مجله تخصصی اپیدمیولوژی ایران؛ ۱۳۸۷، دوره ٤، شماره ۳ و ٤: صفحات ۵۰-٤۳.

مقاله پژوهشی

سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی به روش آگلوتیناسیون مستقیم(DAT) در شهرستان بجنورد از استان خراسان شمالی در سال ۱۳۸٦

وحید ترابی[۱]، مهدی محبعلی[۲]، غلامحسین ادریسیان[۲]، حسین کشاورز[۲]، مسعود مهاجری[۳]، هما حجاران[٤]، بهناز آخوندی[۵]، علی اکبر صنعتی[٦]، 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

[٤] 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

[٦] 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 محبعلی، نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، تلفن: ۸۸۹۵۱۴۰۰، پست الکترونیک: mohebali@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 ۱۳۸٦ و به منظور ارائه برنامه کنترل این بیماری در آن شهرستان انجام گردیده است.

روش‌کار: 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 ٤ قلاده سگ مشکوک به لیشمانیوز احشائی کالبد گشایی شدند. جهت تعیین گونه انگل،از روش‌های ملکولی TS1 PCR استفاده گردید.

نتایج: در مجموع پلاسمای خون ۱٦۰۸ نفر از افراد تحت مطالعه به روش DAT مورد آزمایش سرولوژی قرار گرفتند که ۳۸ نفر(۲/۳٦٪) از آن‌ها دارای عیار ۱:۸۰۰ و به بالا و فقط ۹ نفر(۰/۵٦٪) 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 پائین مشاهده نگردید($P>0/05$). گونه‌های لیشمانیای جدا شده مربوط به ۲ قلاده از ٤ قلاده سگ علامت‌دار ؛ L.infantum تعیین گردیدند و همچنین سکانس‌های 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

لیشمانیوز احشائی (کالاآزار) 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 بهداشت 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). کالاآزار در ایران از نوع مدیترانه‌ای بوده و عامل آن لیشمانیا اینفانتوم، ناقل آن گونه هائی از پشه خاکی‌های جنس فلبوتوموس و مخزن انگل، سگ و سگ سانان وحشی هستند(۴،۳). 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 (۷،۶،۵،۴). از ابتدای سال ۱۳۷۵ تا نیمهٔ اول سال ۱۳۸۵ جمعا ۱۱۰ مورد کالاآزار از استان خراسان شمالی گزارش شده است. تمام موارد ثبت شده کالاآزار 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 کالاآزار 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 درآن 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 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 ۴روستای 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 کالاآزار 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 (بچه های زیر ۱۲ سال) ساکنین هر یک از خوشه‌های (روستاها) انتخاب شده انجام گردید. حجم نمونه، با توجه به شیوع سرمی لیشمانیوز احشائی (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

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

با توجه به اینکه سگ‌ها مخازن اصلی بیماری لیشمانیوز احشائی 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 احشائی 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 (۸و۶). 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 اشنایدر+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[1] 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 نیزبه 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 (۸و۶). در این روش، آنتی ژن در مجاورت رقت‌های مختلف سرم یا پلاسمای 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 V شکل، رقت‌های مورد نیاز از پلاسمای 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 تکمه 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 می شدند. بالاترین رقت از نمونه سرمی که آگلوتیناسیون در آن ایجاد شده به عنوان حداکثر عیارپذیرفته 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 احشائی 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 سرولوژی

در این بررسی جمعاً تعداد ۱۶۰۸ نمونه پلاسمای 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 پلاسمای انسانی، ۱۴۴۹نمونه (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 آگلوتیناسون مستقیم، عفونت سرمی لیشمانیایی در ۷ نفر از کودکان ۱۲ سال و به پایین با عیار برابر ۱:۳۲۰۰

[1] Random 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 ۱۳۸٦

گروه‌های سنی	تعداد نمونه				جمع	موارد مثبت(عیار ۱:۸۰۰)				جمع	موارد مثبت (عیار ۱:۳۲۰۰)				جمع
	مونث		مذکر			مونث		مذکر			مونث		مذکر		
	تعداد	درصد	تعداد	در صد		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	۳	۰/۳۸	۷
بالای ۱۲ سال	۹۵	۵۹/۷۵	۶۴	۴۰/۲۵	۱۵۹	۱	۱/۰۵	۱	۱/۵۶	۲	۱	۱/۰۵	۱	۱/۵۶	۲
جمع	۷۷۱	۴۷/۹۵	۸۳۷	۵۲/۰۵	۱۶۰۸	۱۶	۲/۰۷	۱۳	۱/۵۵	۲۹	۵	۰/۶۵	۴	۰/۴۸	۹

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 ۱۳۸٦

نوع روستا	نام روستا	تعداد موارد سرولوژی مثبت		تعداد موارد	جمع
		۱: ۸۰۰	۱:۳۲۰۰	سرولوژی منفی	
مورد	اسفیدان	۱۰	۴	۲۵۴	۲۶۸
	بچه دره	۵	۲	۳۸۸	۳۹۵
	مهنان*	۹	۳	۲۶۸	۲۸۰
	طراقی کرد	۵	۰	۱۶۸	۱۷۳
شاهد	مزارلق	۰	۰	۱۸۰	۱۸۰
	قره باشلو	۰	۰	۳۷	۳۷
	نوده	۰	۰	۲۵۴	۲۵۴
	پاقله	۰	۰	۲۱	۲۱
جمع		۲۹	۹	۱۵۷۰	۱۶۰۸

*انگل لیشمانیا اینفانتوم از سگ‌های این روستا جدا سازی شد.

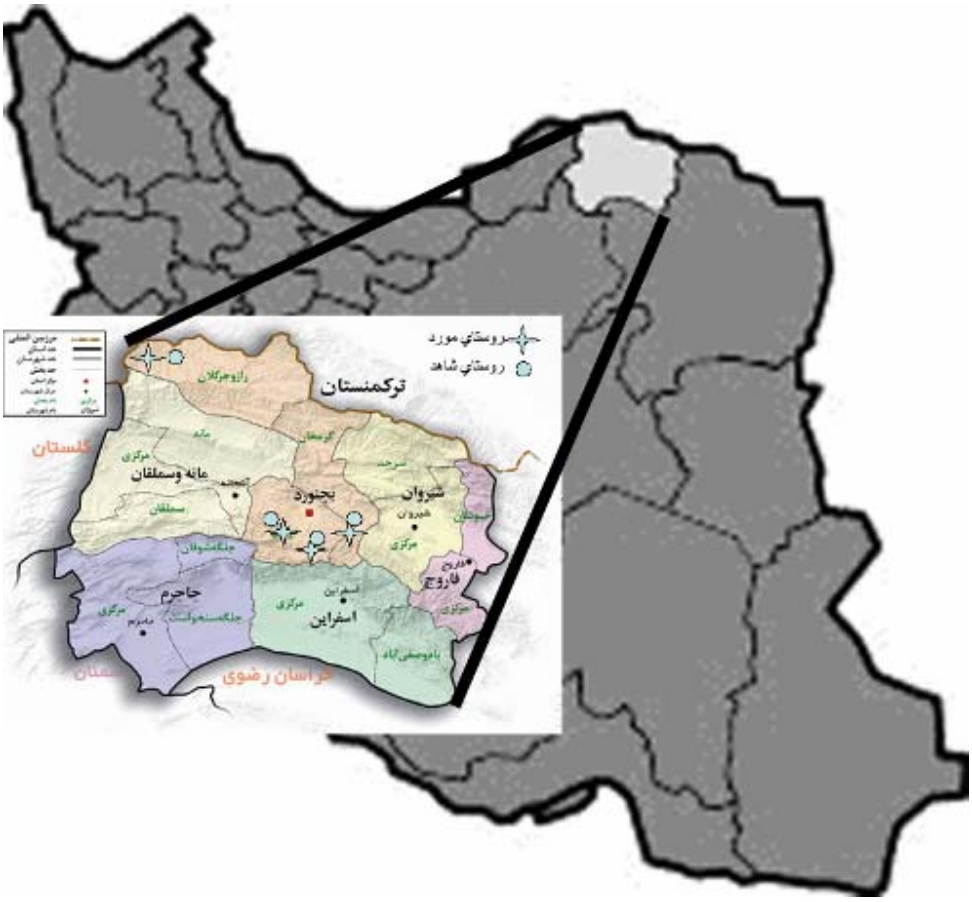
شناسایی شد و شیوع بیماری در این گروه سنی ۰/۴۸٪ برآورد گردید و ۲ نفر از افراد بالای ۱۲ سال نیز دارای عیار برابر ۱:۳۲۰۰ بودند و شیوع بیماری در این گروه سنی ۱/۲۶٪ برآورد گردید. یک نمونه (۰/۰۶۲ ٪) با دارا بودن عیار ۱:۱۶۰۰ مشکوک به ابتلا به کالاآزار بوده است لذا جهت بررسی بیشتر نمونه فوق با استفاده از روش IFA نیز از لحاظ تیتر آنتی‌بادی ضد لیشمانیوز احشائی مورد ارزیابی قرار گرفت که نتیجه آن کاملا 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 کالاآزار بودند به طور معنی‌داری از روستاهای شاهد که هیچ موردی از کالاآزار از آن‌ها گزارش نشده بود بیشتر بوده است. جدول شماره ۲ توزیع فراوانی 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 (جداول شماره۲ و ۱).

با انجام آزمون آماری کای مربع مشاهده شد که بین دو جنس مذکر و مونث و همینطور جمعیت‌های بالای ۱۲ سال با جمعیت‌های ۱۲ سال و به پائین، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

نتیجه نهائی 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 شماره۱).

یافته‌های مولکولی

درنمونه‌های تهیه شده از بافت کبد و طحال هر ۴ قلاده سگ کالبد گشایی شده که از لحاظ سرمی نیز مثبت (دارای عیارهای ۱:۳۲۰ ≤) بودند، آماستیگوت‌های لیشمانیا مشاهده گردید. در



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

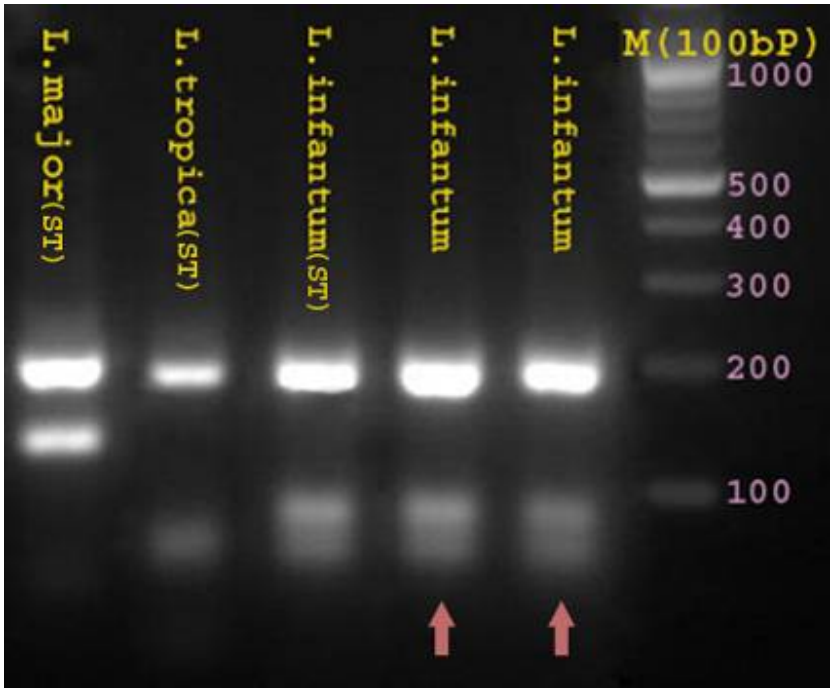
این مطالعه، ۲ نمونه از ۴ نمونه مثبت سگ‌های مورد بررسی در محیط‌های کشت رشد و تکثیر پیدا کردند که پس از جداسازی و تخلیص DNA آن‌ها و انجام آزمایش به روش RAPD-PCR و پرایمر ده نوکلئوتیدی AB1-O7 در مقایسه با سوش‌های استاندارد لیشمانیا (تروپیکا، ماژور و اینفانتوم)، گونه انگل، لیشمانیا اینفانتوم تعیین گردید. متاسفانه نمونه‌های مربوط به ۲ قلاده 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 مجددا 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 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 ایزوله ها با شماره های 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 احشائی 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 احشائی از استان خراسان شمالی گزارش شده است و به وسیله روش های پارازیتولوژی به تایید رسیده‌اند که بیش از نیمی از آن‌ها مربوط به شهرستان بجنورد بوده است. از آنجایی‌که تا کنون مطالعه‌ای راجع به خصوصیات اپیدمیولوژیک عفونت احشائی



شکل ۱- نتایج روش مولکولی PCR- RFLP مربوط به قطعه ITS1 در ایزوله های مربوط به سگ‌های کالبد گشایی شده از شهرستان بجنورد در سال ۱۳۸٦

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 روش‌های مطلوب، ساده و عملی جهت بررسی‌های 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 سرولوژی 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 می‌دهد که از مجموع ۶۵۵۸ مورد سرم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف آب و هوائی ایران که به روش فعال خانه به خانه جمع‌آوری شده بودند، ۱۶۸ (۲/۶درصد) مورد با روش DAT دارای نتایج سرولوژی مثبت بوده‌اند (۶). علاوه بر آن در این مطالعه ۱۰۸۸ نمونه از سرم‌های جمع‌آوری شده فوق مربوط به استان‌های خراسان بوده‌اند که تنها ۵ مورد از آن‌ها (۰/۴۶درصد) 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 ۱۵ نفر از بچه‌های زیر ۱۰ سال مشکوک به کالاآزار که دارای علائم اختصاصی از قبیل تب‌های 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 ۱۰۲۴۰۰ بودند و چون دارای علائم بالینی بودند لذا بلافاصله تحت درمان قرار گرفتند. با استفاده از بررسی‌های یاد شده به نظر می‌رسد که کانون‌هائی 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 معنی‌داری بین دو جنس مونث (۲/۷۲٪) و مذکر (۲/۳٪) و جمعیت‌های بالای ۱۲ سال (۲/۵۱٪) با جمعیت‌های ۱۲ سال و به پائین (۲/۳۵٪) مشاهده نگردید. بر اساس مطالعه‌ای که در هندوستان توسط Sharma و همکاران انجام شد، میزان بروز کالاآزار در سنین قبل از بلوغ، اختلاف معنی‌داری 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 هورمون‌های جنسی زنانه در جنس مونث نسبت داده‌اند (۱۶). بر اساس مطالعات انجام شده توسط برخی از محققین ایرانی در مواردی بین میزان شیوع سرمی و جنسیت اختلاف معنی داری

مشاهده شده (۶،۷،۱۷) و در مواردی هیچگونه اختلاف معنـی‌داری دیده نشده است (۱۸،۱۹). به نظر می‌رسد کـه ایـن تفـاوت‌هـا بـه روش نمونه برداری، حجم نمونه جمع‌آوری شده و وجود و یا عـدم وجود علائم بالینی و عیار مرزی در نظر گرفته شده ارتباط داشـته باشد. بر اساس نتایج بعضی از مطالعات انجام شده در ایران فراوانی لیشمانیوز احشائی علامت‌دار با سن ارتباط دارد و در اکثر موارد در بچه‌های زیر ۵ سال دیده مـی‌شـود (۴،۵،۶،۷،۱۰،۲۰،۲۱) ولـی از نظر عفونت لیشمانیای احشائی و افراد سرولوژی مثبت صرف نظـر از عیار آنتی‌بادی اندازه‌گیری شده، ممکن است اختلاف آماری قابل توجهی بین سنین مختلف دیـده نـشود کـه نتـایج حاصـل از ایـن 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 نمونـه‌هـای تهیـه شـده از کبـد و طحـال هـر ۴ قـلاده سـگ کالبـدگـشایی شـده کـه از لحـاظ سـرمی نیـز مثبـت بودنـد، آماستیگوت‌های لیشمانیا مشاهده گردیدند. گونه‌هـای لیـشمانیای جدا شده از سگ علامت‌دار منـاطق تحـت بررسـی بـا اسـتفاده از روش‌های مولکولی، L.infantum تعیین گردیدند کـه ایـن موضـوع گویای آن است که در شهرستان بجنورد نیز مانند سایر نقاط ایران کالاآزار از نوع مدیترانه‌ای بوده و سـگ سـانان بـه عنـوان مخـازن اصلی این بیماری محسوب می‌شوند.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری نهائی آن که لیشمانیوز احشائی با اندمیسیته پـائین در شهرستان بجنـورد در حـال گـردش اسـت. مطالعـات تکمیلـی اپیدمیولوزیک خصوصا بـر روی نـاقلین و مخـازن بیمـاری توصـیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت‌هـای مـالی انـستیتو تحقیقـات بهداشـتی دانشگاه علوم پزشکی تهران (طرح شماره ۲۴۰/۱۵۹۲) و با کمـک ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر انجام پذیرفته اسـت. لازم است از همکاری‌های بی دریغ دکتر نیک‌پرست مدیر محترم شبکه بهداشـت و درمـان شهرسـتان بجنـورد و سـرکار خـانم فیـروزه ،کارشناس آزمایشگاه لیـشمانیوز آن شهرسـتان تـشکر و قـدردانی گردد.

از همکار محترم آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران سرکار خانم چـاره‌دار و سـایر عزیزانـی کـه در اجرای این مطالعه به طور مستقیم و یا غیرمستقیم کمک نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. World Health Organization. The leishmaniases, Report of a WHO Export committee World Health Organization. Geneva: 1990, 793.
2. Godal T. New dimension for parasaitology in the 21st century. In:Ozcel A. Alkan MZ(eds) parasitology for 21st century CAB International 1996: 1-13.
3. Mohebali M, Hajjaran 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. Mohebali 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. Mohebali M, Edrissian Gh.H, Nadim A, Hajjaran H, Akhoundi 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. Bulletindela societe depathologie exotique 1988; 81: 238-48.
8. Harith A, Slappedel RJ, Reiter I, Van Kanpen F, De Korte P, Huigen E and 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, Mohebali M, Hajjaran H, Rezaei S and Mamishi S. Diagnosis and charactization 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,Mohebali 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,Mohebali M,Hajjaran 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, Rodriques 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, Hajjaran H, Mohebali M, Soleimanzadeh G and Bokaei S. Application and evaluation of direct agglutination test in ser-diagnosis of visceral leishmaniasis in man and

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, Mohebali 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, Mohebali M, Keshavarz H, Hajjaran H, Akhoundi B, Zarei Z Aseroepidemiological survey of visceral leishmaniasis (Kala-azar) in Germi district,Ardabil province. Journal of School 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,Mohebali 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-Kheyrabadi K, Mohebali 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