بررسی مقایسه‌ای روش‌های سرولوژی با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تشخیص آزمایشگاهی مخازن لیشمانیوز احشایی(سگ)

دکتر عبدالعلی مشفع[*]
ذبیح الله زارعی[**]
بهناز آخوندی[***]
دکتر غلامحسین ادریسیان[****]
دکتر بهرام کاظمی[*****]
دکتر شهرام جمشیدی[******]
دکتر محمود محمودی[*******]
دکتر مژگان بنده پور[********]
دکتر مهدی محبعلی[****]

[*]دکترای انگل شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی
[**]کارشناس حشره شناسی، ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر
[***]دانشجوی دکترای انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی
[****]دکترای انگل شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی
[*****]دکترای انگل شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، دانشکده پزشکی ، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی
[******]دکترای دامپزشکی، استادیار دانشگاه تهران ، دانشکده دامپزشکی ، گروه طب داخلی حیوانات کوچک
[*******]دکترای آمار زیستی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه آمار
[********]دکترای ژنتیک ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی

تاریخ وصول:۱۳۸۸/۱/۱۹
تاریخ پذیرش:۱۳۸۸/۲/۲۱

مؤلف مسئول: دکتر مهدی محبعلی
پست الکترونیک: mohebali@tums.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: لیشمانیوز احشایی سگ و سگسانان به وسیله تک یاخته‌ای به نام لیشمانیااینفانتوم ایجاد می‌گردد و بیماری زئونوتیک آندمیک در کشورهای حوزهٔ مدیترانه و خاورمیانه از جمله ایران می‌باشد. میزان شیوع سرمی بیماری در مناطق مختلف آب و هوایی ایران از ۱۰ تا ۳۷ درصد گزارش شده است. تشخیص عفونت در سگسانان به ویژه سگ‌های فاقد علامت بالینی به منظور کنترل بیماری در انسان از اهمیت خاصی برخوردار است. لذا این مطالعه به منظور مقایسه روش‌های تشخیصی آگلوتیناسیون مستقیم و تست نواری دیپ‌استیک با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه از نوع فرآیند نتایج است که بر روی ۷۱ قلاده سگ از ۴ روستای آندمیک کالاآزار در شهرستان مشکین شهر در سال ۱۳۸۷ انجام شد. پس از گرفتن نمونه خون و پوست از سگ‌های تحت بررسی با روش‌های سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم، تست نواری دیپ‌استیک rK39 و روش ملکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد آزمایش قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری مک نیمار و تست کاپا تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از ۷۱ قلاده سگ مورد مطالعه؛ ۱۵ قلاده (۲۱/۱ درصد) دارای علایم بالینی و ۵۶ قلاده (۷۸/۹ درصد) فاقد علامت بالینی، ۱۷ قلاده (۲۳/۹ درصد) با روش آگلوتیناسیون مستقیم دارای تیتر بیشتر یا مساوی ۱:۳۲۰، ۲۲ قلاده (۳۱ درصد) در روش دیپ‌استیکrk39 مثبت، با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پوست ۲۱ قلاده (۲۹/۶درصد) و خون ۳۱ قلاده(۴۳/۷ درصد) مثبت بودند و در مجموع ۳۸ قلاده (۵۳/۵ درصد) با تست واکنش زنجیره‌ای پلی مراز بر روی نمونه‌های پوست و یا خون آن‌ها مثبت شدند. بیشترین توافق بین روش آگلوتیناسیون مستقیم و دیپ استیک دیده و کمترین همخوانی بین آگلوتیناسیون مستقیم با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست و یا خون مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه روش آگلوتیناسیون مستقیم به دلیل شناسایی بهتر سگ‌های آلوده فاقد علامت و همچنین قابل انجام بودن در شرایط میدانی نسبت به سایر روش‌های مورد مطالعه برتری دارد و روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای ردیابی دی ان ای انگل در نمونه پوست سگ‌ها مناسب‌تر است.

واژه‌های کلیدی: آگلوتیناسیون مستقیم، دیپ‌استیک ، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، لیشمانیوز احشایی، سگ

مقدمه

لیشمانیوز احشایی سگ و سگسانان[1] که به وسیله تک یاخته‌ای به نام لیشمانیااینفانتوم[2] ایجاد می‌گردد، یک بیماری زئونوتیک آندمیک در کشورهای حوزهٔ مدیترانه و خاورمیانه، از جمله ایران می‌باشد. میزان شیوع سرمی بیماری در مناطق مختلف آب و هوایی ایران از ۱۰ تا ۳۷ درصد گزارش شده است(۱).

هر ساله تقریباً ۵۰۰ هزار مورد جدید بیماری لیشمانیوز احشایی در مناطق مختلف جهان اتفاق می‌افتد(۲) که باعث ۵۹ هزار مرگ در نقاط مختلف جهان می‌شود و این در حالی است که میزان بروز این بیماری در برخی کشورها در حال افزایش است(۳).

از زمانی که اولین مورد لیشمانیوز احشایی انسان(کالاآزار) در سال ۱۳۲۸ در شهر تنکابن گزارش گردید، تا کنون حداقل چهار کانون آندمیک این بیماری در مناطقی از استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر مورد مطالعه و تأیید قرار گرفته‌اند و هرساله نیز موارد تک گیر لیشمانیوز احشایی از سایر نقاط ایران گزارش می‌گردد. تقریباً در تمامی این کانون‌ها، سگ‌های مبتلا به لیشمانیوز احشایی مشاهده می‌شدند(۴).

سگ‌های اهلی[3] مهم‌ترین مخازن لیشمانیوز احشایی برای انسان به شمار می‌روند. انگل عامل بیماری به وسیله پشه‌های خاکی زیر خانواده فلبوتومینه بین سگسانان و انسان انتقال می‌یابد(۶ و۵). سگ‌های صاحب‌دار به عنوان یک فاکتور خطر مهم برای عفونت‌های انسانی در مناطق آندمیک بیماری در ایران مورد توجه می‌باشند(۷).

باتوجه به اهمیتی که لیشمانیوز احشایی سگ در دامپزشکی و بهداشت عمومی دارد و از آنجایی که بیش از نیمی از سگ‌های مبتلا به عفونت لیشمانیایی فاقد علایم بالینی هستند(۸)، لذا تشخیص سریع و دقیق لیشمانیوز احشایی در سگ‌های صاحب‌دار، دارای اهمیت فراوانی است. علی‌رغم آن که روش‌های انگل‌شناسی هنوز به عنوان قاطع‌ترین وسیله تشخیص لیشمانیوز احشایی مطرح می‌باشند، ولی این روش‌ها به خصوص در زمانی که حیوان مبتلا فاقد علایم بالینی بوده و بار انگلی در آن کم است از حساسیت پایینی برخوردارند و انجام آنها در شرایط صحرایی بسیار دشوار است.

اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های اختصاصی لیشمانیا خصوصاً IgG در جریان گردش عمومی خون با استفاده از روش‌های سرولوژیک معتبر به عنوان روش‌های اساسی جهت تشخیص آزمایشگاهی و غربالگری عفونت لیشمانیای احشایی مطرح است(۶ و ۳، ۲).

روش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم[4] به وسیله هاریت و همکاران[5](۱۹۸۶) برای تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی پیشنهاد شد(۹). در ایران این روش از سال ۱۳۷۵ در سطح

1-Canine Visceral Leishmaniasis (CVL)
2-*Leishmania infantum*
3-Canis familiaris
4-Direct Agglutination Test (DAT)
5-Harith et al

وسیعی در تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در انسان و مخازن حیوانی انگل مورد استفاده قرار گرفته است(۱۱ و ۱۰، ۲). به دلیل عدم نیاز به وسایل و تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی در بسیاری از شرایط قابل انجام است و تکنسین‌های آزمایشگاه نیز با گذراندن یک دوره کوتاه مدت قادر به انجام آن هستند، اما اشکال این روش آن است که حمل و نقل آنتی‌ژن نیاز به رعایت زنجیره سرد دارد، زمان انجام تست تا خواندن نتایج بیش از یک روز طول می‌کشد و چون ماندگاری آنتی‌بادی‌ها در بدن سگ طولانی مدت است، لذا تشخیص بیماری فعال در سگ‌ها نیاز به دقت زیادی دارد(۱۰و۹).

متد دیگر روش دیپ‌استیک[1] است که آزمایشی یک مرحله‌ای و مطمئن و در حقیقت آزمایش کیفی ایمنولوژیک بر اساس وجود یک غشای کروماتوگرافیک است که آنتی‌بادی‌های ضد لیشمانیوز احشایی را در سرم نشان می‌دهد. این غشا قبلاً به وسیله آنتی‌ژنrK39 و آنتی‌پروتئین A جوجه پوشانده شده است. به راحتی در شرایط میدانی قابل انجام است و تا مدت زمان کوتاهی (تا ۱۰ دقیقه) پس از آزمایش می‌توان نتیجه را خواند، اما این تست برای تشخیص بیماری در سگ‌هایی که دارای علایم هستند مناسب‌تر است. بنابراین برای تشخیص موارد عفونت‌های فاقد علامت زیاد قابل اعتماد نیست(۱۱).

روش ملکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز[2] به خاطر حساسیت فوق‌العاده‌اش بیشترین موفقیت را دارد، اگرچه تفاوت‌هایی نیز دیده می‌شود. این روش می‌تواند بر روی دی‌ان‌ای ژنومی و یا کینتوپلاستی انگل در نمونه‌های خون، پوست، غدد لنفاوی، ترشحات چشم و یا مغز استخوان سگ‌های مبتلا انجام شود. در سال‌های اخیر این تکنیک باعث پیشرفت قابل توجهی در تشخیص لیشمانیوز سگ‌ها شده است به طوری که حساسیت ۸۹ تا ۱۰۰ درصد را در سگ‌های علامت‌دار و یا در مواردی که از نظر انگل‌شناسی اثبات شده‌اند، نشان می‌دهد(۱۴ ـ ۱۲).

با توجه به این تفاوت‌ها، هدف مطالعه حاضر مقایسه این سه روش تشخیصی فوق به خصوص در تشخیص عفونت در سگ‌های فاقد علایم بالینی در مناطق آندمیک این بیماری در ایران بوده است تا بتوان از روش مناسب برای شناسایی مخازن حیوانی این بیماری خطرناک انگلی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه فرآیند نتایج [3] است که بر روی ۷۱ قلاده سگ از ۴ روستای آندمیک بیماری در شهرستان مشکین شهر در سال ۱۳۸۷ با روش تصادفی طبقه‌بندی شده منظم از بین سگ‌های این روستاها انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند.

پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران به تصویب رسید.

1-Dipstick
2-Polymerase Chain Reaction(PCR)
3-Research Process

اطلاعات مربوط به سگ و صاحب آن در پرسشنامه‌های جداگانه‌ای ثبت گردید. پس از مهار نمودن هر سگ، از ورید سفالیک آن مقدار ۵ میلی‌لیتر خون با استفاده از سرنگ‌های ونوژکت گرفته شد. هم‌چنین پس از بی‌حس نمودن سگ با استفاده از کتامین(۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) از ناحیه شکم سگ نمونه پوستی به قطر ۱ سانتی‌متر برداشته و محل برداشتن پوست با بتادین شستشو و در صورت نیاز بخیه زده شد.

در آزمایشگاه ایستگاه تحقیقاتی مشکین شهر سرم خون‌های گرفته شده به وسیله سانتریفوژ جدا گردید. سرم جهت انجام تست‌های سرولوژیک و بافی کوت آن جهت انجام تست ملکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جدا و در لوله‌های استریل در فریزر ۲۰ــ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پوست‌های گرفته شده نیز پس از خشک شدن درلوله‌هایی در همان دما جهت انجام تست ملکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نگهداری گردیدند. تمامی‌نمونه‌ها با استفاده از کلد باکس و در شرایط زنجیرهٔ سرد به آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل گردیدند.

در این بررسی از ۲ روش سرولوژی یعنی تست آگلوتیناسیون مستقیم و تست دیپ‌استیک rk39 استفاده شد.

برای انجام تست آگلوتیناسیون مستقیم از آنتی‌ژن لیشمانیا اینفانتوم Lon-49 که در آزمایشگاه لیشمانیوز گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شده و نگهداری گردید، استفاده شد. این روش به همان صورت که قبلاً به وسیله هاریت و همکاران(۱۹۸۶)، ادریسیان و همکاران (۱۹۹۸) و محبعلی و همکاران(۲۰۰۶) توصیف شده بود، انجام شد(۱۵و۹، ۴).

برای انجام تست دیپ‌استیک از نوارهای تجارتی نیتروسلولزی حاوی آنتی‌ژنrK39 ساخت شرکت سیپرس[1] بلژیک استفاده شد. روش انجام این تست به این صورت بود که یک قطره از سرم سگ مورد آزمایش بر روی ابتدای این نوار قرار داده شد و سپس یک قطره از محلول رقیق کننده مخصوص این تست به آن اضافه شد. پس از ۲ تا ۱۰ دقیقه نتیجه خوانده شد. ظاهر شدن باند در محل وجود آنتی‌ژنrK39 نشان دهنده واکنش بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن و مثبت شدن تست می‌باشد. در این تست باند کنترل نیز باید در تمامی تست‌ها ظاهر شود که نشان دهنده صحت انجام آزمایش می‌باشد(۱۲).

برای انجام تست ملکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ابتدا با استفاده از کیت استخراج دی‌ان‌ای ساخت شرکت کیاژن و روش فنل کلروفرم دی‌ان‌ای نمونه‌های مورد نظر (خون و پوست) استخراج شدند. ژن مورد نظر قطعه ITS2 از انگل لیشمانیا بود و پرایمرهای طراحی شده شامل؛

LeiRNAF (5'-CAC CAC GCC GCC TCC TCT CT-3')

LeiRNAR (5'-CCT CTC TTT TTT CNC TGT GC-3')

بودند.

1-Cypress

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در هر واکنش ۳۰ میکرولیتری از این مواد استفاده گردید؛ ۰/۵ میکروگرم از دی‌ان‌ای استخراج شده، ۲۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۰/۲میلی‌مولار دی‌ان‌تی‌پی، ۳ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ۱/۲۵ واحد آنزیم تگ پلی‌مراز؛ ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیوم و آب مقطر تا رسیدن به حجم نهایی. سپس لوله‌های اپندورف حاوی این مواد در دستگاه ترموسایکلر پریموس با این برنامه قرار داده شدند؛ ۹۴ درجه ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل، ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۴۰ ثانیه و در پایان ۷۲ درجه ۵ دقیقه. پس از پایان کار محصول نهایی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. سپس این ژل‌ها با استفاده از نور UV در دستگاه ژل داک ازنظر وجود باند دی‌ان‌ای تکثیر شده در محدودهٔ مورد نظر بررسی می‌گردید(۱۶). همچنین برای ست کردن روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و نیز برای کنترل روزانه این روش از دی‌ان‌ای استخراج شده از پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا ماژور به عنوان استاندارد استفاده گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS[1] و آزمون‌های آماری مک نیمار[2] و تست کاپا[3] با احتمال ۹۵ درصد تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

از نظر گروه سنی بیشترین سگ‌ها در گروه سنی ۲ و ۳ سال به ترتیب ۲۱ (۲۹/۶ درصد) و ۱۸(۲۵/۴ درصد) قرار داشتند. از نظر جنسیت ۴۵ قلاده (۶۳/۴ درصد) سگ نر و ۲۶ قلاده (۳۶/۶ درصد) قلاده سگ ماده بودند.

از نظر وجود علایم بالینی۱۵ قلاده(۲۱/۱ درصد) سگ علامت‌دار(حداقل دارای یکی از علایم ریزش مو، ضایعات جلدی، رشد غیر طبیعی ناخن، لاغری، اشکال در راه رفتن، کوریورتینیت و ریزش ترشحات چرکی از چشم و لنفادنوپاتی بودند) و ۵۶ قلاده(۷۸/۹ درصد) سگ فاقد علامت بودند. از ۷۱ قلاده سگ مورد آزمایش ۳۹ قلاده (۵۴/۹ درصد) آنها دارای تیتر آنتی‌بادی مساوی و بالاتر از ۱:۸۰ علیه لیشمانیا با استفاده از تست آگلوتیناسیون مستقیم بودند و مابقی آنها یعنی ۳۲ قلاده(۴۵/۱ درصد) منفی بودند. تعداد ۱۷ قلاده(۲۳/۹درصد) دارای عیار مساوی و یا بیشتر از ۱:۳۲۰ بودند.

از ۷۱ قلاده سگ ۲۲ قلاده(۳۱ درصد) سگ از نظر تست دیپ‌استیک مثبت و ۴۹ قلاده(۶۹ درصد)آنها منفی بودند.

از ۷۱ قلاده سگ ۳۸ قلاده(۵۳/۵ درصد) با تست واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(از پوست و یا خون) مثبت و ۳۳ قلاده(۴۶/۵ درصد) منفی بودند. از ۷۱ قلاده سگ ۲۱(۲۹/۶ درصد) مورد در روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست مثبت و ۵۰ مورد(۷۰/۴ درصد) منفی و همچنین در روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز خون ۳۱ مورد(۴۳/۷ درصد) مثبت ۴۰ مورد(۵۶/۳ درصد) منفی بودند.

1-Statistical Package for Social Sciences
2- McNemar's test
3- Kappa test

نتایج حاصل از این مطالعه در جداول ۱، ۲ و ۳ با یکدیگر و با وجود علایم بالینی در سگ‌ها مقایسه شده‌اند و با روش‌های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند.

با توجه به جدول۱ ، میزان هم‌خوانی تست آگلوتیناسیون مستقیم با تست دیپاستیک ۷۶ درصد (عدد کاپا ۴۱/.)، با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نمونه پوست ۶۶ درصد (عدد کاپا ۱۷/.)، با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز خون ۶۳ درصد و با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست و یا خون ۵۳/۵ درصد می‌باشد.

نتایج تست آماری مک‌نیمار بین تست آگلوتیناسیون مستقیم با دیپاستیک و با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد، اما بین تست آگلوتیناسیون مستقیم با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز خون و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست و یا خون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$).

با توجه به جدول ۲، میزان هم‌خوانی تست دیپاستیک با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست ۷۰/۴ درصد، با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز خون ۶۲ درصد و با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست و یا خون ۵۵ درصد می‌باشد.

نتایج تست آماری مک‌نیمار بین تست دیپاستیک با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نمونه پوست و با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نمونه خون اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد، اما بین تست دیپاستیک با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست و یا خون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$).

با توجه به جدول ۳، میزان هم‌خوانی وجود علایم بالینی در سگ‌های مورد مطالعه با تست آگلوتیناسیون مستقیم ۷۷/۵ درصد، با تست دیپاستیک ۷۰/۴ درصد، با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست ۶۰/۶ درصد، با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز خون ۵۷/۷ درصد و با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست و یا خون ۴۶/۵ درصد می‌باشد.

نتایج تست آماری مک‌نیمار بین علایم بالینی با روش آگلوتیناسیون مستقیم و با دیپاستیک و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد، اما بین وجود علایم بالینی با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز خون و با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست و یا خون اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$)

تصویر ۱ الکتروفروز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

جدول ۱: مقایسه نتایج روش‌های مختلف دیپاستیک، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تست آگلوتیناسیون

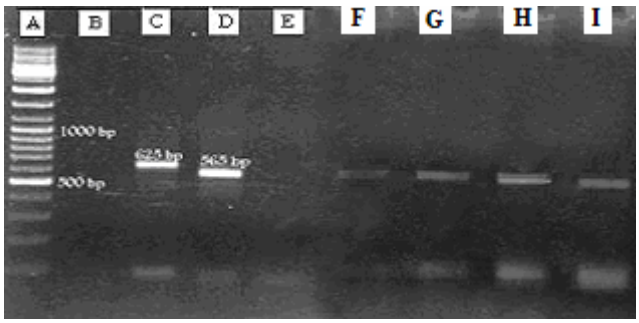
تست آگلوتیناسیون مستقیم	تعداد(درصد)	تست دیپاستیک		واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پوست		واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز خون		واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پوست و یا خون	
		مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)
مثبت	(۲۴)۱۷	(۱۵/۵)۱۱	(۸/۵)۶	(۹/۹)۷	(۱۴/۱)۱۰	(۱۵/۵)۱۱	(۸/۵)۶	(۱۵/۵)۱۱	(۸/۵)۶
منفی	(۷۶)۵۴	(۱۵/۵)۱۱	(۶۰/۵)۴۳	(۱۹/۷)۱۴	(۵۶/۳)۴۰	(۲۸/۲)۲۰	(۴۷/۸)۳۴	(۳۸)۲۷	(۳۸)۲۷
مجموع	(۱۰۰)۷۱	(۳۱)۲۲	(۶۹)۴۹	(۲۹/۶)۲۱	(۷۰/۴)۵۰	(۴۳/۷)۳۱	(۵۶/۳)۴۰	(۵۳/۵)۳۸	(۴۶/۵)۳۳

جدول ۲: مقایسه نتایج روش‌های مختلف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با تست دیپ‌استیک در سگ‌های مورد مطالعه

تست دیپ‌استیک	تعداد(درصد)	واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پوست		واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز خون		واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پوست و یا خون	
		مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)
مثبت	(۳۱)۲۲	(۱۵/۵)۱۱	(۱۵/۵)۱۱	(۱۸/۳)۱۳	(۱۲/۷)۹	(۱۹/۷)۱۴	(۱۱/۳)۸
منفی	(۶۹)۴۹	(۱۴/۱)۱۰	(۵۴/۹)۳۹	(۲۵/۴)۱۸	(۴۳/۶)۳۱	(۳۳/۸)۲۴	(۳۵/۲)۲۵
مجموع	(۱۰۰)۷۱	(۲۹/۶)۲۱	(۷۰/۴)۵۰	(۴۳/۷)۳۱	(۵۶/۳)۴۰	(۵۳/۵)۳۸	(۴۶/۵)۳۳

جدول ۳: مقایسه نتایج روش‌های مختلف آگلوتیناسیون مستقیم، دیپ‌استیک و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز بر حسب وضعیت علایم بالینی در سگ‌های مورد مطالعه

علایم بالینی	تعداد(درصد)	تست آگلوتیناسیون مستقیم		تست دیپ‌استیک		واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پوست		واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز خون		واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پوست و یا خون	
		مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)
دارد	(۲۱/۲)۱۵	(۱۱/۳)۸	(۹/۹)۷	(۱۱/۳)۸	(۹/۹)۷	(۵/۶)۴	(۱۵/۵)۱۱	(۱۱/۳)۸	(۹/۸)۷	(۱۱/۳)۸	(۹/۸)۷
ندارد	(۷۸/۸)۵۶	(۱۲/۷)۹	(۶۶/۱)۴۷	(۱۹/۷)۱۴	(۵۹/۱)۴۲	(۲۳/۹)۱۷	(۵۵)۳۹	(۳۲/۴)۲۳	(۴۶/۵)۳۳	(۴۲/۳)۳۰	(۳۶/۶)۲۶
مجموع	(۱۰۰)۷۱	(۲۴)۱۷	(۷۶)۵۴	(۳۱)۲۲	(۶۹)۴۹	(۲۹/۵)۲۱	(۷۰/۵)۵۰	(۴۳/۷)۳۱	(۵۶/۳)۴۰	(۵۳/۶)۳۸	(۴۶/۴)۳۳



تصویر ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز از نمونه‌های مختلف؛
A ـ مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ B ـ کنترل منفی بدون دی‌ان‌ای، C ـ لیشمانیا ماژور استاندارد ۶۲۵ جفت باز، D ـ لیشمانیا اینفانتوم استاندارد ۵۶۵ جفت باز، E ـ نمونه منفی خون سگ، G و F نمونه‌های مثبت خون سگ‌ها ، I و H نمونه‌های مثبت پوست سگ‌ها

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به این که سگ‌ها مهم‌ترین و اصلی‌ترین مخزن بیماری لیشمانیوز احشایی در ایران می‌باشند، لذا تشخیص بیماری در این حیوانات و شناسایی سگ‌های آلوده در انجام برنامه‌های مبارزه و کنترل این بیماری در جامعه انسانی اهمیت فوق‌العاده ای دارد(۴ و ۱). این مطالعه با هدف بررسی مقایسه‌ای سه روش تشخیصی بیماری لیشمانیوز احشایی در سگ‌ها به منظور تشخیص سریع‌تر و صحیح‌تر آلودگی انجام شد.

در این مطالعه دیده شد که بیشترین هم‌خوانی بین تست آگلوتیناسیون مستقیم و دیپ‌استیک وجود دارد.

با توجه نتایج این مطالعه چنین به نظر می‌رسد که استفاده از تست‌های آگلوتیناسیون مستقیم ودیپ‌استیک و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست در تشخیص لیشمانیوز احشایی سگ‌سانان تفاوتی ندارند، در حالی که روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز خون و یا واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست و یا خون را نمی‌توان به‌اندازهٔ دو تست ذکر شده در تشخیص این بیماری به کار برد. بنا بر این در انتخاب نمونه برای روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، نمونه‌ی پوست مناسب‌تر از خون می‌باشد. دلیل این موضوع نیز تقریباً مشخص است، چرا که میزان بار انگلی در خون محیطی کمتر از بافت‌ها به ویژه پوست حیوان است، چون در چرخه‌ی انتقال انگل نیز دیده می‌شود که پشه‌های خاکی از ترشحات زیر پوست خون‌خواری می‌کنند و به انگل آلوده می‌شوند.

در مجموع با مقایسهٔ این سه روش چنین نتیجه‌گیری می‌شود که روش آگلوتیناسیون مستقیم به عنوان بهترین روش برای تشخیص و پس از آن دیپ‌استیک و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست و بعد واکنش زنجیره‌ای پلی مراز خون قرار می‌گیرند.

در رابطه با تشخیص سگ‌های آلوده بر حسب علایم بالینی که از فاکتورهای مهم تشخیصی می‌باشد، با مقایسهٔ نتایج مطالعه حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که از آگلوتیناسیون مستقیم برای تشخیص برحسب علایم بالینی بیشتر می‌توان استفاده نمود و سپس تست دیپ‌استیک بهترین است و پس از آن واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پوست ارجحیت دارد.

بررسی‌های متعددی وجود دارد که حساسیت تکنیک‌های مختلف را بررسی کرده‌اند. در مطالعه‌ی ۹۰ قلاده سگ در برزیل، ۲۵ قلاده از نظر انگل‌شناسی مثبت بودند و تست ملکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، همه آن‌ها را شناسایی کرد. حساسیت سرولوژی در مقایسه با جداسازی انگل ۸۰ درصد است و وقتی که با تست ملکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مقایسه می‌شود حساسیت آن تنها ۶۳ درصد می‌باشد، درحالی که ۲۲ قلاده سگ از ۵۴ قلاده‌ای که از نظر انگل‌شناسی منفی بودند نیز مثبت شدند(۱۷).

بـه علـت حـساسیت بـالا و قـدرت واکـنش زنجیره‌ای پلی مـراز بـرای شناسـایی حـاملین بـدون علامت، تمایل زیـادی بـرای اسـتفاده از ایـن روش در مطالعه‌های اپیدمیولوژیک وجود دارد. در یـک مطالعـه برروی ۳۰ قلاده سگ بدون‌علامت در مارسی فرانسه، با روش واکنش زنجیره‌ای پلـی مـراز وجـود دی‌ان‌ای انگل در ۲۴ سـگ شناسـایی گردیـد کـه نـشان داد ۸۰ درصد آنها در این منطقه آلوده هستند(۱۸). در مطالعه مشابهی در جزیـره مایورکـا کـه یـک منطقـه آنـدمیک لیشمانیوز است، به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نشان داده شد که ۵۴ درصد سـگ‌هـای سـالم در ایـن منطقه باید به عنوان حاملین بدون علامت لیـشمانیا در نظر گرفته شوند(۱۹).

بر اساس مطالعه‌ای که به وسیله ادریـسیان و همکاران(۲۰۰۳) انجام گرفت، تعـداد ۶۱۶ نمونـه خـون تهیه شـده بـا دیـپ‌اسـتیک، آگلوتیناسـیون مـستقیم و تعـدادی بـا الایـزا و واکـنش زنجیـره‌ای پلـی مـراز و ایمونوفلوروسانس آزمایش شدند که نهایتاً حـساسیت دیپ‌استیک ۹۸/۸ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصـد بـه دسـت آمـد کـه در مقایـسه بـا سـایر تـست‌هـا در آن بررسی بالاتر بـود. همچنـین بیـشترین همـاهنگی بـین دیپ‌استیک و الایزا دیده شد. در مـورد سـگ‌هـا از ۱۹ قلاده استفاده شد که ۴ قلاده شاهد منفـی و ۱۵ قـلاده گـروه آزمـایش بودنـد. سـگ‌هـای گـروه آزمـایش بـا لیشمانیا اینفـانتوم تلقـیح شـدند. از تمـامی‌سـگ‌هـا در فواصل زمانی یک مـاه و دو مـاه و نـیم پـس از تلقـیح نمونه تهیه شده که بـا دیـپ‌اسـتیک و الایـزا آزمـایش شدند. مقادیر حساسیت و ویژگی تست‌هـا سـه مـاه و نیم پس از تلقیح انگل به حداکثر رسـید و دیـپ‌اسـتیک در مقایسه با الایزا از حساسیت و ویژگی بالاتر (۹۳ و ۱۰۰ درصد) برخوردار بود(۲۰).

در مطالعه‌ای که سـاندر و همکـاران[1](۱۹۹۸) بـر روی آنتـی‌ژن rK39 انجـام دادند،نـشان داد کـه دیپ‌استیک شـاخص حـساس و قابـل اعتمـادی بـرای کالاآزار فعال است. آنها حساسیت دیپ‌استیک را برای تشخیص کالاآزار نوع هندی ۱۰۰ درصد و ویژگـی آن را ۹۸ درصد گزارش کردند(۲۱).

در بررسی محبعلـی و همکـاران(۲۰۰۴) تـست دیپ‌استیک در تشخیص موارد حـاد بیمـاری کـالاآزار یعنـی عیارهـای مـساوی و بـالاتر از ۱:۳۲۰ دارای حساسیت زیادی می‌باشد، همچنان که در مطالعه‌هـای گذشته در مورد انسان نیز همین امر را نشان داده‌انـد. پس ایـن تـست در تـشخیص مـوارد بـا علایـم بـالینی نسبت به موارد فاقد علایـم بـالینی موفقیـت بیـشتری دارد، موارد فاقـد علایـم بـالینی، در مقایـسه بـا نتـایج عیارهای مختلف آگلوتیناسیون مستقیم با دیپ‌اسـتیک در همه عیارها بـه جـز عیـار ۱:۱۶۰ و ۱:۳۲۰ اخـتلاف معنی‌داری وجود ندارد(۱۱).

در مطالعـه‌ای کـه بـه وسـیله ریتینگـر و همکاران[2](۲۰۰۲) در برزیل صورت گرفت ۱۷۵ قـلاده سـگ بـا سـه روش واکـنش زنجیـره‌ای پلـی مـراز ، دیـپ‌اسـتیک و الایـزا مـورد آزمـایش قـرار گرفتنـد،

1-Sunder et al
2- Reithinger et al

دیپاستیک به‌ترتیب دارای ویژگی و حساسیت ۷۵ـ۶۱ درصد و ۷۷ـ۷۲ درصد بود(۲۲).

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که برای تشخیص لیشمانیوز احشایی در سگ‌ها برحسب علایم بالینی و شناخت سگ‌های فاقد علامت تست آگلوتیناسیون مستقیم بهتر از سایر تست‌ها است. در حالی که روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به خاطر حساسیت بالا، تعداد بسیار زیادتری مثبت نشان می‌دهد که البته نمی‌توان گفت همه آنها مبتلا هستند، چرا که بسیاری از این سگ‌ها که در نمونه آنها دی‌ان‌ای انگل ردیابی شده است ممکن است حاوی انگل مرده باشند و مثلاً پس از زمان کوتاهی از آلودگی انگل به وسیله سیستم ایمنی از بین رفته باشد و قطعاتی از ژنوم انگل در نمونه باقی مانده باشد و یا حتی ممکن است در بدو ورود انگل نمونه‌گیری شده باشد که سرنوشت این انگل نامعلوم است.

روش دیپاستیک بعد از آگلوتیناسیون مستقیم قرار دارد. در مجموع با توجه به مزایای تست آگلوتیناسیون مستقیم و امکان تهیه آنتی‌ژن در ایران می‌توان این تست را به‌طور جامع به کار برد و هزینه انجام آن به مراتب از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز کمتر است، ولی برای اثبات وجود انگل و جریان داشتن چرخه انتقال در مناطق آندمیک روش‌های ملکولی بهتر از سایر روش‌هاست.

در نهایت پیشنهاد می‌گردد با توجه به امکانات موجود فعلی در کشور برای مطالعه‌های اپیدمیولوژیک از تست‌های سرولوژی استفاده گردد و برای اثبات وجود آلودگی در مخازن این بیماری از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شود.

تقدیر و تشکر

هزینه انجام این مطالعه به وسیله انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران به شماره پروژه ۲۴۰/۴۶۵۹ و ۱۳۰/۶/۱۰۴۴۷ تأمین شده است که بدین‌وسیله مراتب سپاسگزاری خود را اعلام می‌داریم. از همکاران ارجمند دکتر هما حجاران، دکتر ابوالفضل میاهی‌پور، دکتر رضا نیکزاد، سرور چاره‌دار، محمدتقی سطوت و تمامی بهورزان روستاهای مشمول طرح به خصوص اسماعیل تقدیسی و زهرا فرامرزی به خاطر همکاری‌های ارزشمندشان تقدیر و تشکر می‌گردد.

Comparison between Serology and PCR Methods for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis

Moshfe A*,
Zarei Z,**
Akhoundi B*,**
Edrissian Gh**,**
Kazemi B***,**
Jamshidi Sh****,**
Mahmoudi M*****,**
Bandehpour M******,**
Mohebali M**.**

*Assistant Professor of Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
**BSc in Entomology. Meshkin-Shahr Research Station, Ardabil, Iran
***PhD Candidate of Parasitology, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
****Professor of Medical Parasitology, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
*****Professor of Parasitology, Cellular & Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
******Assistant Professor of Veterinary, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran
*******Professor of Biostatistics, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
********PhD of Molecular Genetics, Cellular & Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 08/04/2009
Accepted: 11/05/2009
Corresponding Author: Mohebali M
Email: mohebali@tums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Canine visceral leishmaniasis (CVL) caused by *Leishmania Infantum* is endemic in most Mediterranean basin and its seroprevalence ranges from 10 to 37%. Diagnosis of Infection is very important especially in asymptomatic dogs for control of human leishmaniasis for control of human visceral leishmaniasis. This study was aimed to compare three methods for detection of canine visceral leishmaniosis.

Materials & Methods: In this research process study, 71 dogs were selected from 4 endemic villages in Meshkin-Shahr district. Peripheral blood samples were tested by serologic (DAT and Dipstick rK39) and molecular (PCR) methods. Skin samples were tested by molecular (PCR) methods. Twelve samples of PCR products were sequenced that all of them were identified as Leishmania infantum and 2 nucleotide sequence data submitted to the GenBank database.

Results: From 71 dogs that were studied, 21.1% were symptomatic and others were asymptomatic(78.9%). 17 dogs (23.9%) had ≥ 1:320 titer of antibody by direct agglutination test (DAT). Twenty two dogs(31%) were positive by Dipstick rK39 test, 21 dogs (29.6%) were positive by PCR on skin samples, 31 dogs (43.7%) were positive in blood PCR and 38 dogs (53.5%) were positive by skin/blood PCR. The highest correlation was between DAT and Dipstick test (76%).

Conclusion: According to the results of this study, we can diagnose infection in symptomatic and asymptomatic dogs by DAT as a suitable method and PCR is suitable to follow parasite DNA in skin and other tissues of dogs.

Keywords: Direct Agglutination Test(DAT), Dipstick rK39, PCR, Visceral Leishmaniosis, Dog

REFERENCES:

1.Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi Sh, Zarei Z, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the islamic republic of iran. Vet Parasitol 2005; 129: 243–51.

2.Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27: 305–18.

3.Fisa R, Ga´llego M, Castillejo S, Aisa M.J, Serra T, Riera C, et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. Vet. Parasitol 1999; 83: 87–97.

4.Edrissian GH, Hafizi A, Afshar A, Soleiman-Zadeh G, Movahed-Danesh AM, Garoussi A. An endemic focus of visceral leishmaniasis in meshkin-shahr, east azerbaijan province, north-west part of iran and ifa serological survey of the disease in this area. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1998; 81(2):238-48.

5.Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. Clin. Dermatol 1996; 14: 417–23.

6.Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, 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: 53–7.

7.Gavgani AS, Mohite H, Edrissian GH, Mohebali M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with leishmania infantum. Am J Trop Med Hyg 2002: 67(5): 511-5.

8.Molina R, Amela C, Niet J, San-Andres M. Infectivity of dogs naturally infected with leishmania infantum to colonized phlebotomus perniciosus. Tran R Soc Med Hyg 1994: 88: 491-3.

9.Harith AE, Kolk AH, Kager PA. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero epidemiological studies of visceral leishmaniasis. Tran R Soc Med Hyg 1986; 80(4): 583-7.

10.Bokai S, Mobedi I, Edrissian GhH, Nadim A. Seroepidemiological study of canine visceral leishmaniasis in meshkin- shahr, northwest of iran. Arch Inst Razi 1998; 48-49:41–6.

11.Mohebali M, Taran M, Zarei Z. Rapid detection of Leishmania infantum infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rK39 test and direct agglutination, vet. Parasitol 2004; 121: 239–45.

12.Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. Vet Parasitol 2001; 99: 105-11.

13.Silva ES, Gontijo CMF, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP. Detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2001; 65:896-8.

14.Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitology 2002; 125: 197-207.

15.Mohebali M, Edrissian GH, Nadim A, Hajjaran H, Akhoundi B, Hooshmand B, et al. Application of Direct Agglutination Test (DAT) for the diagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis in Iran. Iranian J Parasitol 2006; 1(1):15-25.

16.Kazemi B, Bijanpour H, Asgharzadeh M, Ghazanchaei A, Mazloumi Gavgani A. The ability of T2/B4 primers to detect leishmania infantum among peripheral blood of visceral leishmaniasis patients in Iran. African J Biotechnol 2008; 7(7): 860-4.

17.Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock L, Eulalio C, et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1995; 53: 251-5.

18.Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. Am J Trop Med Hyg 1996; 55: 273-7.

19.Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of Leishmania infarztum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol 2001; 39: 560-3.

20.Edrissian Gh, hamsi Sh, Mohebali M, Hajjaran H, Mamishi S, Desjeux PH. Evaluation of rapid Dipstick rk39 test in diagnosis and seological survey of visceral leishmaniasis in humans and dogs in Iran. Archives of Iranian Medicine 2003; 6(1): 29-31.

21.Sunder S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. Lancet 1998; 351(21): 563-5.

22.Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of Leishmania infantum infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J Clin Microbiol 2002; 40(7): 2352-6.