

سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی به روش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) در شهرستان بجنورد از استان خراسان شمالی در سال

۱۳۸۶

وحید ترابی^۱، مهدی مجبلی^۲، غلامحسین ادریسیان^۲، حسین کشاورز^۲، مسعود مهاجری^۳، هما حجاران^۴، بهناز آخوندی^۵، علی اکبر صنعتی^۶، ذبیح الله زارعی^۷، افشین دلشاد^۸

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

^۲ استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

^۳ دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد

^۴ استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

^۵ کارشناس ارشد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

^۶ کارشناس، گروه مبارزه با بیماری‌ها، مرکز بهداشت خراسان رضوی، مشهد

^۷ کارشناس، مرکز تحقیقات بهداشتی مشکین شهر، مشکین شهر

^۸ پزشک، مسئول مبارزه با بیماری‌ها، معاونت بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد

نویسنده رابط: مهدی مجبلی، نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، تلفن: ۸۸۹۵۱۴۰۰، پست

الکترونیک: moheballi@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۴/۱۵؛ پذیرش: ۱۳۸۷/۹/۲

مقدمه و اهداف: این مطالعه به منظور ارزیابی شیوع سرمی و تعیین اندمیسیته لیشمانیوز احشائی در شهرستان بجنورد در سال ۱۳۸۶ و به منظور ارائه برنامه کنترل این بیماری در آن شهرستان انجام گردیده است.

روش کار: این مطالعه به شکل توصیفی و به روش مقطعی در ۸ روستای شهرستان بجنورد انجام گردید. روش نمونه برداری به شکل خوشه‌ای چند مرحله‌ای و گروه‌های هدف شامل کودکان ۱۲ سال و به پایین و ۱۰٪ از افراد بزرگسال ساکن مناطق روستایی شهرستان بجنورد بوده است. در این بررسی از پلاسمای خون افراد تحت مطالعه جهت اندازه‌گیری آنتی بادی‌های ضد لیشمانیایی به روش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) استفاده گردید. برای تعیین نوع لیشمانیا در مناطق تحت بررسی؛ تعداد ۴ قلابه سگ مشکوک به لیشمانیوز احشائی کالبد گشایی شدند. جهت تعیین گونه انگل، از روش‌های ملکولی TS1 PCR استفاده گردید.

نتایج: در مجموع پلاسمای خون ۱۶۰۸ نفر از افراد تحت مطالعه به روش DAT مورد آزمایش سرولوژی قرار گرفتند که ۳۸ نفر (۲/۳۶٪) از آن‌ها دارای عیار ۱:۸۰۰ و به بالا و فقط ۹ نفر (۰/۵۶٪) دارای عیار ۱:۳۲۰۰ بودند. از لحاظ شیوع سرمی، اختلاف آماری معنی‌داری بین دو جنس مونث و مذکر و جمعیت‌های بالای ۱۲ سال با جمعیت‌های ۱۲ سال و به پایین مشاهده نگردید ($P > 0.05$). گونه‌های لیشمانیایی جدا شده مربوط به ۲ قلابه از ۴ قلابه سگ علامت‌دار؛ Linfantum تعیین گردیدند و همچنین سکناس‌های قطعه ژنی ITS1 مربوط به هر ۲ ایزوله فوق الذکر با شماره‌های EU810776 و EU810777 در بانک ژنی به ثبت رسیدند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهند، لیشمانیوز احشائی با اندمیسیته پائین در شهرستان بجنورد در حال گردش است.

واژگان کلیدی: سرواپیدمیولوژی، لیشمانیوز احشائی، آگلوتیناسیون مستقیم، خراسان شمالی، ایران

مقدمه

در مناطق روستایی شهرستان بجنورد انجام شد. روش نمونه‌برداری به شکل خوشه‌ای چند مرحله‌ای (Multi-stage sampling) انتخاب شد. در این مطالعه، گروه هدف کودکان ۱۲ سال و به پایین و همچنین ۱۰٪ از بزرگسالان ساکن در ۴ روستای شهرستان بجنورد بودند. این ۴ روستا از بین روستاهائی انتخاب شدند که دارای گزارش موارد مثبت لیشمانیوز احشائی طی ۵ سال اخیر بودند. ابتدا اسامی این روستاها لیست شده و سپس به شکل تصادفی ساده، تعداد ۴ روستا (خوشه) از بین آنها انتخاب شدند. در ضمن جهت کنترل کار، تعداد ۴ روستای شاهد که طی ۵ سال اخیر هیچ موردی از کالآزار از آن مناطق گزارش نگردیده بود؛ به روش فوق‌الذکر انتخاب شدند. سعی گردید این روستاها تا حد امکان در مجاورت یکدیگر قرار داشته باشند و پراکندگی آنها طوری باشد که قسمت‌های مختلف شهرستان بجنورد را در برگیرند (نقشه ۱). به علت اهمیت لیشمانیوز احشائی و ضرورت تشخیص و درمان به موقع و مناسب آن، نمونه برداری به شکل کلی و از تمامی افراد در معرض خطر (بچه‌های زیر ۱۲ سال) ساکنین هر یک از خوشه‌های (روستاها) انتخاب شده انجام گردید. حجم نمونه، با توجه به شیوع سرمی لیشمانیوز احشائی (۰/۷) و دقت ۰/۰۲ و ضریب اطمینان ۹۵٪ و حد اکثر خطای ۰/۰۵ تعیین گردید.

در این مطالعه با توجه به آنکه نمونه‌های تهیه شده از کودکان ۱۲ سال و به پایین به شکل کلی تهیه می‌شدند، در مجموع ۱۱۱۶ نفر از بین ۴ روستائی که طی ۵ سال اخیر موارد گزارش شده لیشمانیوز احشائی داشتند و نیز ۴۹۲ نفر از بین ۴ روستائی که طی ۵ سال اخیر موارد گزارش شده لیشمانیوز احشائی نداشتند، مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۱۰٪ از این نمونه‌ها متعلق به افراد بالای ۱۲ سال روستاهای با سابقه آلودگی کودکان بودند. علت تهیه ۱۰٪ از نمونه‌ها از افراد بالغ؛ کمک به تعیین وضعیت اندمیسیته بیماری در منطقه تحت مطالعه بوده است (۱).

روش نمونه برداری، سرولوژی و کشت

در این بررسی نمونه‌های خون در داخل لوله‌های میکروهماتوکریت هپارینه از نوک انگشت وسطی دست چپ افراد تهیه شد. در نوزادان و بچه‌های زیر یکسال، نمونه برداری از پاشنه پا انجام می‌شد. نمونه‌های خون در شرایط مطلوب به آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقاتی بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل شده و بلافاصله توسط سانتریفیوژ میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه

لیشمانیوز احشائی (کالآزار) یکی از بیماری‌های عفونی- انگلی است که از نظر بهداشتی حائز اهمیت فراوانی است. اگرچه در سال‌های اخیر میزان توجه به لیشمانیوز به عنوان یک مشکل بهداشتی عمومی افزایش یافته، ولی اقدامات موجود برای کنترل این بیماری هنوز کافی به نظر نمی‌رسند. تنوع زیادی که در اشکال بالینی و موقعیت‌های اپیدمیولوژیک بیماری وجود دارد، نشان دهنده این است که هر کانونی به اصول و روش‌های کنترلی خاص خود نیاز دارد (۱،۲). لیشمانیوز جزء بیماری‌های اندمیک ایران و بیش از ۸۰ کشور جهان محسوب می‌شود (۲). کالآزار در ایران از نوع مدیترانه‌ای بوده و عامل آن لیشمانیا اینفانتوم، ناقل آن گونه‌های از پشه خاکی‌های جنس فلوتوموس و مخزن انگل، سگ و سگ سانان وحشی هستند (۳،۴). 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،۶،۷). از ابتدای سال ۱۳۷۵ تا نیمه اول سال ۱۳۸۵ جمعاً ۱۱۰ مورد کالآزار از استان خراسان شمالی گزارش شده است. تمام موارد ثبت شده کالآزار در دهه اخیر؛ به شکل غیرفعال (Passive) و تنها مربوط به بیماران ارجاع شده به مراکز بهداشتی- درمانی استان خراسان شمالی بوده است که حدود نیمی از این تعداد؛ مربوط به شهرستان بجنورد بوده است. موارد مذکور بر اساس موارد علامت‌دار کالآزار بوده است که در مراکز بهداشتی استان‌های خراسان شمالی و رضوی به ثبت رسیده بوده‌اند.

با توجه به شرایط اکولوژیک شهرستان بجنورد؛ تصمیم گرفته شد تا برای اولین بار مطالعه‌ای با دید اپیدمیولوژیک راجع به وضعیت کنونی این بیماری در آن شهرستان طی سال ۱۳۸۶ به اجرا در آید.

روش کار

موقعیت جغرافیائی شهرستان بجنورد

شهرستان بجنورد با جمعیت بالغ بر ۲۴۲۸۵۷ نفر در شمال شرق کشور در (استان خراسان شمالی) با ۸۱۲ هزار نفر جمعیت و همجوار با شهرستان‌های مانه و سملقان، شیروان، جاجرم و اسفراین واقع شده است (نقشه ۱).

نحوه نمونه‌برداری و گروه هدف

این مطالعه از نوع توصیفی و به روش مقطعی به مدت یکسال

سانتریفوژ می‌شدند. پس از جداسازی سرم یا پلاسما در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شده و آنگاه به روش سروولوژی آگلوتیناسیون مستقیم مورد آزمایش قرار می‌گرفتند.

با توجه به اینکه سگ‌ها مخازن اصلی بیماری لیشمانیوز احشایی در ایران هستند و عامل بیماری از این حیوانات به انسان منتقل می‌گردد، لذا همزمان با مطالعات موارد انسانی، تعدادی از سگ‌های مشکوک و دارای علائم مشابه لیشمانیوز احشایی شناسایی گردیده و سپس مورد نمونه برداری قرار گرفتند. مقدار ۵ میلی لیتر خون از ورید سفالیک سگ‌ها تهیه شده و بعد از انتقال به آزمایشگاه بجنورد، سرم آن‌ها جدا گردید و سپس با روش DAT مورد آزمایش قرار گرفت (۸ و ۶). همچنین جهت بررسی‌های پارازیتولوژی و جداسازی انگل لیشمانیا و تعیین گونه آن‌ها، سگ‌های مذکور کالبدگشایی شدند. از کبد و طحال سگ‌ها علاوه بر کشت در محیط‌های اختصاصی N.N.N و اشنايدر+۲۰٪ سرم جنین گاو، گسترش‌های تماسی بر روی لام تهیه گردید و پس از رنگ آمیزی با گیمسا ۱۰٪، نمونه‌ها مورد بررسی‌های پارازیتولوژی قرار گرفتند.

تعیین گونه انگل لیشمانیا

در این بررسی، جهت تعیین گونه انگل‌های لیشمانیای جدا شده از مخازن حیوانی (سگ‌ها) از تکنیک RAPD-PCR^۱ با استفاده از اشکال پروماستیگوت تکثیر یافته در محیط‌های اختصاصی و پرایمر تصادفی AB1-O7 استفاده گردید. از روش ITS1-PCR با استفاده از گسترش تهیه شده بر روی لام و پرایمرهای اختصاصی LITSR و L5.8S و تکثیر قطعه ITS1 نیز به منظور تایید روش فوق‌الذکر استفاده گردید (۹).

روش آزمایش نمونه‌ها به روش آگلوتیناسیون مستقیم

آنتی ژن آگلوتیناسیون مستقیم در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران و براساس روش دکتر هریت تهیه شد (۸ و ۶). در این روش، آنتی ژن در مجاورت رقت‌های مختلف سرم یا پلاسما فرد مشکوک قرار داده شد که در صورت حضور آنتی بادی اختصاصی در سرم بیمار، پس از گذشت ۱۸-۱۲ ساعت آگلوتیناسیون صورت می‌گرفت. ابتدا به کمک محلول رقیق کننده و میکروپلیت‌های ۷ شکل، رقت‌های مورد نیاز از پلاسما بیمار تهیه شده و پس از افزودن آنتی ژن در رقت‌های ۱:۸۰۰ و ۱:۳۲۰۰، میکروپلیت‌ها در داخل اطاقک مرطوب قرار گرفتند و در

یک سطح افقی در دمای اتاق تا روز بعد (حداقل ۱۲ ساعت) باقی ماندند. برای تفسیر آزمایش، پلیت را روی سطح سفید قرار داده و در تفسیر نتایج آزمایش چنانچه در حفره‌ای که آنتی ژن در آن ریخته شده بود، انگل‌ها به صورت یک تکه کوچک آبی رنگ با حاشیه کاملاً جمع شده و در وسط حفره میکروپلیت ته نشین شده بودند عدم آگلوتیناسیون تلقی شده و نتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانیا منفی به حساب می‌آمد و اگر انگل‌ها به حالت کلوئیدی 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 می‌شدند. بالاترین رقت از نمونه سرمی که آگلوتیناسیون در آن ایجاد شده به عنوان حداکثر عیار پذیرفته شد و در صورت مثبت شدن هر نمونه در رقت‌های ۱:۸۰۰، نمونه‌ها مجدداً در رقت‌های بالاتری آزمایش می‌شدند. در روش DAT برای نمونه‌های انسانی، آنتی بادی ضد لیشمانیا با عیارهای ۱:۸۰۰ و به بالا به عنوان عفونت لیشمانیوز احشایی و عیارهای پائین‌تر از ۱:۸۰۰ منفی در نظر گرفته شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون توصیفی و آزمون کای مربع و تست دقیق فیشر به کمک نرم افزار SPSS Version (11/5) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

یافته‌های سروولوژی

در این بررسی جمعاً تعداد ۱۶۰۸ نمونه پلاسما انسانی تهیه شد و نمونه‌ها در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران با استفاده از روش آگلوتیناسیون مستقیم و با استفاده از سرم‌های کنترل مثبت و منفی آن مرکز مورد آزمایش قرار گرفتند. چنانچه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، از مجموع ۱۶۰۸ نمونه پلاسما انسانی، ۴۴۹ (نمونه ۹۰/۱۱٪) مربوط به گروه سنی ۱۲ سال و به پائین و ۱۵۹ (نمونه ۹/۸۹٪) مربوط به گروه‌های سنی بالاتر از ۱۲ سال بودند. حداقل سن افراد تحت بررسی ۱/۵ ماه و حداکثر ۴۵ سال بوده است. از کل افراد بررسی شده، ۷۷۳ نفر (۴۸/۰۷٪) پسر ۱۲ سال و به پایین و ۶۷۶ نفر (۴۲/۰۴٪) دختر ۱۲ سال و به پایین و ۶۴ نفر (۳/۹۸٪) مرد بالای ۱۲ سال و ۹۵ نفر (۵/۹۱٪) زن بالای ۱۲ سال بودند. پس از انجام آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم، عفونت سرمی لیشمانیایی در ۷ نفر از کودکان ۱۲ سال و به پایین با عیار برابر ۱:۳۲۰۰

^۱Random Amplified Polymorphic DNA

جدول ۱- نتایج آزمایش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) بر حسب جنس و سن در افراد تحت مطالعه در شهرستان بجنورد از استان خراسان شمالی در سال ۱۳۸۶

گروه‌های سنی	تعداد نمونه				موارد مثبت (عیار ۱:۸۰۰)				موارد مثبت (عیار ۱:۳۲۰۰)			
	مونث		مذکر		مونث		مذکر		مونث		مذکر	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
زیر ۱۲ سال	۶۷۶	۴۶/۶۵	۷۷۳	۵۳/۳۵	۱۴۴۹	۱۵	۲/۲۱	۱۲	۱/۵۵	۲۷	۴	۰/۵۹
بالای ۱۲ سال	۹۵	۵۹/۷۵	۶۴	۴۰/۲۵	۱۵۹	۱	۱/۰۵	۱	۱/۵۶	۲	۱	۱/۰۵
جمع	۷۷۱	۴۷/۹۵	۸۳۷	۵۲/۰۵	۱۶۰۸	۱۶	۲/۰۷	۱۳	۱/۵۵	۲۹	۵	۰/۴۸

جدول ۲- توزیع فراوانی افراد سرم مثبت به روش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) به تفکیک روستاهای تحت مطالعه در شهرستان بجنورد از استان خراسان شمالی در سال ۱۳۸۶

نوع روستا	نام روستا	تعداد موارد سرولوژی مثبت		جمع
		۱:۸۰۰	۱:۳۲۰۰	
مورد	اسفیدان	۱۰	۴	۲۶۸
	بچه دره	۵	۲	۳۹۵
	مهنان*	۹	۳	۲۸۰
	طراقی کرد	۵	۰	۱۷۳
شاهد	مزارلق	۰	۰	۱۸۰
	قره باشلو	۰	۰	۳۷
	نوده	۰	۰	۲۵۴
	پاقله	۰	۰	۲۱
	جمع	۲۹	۹	۱۶۰۸

* انگل لیشرمانیا ایفانتوم از سگ‌های این روستا جدا سازی شد.

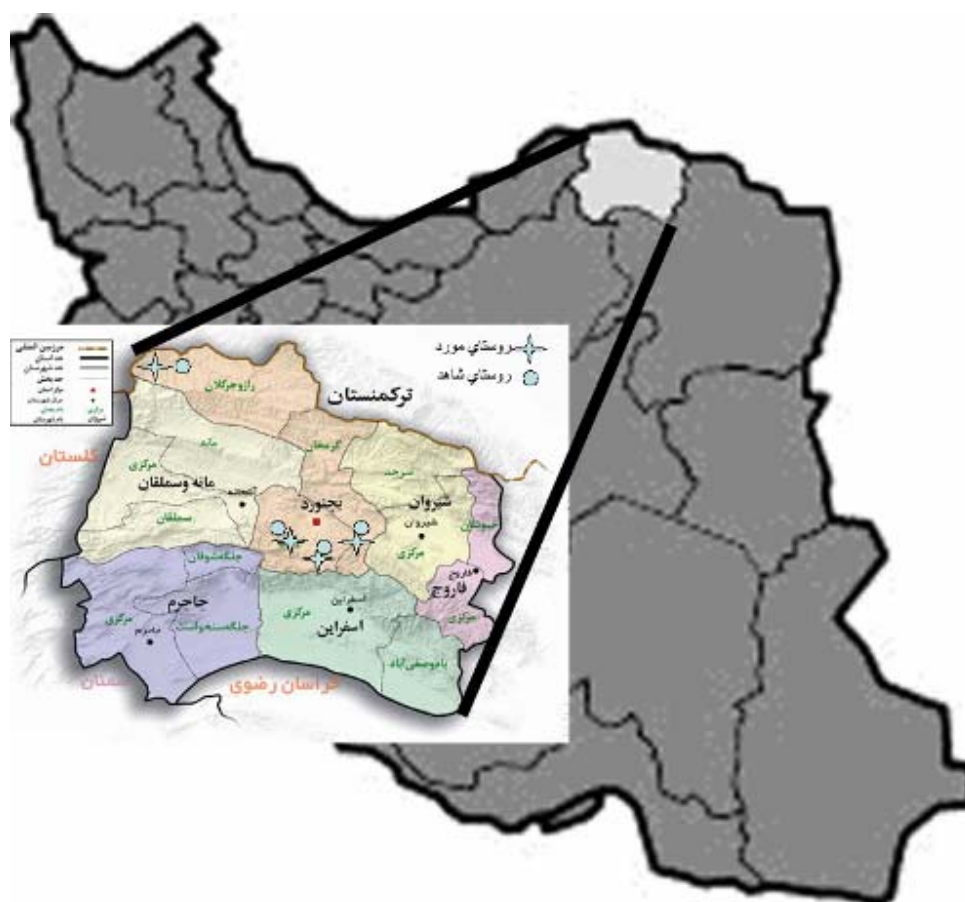
فرآوانی افراد سرم مثبت را به تفکیک روستاهای تحت مطالعه واقع در شهرستان بجنورد نشان می‌دهد. بالاترین میزان آلودگی مربوط به روستای اسفیدان است که در نزدیکی شهر بجنورد واقع گردیده است (جدول شماره ۲ و ۱).

با انجام آزمون آماری کای مربع مشاهده شد که بین دو جنس مذکر و مونث و همچنین جمعیت‌های بالای ۱۲ سال با جمعیت‌های ۱۲ سال و به پائین، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. نتیجه نهایی این مطالعه نشان می‌دهد که از ۱۶۰۸ نمونه سرمی تهیه شده در این مطالعه، تعداد ۲۹ مورد (۱/۸٪) دارای عیار ۱:۸۰۰ و ۹ مورد (۰/۵۶٪) دارای عیار ۱:۳۲۰۰ بودند (جدول شماره ۱).

یافته‌های مولکولی

در نمونه‌های تهیه شده از بافت کبد و طحال هر ۴ قلاده سگ کالبد گشایی شده که از لحاظ سرمی نیز مثبت (دارای عیارهای $\geq 1:3200$) بودند، آماستیگوت‌های لیشرمانیا مشاهده گردید. در

شناسایی شد و شیوع بیماری در این گروه سنی ۰/۴۸٪ برآورد گردید و ۲ نفر از افراد بالای ۱۲ سال نیز دارای عیار برابر ۱:۳۲۰۰ بودند و شیوع بیماری در این گروه سنی ۱/۲۶٪ برآورد گردید. یک نمونه (۰/۰۶۲٪) با دارا بودن عیار ۱:۱۶۰۰ مشکوک به ابتلا به کالآزار بوده است لذا جهت بررسی بیشتر نمونه فوق با استفاده از روش IFA نیز از لحاظ تیتراژ ضد لیشرمانیوز احشائی مورد ارزیابی قرار گرفت که نتیجه آن کاملاً منفی بود و به همین دلیل این نمونه با توجه به عدم حضور علائم بالینی، منفی در نظر گرفته شد. در ۲۹ نمونه (۱/۸٪) عیار ۱:۸۰۰ مشاهده شد. عیارهای کمتر از ۱:۸۰۰ منفی تلقی گردیدند. مشخصات کلیه افراد سرم مثبت جهت پی‌گیری و مراقبت در اختیار مرکز بهداشت شهرستان بجنورد قرار گرفتند. جدول شماره ۲ موارد سرولوژی مثبت را در روستاهای مورد و شاهد نشان می‌دهد. موارد سرولوژی مثبت در روستاهای مورد که در ۵ سال اخیر دارای موارد کالآزار بودند به طور معنی‌داری از روستاهای شاهد که هیچ موردی از کالآزار از آن‌ها گزارش نشده بود بیشتر بوده است. جدول شماره ۲ توزیع



نقشه ۱- موقعیت جغرافیائی شهرستان بجنورد از استان خراسان شمالی و پراکندگی روستاهای تحت مطالعه در این شهرستان

سگ‌ها پس از بررسی، با ژن ITS1 لیشمانیا اینفانتوم به شماره Accession NO:EU326227/1 ثبت شده در بانک ژنی مربوط به مرکز بین المللی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، به میزان ۹۹٪ شباهت داشت. این ایزوله‌ها با شماره‌های EU810776 و EU810777 در بانک ژن مذکور ثبت گردیدند.

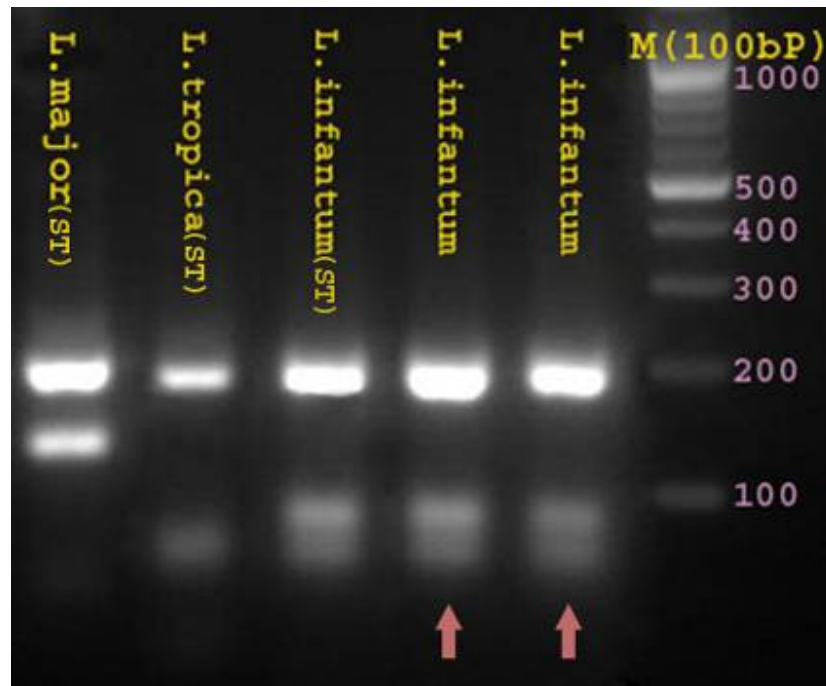
بحث

در دهه‌های اخیر، موارد پراکنده و تک‌گیری از کالاآزار از مناطق مختلف ایران گزارش شده بود (۱۰). در حال حاضر کانون‌های اندمیک متعددی از لیشمانیوز احشایی از استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر گزارش شده‌اند (۷،۶،۵،۴) و به نظر می‌رسد که این کانون‌ها در سایر نقاط کشور رو به گسترش هستند (۱۱،۱۲). در دهه اخیر، تعداد ۱۱۰ مورد لیشمانیوز احشایی از استان خراسان شمالی گزارش شده است و به وسیله روش‌های پارازیتولوژی به تایید رسیده‌اند که بیش از نیمی از آن‌ها مربوط به شهرستان بجنورد بوده است. از آنجایی که تا کنون مطالعه‌ای راجع به خصوصیات اپیدمیولوژیک عفونت احشایی

این مطالعه، ۲ نمونه از ۴ نمونه مثبت سگ‌های مورد بررسی در محیط‌های کشت رشد و تکثیر پیدا کردند که پس از جداسازی و تخلیص DNA آن‌ها و انجام آزمایش به روش RAPD-PCR و پرایمر ده نوکلئوتیدی AB1-O7 در مقایسه با سوش‌های استاندارد لیشمانیا (تروپیکا، ماژور و اینفانتوم)، گونه انگل، لیشمانیا اینفانتوم تعیین گردید. متاسفانه نمونه‌های مربوط به ۲ قلابه دیگر از سگ‌های مبتلا، در محیط‌های کشت اختصاصی رشد نکردند زیرا آن محیط‌ها پس از کشت به انواع باکتری و قارچ آلوده شده و به تبع آن امکان انجام روش‌های مولکولی و تعیین گونه انگل میسر نگردید.

همچنین به منظور تایید نتایج مولکولی، قطعه ITS1 مربوط به rDNA هر ۲ نمونه مذکور مورد آزمایش PCR-RFLP قرار گرفت که گونه هر ۲ ایزوله مذکور مجدداً لیشمانیا اینفانتوم تعیین گردید (شکل شماره ۱).

در پایان به منظور بررسی سکانس نوکلئوتیدها، نوکلئوتیدهای قطعه ITS1 توسط شرکت فرانسوی Millegene تعیین توالی گردید. سکانس نوکلئوتیدهای قطعه ITS1 در ۲ ایزوله مربوط به



شکل ۱- نتایج روش مولکولی PCR- RFLP مربوط به قطعه ITS1 در ایزوله های مربوط به سگ های کالبد گشایی شده از شهرستان بجنورد در سال ۱۳۸۶

۱۵ نفر از بچه های زیر ۱۰ سال مشکوک به کالآزار که دارای علائم اختصاصی از قبیل تب های بیش از دوهفته، بزرگی شکم، لاغری و رنگ پریدگی و ساکن روستاهای نزدیک اطراف و یا حاشیه شهرهای بجنورد و شیروان بودند، نمونه سرم خون تهیه گردید که پس از آزمایش به روش DAT، تعداد ۵ نفر از آنان دارای عیارهای ۱:۳۲۰۰ تا ۱۰:۲۴۰۰ بودند و چون دارای علائم بالینی بودند لذا بلافاصله تحت درمان قرار گرفتند. با استفاده از بررسی های یاد شده به نظر می رسد که کانون هائی از لیشمانیوز احشائی با اندمیسیته پائین در بعضی از مناطق استان خراسان شمالی وجود داشته باشد.

از لحاظ شیوع سرمی در این مطالعه اختلاف آماری معنی داری بین دو جنس مونث (۲/۷۲٪) و مذکر (۲/۳٪) و جمعیت های بالای ۱۲ سال (۲/۵۱٪) با جمعیت های ۱۲ سال و به پائین (۲/۳۵٪) مشاهده نگردید. بر اساس مطالعه ای که در هندوستان توسط Sharma و همکاران انجام شد، میزان بروز کالآزار در سنین قبل از بلوغ، اختلاف معنی داری در دو جنس مذکر و مونث نداشتند ولی بعد از بلوغ، میزان بروز بیماری مذکور در افراد مذکر بیشتر بوده است. محققین مذکور علت این اختلاف را به نقش حفاظتی هورمون های جنسی زنانه در جنس مونث نسبت داده اند (۱۶). بر اساس مطالعات انجام شده توسط برخی از محققین ایرانی در مواردی بین میزان شیوع سرمی و جنسیت اختلاف معنی داری

لیشمانیا اینفانتوم در شهرستان بجنورد انجام نشده بود، لذا مطالعه حاضر با دید سرواپیدمیولوژی برای اولین بار در آن شهرستان طی سال ۱۳۸۶ انجام پذیرفت. بر اساس مطالعات مختلف، یکی از روش های مطلوب، ساده و عملی جهت بررسی های سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشائی در انسان و مخازن حیوانی، استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم است (۱۵،۱۴،۱۳،۶،۵،۳) که در این مطالعه نیز از روش مذکور استفاده گردید.

بر اساس نتایج این مطالعه، ۲/۳۶٪ از ۱۶۰۸ نفر تحت مطالعه از نظر سروولوژی مثبت بودند و ۹ مورد (۰/۵۶٪) دارای آنتی بادی بر علیه لیشمانیا باعیار ۱:۳۲۰۰ بودند. نتایج مطالعه انجام شده توسط محبعلی و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان می دهد که از مجموع ۶۵۵۸ مورد سرم جمع آوری شده از مناطق مختلف آب و هوائی ایران که به روش فعال خانه به خانه جمع آوری شده بودند، ۱۶۸ (۲/۶ درصد) مورد با روش DAT دارای نتایج سروولوژی مثبت بوده اند (۶). علاوه بر آن در این مطالعه ۱۰۸۸ نمونه از سرم های جمع آوری شده فوق مربوط به استان های خراسان بوده اند که تنها ۵ مورد از آنها (۰/۴۶ درصد) مثبت و دارای آنتی بادی ضد لیشمانیا با عیارهای ۱:۳۲۰۰ و به بالا بوده است و ۳ نفر از آنها دارای علائم بالینی اختصاصی بوده و تحت درمان قرار گرفتند. لذا نتایج حاصله از این مطالعه با مطالعه فوق کاملا همخوانی دارند. از

تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. World Health Organization. The leishmaniasis, Report of a WHO Expert committee World Health Organization. Geneva: 1990, 793.
2. 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.
3. Mohebalı M, Hajjara n H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi Sh, Zarei Z, and et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitology* 2005; 129: 243-51.
4. Edrissian Gh.H, Ahanchin A.R, Gharachahi A, Ghorbani M, Nadim A and Ardehali S. Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars province, southern Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences* 1993; 18: 99-105.
5. Mohebalı M, Hamzavi Y, Edrissian Gh.H and Forouzani A. Seroepidemiological study of visceral leishmaniasis among humans and animal reservoirs in Bushehr province, Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2001; 7: 912-17.
6. Mohebalı M, Edrissian Gh.H, Nadim A, Hajjara n H, Akhouni B, Hooshmand B and et al. Application of Direct Agglutination Test (DAT) for the diagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis in Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 2006; 1: 15-25.
7. Edrissian Gh.H, Hafizi A, Afshar A, Soleiman-zadeh G, Movahed-Danesh AM and Garoussi Z. An endemic focus of visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr, East Azarbaijan province, North-West part of Iran. *Bulletin de la societe de pathologie exotique* 1988; 81: 238-48.
8. Harith A, Slappedel RJ, Reiter I, Van Kanpen F, De Korte P, Huigen E and et al. Application of a direct-agglutination test for detection of specific anti-leishmania antibodies in the canine reservoir. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27: 2252-7.
9. Kazemi-Rad E, Mohebalı M, Hajjara n H, Rezaei S and Mamishi S. Diagnosis and characterization of leishmania species in giemsa-stained slides by PCR-RFLP. *Iranian Journal of Public Health* 2008; 37: 54-60.
10. Nadim A, Navid-Hamidi E, Javadian E, Tahvildar-bidrouni G, Amini H. Present status of kala-azar in Iran. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1978; 27: 25-8.
11. Fakhar M, Mohebalı M, Barani M. Introduction of an endemic focus of kala-azar in Ghom province and seroepidemiological survey on visceral leishmaniasis in human and animal reservoirs (dogs) in this area. *Armaghane-danesh Journal* 2004; 33: 43-52.
12. Manouchehri-Naeini K, Abasi A, Khadivi R, Mohebalı M, Hajjara n H. Seroepidemiological study on visceral leishmaniasis in nomadic children from Chaharmahal Bakhtiari. *proceeding in 4th national Iranian congress of Parasitology and parasitic diseases, Mashhad University of Medical sciences, October 13-16, 2003, Mashhad, Iran*
13. Cardoso L, Rodrigues M, Santos H, Schoone G.J, Carreta P, Varejao E and et al. Sero-epidemiological study of canine leishmania spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology* 2004; 121: 21-32.
14. Bokai S, Mobedi I, Edrissian Gh.H and Nadim A. Seroepidemiological study of canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr, northwest of Iran. *Archive of Institute Razi* 1998; 48-49: 41-6.
15. Edrissian Gh.H, Hajjara n H, Mohebalı M, Soleimanzadeh G and Bokaei S. Application and evaluation of direct agglutination test in ser-diagnosis of visceral leishmaniasis in man and

مشاهده شده (۶،۷،۱۷) و در مواردی هیچگونه اختلاف معنی‌داری دیده نشده است (۱۸،۱۹). به نظر می‌رسد که این تفاوت‌ها به روش نمونه برداری، حجم نمونه جمع‌آوری شده و وجود و یا عدم وجود علائم بالینی و عیار مرزی در نظر گرفته شده ارتباط داشته باشد. بر اساس نتایج بعضی از مطالعات انجام شده در ایران فراوانی لیشمانیوز احشایی علامت‌دار با سن ارتباط دارد و در اکثر موارد در بچه‌های زیر ۵ سال دیده می‌شود (۴،۵،۶،۷،۱۰،۲۰،۲۱) ولی از نظر عفونت لیشمانیای احشایی و افراد سرولوژی مثبت صرف نظر از عیار آنتی‌بادی اندازه‌گیری شده، ممکن است اختلاف آماری قابل توجهی بین سنین مختلف دیده نشود که نتایج حاصل از این مطالعه گویای این مطلب است. از نظر نوع انگل لیشمانیای در حال گردش بین انسان و سگ به عنوان مخزن اصلی بیماری در منطقه، در نمونه‌های تهیه شده از کبد و طحال هر ۴ قلاده سگ کالبدگشایی شده که از لحاظ سرمی نیز مثبت بودند، آماستیگوت‌های لیشمانیا مشاهده گردیدند. گونه‌های لیشمانیای جدا شده از سگ علامت‌دار مناطق تحت بررسی با استفاده از روش‌های مولکولی، Linfantum تعیین گردیدند که این موضوع گویای آن است که در شهرستان بجنورد نیز مانند سایر نقاط ایران کالآزار از نوع مدیترانه‌ای بوده و سگ سانان به عنوان مخازن اصلی این بیماری محسوب می‌شوند.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری نهائی آن که لیشمانیوز احشایی با اندمیسیته پائین در شهرستان بجنورد در حال گردش است. مطالعات تکمیلی اپیدمیولوژیک خصوصاً بر روی ناقلین و مخازن بیماری توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت‌های مالی انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران (طرح شماره ۲۴۰/۱۵۹۲) و با کمک ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر انجام پذیرفته است. لازم است از همکاری‌های بی دریغ دکتر نیک‌پرست مدیر محترم شبکه بهداشت و درمان شهرستان بجنورد و سرکار خانم فیروزه، کارشناس آزمایشگاه لیشمانیوز آن شهرستان تشکر و قدردانی گردد.

از همکار محترم آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران سرکار خانم چاره‌دار و سایر عزیزانی که در اجرای این مطالعه به طور مستقیم و یا غیرمستقیم کمک نموده‌اند

- of Public Health & Institute of Public Health Research 2005;4: 45 -55.
19. Sarkari B, Moshfeh AA, Pedram N, Aminzargar MA, Yazdanpanah B, Akoundi B, Mohebal M. Seroepidemiological study of visceral leishmaniasis in Booyerahmad district in 2005. *Armaghane Danesh* 2007;2: 69-77.
 20. Soleimanzadeh G, Edrissian Gh.H, Movahhed-Danesh AM, Nadim A. Epidemiological aspects of kala-azar in Meshkin-Shahr, Iran: human infection. *Bulletin of the World Health Organization* 1993; 71: 759-62.
 21. Mohammadi-Kheyraadi K, Mohebal M, Mamishi S, Arshi Sh. Epidemiological aspects of Kala-azar in hospitalized patients in Ardabil hospitals. *Journal of School of Public Health & Institute of Public Health Research* 2003; 2: 11-24
 - canine reservoirs in Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences* 1996; 21: 119-24.
 16. Sharma M.C, Gupta A.K, Saran R and Sinha S.P. The effect of age and sex on incidence of kala-azar. *The Journal of communicable diseases* 1990; 22: 277-78.
 17. Arshi Sh, Mohebal M, Akhoundi B, sadeghi-Bazargani H, Sepehram V, Zarei Z, Hajikhani S, Sezavar Sh. Identification of a new endemic focus of kala-azar and seroepidemiological study of visceral Leishmania infection in Ardabil province. *Journal of School of Public Health & Institute of Public Health Research* 2002;1: 9-18.
 18. Mahami M, Mohebal M, Keshavarz H, Hajjaran H, Akhoundi B, Zarei Z. A seroepidemiological survey of visceral leishmaniasis (Kala-azar) in Germe district, Ardabil province. *Journal of School*