کارایی روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در تشخیص زودرس و شناسایی موارد بدون علامت بیماری لیشمانیوز احشایی درانسان و سگ

نویسندگان:

مهدی فخار*[۲،۱]، محمد حسین معتضدیان[۲]، قاسم عسگری[۲]، محسن کلانتری[۲]، غلامرضا حاتم[۲]، محسن‌علی اکبرپور[۳]، محمدعلی قره چاهی[۳]

۱- بخش انگل شناسی و قارچ شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲- بخش انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۳- بخش بیماری های واگیر، مرکز بهداشت استان فارس، شیراز، ایران

فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی جهرم، دوره هشتم، شماره دو ،تابستان ۸۹

چکیده:

مقدمه: مطالعه حاضر به منظور شناسایی موارد بدون علامت بیماری لیشمانیوز احشایی در انسان و سگ با استفاده از روش های واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) و سرولوژی در شهرستان داراب از استان فارس انجام گرفت.

روش کار:

در این مطالعه توصیفی- مقطعی از کلیه کودکان زیر ده سال و ۱۰ درصد بالغین و ۲۰ درصد سگ های صاحب دار به صورت تصادفی نمونه گیری شد. برای تعیین میزان شیوع عفونت لیشمانیایی احشایی در انسان و سگ از روش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) و روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) استفاده شد. اطلاعات بدست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم افزارهای Epi Info 2000 و SPSS نسخه ۹ مورد تجزیه قرار گرفت.

یافته ها:

در این بررسی ۳۷۶ نمونه پلاسمای انسانی (۳۱۲ نمونه از مناطق روستایی و ۶۴ نمونه از مناطق عشایری) و ۲۳ نمونه پلاسمای سگ به روش آگلوتیناسیون مستقیم مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع نمونه های انسانی ۵ مورد (۱/۳۳ درصد) از نظر سرولوژی مثبت و از مجموع نمونه های سگ، یک قلاده (۴/۳ درصد) دارای تیتر مساوی ۱:۳۲۰ بود. همچنین با روش PCR در خون۵ قلاده سگ (۲۱/۷ درصد) و ۳۲ نفر (۸/۵ درصد) از افراد تحت مطالعه DNA کینتوپلاستی انگل لیشمانیا شناسایی و گونه آنها *L .infantum* تعیین شد.

بحث و نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش PCR با پرایمرهای RV1 و RV2 (اختصاصی جنس) بر روی خون محیطی، روش مناسبی برای تشخیص زودرس بیماری در انسان و سگ و همچنین یافتن موارد بدون علامت به خصوص در مناطق آندمیک می باشد.

واژگان کلیدی: لیشمانیوز احشایی ، عفونت انسانی، عفونت سگ ها، DAT، PCR

مقدمه:

لیشمانیوزها که در ردیف بیماری های انگلی قابل انتقال بین انسان و حیوان هستند، در اغلب نقاط جهان وجود دارند و به صورت ضایعات پوستی (سالک)، احشایی (کالا آزار) و جلدی- مخاطی بروز می کنند [۱].

عامل اصلی بیماری کالا آزار در منطقه مدیترانه و از جمله ایران *Leishmania infantum* می باشد. مخازن آن را سگ و سگ- سانان (روباه و شغال) و ناقلین آن را گونه های مختلف پشه خاکی تشکیل می دهند. این بیماری در ایران اغلب در کودکان زیر ده سال (۹۸ درصد) دیده می شود و به طور کلی بیش ترین موارد بیماری مربوط به عشایر استان های مختلف کشور می باشد. بیماری کالا آزار در بیش تر مناطق ایران به صورت اسپورادیک (تک گیر) و در مناطقی از استان های اردبیل

* نویسنده مسئول، آدرس : ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی، صندوق پستی: ۱۶۶۵-۴۸۱۷۵

تلفن تماس: ۰۹۱۲۲۵۲۲۷۸۲ صندوق پستی: ۱۶۶۵-۴۸۱۷۵ پست الکترونیک: mahdif53@yahoo.com

تاریخ ارسال: ۱۳۸۸/۹/۱۷ تاریخ اصلاح: ۱۳۸۹/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۲۵

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-03]

[DOI: 10.29252/jmj.8.2.1]

(مشکین شهر، دشت مغان و روستای ثمرین)، آذربایجان شرقی (اهر و کلیبر)، فارس (فیروز آباد ، جهرم و نور آباد)، بوشهر (برازجان و خورموج) و قم (بخش خلجستان) به صورت آندمیک دیده می شود [۶-۲].

به طور کلی تشخیص بیماری لیشمانیوز احشایی یا کالاآزار به دلیل این که تظاهرات بالینی آن با سایر بیماری های شایع از قبیل مالاریا، تیفوئید و سل مشابه بوده، پیچیده است. گاهی این بیماری ها به طور هم زمان به صورت عفونت توأم در شخص مبتلا به کالاآزار دیده می شوند. از سوی دیگر به دلیل وجود هایپرسلولاریتی و معکوس شدن رده میلوئید به اریتروئید، پلاسماسیتوز، مگاکاریوسیت ها، نکروز و فیبروز در آسپیراسیون و بیوپسی مغز استخوان در بسیاری از موارد بیماری کالاآزار با انواع لوکمی ها، لمفوما، آنمی ها (همولیتیک، مگالوبلاستیک)، اختلالات میلوپرولیفراتیو و هموگلوبینوپاتی ها اشتباه شده و منجر به تشخیص نادرست و در نتیجه درمان اشتباهی می شود. در بسیاری از این موارد، تشخیص نادرست منجر به مرگ بیمار خواهد شد [۸ و ۷]. همچنین در مناطق آندمیک درصد بسیاری از موارد بیماری را افراد بدون علامت تشکیل می دهند و عده ای نیز به صورت تحت بالینی دچار بیماری می شوند که این مسئله نیز تشخیص را به دلیل این که بسیاری از این افراد با استفاده از آزمون های سرولوژی دارای تیتر مثبت و یا در مرز مثبت هستند اما شکایتی از بیماری ندارند و در مواردی نیز افراد به خودی خود بهبود می یابند و نیاز به درمان ندارند به چالش می کشاند [۱۰ و ۹].

روش های سرولوژیک مختلفی در تشخیص بیماری همراه با علائم بالینی بکار می روند که از آن میان می توان به آزمایش های آگلوتیناسیون مستقیم، الیزا و ایمینوفلورسنت اشاره نمود. از کل این آزمایش ها، آزمایش های آگلوتیناسیون مستقیم (Direct Agglutination Test - DAT) از حساسیت بالایی برای مطالعات سرواپیدمیولوژیک برخوردار بوده و با توجه به سهولت انجام به عنوان یکی از آزمایش های انتخابی در تشخیص بیماری بکار می رود [۱۲ و ۱۱].

در سال های اخیر، استفاده از روش های تشخیصی بر اساس PCR با حساسیت و ویژگی بسیار بالا متداول شده است. در همین راستا مطالعات زیادی به منظور تشخیص و تعیین هویت انگل لیشمانیا در خون محیطی بیماران مبتلا به کا لا آزار انجام گرفته است [۱۳]. از مزایای استفاده از PCR در تشخیص کالاآزار می توان به مواردی از قبیل تشخیص زودرس بیماری به خصوص در افراد بدون علامت بالینی و یا دارای عفونت مخفی، افراد دچار سرکوب سیستم ایمنی (از جمله ایدز و بیماری های زمینه ای دیگر) ، حساسیت و ویژگی بسیار بالا، روش غیر تهاجمی، ارزیابی درمان پس از دارو درمانی و تعیین گونه انگل اشاره نمود [۱۶-۱۴].

با توجه به اینکه عدم تشخیص و درمان به موقع ممکن است تا صد درصد باعث مرگ و میر بیماران به ویژه کودکان شود، لذا تشخیص دقیق و زودهنگام بیماری از اهمیت ویژه ای برخوردار است. بنابراین دستیابی به روش یا روش های کارآمد، دقیق، آسان و در عین حال سریع در خصوص تشخیص و شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری امری است ضروری که بخشی از مطالعه حاضر نیز در راستای تامین چنین هدفی بوده است.

بخش رستاق در ۶۵ کیلومتری شهرستان داراب در جنوب شرقی استان فارس واقع شده است که ا طراف آن، منطقه سکونت ییلاقی عشایر عرب (ایل خمسه) می باشد. هدف اصلی از این مطالعه، شناسایی موارد بدون علامت بیماری لیشمانیوز احشایی درانسان و سگ با استفاده از روش های واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) و سرولوژی و همچنین بررسی وضعیت بیماری کالا آزار در روستاها و مناطق عشایری (ایل خمسه) شهرستان داراب (روستاهای بخش رستاق و چهار منطقه عشایری آن) از استان فارس بود .

روش کار:

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، جامعهٔ مورد پژوهش ساکنین روستاهای بخش رستاق و چهار منطقه عشایری شهرستان داراب از استان فارس بود. در این مطالعه گروه هدف بیماری کالا آزار، شامل کودکان ۱۰ سال و کمتر و تعدادی از بزرگسالان مناطق مورد بررسی بوده است. نمونه گیری به صورت کلی از تمام کودکان زیر ده سال و ۱۰ درصد بالغین و ۲۰ درصد سگ های صاحبدار مناطق مذکور به صورت تصادفی انجام شد (این تعداد بر اساس فرمول حجم نمونه و مطالعات قبلی در ایران انتخاب شدند). این مقادیر با توجه به مطالعات محققین دیگر در سایر مناطق کشور انتخاب شده است [۶-۲]. برای بررسی افراد انتخاب شده با کمک بهورزان منطقه، والدین و فرزندانشان به مرکز بهداشتی درمانی هر روستا هدایت شده و سپس اقدام به خون گیری از ورید دست آن ها به میزان ۲-۱ سی سی در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA شد. در مورد کودکان در محدوده ی سنی بین ۶ ماه تا یک سال با استفاده از لانست و لوله های میکرو هماتوکریت از پاشنه پا خون گیری بعمل آمد. نمونه های خون درون فلاسک یخ دار به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی شیراز منتقل و پس از جمع آوری پلاسمای حاصل و همچنین بافی کت، به طور جداگانه در ۲۰- درجه سانتی گراد تا موقع انجام آزمون سرولوژی و PCR نگهداری شدند. جمع آوری اطلاعات از طریق پرسشنامه ای که از قبل آماده شده

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-03]
[DOI: 10.29252/jmj.8.2.1]

بود انجام گرفت.

برای تهیه نمونه ی خون از سگ های تحت بررسی، ابتدا سگ مورد نظر را با وسایل مخصوص مهار کرده و به صورت استریل از ورید سافن با سرنگ ۵ سی سی خون گیری بعمل آمد. سپس نمونه ی خون به داخل لولهٔ های آزمایش حاوی ماده ضد انعقاد EDTA منتقل شده و برچسب اطلاعات مربوط به حیوان روی لوله چسبانیده شد. پس از جدا نمودن پلاسما و همچنین بافی کت، به طور جداگانه در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بعد از انتقال نمونه های انسانی و حیوانی (سگ) به آزمایشگاه، برای تعیین میزان شیوع عفونت لیشمانیایی احشایی از روش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم و جهت شناسایی موارد بدون علامت از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز در انسان و سگ استفاده شد.

آنتی ژن آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم از آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت براساس روش دکتر هریت (Harith) و همکاران در سال ۱۹۸۶ [۱۷] تهیه شد.

داده های بدست آمده از نتایج آزمایش DAT و سایر داده های فرم جمع آوری اطلاعات با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۹، Epi Info 2000 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. در تحلیل داده ها از جداول فراوانی مطلق و آزمون آماری مجذور کای استفاده شد.

در مورد نمونه های خون بدست آمده از انسان و سگ، پس از سانتریفوژ و جدا سازی پلاسما از آن، بافی کت بدست آمده که حدوداً ۲۰۰ میکرولیتر می باشد به منظور انجام روش PCR جهت شناسایی KDNA (DNA کینتوپلاست) انگل لیشمانیا در آن استفاده شد. پس از انتقال بافی کت به لوله های ۱/۵ سی سی اپندورف، اقدام به استخراج DNA با روش استفاده از Lysis buffer و پروتئیناز K بر اساس روش فخار و همکاران [۱۵] شد و سپس با استفاده از پرایمرهای عمومی RV1 (5`- CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G-3`) و RV2 (5` - CCA CCT GGC CTA TTT TAC ACC A-3`) قطعه ثابت (۱۴۵جفت باز) از حلقه های کوچک (minicircles) DNA کینتوپلاستی انگل لیشمانیا تکثیر و در یک مرحله روش PCR انجام شد [۱۸]. پس از انجام عمل PCR، محصول بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. سپس با توجه به شاخص وزنی و مقایسه باند حاصل از نمونه ها با گونه های مرجع انگل لیشمانیا، جنس انگل تعیین شد. همچنین جهت تعیین گونه انگل با استفاده از پرایمرهای اختصاصی LINR4 (5-GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3) و LIN17 (5-TTTGAACGGGATTTCTG-3) قطعه متغیر از حلقه های کوچک (minicircles) DNA کینتوپلاستی انگل لیشمانیا تکثیر و در یک مرحله روش PCR اختصاصی انجام شد [۱۹].

مواد لازم برای PCR نمونه ای به حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از پرایمرهای معرفی شده توسط لاچود (Lauchaud) و همکاران [۱۸] با انجام تغییراتی در تعداد سیکل ها، مواد به کار رفته و اصلاح آن بر اساس نمونه های بالینی استفاده شد. ضمناً قبل از گذاشتن درون دستگاه ترموسیکلر، مقدار ۲۰ میکرولیت ر از روغن معدنی مخصوص PCR جهت جلوگیری از تبخیر بافرها به هر لوله اضافه شد. سپس نمونه ها به دستگاه ترموسیکلر CG1-96 ۹۶ گوده ای منتقل و برنامه به دستگاه داده شد.

یافته ها:

در این مطالعه، ۳۷۶ نمونه پلاسمای انسان (۳۱۲ نمونه از مناطق روستایی و ۶۴ نمونه از مناطق عشایری) با روش آگلوتیناسیون مستقیم مورد بررسی قرار گرفتند. ۳۵۵ نمونه (۹۴/۴ درصد) از گروه های سنی ۱۰ سال و پایین تر و ۲۱ نمونه (۵/۶ درصد) از گروه های سنی بالای ۱۰ سال تهیه شد. ۱۶۴ نفر (۴۳/۶ درصد) مذکر و ۲۱۲ نفر (۵۶/۴ درصد) مونث بودند. حداقل سن ۴ ماه و حداکثر آن ۳۱ سال بود. از مجموع نمونه ها، ۵ مورد (۱/۳۳ درصد) دارای تیتر مثبت بودند. از این تعداد ۴ نفر در گروه سنی ۵-۲ سال و ۱ نفر در گروه سنی ۱۰-۵ سال قرار داشتند. در گروه سنی بالاتر از ده سال و گروه های سنی کمتر از یک سال و ۲-۱ سال موردی از بیماری مشاهده نشد.

از ۵ مورد با نتیجه تیتر مثبت، ۴ مورد دارای سابقه قبلی ابتلاء به کالاآزار بودند. به عبارت دیگر از کل افراد جامعه هدف، ۱/۰۶ درصد دارای سابقه قبلی ابتلاء بودند.

فراوانی نسبی تیتر مثبت در جنس مذکر ۱/۲ درصد (۲ مورد) و در جنس مونث ۱/۴ درصد (۳ نفر) بود که از نظر آماری اختلاف معنی داری بین دو جنس مشاهده نشد(P = ۰/۸۶).

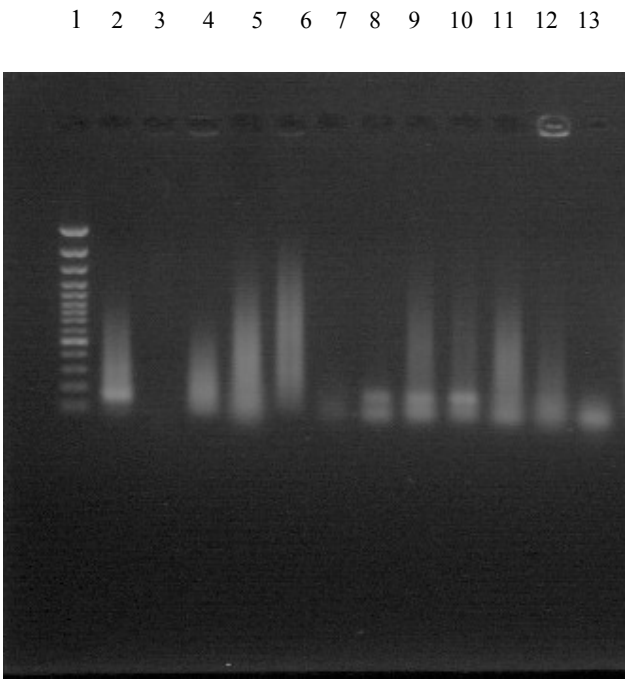
تمام افراد دارای تیتر مثبت، متعلق به مناطق عشایری بنگل و بیخ و بنگل بودند و مورد مثبتی از روستای رستاق و توابع آن یافت نشد.

همچنین تعداد ۴ نفر (۱/۰۶ درصد) از افراد مورد پژوهش ساکن روستای رستاق، تیتر ۱:۱۶۰۰را نشان دادند که هیچ کدام دارای سابقه قبلی ابتلاء به کالاآزار نبودند و پس از پی گیری مجدد، افزایش تیتر مشاهده نشد. هیچ یک از افراد دارای تیتر مثبت، شکایتی از بیماری نداشته و همچنین سابقه مسافرت به مناطق آندمیک نداشتند. از مجموع نمونه های بافی کوت (۳۷۶ نمونه)، تعداد ۳۲ نمونه (۸/۵ درصد) (۶ نمونه مربوط به روستای رستاق و ۲۶ نمونه مربوط به مناطق عشایری) از نظر وجود DNA

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-03]

[DOI: 10.29252/jmj.8.2.1]

کینتوپلاستی (KDNA) در خون محیطی مثبت شدند (تصویر ۱).



تصویر ۱ : نتیجه الکتروفورز محصولات PCR اختصاصی نمونه های خون انسان با پرایمرهای RV1 و RV2 در ژل آگاروز ۱/۵ درصد

۱- مارکرbp ۱۰۰
۲- کنترل مثبت (bp ۱۴۵)
۳- کنترل منفی

۲۶ نمونه مثبت متعلق به مناطق عشایری کوه نمک (۲ مورد)، بنگل (۱۸ مورد) و بیخ و بنگل (۶ مورد) بودند. در این مناطق به طور کلی ۶۴ نمونه تهیه شد که ۲۶ نمونه (۴۰/۶ درصد) آن از نظر PCR مثبت بود.

در میان ۳۲ نمونه مثبت، ۱۴ مورد (۴۳/۷ درصد) جنس مذکر و ۱۸ مورد (۵۶/۳ درصد) متعلق به جنس مونث بودند. لذا فراوانی نسبی عفونت در جنس مذکر ۸/۵۳ درصد و در جنس مونث ۸/۵ درصد تعیین شد که بدین ترتیب از نظر آماری اختلاف معنی داری بین دو جنس مشاهده نشد(P =۰/۹۸). از نظر گروه های سنی، در گروه سنی زیر یک سال ۱ مورد، محدوده ی سنی بین ۲-۱ سال ۳ مورد، ۵-۲ سال ۸ مورد، ۱۰-۵ سال ۱۳ مورد و بزرگ تر از ۱۰ سال ۷ مورد مشاهده شد. در میان افراد مثبت، ۶ مورد دارای سابقه قبلی کالاآزار بودند. از نظر علائم بالینی هیچ کدام از موارد، شکایتی از عفونت نداشتند. همچنین ۴ مورد نیز هم از نظر PCR و هم از نظر سرولوژی(DAT) مثبت بودند. در ضمن با استفاده از پرایمرهای LIN17 و LINR4 برای تعیین گونه انگل، انگل لیشمانیا اینفانتوم در خون محیطی افراد یافت شد. در مطالعه ایی که بر روی مخازن حیوانی (سگ) انجام گرفت، تعداد ۲۳ قلاده سگ صاحبدار از نظر سرولوژی به روش آگلوتیناسیون مستقیم مورد بررسی قرار گرفتند که ۷ قلاده (۳۰/۴ درصد) دارای تیتر ۱:۱۶۰ و یک قلاده (۴/۳ درصد) دارای تیتر بالاتر و مساوی ۱:۳۲۰ بودند. تمام نمونه های مثبت سرمی (تیتر ۱:۳۲۰ ≥) متعلق به سگ های اهلی عشایر بودند. ازنظر علائم بالینی، ۲ مورد (۲۵ درصد) از سگ های سرم مثبت دارای علائم بالینی شامل ریزش مو، لاغری شدید، ضایعه پوستی و بزرگی غدد لنفاوی بوده و بقیه موارد مثبت (۷۵ درصد) فاقد هرگونه علائم بالینی مشخص بودند. از نظر گروه های سنی، بیش ترین میزان شیوع سرمی (۶۲/۵ درصد) در سگ های گروه سنی ۵-۱ سال بود . از نظر جنس، اختلاف معنی داری بین دو جنس مشاده نشد و میزان عفونت در هر دو جنس یکسان بود.

همچنین با روش PCR (پرایمرهای عمومی RV1 و RV2) ، در خون ۵ قلاده سگ (۲۱/۷ درصد) DNA کینتوپلاستی انگل لیشمانیا شناسایی شد که تنها ۳ قلاده از آن ها با روش DAT نیز دارای تیتر سرمی ۱:۱۶۰ بودند. با استفاده از پرایمرهای LIN17 و LINR4 گونه انگل، ل. اینفانتوم (L.infantum) تعیین شد که تنها ۳ قلاده از آن ها با روشDAT نیز دارای تیتر سرمی ۱:۱۶۰ بودند.

بحث و نتیجه گیری:

از مجموع نمونه های انسانی ۵ مورد (۱/۳۳ درصد) دارای تیتر مثبت سرولوژی بودند که همگی در گروه سنی ۵-۲ سال قرار داشتند. در مطالعه هاشمی نسب بر روی ۱۳۰ بیمار مبتلا به کالا آزار در استان فارس یک سوم بیماران زیر ۳ سال سن داشتند [۲۰]. در مطالعهٔ سلیمان زاده و همکارانش ۱۷ درصد کودکان مبتلا زیر یک سال بودند [۲۱]. اما در مطالعه حاضر، افراد سرم مثبت در گروه سنی ۵-۲ درصد بودندکه علل آن را می توان ابتلاء قبلی، درمان و یا موارد تحت بالینی ذکر نمود. زیرا آنتی بادی های علیه عفونت لیشمانیا که توسط DAT شناسایی می شوند دارای طول عمر ۴-۳ سال و حتی بیشتر هستند.

در مطالعه حاضر، از نظر آماری اختلاف معنی داری بین دو جنس مذکر و مونث از جهت فراوانی نسبی تیتر مثبت مشاهده نشد (P=۰/۸۶). در مطالعهٔ ادریسیان در استان اردبیل به نکته قابل توجهی اشاره شده است که علی رغم شیوع بالاتر موارد ابتلاء به کالا آزار در جنس مذکر، شیوع سرواپیدمیولوژیک عفونت بدون علائم بالینی در جنس مونث بالاتر بوده است [۳]. می توان گفت در کانون های آندمیک هر دو جنس به یک نسبت در معرض آلودگی قرار می گیرند ولی احتمالاً موارد بدون علائم بالینی در جنس مونث بیش تر از جنس مذکر است [۱۵ و ۵-۳]. در مطالعه ای که در هندوستان انجام گرفته است، شارما (Sharma) و همکاران اظهار داشته اند که بروز کالا آزار در سنین قبل از بلوغ اختلاف معنی داری در دو جنس نداشته ولی بعد از

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-03]
[DOI: 10.29252/jmj.8.2.1]

بلوغ بیماری در افراد مذکر بیش تر بوده است و علت این اختلاف را به نقش محافظتی هورمون های جنسی زنانه از ابتلاء به بیماری نسبت داده اند. البته حجم نمونه در این مطالعه تنها ۹۳ نفر بوده است [۲۲]. همچنین نتایج حاصل از PCR مطالعه ی حاضر نشان می دهد که ۸/۵ درصد افراد این منطقه دچار عفونت لیشمانیایی هستند ولی شکایتی از بیماری خود ندارند (بدون علامت). از سوی دیگر ۵ مورد از آن ها (۳۲ مورد) دارای تیتر مثبت آگلوتیناسیون مستقیم بودند و از نظر آماری ارتباط معنی داری بین دو روش PCR و آگلوتیناسیون مستقیم در شناسایی موارد بدون علامت مشاهده شد (P= ۰/۰۱). این یافته ها نشان می دهد اگر چه روش آگلوتیناسیون مستقیم تنها موارد کمی از افراد بدون علامت را شناسایی می کند و در این خصوص از حساسیت پائینی برخوردار است، در شناسایی موارد بدون علامت کمک کننده است و همچنین بین حضور انگل در خون با حضور آنتی بادی ارتباط وجود دارد. از سوی دیگر، در بررسی سرولوژی در شهرستان مذکور، ۴ مورد دارای تیتر۱:۱۶۰۰ وجود دارند که با روش PCR بر روی خون، در۳ مورد KDNA انگل یافت شد. این یافته نیز حاکی از آن است که روش PCR در شناسایی موارد بدون علامت از کارآیی مناسبی برخوردار است. به علاوه با توجه به این که فراوانی شیوع سرمی بیماری در هر دو جنس یکسان بوده است و بیش ترین مورد مربوط به گروه سنی زیر ۵ سال عشایر می باشد، لذا به نظر می رسد سن (زیر ۵ سال) و سوء تغذیه از عوامل خطر اصلی برای بیماری کالاآزار در منطقه باشند. در ضمن مشاهده می شود که بیش ترین فراوانی بیماری مربوط به گروه سنی ۱۰-۵ و بالاتر (بالغین) است که این مطلب با مطالعات سایرین روی موارد بدون علامت مطابقت دارد [۱۶ و ۱۵ و ۱۰ و ۶ و ۵]. بنا براین الگوی موارد علامت دار با موارد بدون علامت کاملاً متفاوت است. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده، می توان از روش PCR برای غربالگری اولیه بیماری و شناسایی موارد بدون علامت و دارای عفونت نهفته استفاده نمود. با توجه به این که فرم های علامت دار بیماری در مناطق آندمیک درصد اندکی از موارد را به خود اختصاص می دهند و اغلب موارد بدون علامت هستند، لذا شناسایی آن ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از طرف دیگر بر اساس مطالعات انجام گرفته در مناطق آندمیک کشورهای فرانسه، اسپانیا و ایتالیا مبنی بر وجود انگل ل. اینفانتوم زنده در خون اهداء کنندگان خون [۲۵-۲۳] و همچنین مطالعه قبلی مولف [۱۵] روی ساکنین منطقه نور آباد استان فارس فاقد علامت بالینی بودند به اثبات رسیده است و از سوی دیگر انتقال بیماری کالاآزار از طریق انتقال خون نیز گزارش شده است[۲۵ و ۲۶]. به نظر می رسد انتقال خون یکی از راه های انتقال بیماری در مناطق آندمیک باشد، لذا غربالگری اهداء کنندگان خون ساکن مناطق آندمیک امری ضروری است. در مطالعه محبعلی و همکاران ۱۴/۲ درصد از سگ های مناطق مختلف ایران از نظر سرولوژی مثبت بوده اند و تنها ۲۴ درصد از آن هایی که با آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم مثبت بودند علائم بالینی لیشمانیوز احشایی را داشتند [۲۷]. در مطالعه حاظر نیز ۲۵ درصد از سگ های سرولوژی مثبت دارای علائم بالینی بودند. موفقیت در برنامه های کنترل لیشمانیوز احشایی زئونوز نیازمند به آگاهی از میزان عفونت در میان جمعیت های انسانی و مخازن و همچنین آگاهی از کانونهای فعال بیماری می باشد. تشخیص بالینی لیشمانیوز احشایی سگ ها به دلیل این که علائمی که ظاهر می کنند بسیار متغیر بوده و با ضایعات ایجاد شده سایر بیماری ها مشابهند، مشکل است. به علاوه تقریباً نیمی از سگ های دارای عفونت، فاقد علائم بالینی هستند [۲۹ و ۲۸]. اما سگ های بدون علامت مانند سگ های علامت دار برای پشه خاکی ها خاصیت عفونت زایی دارند. غالباً برای ارزیابی میزان شیوع عفونت لیشمانیای سگ از روش های سرولوژی از قبیل آگلوتیناسیون مستقیم و ایمینوفلورسنت استفاده می شود، ولی ممکن است در ماه های اول عفونت این آزمایش ها منفی باشند [۳۰ و ۳۱]. لذا توصیه می شود در مناطق آندمیک ایران، از یک سو تمامی سگهای ولگرد را از بین برده و از سوی دیگر سگ های صاحبدار به وسیله انجام آزمایش های سرولوژی و PCR مورد بررسی قرار گرفته و در صورت مثبت بودن هر یک از آزمایش های مذکور نسبت به معدوم نمودن آن ها اقدامات لازم بعمل آید.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که روش PCR با پرایمرهای RV1 وRV2 بر روی خون محیطی برای تشخیص زودرس بیماری در انسان و سگ و یافتن موارد بدون علامت به خصوص در مناطق آندمیک روش مناسبی می باشد. همچنین با توجه به میزان بالای عفونت در افراد عشایر و سگ های آن ها از نظر سرولوژی و نیز اثبات وجود عفونت فعال احشایی با استفاده از روش PCR نتیجه گرفته می شود که سگ به عنوان یکی از مخازن آلودگی برای انسان در مناطق عشایری داراب به شمار می رود و این بیماری در عشایر عرب (ایل خمسه) منطقه به خصوص در عشایر بیخ و بنگل به صورت آندمیک وجود دارد.

تقدیر و تشکر : بدین وسیله از کلیه ی همکاران مرکز بهداشت داراب، مرکز روستایی رستاق و مرکز بهداشت استان فارس به خاطر همکاری های ارزشمندشان قدردانی می شود. همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به خاطر تامین مالی هزینه های طرح تشکر می نماید.

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-03]

[DOI: 10.29252/jmj.8.2.1]

References

1. Ardehali S, Rezaei HR, Nadim A. *Leishmania* parasite and leishmaniosis. 2nd ed. Tehran: Academic Pub Center; 1994: 3-11 (Persian)

2. Edrissian GH, Visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in diagnosis and epidemiological studies. In: Ozcel MA, Alkan MZ (eds) Parasitology for the 21st century. CAB International; 1996 41 - 49

3. Edrissian GH. Visceral leishmaniasis, the Iranian experience. Arch Iran Med 1998; 1: 22 - 26

4. Fakhar M, Mohebali M, Barani M. Identification of endemic focus of kala-azar and seroepidemiologcal study of visceral *Leishmania* infection in human and canine in Qom Province. Armaghan-danesh 2004; 9(3): 43 - 52 (Persian)

5. Fakhar M, Motazedian MH, Asgari Q, et al. A new endemic focus of visceral leishmaniosis in southern Iran. Armaghane-danesh 2006; 42 : 3–114. (Persian)

6. Asgari Q, Fakhar M, Motazedian MH. Nomadic kala-azar in south of Iran Iran J Pub Health 2006,35 85 -86

7 Sensitivity of bone Costa CH, Stewart JM, da Silva MR marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. 2005; 72(6): 811-4.Am J Trop Med Hyg

8. Kumar PV, Vasei M, Sadeghipour A, et al, Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. J Pediatr Hematol Onchol 2007; 29 : 77 - 80

9. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. Crit Rev Microbiol 1995; 21 : 123 – 152

10, et al. Study on PCR Yang YT, Wang JY, Gao CH. method for detecting the asymptomatic infection of Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji *Leishmania infantum*. Sheng Chong Bing 2006; 24 ; 92 - 6.

11. Mikaeili F, Fakhar M, Sarkari B, et al. Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. Iran J Immunol 2007; 4: 116–121

12. Mohebali M, Edrissian GhH, Nadim A. etal. Application of direct agglutination test (DAT) for the diagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis in Iran. Iran J Parasitol 2006; 1(1): 15-25.

13. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin Diag Lab Immuno 2002; 9(5): 951-958.

14. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, et al. Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special references to AIDS patients. J Clin Microbiol 2000; 38 236-240.

15. Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. Ann Trop Med Parasitol 2008; 102(7): 577-83.

16. Cascio A, Calattini S, Colomba C. et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. Pediatr 2002; 109(2): 1-5.

17. Harith AE, Kolk AHJ, Kager A, et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Trans Soc Trop Hyg 1986; 80 58-87.

18. Lachaud L, Marchergni-Hammami S, Chabbert E. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 210-215.

19. Aransay, AM, Scoulica E , Tselentis R. Detection and identification of *leishmania* DNA within naturally infected sand flies semi nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol 2002

20. Hashemi-Nasab A, Zadeh-Shirazi H. Visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fars Province, Iran; study of 130 cases. J Trop Med Hyg 1980; 83(3): 119-22

21. Soleimanzadeh G, Edrissian GH, Anvari S et al. Clinical aspcts of visceral leishmaniasis in Meshkinshahr , North-west Iran. International Congress of Parasitology: Izmir; Turkey: 1994.

22. Sharma MC, Gupta Ak, Saran R, et al. The effect of age and sex on incidence of kala-azar. J communi Disease 1990; 22(4): 277-8.

23. Riera C, Fissa R, Udina M. et al. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Island, Spain) by different diagnostic methods. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 2004; 98; 102-110.

24. Papadopouloua C, Kostoulab A, Dimitrioua D. et al. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. J Infect 2005; 50 53 - 60

25. Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuvre JP. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France.J Clin Microbiol 1999; 37(6):1953; 1957.

26. Chang KP, Reed SG. Blood transfusion transmitted kala-azar: Indian Science. Acta Parasitol Turaica 1997; 21(suppl.1): 158.

27. Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Vet Parasitol 2005, 129: 243–252.

28. Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Canine leishmaniasis: moving towards a solution, proceedings of the second International canine leishmaniasis forum. Seville: Spain; 2002: 7-14

29. Ashford DA, David JR, Freire M, et al. Studies on control of visceral leishmaniasis impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg 1998; 59 53 – 57.

30. Molina R, Amela C, Nieto J, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus pernicious*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1994; 88 491-493.

31. Ashford DA, Bozza M, Freire M. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis Am J Trop Med Hyg 1995; 53: 251-255.

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-03]

[DOI: 10.29252/jmj.8.2.1]

The efficacy of PCR for early diagnosis and detection of asymptomatic cases of visceral leishmaniasis in human and dog

Fakhar M*[1], Motazedian MH[2], Asgari Q[2], Kalantari M[2], Hatam GR[2], Akbarpoor MA[3], Gharachahi MA[3]

1. Dept. of Parasitology and Mycology/ Molecular and Cellular Biology Research Center, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Dept. of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. Infectious diseases Unit, Provincial Health Center of Fars, Shiraz, Iran

Journal of Jahrom University of Medical Seiences Vol. 8, No 2 , Summer 2010

Abstract

Introduction:
This study was conducted to detect asymptomatic cases of visceral leishmaniasis in human and dog, using PCR and serology methods in Darab, Fars Province.
Material and Methods:
In this descriptive cross-sectional survey, blood samples were randomly collected from all children aged 10 years old; 10% of the adults and 20% of the dog owners were investigated. To determine the prevalence of infection rate of VL, direct agglutination tests (DAT) and PCR-based assays were applied. In addition, to identify the species of the parasite, the species-specific PCR on blood samples was used.
Results:
Of the 376 subjects investigated, 355 were children 10 years old and 21 subjects were adults. Overall, 5 (1.33%) subjects (2 males and 3 females) were found seropositive; they were aged 2-5 years. Of 23 dog samples, one case (4.3%) showed specific *Leishmania* antibodies equal to 1: 320 titer. Also, overall, 32 (8.5%) subjects and five dogs (21.7%) were found PCR-positive in the *Leishmania* KDNA- specific PCR and *L.infantum* was detected in all the samples.
Conclusion:
The results showed that PCR on blood with RV1 and RV2 primers is a valuable method for early diagnosis of VL in human and detection of asymptomatic cases especially in endemic regions.

Keywords:
Visceral leishmaniasis, Human Infection, Canine Infection, DAT, PCR

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-07-03]

[DOI: 10.29252/jmj.8.2.1]

* Corresponding author, Email: mahdif53@yahoo.com