روش‌های تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی (کالاآزار)

دکتر مهدی فخار

دانشجوی دکتری انگل‌شناسی، دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی و بورسیه دانشگاه علوم پزشکی مازندران

فتانه میکائیلی

دانشجوی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی، دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

دکتر محمدحسین معتضدیان

دانشیار انگل‌شناسی، دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

ABSTRACT

Various noninvasive tests, with various specificities and sensitivities, are available for the diagnosis of leishmaniasis; however, none have become popular in areas of endemicity, they also are expensive, require skilled personnel and expensive equipment. Parasite diagnosis by biopsy of spleen and bone narrow remains the "gold standard" with its usual limitations. It seems that if Antigen preparation is provided in optimal procedure, DAT serological method is applicable and available in field condition. The rK39 strip test has the potential to be used for diagnosis of VL under field conditions. Other tests, which are likely candidates for diagnosis and prognosis of leishmaniasis in the future, are KATEX and a field-adaptable version of PCR, which would be simple, inexpensive, and easily available.

خلاصه

روش‌های تشخیصی غیر تهاجمی مختلفی با ویژگی و حساسیت متفاوت برای تشخیص لیشمانیازیس وجود دارد، اما هیچ‌کدام از این روش‌ها در مناطق آندمیک محبوبیت ندارد، زیرا اکثرا گران هستند و نیاز به اشخاص باتجربه و تجهیزات گران‌قیمت دارند. تشخیص انگل با بیوپسی از طحال، مغزاستخوان به‌عنوان روش استاندارد طلایی می‌باشد و فقط روش سرولوژیک DAT است که به‌آسانی و در شرایط فیلد، البته به شرط تهیه آنتی‌ژن مطلوب، انجام‌پذیر می‌باشد، تست نواری rK39 نیز برای تشخیص کالاآزار در شرایط فیلدی استفاده می‌شود که آن‌هم به‌دلیل داشتن معایب ذکر شده محدودیت‌هایی دارد. تست‌های دیگری که برای تشخیص لیشمانیازیس احشایی در آینده در نظر گرفته شده‌اند شامل KATEX و یک روش PCR ساده، ارزان و قابل دسترس در فیلد می‌باشد.

□□□□□□□□□□

مقدمه

لیشمانیوزیس نوعی بیماری انگلی است که توسط تک‌یاخته‌ای به‌نام لیشمانیا ایجاد می‌شود و به سه شکل جلدی، جلدی-مخاطی و احشایی در انسان دیده می‌شود. نوع احشایی بیماری یا کالاآزار در بیشتر مناطق ایران به‌صورت اسپورادیک و در مناطق مشکین‌شهر، دشت مغان، کلیبر، برازجان، خورموج، فیروزآباد، جهرم و قم به‌صورت آندمیک دیده می‌شود(۱). عامل اصلی بیماری کالاآزار در منطقه وسیع حوزه مدیترانه و از جمله ایران، لیشمانیا اینفانتوم *(Leishmania infantum)* می‌باشد. کالاآزار در ایران اغلب در کودکان و بیشتر در بین روستائیان دیده می‌شود(۲). عفونت احشایی لیشمانیا ممکن است بدون علامت بوده یا آن‌که علامت‌دار گردد و در برخی از مناطق عفونت غیرآشکار بسیار شایع‌تر از بیماری بالینی است. علایم اصلی بیماری تب، اسپلنومگالی و کم‌خونی می‌باشد و یافته‌های آزمایشگاهی غیرطبیعی بیمار عبارتند از پان‌سایتوپنی و هیپرگاماگلوبینمی و هیپوآلبومینیمی. مخازن این بیماری در ایران شامل سگ و سگ‌سانان (روباه، شغال و گرگ) بوده و ناقلین آن‌را گونه‌های مختلف پشه‌خاکی از جمله گونه غالب در ایران فلبوتوموس‌ماژور تشکیل می‌دهد. در صورت عدم تشخیص و درمان به‌موقع بیماری در انسان، ممکن است تا ۹۸٪ باعث مرگ‌ومیر بیماران به‌ویژه در کودکان گردد. بنابراین تشخیص دقیق و به‌موقع بیماری و نهایتا درمان بیماران از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است(٤١). ضمنا با توجه به شیوع بیماری مهلک ایدز در جوامع بشری و از جمله ایران و گزارشات متعدد عفونت توام ایدز و لیشمانیوز احشایی از دنیا به‌خصوص جنوب اروپا، به‌نظر می‌رسد استفاده از روش‌های تشخیص سریع و ترجیها غیرتهاجمی از جایگاه خاصی برخوردار بوده و آشنایی با آن‌ها امری ضروری است(جدول۱)(۳۵و٤). انواع روش‌های تشخیصی کالاآزار که در این مقاله مرور شده است برای کالاآزار نوع مدیترانه‌ای می‌باشد و شامل روش‌های پارازیتولوژی، روش‌های تشخیص ایمنی، روش‌های مولکولی، روش‌های بیوشیمیایی و سایر روش‌ها می‌باشند.

□□□□□□□□□□

روش‌های پارازیتولوژی

الف- روش اسمیر مستقیم: در این روش از نمونه‌های آسپیراسیون مغزاستخوان، طحال و کبد گسترش‌های تماسی یا Immpression Smear تهیه می‌شود و با رنگ‌های گیمسا و رایت، پس از فیکس‌کردن با متانول، رنگ‌آمیزی می‌گردد. حساسیت روش اسمیر مغزاستخوان ٦٠ تا ۸۵ درصد و طحال بیش از ۹۵ درصد می‌باشد(۵). البته از روش آسپیراسیون طحال به‌علت خونریزی شدید و احتمال پارگی طحال در حال حاضر استفاده نمی‌شود. در روش مستقیم آماستیگوت‌های انگل لیشمانیا را می‌توان در داخل ماکروفاژها یا خارج از آن‌ها مشاهده نمود که دارای یک هسته و یک کینتوپلاست می‌باشند. ضمنا نمونه‌های بیوپسی کبد و طحال را می‌توان با رنگ‌های روتین بافت‌شناسی مانند هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی نمود.

ب- روش کشت: از همان نمونه‌های به‌دست آمده از بیمار که در قبل توضیح داده شد می‌توان وارد محیط‌های کشت نمود. محیط‌های کشت مورد استفاده شامل Evans, RPMI1640 Grace's, N.N.N, M199, Schneider's, و غیره می‌باشند. دمای مناسب برای انکوبه کردن انگل لیشمانیا در محیط کشت ۲۲ تا ٢٤ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. بعضی از این محیط‌های کشت تک‌فازی بوده از جمله Schneider, RPMI M199, و Grace's که بیشتر برای کشت انبوه انگل از آن‌ها استفاده می‌شود و بعضی دیگر از محیط‌های کشت دوفازی بوده از جمله N.N.N و Evans که برای جداسازی اولیه انگل و حمل از نقطه‌ای به نقطه دیگر از آن‌ها استفاده می‌شود(۵).

ج- روش تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی: از این روش معمولا به‌عنوان یک روش تشخیصی استفاده نمی‌شود چرا که چندین ماه طول می‌کشد تا به نتیجه مثبت دست یابیم اما به‌هر حال از حیواناتی از قبیل هامستر، موش و یا خوکچه‌هندی برای این منظور می‌توان استفاده نمود. هامستر طلایی بهترین حیوان آزمایشگاهی برای حفظ و نگهداری انگل‌های *(L.infantum، L.donovani, L.chagasi)* L.donovani complex می‌باشد. در این روش نمونه‌های آلوده به انگل (مانند مغزاستخوان بیمار و یا نمونه‌های آسپیراسیون

از کبد) تحت شـرایط اسـتریل و از طریق داخل صفاقی و یا تزریق داخل قلبی به حیوان حساس تلقیح می‌گردد. لازم به‌ذکر اسـت که فرم آماسـتیگوت و هم فرم پروماسـتیگوت انگل برای حیوان حسـاس آزمایشگاهی، آلوده‌کننده می‌باشد لذا از محیط‌های کشـت حاوی انگل نیز می‌توان به حیوان حساس تلقیـح نمـود و به بررسـی عفونت‌زایـی و ویرولانس انگل بپردازیـم. در این روش معمولا یـک ماه پس از تلقیح، علایم بیماری از جمله ضعف، لاغری، گوشه‌گیرشـدن و پژمرده‌شدن موهـای حیوان ظاهر می‌گردد که پس از آن می‌توان حیوان را به روش اخلاقی کشته و از اندام‌های مختلف انگل را جداسازی نماییم(٦).

□□□□□□□□□□

روش‌های تشخیص ایمنی (Immunodiagnosis):

این روش‌ها خود شامل دو قسمت به شرح ذیل می‌باشند:

الـف- شناسـایی آنتـی‌ژن (Antigen detection): ایـن روش از روش‌های شناسـایی آنتی‌بادی اختصاصی‌تر است، **دلایل برتری شـامل:** عـدم وجود واکنـش متقاطع، پیگیری بیماران پس از درمان و اسـتفاده از آن در تشـخیص بیماری در افرادی‌کـه در تولید آنتی‌بـادی نقص دارند از جمله بیماران ایدزی است. دکتر De Colmenares دو فراکسیون پلی‌پپتیدی شـامل ۷۵-۷۲ کیلودالتون و ۱۲۳کیلودالتون را در ادرار بیماران کالاآزاری گزارش نموده اسـت(۷) که حساسـیت فراکسـیون ۷۵-۷۲ کیلودالتونـی، ۹٦ درصـد و ویژگـی آن ۱۰۰ درصـد می‌باشد. از طرف دیگر، این آنتی‌ژن‌ها، سه هفته پس از درمان بیمـار، در ادرار وجود ندارند لذا آزمون بسـیار مناسـبی برای ارزیابی رونـد درمان بیماران می‌باشـد(۷). یک آزمون جدید آگلوتیناسیون لاتکس به‌نام KATEX با حساسیت ۱۰۰-٦۸ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد برای شناسایی آنتی‌ژن لیشمانیا (۱۵-۵ کیلودالتـون) در ادرار بیمـاران کالاآزاری معرفی شـده است که ضمنا با استفاده از روش Capture-ELISA و کاربرد آنتی‌بادی مونوکلونال نیز، این آنتی‌ژن شناسـایی می‌گردد(۸).

ب- شناسایی آنتی‌بادی (Antibody detection): روش‌های غیراختصاصی تشخیص کالاآزار بر اساس شناسایی آنتی‌بادی چندین دهه اسـت که اسـتفاده می‌شـود، که تعدادی از این روش‌ها عبارتند از Napier's formol gel یا Aldehyde test و Chopra antimony. پاییـن بـودن ویژگی و حساسـیت این تسـت‌ها آن‌هـا را تا حد زیـادی غیرقابـل اعتمـاد می‌کند، البته چندین روش تشـخیص ایمنی با ویژگی و حساسـیت بـالا وجـود دارد(۹). در فـرد بیمار بـا فعال شـدن Bcellها، سـطوح بالایـی از آنتی‌بادی‌هـای IgG و IgM علیه هاپتن و پروتئین‌های غیراختصاصی مختلـف تولید می‌گردد و وجود سـطوح بالای آنتی‌بادی علیـه آنتی‌ژن‌های انگل تشـخیص کالاآزار را آسـان می‌کنـد. چندیـن روش سـرولوژیکی برای تشـخیص ایـن آنتی‌بادی‌هـا وجـود دارد کـه اختصاصـی بـودن آنتی‌بادی علیـه آنتی‌ژن و یا اپی‌توپ در این تسـت‌ها اسـتفاده می‌شـود و حساسـیت تسـت بـه روش آزمایش و ویژگـی فقـط بـه آنتـی‌ژن بسـتگی دارد، **این تسـت‌ها عبارتنـد از:** ژل‌دیفیوژن، ثبوت‌کمپلمان، هماگلوتیناسـیون غیرمسـتقیم، IFA و کانترکارنـت ایمونوالکتروفـورز، به‌جز تسـت IFA بقیه تسـت‌ها به‌نـدرت برای تشـخیص روتین کالاآزار اسـتفاده می‌شـوند(۱۰،۱۱). در سـال ۱۹۸۸ تسـت DAT اصلاح‌شـده‌ای بـرای تشـخیص کالاآزار در چندیـن کشـور آندمیک مورد اسـتفاده قرار گرفت(۲۱). در این تست پروماسـتیگوت‌های انگل با تریپسـین مخلوط و سـپس در فرمالیـن فیکس شـده و با رنـگ آبی کوماسـی رنگ‌آمیزی و سـرم بیمـار با آنتی‌ژن انکوبـه و روز بعد، آگلوتیناسـیون مشاهده می‌گردد. طبق مطالعات تست DAT دارای حساسیت ۱۰۰-۹۱ درصـد و ویژگی ۱۰۰-۷۲ درصد می‌باشـد. معایب این تسـت، شرایط مشکل فیلدی، شکنندگی آنتی‌ژن، کمبود زنجیره سـرد و گوناگونی دستجات آنتی‌ژنی همراه با خواندن غیر اسـتاندارد تست اسـت و از آنجایی‌که تست DAT حتی مدت طولانی بعد از درمان مثبت می‌شـود ارزش تشـخیصی بالای آن به اثبات نرسیده است (۱۲،۱۳،۱٤،۱۵).

تسـت ELISA به‌عنـوان یک تسـت سـرلوژیک تقریبا برای تشـخیص همه بیماری‌هـای عفونی از جمله لیشـمانیازیس کاربرد دارد. حساسـیت این تسـت بالا اسـت اما ویژگی آن بسـتگی بـه آنتی‌ژن اسـتفاده شـده دارد و معمـولا آنتی‌ژن اسـتفاده شـده آنتی‌ژن محلـول خالص (CSA) اسـت، این آنتـی‌ژن از انجمـاد و ذوب مکـرر (٦-٤بار) سوسپانسـیون پروماسـتیگوت‌ها در بافرفسفات سالین (PBS) و به‌دنبال آن

سانتریفوژ سرد با دور 10000-20000g به‌دست می‌آید و مایع رویی به‌عنوان آنتی‌ژن محلول استفاده می‌شود و در پلیت‌های الیزا بعد از تخمین میزان پروتئین (100-5000ng/ml) پوشانده (Coat) می‌شود. حساسیت این تست با استفاده از این غلظت از آنتی‌ژن محلول خالص ۱۰۰-۸۰ درصد است اما واکنش‌های متقاطع با سرم بیماران تریپانوزومیازیس، توبرکلوزیس و توکسوپلاسموزیس گزارش شده است(۱۷،۱۶)، از طرف دیگر با استفاده از آنتی‌ژن‌های مختلف دیگر (66KDa - 72KDa 116KDa) ویژگی ۱۰۰ درصد به‌دست می‌آید، اما حساسیت تست ۳۷/۵ درصد است (۷،۱۸). طبق گزارش Palatnik-de-Souza و همکارانش استفاده از لیگاند مانوز- فوکوز به‌عنوان آنتی‌ژن در تست الیزا که گلیکوپروتئین 36KDa بیان شده در سراسر چرخه زندگی لیشمانیا (آماستیگوت و پروماستیگوت) است حساسیت تست را به ۱۰۰ درصد و ویژگی را به ۹۶ درصد می‌رساند(۱۹)، و در مطالعه‌ای مشخص شده است که حساسیت و ویژگی تست الیزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های محلول به‌دست آمده از پروماستیگوت‌های کشت داده شده در محیط فاقد پروتئین افزایش می‌یابد(۲۰). آنتی‌ژن نوترکیبی rK39 که در ناحیه Kinesin ژن انگل محفوظ است برای آنتی‌بادی‌های بیماران مبتلا به کالاآزار با عوامل L.donovani complex اختصاصی است و این آنتی‌ژن بسیار حساس است و نشان‌دهنده شروع بیماری حاد است(۲۱). ویژگی و حساسیت این آنتی‌ژن در تشخیص کالاآزار و PKDL توسط تست الیزا ۱۰۰ درصد است (۲۲). تیتر آنتی‌بادی ضد rK39 به‌طور مستقیم با فعالیت بیماری در ارتباط است و بنابراین برای پیگیری بیماران پس از درمان مناسب است و با درمان موفق‌آمیز، تیتر آن به سرعت پائین می‌آید و با بازگشت بیماری این تیتر به‌سرعت دوباره افزایش می‌یابد (۱۷). به‌خاطر موقعیت‌هایی که در مناطق آندمیک وجود دارد و از آن‌جایی که روش‌های پیچیده تشخیص نمی‌توانند به‌طور گسترده استفاده شوند بنابراین نیاز به روش تشخیصی مناسب، سریع و ساده با حساسیت و ویژگی خوب می‌باشد و لذا تست ایمونوکروماتوگرافیکی بر اساس آنتی‌ژن rK39 در موقعیت‌های مشکل فیلدی استفاده می‌شود که این آنتی‌ژن نوترکیب بر روی نوار کاغذی نیترو سلولزی مستطیلی شکلی به‌صورت باندی از قبل پوشانده می‌شود و آنتی‌پروتئین A بز در بالای باند آنتی‌ژنی روی کاغذ اضافه می‌شود، سپس از نوک انگشت بیمار به اندازه نیمی از قطره خون، سرم و یا پلاسما در نوک نوار قرار داده و سپس نوک نوار را در ۵-٤ قطره PBS غوطه‌ور می‌کنیم و بعد آن‌را روی اسلاید شیشه‌ای تمیزی گذاشته که در صورت وجود آنتی بادی در نمونه بیمار با کونژوگه (پروتئین A کلوئیدال طلایی) واکنش می‌دهد و حرکت توسط خاصیت موئینگی و واکنش با آنتی‌ژن rK39 باند صورتی‌رنگی را ایجاد می‌کند در نوار فرد بیمار، دو باند صورتی‌رنگ ایجاد می‌شود که باند بالایی مربوط به شاهد می‌باشد و باند پائین‌تر مربوط به بیمار است، این تست حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی ۹۸ درصد دارد (۲۳). البته طبق مطالعه‌ای در سودان همه بیماران مبتلا به کالاآزار که تست نواری rK39 آن‌ها منفی شد IgG علیه rK93 را توسط میکروالیزا نشان دادند (در تیترهای پائین) و در مطالعه‌ای هم در جنوب اروپا تست نواری rK39 فقط در ۷۱/٤ درصد بیماران مثبت بود و این تفاوت در حساسیت تست احتمالا به‌علت تفاوت پاسخ آنتی‌بادی در گروه‌های نژادی مختلف است(۲۵،۲٤)، البته از آن‌جایی که IgG ضد rK39 در سرم بیماران مدتی بعد از درمان هم وجود دارد بنابراین، این تست برای تشخیص بیمارانی با عود کالاآزار که تاریخچه‌ای هم از بیماری دارند، نباید استفاده شود. مشکل دیگر این تست این است که بیمار با تست نواری rK39 مثبت ممکن است به یک بیماری دیگر مبتلا بوده و این تست مثبت شود از جمله مالاریا، تب تیفوئید و توبرکلوزیس. با وجود این محدودیت‌ها، ثابت شده است که این تست برای تشخیص آلودگی حاد مناسب است و تنها روش تشخیصی موجود برای کالاآزار است که ویژگی و حساسیت قابل قبولی دارد و ارزان و ساده است و در هر شرایطی قابل انجام می‌باشد(۲۷،۲٦،۲۵). آنتی‌بادی‌های اختصاصی هم‌چنین توسط وسترن بلات نیز ردیابی می‌شوند و در این تست پروماستیگوت‌های *L.donovani* را پس از رشد و رسیدن به فازلگاریتمی لیز نموده و پروتئین محلول را بر روی ژل سولفات پلی‌آکریلامید دودسیل‌سدیم‌الکتروفورز نموده و پروتئین‌های جدا شده را بر

روی نوار نیترو سلولز قرار داده و با سرم بیمار مجاور می‌گردد، حساسیت این روش با استفاده از نشانگرهای آنتی‌بادی نشان‌دار افزایش می‌یابد، اما این روش وقت‌گیر، پرهزینه و از نظر تکنیکی سخت و زمان‌بر است(۲۶).

ج- آزمون پوستی(Skin testing): واکنش افزایش حساسیت تاخیری (DTH) یا ایمنی به‌واسطه Tcell، یک پاسخ ایمنی اختصاصی است. آزمون پوستی مونته نگرو (تست پوستی لیشمانین) روش تشخیصی برای واکنش افزایش حساسیت تاخیری ویژه لیشمانیازیس است، اما استفاده از این تست محدودیت‌هایی دارد(۲۷،۱۱). در این روش 0.5ml از پروماستیگوت‌های L.major کشته شده توسط فنول (پروماستیگوت ۵×۱۰^{۷}) در داخل پوست ساعد بیمار تزریق می‌شود و بعد از ٤٨ تا ٧٢ ساعت، قطر تورم ایجاد شده اندازه‌گیری می‌گردد، به‌عنوان شاهد در ساعد دیگر بیمار سرم فیزیولوژی به همراه فنول تزریق می‌شود، این تست در موارد حاد کالاآزار به خاطر عدم واکنش افزایش حساسیت تاخیری منفی است و تنها در مواردی که کالاآزار بهبود یافته است، مثبت می‌شود (۲۸،۲۷).

□□□□□□□□□□

روش‌های مولکولی

از سال ۱۹۸۰ به بعد تکنیک‌های جدید برای شناسایی انگل‌ها از جمله روش هیبریداسیون DNA، واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) و غیره توسعه یافت(۳۷). انجام روش PCR برای تشخیص و تعیین هویت عوامل ایجادکننده لیشمانیوز احشایی از سال ۱۹۹۰ به بعد آغاز و بر روی نمونه‌های خون، مغزاستخوان، طحال و غدد لنفاوی بیماران انجام گرفته است(۳۸). محققین با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی‌های ثابت موجود در مینی‌سیرکل‌ها (حلقه‌های کوچک) DNA کینتوپلاست (KDNA) گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا در بافت‌های مختلف بیمار به این نتیجه رسیدند که استفاده از DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا بسیار مناسب است چرا که کینتوپلاست, حاوی هزاران کپی از DNA مینی‌سیرکل می‌باشد. لذا در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های تشخیصی بر اساس PCR با حساسیت و ویژگی بسیار بالا متداول شده است. از جمله در مطالعه در سودان، روش PCR نسبت به روش میکروسکوپی برای شناسایی انگل در غدد لنفاوی و مغزاستخوان حساس‌تر گزارش شده است(۳۳) و هم‌چنین مطالعات زیادی به منظور تشخیص کالاآزار و تعیین هویت انگل در خون محیطی بیماران با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفته است که نتایج مطلوبی نیز به همراه داشته است از جمله در کشور ایران که توسط دکتر معتضدیان و همکاران بر روی خون بیماران مشکوک به کالاآزار انجام گرفته است. به‌طور کلی حساسیت و ویژگی روش PCR بر روی خون محیطی به ترتیب ۱۰۰-۷۰ درصد و ۱۰۰ درصد در نقاط مختلف دنیا (٤٠،٣٩) و در ایران ۸۵ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش شده است(۳) که این تفاوت به عوامل مختلفی از جمله نوع پرایمر، گونه انگل، میزان تراکم انگل در خون و غیره بستگی دارد. در استفاده از روش خون محیطی ترجیحا بایستی از بافی‌کوت خون استفاده شود چرا که حساسیت روش را تا ده برابر افزایش خواهد داد، هم‌چنین می‌توان از جمع‌آوری خون محیطی با استفاده از کاغذ صافی نیز در این روش استفاده نمود(٤٠). تکنیک PCR-ELISA روش بسیار حساسی است که علاوه بر تشخیص کالاآزار، می‌توان با استفاده از آن، سوش‌های L.donovani complex را شناسایی نمود به‌طوری‌که توانایی شناسایی ۰/۱ پروماستیگوت یا ۱ فیمتوگرم (fg) از مواد حاوی ژنوم انگل را دارد(٤٢). تکنیک دیگر F-PCR (Fluorogenic-PCR) می‌باشد که اساس آن پروب DNA فلورسنت می‌باشد که اختصاصی نواحی ثابت تحت واحدهای کوچک RNA ریبوزومی (rRNA) انگل لیشمانیا و استفاده از یک جفت پرایمر می‌باشد که این روش با حساسیت و ویژگی بالا و بسیار سریع در طی کمتر از ٢٤ ساعت انجام می‌شود(٤٣). تکنیک بعدی RFLP-PCR است که می‌توان از این روش در تعیین هویت انگل‌های جداشده از بیماران و هم‌چنین جهت تفکیک عود (Relapse) و عفونت مجدد (Reinfection) در بیماران بهبود یافته از کالاآزار استفاده نمود(٤٤). از جمله مزایای PCR در تشخیص کالاآزار، می‌توان به مواردی از قبیل تشخیص زودرس بیماری به خصوص در افراد بدون علامت بالینی و دارای عفونت مخفی، حساسیت و ویژگی بسیار بالا، روش غیرتهاجمی

جهت تشخیص بیماری در افراد دچار نقص سیستم ایمنی، ارزیابی درمان پس از دارو درمانی و تعیین گونه انگل اشاره نمود. از معایب آن نیز می‌توان نیاز به امکانات و تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی و افراد با تجربه اشاره نمود، از همه مهم‌تر گاهی در مناطق آندمیک افراد سالم با روش PCR، مثبت می‌شوند در حالی‌که هیچ‌گونه شکایتی از بیماری ندارند و ممکن است چنین مواردی اشتباها کالاآزار تشخیص داده شوند، لذا به‌طور کلی توصیه می‌شود که در مناطق آندمیک بیماری جهت تشخیص نهایی از هر دو روش DAT و PCR به‌طور هم‌زمان استفاده شود(٤٥).

□□□□□□□□□□

روش‌های بیوشیمیایی

این روش که بر اساس الکتروفورز ایزوآنزیم‌های انگل لیشمانیا از جمله سیستم‌های آنزیمی برتر شامل MDH, PGM، NH1، NH2, 6PGD, GPI بر روی ژل‌های استات‌سلولز، پلی آکریلامید و یا نشاسته و تعیین زایمودم‌های انگل می‌باشد، ضروری است که انگل را ابتدا در محیط‌های کشت به تولید انبوه رسانده و سپس با جمع‌آوری انگل اقدام به انجام این روش نمود که خود مستلزم معایب خاص خود می‌باشد. لازم به یادآوری است که هنوز روش استاندارد و قابل قبول جهت تعیین هویت انگل لیشمانیا و تعیین سوش‌های آن، همین روش می‌باشد(٣٦).

□□□□□□□□□□

عفونت توام لیشمانیوزیس و ایدز

وجود تظاهرات بالینی غیرمعمول کالاآزار در بیماران ایدزی یک چالش تشخیص در این بیماران می‌باشد، در واقع تب، اسپلنومگالی و هپاتومگالی در کمتر از نیمی از این بیماران دیده شده است، در این افراد، لیشمانیازیس به همراه درگیری معده-روده‌ای (معده-دئودنوم-کولون)، آب‌آوردگی شکم، جنب یا پریکارد، ابتلا به ریه‌ها، لوزه‌ها، پوست و حتی به‌صورت بیماری منتشره وجود دارد(٣٠،٢٩). اصول تشخیصی برای این بیماران همانند روش‌هایی است که برای بیماران کالاآزار غیرآلوده به ایدز به‌کار می‌رود، آماستیگوت‌ها ممکن است در محل‌های غیرمعمول از جمله در نمونه‌هایی از شستشوی مایع برونش-آلوئولار (BAL)، مایع جنب و یا بیوپسی نمونه‌هایی از دستگاه گوارش و بافی‌کوت خون محیطی دیده شوند، حساسیت تست‌های ایمونولوژیکی مثل IFA و ELISA برای بیماران ایدزی مبتلا به کالاآزار پائین است از این‌رو PCR خون و یا بافی‌کوت روش تشخیصی مفیدی برای این بیماران می‌تواند باشد(٣٤،٣٣،٣٢،٣١،٢٩).

ویژگی(٪)	حساسیت(٪)	تست و روش یا بافت استفاده شده
		روش‌های تشخیص ایمنی
		شناسایی آنتی‌بادی
٦٠-٧٣	٧٠-٨٠	تست ثبوت کمپلمان
٩٠-٩٥	٧٠-٧٥	ایمونودیفیوژن
٥٠-٧٠	٨٠-٩٠	کانتر کارنت ایمونوالکتروفورز
٨٠-٩٠	٧٣-٧٥	هماگلوتیناسیون غیر مستقیم
٧٠-٨٩	٥٥-٧٠	ایمونوفلورسانت غیر مستقیم
٧٢-٩٥	٩١-١٠٠	آگلوتیناسیون مستقیم
٨٤-٩٥	٨٠-١٠٠	الیزا با CSA
٩٠-٩٥	٦٣-١٠٠	الیزا با لیگاند مانوز-فوکوز
١٠٠	١٠٠	الیزا با آنتی‌ژن rK39
٨٨-٩٨	١٠٠	تست نواری سریع با rK39[1]
٩٧-١٠٠	٦٧-٧١	تست نواری سریع با rK39[2]
تحت ارزیابی	٦٨-١٠٠	**شناسایی آنتی‌ژن** KATEX
تحت ارزیابی		**شناسایی DNA**
	٩٦	PCR با پرایمر LD_1
	١٠٠	خون
	٩٣/٨	مغز استخوان
		پوست

١-گزارش شبه قاره هند ٢-گزارش خارج از شبه قاره هند

جدول ١- حساسیت و ویژگی روش‌های مختلف برای تشخیص کالاآزار

References:

۱ – فخار م ، محبعلی م ، بارانی م : معرفی یک کانون آندمیک کالاآزار در استان قم و بررسی سرواپیدیولوژیک عفونت لیشمانیای احشایی در انسان و مخازن حیوانی (سگ) این منطقه ، مجله ارمغان دانش ، سال نهم ، ۱۳۸۳ ، (۳۳) ، ۵۲-۴۳ .

۲ – ادریسیان غ ح ، محبعلی م ، حجاران ه و همکاران : بیماریابی کالا آزار با استفاده از روش آگلوتیناسیون مستقیم، مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، سال اول ، ۱۳۸۱ (۱): ۵۱-۹.

۳ – مودب ا ، البرزی ع ، بهبهانی ع ، شاهیان جهرمی ف ، معتضدیان م ح . تشخیص زودرس لیشمانیوز احشایی با استفاده از خون محیطی و روش واکنش زنجیره های پلیمراز . مجله دانشکده علوم پزشکی همدان ، سال دهم ، شماره ٤ ، ۱۳۸۲: ۲۲-۱٦ .

4 - Mohebali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I.,Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Manouchehri, K.,Avizeh, R. & Fakhar, M. Epidemiologicalaspects of canine visceral leishmaniasis in the IslamicRepublic of Iran. Vet. Parasitol, 2005. 129, 243–251

5 - Sundar, S., K. Pai, R. Kumar, K. P. Tripathi, A. A. Gam, M. Roy, and R. T. Kenny. 2001. Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from Northeast India. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:193–196.

6 – Bray, R. S. Experimental leishmaniasis of mammals, p. 425–464. In W. Peters and R. Killick-Kendrick (ed.), the leishmaniasis in biology and medicine, vol. 1. Academic Press, New York , N.Y.

7 - De Colmenares, M. M . Portus, C. Riera, M. Gallego, M. J. Aisa, S. Torras, and C. Munoz. 1995. Detection of 72–75 kD and 123 kD fractions of leishmania antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 52:427–428.

8 - Attar, Z. J., M. L. Chance, S. el-Safi, J. Carney, A. Azazy, M. El-Hadi, C. Dourado, and M. Hommel. 2001. Latex agglutination test for the detection of Urinary antigens in visceral leishmaniasis . Acta Trop. 78:11–16

9 - Bray, R. S. 1976. Immunodiagnosis of leishmaniasis, p . 65–76 . In S. Cohen and E. H. Sadun (ed.), Immunology of parasitic infections. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom .

10 - Sinha, R., and S. Sehgal. 1994. Comparative evaluation of serological tests in Indian kala-azar. J. Trop. Med. Hyg. 97:333–340.

11 - World Health Organization. 1995. Bridging the gap. World Health Report . World Health Organization, Geneva, Switzerland .

12 - Harith, A. E., A. H. Kolk, J. Leewenburg, R. Muigai, E. Huigen, T. Jelsma, and P. A. Kagar. 1988. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. 26:1321–1325.

13 - Zijlstra, E. E., M. S. Ali, A. M. el-Hassan, I. A. el-Toum, M. Satti, H. W. Ghalib, and P. A. Kager. 1991. Direct agglutination test for diagnosis and seroepidemiological survey of kala-azar in the Sudan. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85:474–476.

14 - Zijlstra, E. E., M. S. Ali, A. M. el-Hassan, I. A. el-Toum, M. Satti, H. W. Ghalib, and P. A. Kager. 1992. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg. 86:505–507.

15 - Sundar, S., G. S. Singh, V. P. Singh, N. Singla, K. Kumar, and V. K. Vinayak.1996 . Comparative evaluation

of DAT, IFAT and micro-ELISA in the serodiagnosis of Indian kala-azar. J. Parasitic Dis. 20:41–43.
16 - Choudhry, A., P. Y. Guru, R. P. Saxena, A. Tandon, and K. C. Saxena. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Bhadohi (Varanasi), India. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84:363–366.
17 - Kumar, R., K. Pai, K. Pathak, and S. Sundar. 2001. Enzyme-linked immunosorbentassay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:1220–1224.
18 - Vinayak, V. K., D. Mahajan, R. C. Sobti, N. Singla, and S. Sunder. 1994. Anti-66 kDa anti-leishmanial antibodies as specific immunodiagnostic probe for visceral leishmaniasis. Indian J. Med. Res. 99:109–114.
19 - Palatnik-de-Sousa, C. B., E. M. Gomes, E. Paraguail-de-Souza, M. Palatnik, K. Leez, and R. Borojevic. 1995. Leishmania donovani: titration of the antibodies to the fucose mannose ligand as an aid in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89:390–393.
20 - Ryan, J. R., A. M. Smithyman, G. H. Rajasekariah, L. Hochberg, J. M.
Stiteler, and S. K. Martin. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay based
On soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG
Antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis . J. Clin. Microbiol. 40:1037–1043.
21 - Qu, J. Q., L. Zhong, M. Masoom-Yasinzai, M. Abdur-Rab, H. S. Aksu, S. G. Reed, K. P. Chang, and A. Gilman-Sachs. 1994. Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of Leishmania kinesin. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88:543–545.
22 - Singh, S., A. Gilman-Sachs, K. P. Chang, and S. G. Reed. 1995. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. J. Parasitol. 81:1000–1003.
23 - Sundar, S., S. G. Reed, V. P. Singh, P. C. K. Kumar, and H. W. Murray.1998. Rapid accurate field diagnosis of visceral leishmaniasis . Lancet 351:563–565.
24 - Zijlstra, E. E., Y. Nur, P. Desjeux, E. A. Khalil, A. M. el-Hassan, and J.
Groen . 2001. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39
strip test: experience from the Sudan. Trop. Med. Int. Health 6:108–113.

25 - Jelinek, T., S. Eichenlaub, and T. Loscher. 1999. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis.Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18:669–670.
26 - Singh, S. 1996. Recent advances in the laboratory diagnosis of leishmaniasis,p. 39–56. In S. Sundar (ed.), Indian kala-azar. Khandelwal Offsets, Varanasi, India.
27 - Haldar, J. P., S. Ghose, K. C. Saha, and A. C. Ghose. 1983. Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. Infect. Immun. 42:702–707.
28 - Marsden, P. D. 1986. Mucosal leishmaniasis (espundia Escomel 1911).Trans. R . Soc. Trop. Med. Hyg . 80: 859–876.
29 - Alvar, J., C. Can—avate, B. Gutie´rrez-Solar, M. Jime´nez, F. Laguna, R. Lo´pez- Ve´lez, R. Molina, and J. Moreno. 1997. Leishmania and human immunode- ficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin. Microbiol. Rev. 10:298–319.

30 – Rosenthal, E., P. Marty, P. del Giudice, C. Pradier, C. Ceppi, J. A. Gastaut, Y. L. Fichoux, and J. P. Cassuto. 2000.
HIV and leishmania coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of leishmania. Clin. Infect. Dis. 31:1093–1095. VOL. 9, 2002 MINIREVIEWS 957
31 – Albrecht, H. 1998. Leishmaniasis: new perspectives on an underappreciated opportunistic infection. AIDS 12: 2225–2226.
32 – Berhe, N., A. Hailu, D. Wolday, Y. Negessey, P. Cenini, and D. Frommel. 1995. Ethiopian visceral leishmaniasis patients co–infection with human immunodeficiency virus. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89:205–207.
33 – . Andresen, K., S. Gasim, A. M. El. Hassan, E. A. Khalil, D. C. Barker, T. G. Theander, and A. Kharazmi. 1997. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymphnode samples from patients from the Sudan. Trop. Med. Int. Health 2:440–444.
34 – Rosenthal, E., P. Marty, I. Poizot–Martin, et al. 1995. Visceral leishmaniasis and HIV co–infection in Southern France. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89:159–162.
35 – Sundar S, Rai M. 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis . Clin .Diag.Lab , Immuno. 9(5); 951–958.
36 – Hatam G.R, et al. Isoenzyme characterization of Iranian Leishmaniaisolates from cutaneons Leishmaniasis. Iranian Journal of Science & Transaction A. 2005, (29), A1. 65–70
37– Lopez, M., Y. Montoya, M. Arana, F. Cruzalegui, J. Braga, L. Llanos– Cuentas, G. Romero, and J. Arvalo. 1988. The use of non–radioactive DNA probes for the characterization of leishmania isolates from Peru. Am. J. Trop. Med. Hyg. 38:308–314.
38 – Adhya, S., M. Chatterjee, M. Q. Hassan, S. Mukherjee, and S. Sen. 1995. Detection of leishmania in blood of early kala–azar patients with the aid of polymerase chain reaction. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89:622–624
39 – Osman, O. F., L. Oskam, E. E. Zijlstra, N. C. M. Kroon, G. J. Schoone, E.–T. A. G. Khalil, A. M. El–Hassan, and P. A. Kager. 1997. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. 35:2454–2457.
40 – Lachaud, L., E. Chabbert, P. Dubessay, J. Reynes, J. Lamothe, and P. Bastein. 2001. Comparison of various sample preparation methods of PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. J. Clin. Microbiol. 38:613–617.
41 – Eddrissian GH, Hajaran H, Mohebali M, et al. Application and evaluation of direct agglutination test in serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in man and canine reservoir in Iran. Iran J Med Sci 1996; 21:119–24.
42 – Martin Sanchez, J., M. C. Lopez–Lopez, C. Acedo–Sanchez, J. J. Castro– Fajardo, J. A. Pineda, and F. Morillas–Marquez. 2001. Diagnosis of infection with Leishmania infantum using PCR–ELISA. Parasitology 122:607–615.
43 – Wortmann, G., C. Sweeny, H. S. Houng, N. Aronson, J. Stiteler, J. Jackson, and C. Ockenhouse. 2001. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:583–587.
44 – Morales, M. A., C. Chicharro, M. Ares, C. Canavate, D. C. Barker, and J. Alvar. 2001. Molecular tracking of infections by Leishmania infantum. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 95:104–107.
45 – Le Fichoux, Y., J. F. Quaranta, J. P. Aufeuvre, A. Lelievre, P. Marty, I. Suffia, D. Rousseau, and J. Kubar. 1999. Occurrence of Leishmania infantum parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. J. Clin. Microbiol. 37:1953–1957.