

مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی

دوره ۴ شماره ۱ بهار ۱۳۸۵، صفحات: ۸-۱

ارزیابی کیت لاتکس آگلوتیناسیون (Katex®) جهت تشخیص آنتی ژن های لیشمانیا در ادرار مبتلایان به لیشمانیوز احشایی

سهیلا مولایی : دانشجوی کارشناسی ارشد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر مهدی محبعلی: استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران - نویسنده رابط mmohebali@hotmail.com

بهناز آخوندی : کارشناس ارشد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

ذبیح الله زارعی : کارشناس ارشد ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر

دریافت: ۸۳/۱۲/۲۶ پذیرش: ۸۴/۳/۲

چکیده :

زمینه و هدف : این مطالعه از شهریورماه ۱۳۸۲ به مدت یکسال وبا هدف ارزیابی آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون با استفاده از نمونه ادرار جهت تشخیص سریع لیشمانیوز احشایی انسان در استان اردبیل انجام گردید.

روش کار : در این مطالعه، از کیت Katex ساخت شرکت Kalon انگلستان استفاده شد و نتایج حاصله با نتایج آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) بر روی سرم خون مبتلایان مقایسه گردید. نمونه های دارای علائم اختصاصی کالا آزار و آنتی بادی ضد لیشمانیا با عبارهای ۳۲۰۰:۱ و بیشتر به روش DAT) و ۶۵ نفر افراد دارای سابقه عفونت لیشمانیایی (با عبارهای ۸۰۰:۱ و بیشتر به روش DAT و بدون علائم اختصاصی) و ۹۰ نفر افراد سالم (بدون آنتی بادی اختصاصی و فاقد علائم بالینی) به عنوان جمعیت کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج : نتایج این مطالعه نشان داد که روش لاتکس آگلوتیناسیون در مرحله حاد (فعال) بیماری، دارای حساسیت ۸۲/۷٪ و ویژگی ۹۸/۹٪ و در افراد دارای سابقه بیماری، از حساسیت ۶/۱۵٪ و ویژگی ۹۸/۹٪ برخوردار می باشد. میزان هماهنگی بین DAT و Katex در مرحله حاد بیماری ۹۴/۹٪ و در مرحله دارای سابقه بیماری ۵۹/۳٪ بوده است.

نتیجه گیری : آزمایش Katex جهت تشخیص مرحله حاد بیماری کالا آزار دارای ارزش تشخیصی فراوانی است.

واژگان کلیدی : لاتکس آگلوتیناسیون ، آگلوتیناسیون مستقیم ، لیشمانیوز احشایی ، تشخیص آزمایشگاهی ، ادرار، انسان

لیشمانیا اینفانتوم است (Edrissian Gh.H. et al.)

(۱۹۹۹).

کالا آزار در اغلب نقاط ایران به صورت اسپورادیک و در بعضی از استانهای کشور به طور اندمیک یافت می شود (Edrissian Gh.H. et al. ۱۹۹۹).

مقدمه :

لیشمانیوز احشایی (کالا آزار) بیماری عفونی خطرناکی است که اگر به موقع تشخیص و درمان نشود میزان مرگ و میر بالایی خواهد داشت. لیشمانیوز احشایی در ایران از نوع مدیترانه ای بوده و عامل آن

قرار گرفت که نتایج حاصله رضایت بخش بود (Attar et al. ۲۰۰۱).

در تشخیص و مطالعات سرواپیدمیولوژیک لیشمانیوز احشایی، آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم یک روش ساده، مقرون به صرفه و کاربردی است. این آزمایش از حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برخوردار می باشد (Harith A.E. et al. ۱۹۸۸).

از آنجایی که آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم امروزه جهت تشخیص و بررسی سرو اپیدمیولوژی کالا آزار در انسان و حیوانات مخزن در مناطق مختلف ایران خصوصاً مناطق اندمیک به طور گسترده استفاده می شود و مطالعات انجام شده توسط واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نمایانگر آن است که این آزمایش از نظر سهولت کار، اقتصادی بودن و ویژگی نسبت به سایر آزمایش ها برتری دارد (Edrissian Gh.H. et al. ۱۹۹۳). لذا در این مطالعه به عنوان آزمایش مبنا (Golden standard) مورد استفاده قرار گرفته است.

در این تحقیق با استفاده از روش Katex به تشخیص آنتی ژن های لیشمانیایی در ادرار مبتلایان به کالا آزار اقدام نموده و نتایج حاصله با روش سروولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) مورد مقایسه قرار گرفتند.

روش کار :

روش این مطالعه مقایسه نتایج (Process research) روش است. در این روش نمونه های سرم و پلاسما به روش DAT و نمونه های ادرار به روش Katex مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج حاصله با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند.

روش آزمایش DAT : این آزمایش با استفاده از سرم یا پلاسما در پلیت های ۹۶ حفره ای (۸×۱۲) به شکل V انجام می گیرد. آنتی ژن مورد استفاده در این آزمایش در آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه تهران به روش دکتر هریت با

مناطق از استان اردبیل کانون اندمیک بیماری بوده و تعداد موارد بیماری در این مناطق در حال افزایش می باشد و تا زمان کنترل بیماری در انسان ها و مخازن حیوانی، تشخیص به موقع و درمان بیماری، نقش اصلی را در تقلیل مرگ و میر این بیماری خواهد داشت (WHO ۱۹۹۰).

از زمان شناخت انواع لیشمانیوزها مرتباً روش های تشخیصی جدیدتر و دقیق تری ابداع شده اند که هر یک مزایا و معایب خاص خود را داشته اند. انجام روش های پارازیتولوژیک و سروولوژیک اغلب محتاج روش های تهاجمی از جمله خونگیری و نمونه برداری از طحال و یا مغز استخوان بیمار است که در مراحل تهیه این نمونه ها ممکن است مشکلاتی از قبیل آلودگی به عفونتهای جدید از جمله هپاتیت و ایدز پیش آید. علاوه بر آن حساسیت مغز استخوان جهت مشاهده اجسام لیشمان نیز حدود ۶۹٪ برآورد شده است (Soleimanzadeh G. et al. ۱۹۹۳). در روش های سروولوژی مشکلاتی از قبیل پیچیدگی تهیه آنتی ژن، مشکلات اجرایی، اتلاف وقت، مصرف زیاد مواد و نیاز به تجهیزات گران قیمت، وجود دارد. بنابراین احتیاج به روش های سریع، کم هزینه و بی خطر روز به روز بیشتر احساس می شود. از سوی دیگر افزایش موارد لیشمانیوز احشایی در بیماران مبتلا به سندرم نقص ایمنی و کاهش پاسخ مناسب و کمبود سطح آنتی بادی لازم برای بررسی تست هایی که با سنجش آنتی بادی به بررسی وجود بیماری می پردازند این ضرورت را ایجاد می کند که از جستجوی آنتی ژن و پیگیری آن در نمونه های آزمایشگاهی برای تشخیص بیماری استفاده شود (Colmenares M. et al. ۱۹۹۵).

یکی از این روش ها، جستجوی آنتی ژن های لیشمانیایی در ادرار مبتلایان توسط روش لاتکس آگلوتیناسیون (Katex) است. این روش اولین بار توسط Attar و همکاران در سال ۲۰۰۱ به منظور تشخیص آنتی ژن های لیشمانیایی در ادرار بیماران مورد ارزیابی

درجه آگلوتیناسیون به شرح زیر قرائت شد (شکل ۱) :

آگلوتیناسیون ++++ : به شکل قالب چین خورده وتوده ابر مانند

آگلوتیناسیون +++ : به شکل کلافه بزرگ

آگلوتیناسیون ++ : خیلی ریز

آگلوتیناسیون + : چند آگلوتیناسیون ریز پراکنده در مقایسه با کنترل منفی

عدم آگلوتیناسیون : شیری رنگ

نحوه ارزشیابی آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون: جهت ارزیابی Katex در تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی، ادرار افراد گروههای زیر مورد آزمایش قرار گرفته با نتایج حاصله از سرم خون این افراد به روش DAT مورد مقایسه قرار گرفتند :

گروه اول : بیماران در مرحله حاد بیماری (معیار حاد بودن داشتن علائم بالینی اختصاصی و عیار DAT مساوی یا بیشتر از ۳۲۰۰ : ۱)

گروه دوم : افراد دارای سابقه عفونت احشایی لیشمانیا (بیماران فاقدعلائم بالینی و عیار DAT مساوی و یا بیشتر از ۸۰۰ : ۱) . تعداد نمونه در مرحله حاد ۲۹ مورد و در مرحله دارای سابقه عفونت ۶۵ مورد بوده است که از روستاهای اطراف مشکین شهر ، گرمی ، بيله سوار و اردبیل تهیه گردید.

گروه سوم و گروه چهارم : ۴۵ نمونه سرم و ادرار افراد سالم از بیمارستانهای شریعتی و مرکز طبی کودکان تهران تهیه گردید که به عنوان افراد شاهد منطقه غیر آندمیک در نظر گرفته شدند و ۴۵ نمونه سرم و ادرار از افراد سالم شهرستان مشکین شهر تهیه گردید که به عنوان افراد شاهد منطقه آندمیک لیشمانیوز در نظر گرفته شدند. سپس نتایج Katex با نتایج DAT مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج :

در مجموع ۹۴ نمونه سرم یا پلاسما و ادرار افراد مبتلا به کالآزار (۲۹ مورد مرحله حاد بیماری و

استفاده از گونه همولوگ لیشمانیا اینفانتوم تهیه گردید (Harith A.E. et al. ۱۹۸۸) اساس آزمایش به این ترتیب است که: چنانچه فرد به کالا آزار مبتلا باشد آنتی بادی بر علیه لیشمانیا در سرم فرد وجود داشته و با آنتی ژن اضافه شده بر روی آن واکنش داده و ایجاد ذرات آگلوتینه می نماید که در زمینه آبی رنگ دیده می شود. اما چنانچه آنتی بادی در سرم فرد نباشد محلول آنتی ژن رسوب کرده و ایجاد رسوب تکمه مانند می کند . عیارهای نهایی آنتی بادی از آخرین حفره ای که در آن حلقه آبی تشکیل نشده باشد به دست می آید. مطالعات انجام شده نشان می دهد که در بیماران کالآزاری عیار آنتی بادی لیشمانیا برابر و یا بیشتر از ۳۲۰۰ : ۱ می باشد (Edrissian Gh.H. et al. ۱۹۹۶). در این تست از سرم شاهد مثبت و شاهد منفی انسانی استفاده گردید .

آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون (Katex) : کیت مورد استفاده در این مطالعه ساخت شرکت Kalon Biological Ltd از کشور انگلستان بوده است. این کیت حاوی سه ظرف معرف لاتکس، معرف کنترل مثبت و معرف کنترل منفی می باشد. معرف ها در درجه حرارت ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداشته شدند.

برای انجام این آزمایش ابتدا تمام معرف های آزمایش را به دمای اتاق رسانیده و نمونه های ادرار اصلاح گردید. به این صورت که نمونه های ادرار را به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانیده و سپس در (rpm) ۲۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲-۱ دقیقه سانتریفوژ گردید. مجدداً نمونه ها به درجه حرارت آزمایشگاه رسانده شدند .

از مایع شفاف رویی به میزان ۵۰ میکرولیتر برداشته و بر روی لام شیشه ای مخصوص آزمایش گذاشته شد.

همزمان یک قطره کنترل منفی و یک قطره کنترل مثبت در کنار نمونه ها قرار داده شده سپس ۵۰ میکرو لیتر از معرف لاتکس را روی نمونه ها قرار داده و به صورت دورانی روی روتاتور چرخانده شد و نتیجه آگلوتیناسیون در مدت ۲ دقیقه قرائت شد.

آورده شد. نتایج حاصله در جدول شماره ۲ آورده شده است.

در این مطالعه از مجموع ۱۸۴ نمونه مورد آزمایش، ۲۹ مورد دارای علائم بالینی بودند که از این تعداد ۲۵ مورد کاتکس مثبت بودند. توزیع علائم بالینی در این افراد و مقایسه آن با عبارهای مختلف DAT در جدول شماره ۳ آورده شده است.

قرار گیرد. از سوی دیگر افزایش موارد لیشمانييازيس احشایی در بیماران مبتلا به سندرم نقص ایمنی و کاهش پاسخ مناسب و کمبود سطح آنتی بادی لازم برای بررسی تست هایی که با سنجش آنتی بادی به بررسی وجود بیماری می پردازند، این ضرورت را ایجاب می کند که از وجود آنتی ژن و پیگیری آن در نمونه های آزمایشگاهی برای تشخیص بیماری استفاده شود (Colmenares M. et al. ۱۹۹۵, De Gorgelas M. and Miles M.A. ۱۹۹۴).

بررسی آنتی ژن در ادرار بهتر از سرم می باشد زیرا وجود فاکتورهای مختلف در سرم مانند آمیلوئید سرم، روماتوئید فاکتور و سطوح بالای از آنتی بادی ها مانع از ظهور شاخص های آنتی ژنیک گشته و یا به طور رقابتی از اتصال آنتی ژن جلوگیری به عمل می آورند (Attar J.M. et al. ۲۰۰۱).

جستجوی آنتی ژن در ادرار همچنین دارای مزایای زیر است:

- ۱- نمونه ادرار سهل و آسان به دست می آید.
- ۲- نمونه خطرات بیماری های منتقله از راه خون را ندارد.
- ۳- بیشتر موارد حاد (فعال) بیماری را نشان می دهد (Sehgal S. et al. ۱۹۸۲, Galvao-Castro B. et al. ۱۹۸۴) در این مطالعه ما به بررسی آنتی ژن های ادراری در بیماران مبتلا به کالا آزار با استفاده از روش لاتکس آگلوتیناسیون پرداختیم. این تست اولین بار در سال ۲۰۰۱ توسط اتار و همکاران در بیمارستان گرمسیری لیورپول انجام گرفت و سپس توسط محققینی در برزیل،

۶۵ مورد دارای سابقه عفونت) و ۹۰ مورد نمونه سرم و ادرار شاهدهای منفی، توسط Katex و DAT مورد بررسی قرار گرفتند و پارامترهای مربوط به هر یک از این تست ها با مراحل حاد و مزمن بیماری محاسبه گردیدند (جدول شماره ۱).

در این مطالعه همچنین پارامترهای مختلف آماری مربوط به Katex برحسب عبارهایی مختلف DAT بر در آزمایش Katex مدت زمان قرائت نتایج بسیار مهم است به طوری که در مدت دو دقیقه باید نتایج خوانده شوند. نتایج مربوطه در جدول شماره ۴ آورده شده است.

بحث:

امروزه برای تشخیص لیشمانييازيس احشایی از روش های پارازیتولوژیک و سرولوژیک استفاده می شود. نتایج مثبت روش های پارازیتولوژیک از مطمئن ترین روش ها در تشخیص دقیق کالاآزار می باشد (Mandel D. and Benettis T. et al. ۲۰۰۰).

تهیه نمونه برای آزمایشات پارازیتولوژیک و سرولوژیک اغلب محتاج روش های تهاجمی از جمله خونگیری، آسپیراسیون طحال و یا مغز استخوان از بیمار است که در راه تهیه این نمونه ها ممکن است مشکلاتی برای بیمار از جمله امکان آلودگی به عفونت های جدید (هیپاتیت، ایدز) پیش آید و یا در پاره ای از موارد منجر به مرگ و خونریزی طحال شود. بنابراین استفاده از این روش به خصوص در اطفال معمول نیست، در تست های سرولوژیک اکثراً واکنش متقاطع با دیگر گونه های لیشمانیا و باکتری ها دیده می شود. همچنین بسیاری از تست های سرولوژیک نمی تواند عفونت های حاد و مزمن را از هم تشخیص دهد (Hommel M. ۱۹۹۹).

با در نظر گرفتن این که بیماران اغلب در رده سنی پایین و مبتلا به کم خونی شدید هستند، بنابراین استفاده از یک نمونه آزمایشگاهی دیگر از جمله ادرار که تهیه آن کمترین خطر را برای بیمار در برداشته باشد باید مدنظر

درمان قرار نگرفته است آنتی ژن های مترشحه از انگل را در ادرار ردیابی می کند. از نظر زمانی، متوسط زمان برای خواندن نتایج ۱/۵ دقیقه می باشد.

نتیجه گیری :

آنتی ژن Katex همچنین دارای مزایایی از قبیل تهیه آسان آنتی ژن، انجام سریع، عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت، خواندن نتایج با چشم غیرمسلح، کارایی در مرحله فعال بیماری و حساسیت و ویژگی مطلوب بوده، لذا از این آزمایش می توان به منظور تشخیص و بررسی آنتی ژنهای ادراری در بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی فعال (حاد) و بیماران دارای نقص ایمنی در غیاب آنتی ژن DAT استفاده کرد.

تشکر و قدردانی :

نویسندگان این مقاله وظیفه خود می دانند از مسئولین محترم انستیتو تحقیقات بهداشتی که انجام این پروژه را به شماره (ط- ۲۴۱/۷۴/۸۱/۳/۵) پشتیبانی مالی و اجرایی نمودند و از همکاران محترم آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی خانم ها دکتر هما حجاران و سرورچاره دار و ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر که در انجام این مطالعه همکاری داشته اند قدردانی نمایند. همچنین سپاسگزاری خود را از خانم نگار مدرس صدرانی مسئول آزمایشگاه بیمارستان ولیعصر شهرستان مشکین شهر که در مرحله نمونه برداری این مطالعه همکاری داشته اند اعلام می دارند.

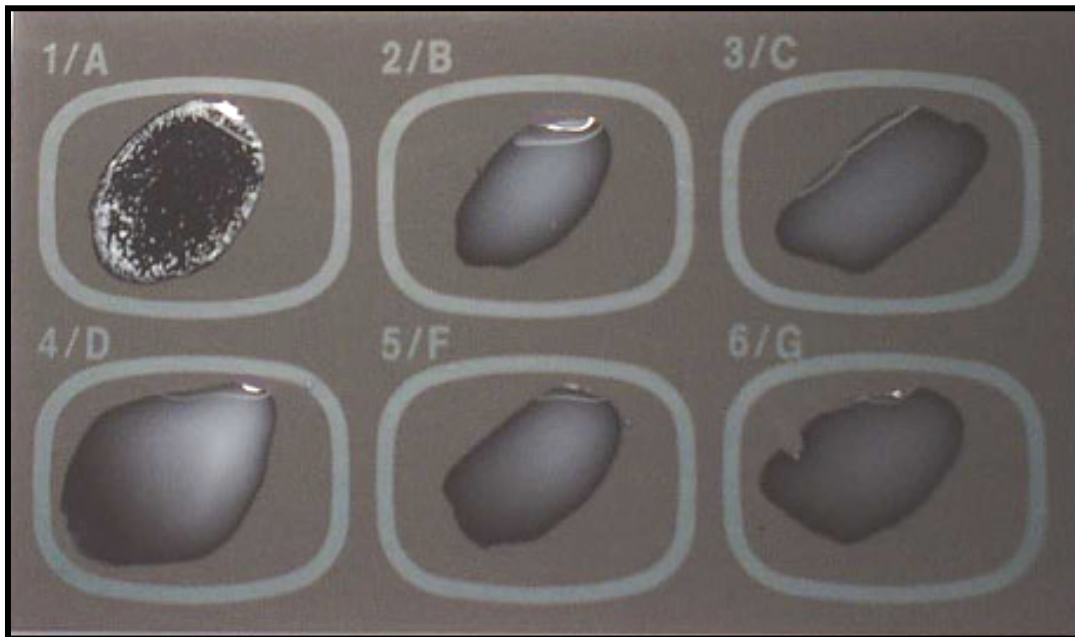
یمن ونپال مورد آزمایش قرار گرفت، این محققین حساسیت ۱۰۰-۶۸٪ را برای این آزمایش گزارش نمودند (Attar J.M. ۲۰۰۱).

این محققین با این که حساسیت بالایی را برای این آزمایش به دست آوردند اما اعلام کردند که نتایج بهتر وقتی به دست می آید که Katex و DAT همزمان باهم انجام گیرد.

در مطالعه ما سرم و ادرار به ترتیب با DAT و Katex مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که در مرحله حاد بیماری حساسیت تست ۸۲/۷٪ و ویژگی ۹۸/۹٪ می باشد. میزان هماهنگی در این مرحله ۹۵/۷ به دست آمد ولی در مرحله مزمن بیماری حساسیت تست ۶/۱۵٪ و ویژگی ۹۸/۹٪ برآورده شد. در مرحله حاد بیماری که آنتی ژن های انگل در ادرار ترشح می شود آزمایش Katex اکثراً مثبت و حساسیت آزمایش بالا می باشد ولی در مرحله عفونت بیماری که بیمار تحت درمان قرار گرفته است ترشح آنتی ژن های انگل از ادرار کم شده و تست به سمت منفی شدن پیش می رود، بنابراین حساسیت تست در این مرحله بسیار پایین است.

جدول ۲ میزان حساسیت و ویژگی، قدرت پیشگویی مثبت و منفی، کارایی و اعتبار را نشان می دهد. اعتبار در مرحله حاد بیماری ۹۰/۸٪ در مرحله عفونت بیماری ۵۰/۵٪ می باشد.

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که آزمایش Katex بلافاصله بعد از درمان منفی می شود. بنابراین برای ارزیابی نتیجه درمان هم می توان از این آزمایش استفاده کرد. ارزش این آزمایش در این است که در مرحله اولیه بیماری و در مواردی که بیمار هنوز تحت



شکل ۱- درجات مختلف آگلوتیناسیون با استفاده از آزمایش ادرار به روش Katex

۱/A:++++

۲/B:+++

۳/C:++

۴/D:+

۵/F, ۶/G: Negative

جدول ۱- میزان حساسیت ، ویژگی ، کارایی ، قدرت پیشگویی مثبت و منفی و اعتبار Katex در ۲۹ مورد افراد مرحله حاد و افراد با سابقه بیماری کالا آزار در شهرستان مشکین شهر

مرحله بیماری	شاخص	حساسیت	ویژگی	کارایی	اعتبار	قدرت پیشگویی مثبت	قدرت پیشگویی منفی	مثبت واقعی	مثبت کاذب	منفی واقعی	منفی کاذب	توافق
حاد	۸۲/۷	۹۸/۹	۹۰/۸	۸۱/۶	۸۶/۸	۹۹/۷	۲۵	۱	۸۹	۴	۹۵/۷	
با سابقه عفونت	۶/۱۵	۹۸/۹	۳۵	۵۰/۵	۳/۲	۹۳/۸	۵۹/۳	۳	۱	۸۹	۶۲	

جدول ۲- مقایسه پارامترهای مختلف آماری مربوط به Katex بر حسب عیارهای مختلف DAT

DAT	Katex®					
	حساسیت	ویژگی	توافق	قدرت پیشگویی مثبت	قدرت پیشگویی منفی	اعتبار
۱:۸۰۰	-	۹۸/۹	۴۸/۴	-	۹۲/۹	۴۹/۴
۱:۱۶۰۰	-	۹۸/۹	۴۸/۴	-	۹۲/۹	۴۹/۴
۱:۳۲۰۰	۵/۳	۹۸/۹	۴۸/۹	۲۷	۹۳/۲	۵۲/۱
۱:۶۴۰۰	۱۴/۲	۹۸/۹	۴۸/۹	۴۷	۹۴/۷	۵۶/۵
۱:۱۲۸۰۰	۳۱/۳	۹۸/۹	۸۶/۶	۴۹/۵	۹۵/۷	۶۵/۱
۱:۲۵۶۰۰	۱۰۰	۹۸/۹	۹۸/۹	۹۹/۸	۱۰۰	۹۹/۴
۱:۵۱۲۰۰	۱۰۰	۹۸/۹	۹۸/۹	۹۹/۸	۱۰۰	۹۹/۴
۱:۱۰۲۴۰۰	۱۰۰	۹۸/۹	۹۹/۱	۹۹/۸	۱۰۰	۹۹/۴

جدول ۳- توزیع علائم بالینی در افراد مبتلا به کالا آزار Katex مثبت بر حسب عیارهای مختلف DAT

علائم بالینی	تیتراسیون											
	۱:۳۲۰۰	۱:۶۴۰۰	۱:۱۲۸۰۰	۱:۲۵۶۰۰	۱:۵۱۲۰۰	۱:۱۰۲۴۰۰	جمع کل					
کم خونی	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۸					
تب	۱	-	۱	۱	۱	۱	۸					
بزرگی شکم	-	۱	۲	۲	-	-	۶					
بی اشتها	-	-	-	-	-	-	۱					
لاغری	۱	-	-	-	-	-	۱					
آدنوپاتی ناحیه فمورال	-	-	-	-	۱	-	۱					
جمع	۳	۲	۴	۴	۴	۴	۲۵					

جدول ۴- توزیع مدت زمانی جهت رؤیت نتیجه Katex در نمونه ادرار افراد تحت بررسی

زمان آزمایش (دقیقه)	تعداد	درصد
۰/۵	۲۹	۱۵/۸
۱	۱۷	۹/۲
۱/۵	۱۰۰	۵۴/۳
۲	۲۳	۱۲/۵
۲/۵	۱۵	۸/۲
جمع	۱۸۴	۱۰۰

References:

- Attar J.M., Michael L.C., Sayda el. S., James C., Azazy A., Moha EL.H., Cibele D. and Macel H. (۲۰۰۱) Latex agglutination test for the detection urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta tropica*. ۷۸:۱۱-۱۶.
- Colmenares M., Portus M., Riera C. and Gallego S. (۱۹۹۵) Detection of ۷۲-۷۵kd and ۱۲۳kd fraction of leishmaniasis antigens in urine of patients with visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. ۵۲:۴۲۷-۴۲۸.
- De Gorgelas M. and Miles M.A. (۱۹۹۴) Visceral leishmaniasis and AIDS. *Nature*: ۳۷۲:۷۳۴.
- Edrissian Gh.H., Hajjarian H., Mohebali M., Soleimanzadeh G. and Bokaie S. (۱۹۹۶) Application and evaluation of direct agglutination test in sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in man and canin reservoirs in Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences*. ۲۱:۱۱۹-۱۲۴.
- Edrissian Gh.H., Ahanchin A.R., Gharachahi A., Ghorbani M., Nadim A. and Ardehali S. (۱۹۹۳) Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoir in Fars province, southern Iran. *Iranian Journal of Medical sciences*. ۱۸:۹۹-۱۰۵.
- Galvao. Castro B., Ferreira J.A., Marzochi K.F., Marzochi M.C., Coutinho S.G. and Lambert P.H. (۱۹۸۴) Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*. ۵۶:۵۸-۶۶.
- Harith A.E., Kolk A.H.J., Kager P.A. (۱۹۸۸) Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene*. ۸۱:۶۰۳-۶۰۶.
- Hommel M. (۱۹۹۹) visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *Journal of infectious Diseases*. ۳۹:۱۰۱-۱۱۱.
- Mandel D. and Benettis T. (۲۰۰۰) Principles and practice of infections disease. Fifth edition. Vol:۲
- Sehgal S., Aikat B.K. and Pathania A.G.S. (۱۹۸۲) Immune complexes in Indian Kala-azar. *Bulletin of World Organization*. ۶۰:۹۴۵-۹۴۹.
- Soleiman-Zadeh G., Edrissian Gh.H., Movahhed-Danesh A.M. and Nadim A. (۱۹۹۳) Epidemiological aspects of kala-azar in Meshkin shahr, Iran: human infection. *Bulletin of the world Health organization*. ۷۱(۶):۷۵۹-۶۲.
- World Health Organisation. (۱۹۹۰) Control of the leishmaniasis. *WHO Technical Report Series*. ۷۹۳:۱-۱۵۸.