۸۱ – ۱۳۸۰
- ۱۰- منوچهری نائینی ک، عباسی ع ا، خدیوی ر، محبعلی م، حجاران ه. سرواپیدمیولوژی لیشمانیازیس احشایی در کودکان مناطق عشایری استان چهارمحال بختیاری مقاله شماره ۱۹۳ چهارمین همایش سراسری انگل شناسی و بیماریهای انگلی ایران دانشگاه علوم پزشکی مشهد مقدس ۲۴- ۲۱ مهر ۱۳۸۲