● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ پنجم، شمارهٔ ۱، ص ۲۳-۱۷، ۱۳۷۶

مقالهٔ پژوهشی

تهیه آنتی‌ژن لاتکس آگلوتیناسیون و ارزشیابی تکنیکی آن در مقایسه با روش‌های سرولوژیک ELISA,IFA و DAT به منظور تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی

دکتر مهدی محبعلی[1] و محسن محمدی[2]

خلاصه

در این مطالعه که از سال ۱۳۷۵ تا ۱۳۷۶ انجام گردید، سویه سودانی لیشمانیا دونووانی (S-1) را تکثیر و در محیط‌های اختصاصی، تعداد پروماستیگوت‌ها را به یک میلیارد در هر میلی‌لیتر رسانیده و پس از متلاشی‌کردن پیکر انگل‌ها به روش متوالی ذوب و انجماد و سانتریفوژ با دور بالا، میزان قابل توجهی آنتی‌ژن محلول تهیه گردید. بعد از اندازه گیری پروتئین با استفاده از روش Lowry و تثبیت آن به میزان ۲/۲mg/ml، آنتی‌ژن حاصله به نسبت ۲ به ۱ با ذرات لاتکس به قطر ۰/۸ میکرون و رقت ۱:۱۰۰ مجاور گردید. پس از تهیه آنتی‌ژن لاتکس آگلوتیناسیون به مقدار مطلوب، بر روی ۲۱۰ نمونه پلاسمای انسان که از شهرستان مشکین‌شهر به همراه پرسش‌نامه‌های مربوطه به واحد تک یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال شده بودند و قبلاً نیز به روش‌های آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) و ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم (IFA) مورد آزمایش قرار گرفته بودند و ۵۷ نمونه پلاسمای تهیه شده از سگ‌های روستای قورت تپه از توابع شهرستان مشکین شهر که به وسیله DAT و ELISA مورد آزمایش قرار گرفته بودند، آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون (LAT) به عمل آمد. ضمناً ۹۲۴ نمونه پلاسمای بچه‌های بزرگتر از ۹ سال و ۱۵ نمونه پلاسمای سگ که از روستای کردان شهرستان ساوجبلاغ کرج جمع‌آوری شده بودند به روش‌های DAT و LAT مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان می‌دهد LAT در نمونه‌های انسانی ۸۰٪ و در نمونه‌های مربوط به سگ دارای حساسیت ۹۶٪ است و میزان هماهنگی LAT با DAT درنمونه‌های انسانی ۸۰٪ و در نمونه‌های سگ ۸۹/۴٪ بوده است.

واژه‌های کلیدی: لاتکس آگلوتیناسیون، لیشمانیوز احشایی، تشخیص، سرواپیدمیولوژی

۱ـ دانشیار انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی ۲ـ کارشناس ارشد رشته انگل‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران

مقدمه

لیشمانیوزها، امروزه در جهان از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند و اپیدمیولوژی آنها بر پایه تماس وسیع و گسترده میان ناقلین، مخازن حیوانی و انسان شکل می‌گیرد. درمان این بیماری هنوز متکی به تزریق ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان است که تأثیر آن در همه موارد به یک میزان نیست و هیچ گونه پیش‌گیری عملی دارویی برای آنها وجود ندارد. واکسن‌ها هنوز در دست مطالعه‌اند و کنترل ناقلین فقط در برخی شرایط خاص اپیدمیولوژیک، قابل اجرا است (۱۳). در بین گونه‌های لیشمانیای موجود در ایران، آلودگی با لیشمانیا اینفانتوم(L.infantum) که عامل لیشمانیوز احشایی نوع مدیترانه‌ای است، بیشترین خطر مرگ و میر را در پی دارد که در صورت تشخیص و درمان به موقع، بیش از ۹۵٪ بیماران بهبودی کامل می‌یابند. عدم تشخیص به موقع به مرگ ۹۰٪ از مبتلایان خواهد انجامید (۱۶). لیشمانیوز احشایی یکی از زئونوزهای مهم انگلی در ایران به شمار می‌رود و تاکنون سگ، روباه، شغال (۷) و جوندگان آلوده به آن (۱۲) از ایران گزارش شده‌اند. در حال حاضر لیشمانیوز احشایی از تمام استان‌های ایران گزارش شده است ولی در دو استان اردبیل (شهرستان‌های مشکین‌شهر و دشت مغان) و استان فارس (شهرستان‌های جهرم و فیروزآباد) به شکل اندمیک دیده می‌شود (۵،۶،۱۵).

تا زمانی که لیشمانیوز احشایی از طریق از بین بردن مخازن حیوانی، سم‌پاشی، آموزش بهداشت، واکسیناسیون انسان‌ها و حیوانات مخزن، تحت کنترل قرار نگیرد، تشخیص به موقع و درمان بیماری عامل مهمی در تقلیل مرگ و میر مبتلایان خواهد بود.

از ابتدای قرن میلادی اخیر، یعنی از زمان کشف عوامل مولد لیشمانیوز مرتباً روش‌های تشخیصی جدیدتر و دقیق‌تری ابداع شده که هر یک مزایای خاص خود را داشته‌اند، در عین کاستی‌های هر روش، لزوم ایجاد روش‌های جدیدتری را مطرح کرده است. روش‌های انگل‌شناسی برای بیمار مشکل و برای پزشک و آزمایشگاه وقت‌گیر و پر دردسر بوده و در مواردی با وجود ابتلای بیمار یافتن انگل مقدور نیست. از ابتدای قرن اخیر، روش‌های سرولوژی پیشرفت وسیعی در تشخیص کالاآزار داشته‌اند. اما از آنجا که بسیاری از این روش‌ها مشکلاتی از قبیل پیچیدگی تهیه آنتی‌ژن، مشکلات اجرایی، اتلاف وقت، مصرف زیاد مواد، نیاز به دستگاه‌های گران‌قیمت دارند، لذا مقرون به صرفه نبوده و احتیاج به روش‌های سریع، کم‌هزینه روز به روز محسوس‌تر می‌گردد. یکی از روش‌ها، لاتکس آگلوتیناسیون است. این روش در سال ۱۹۸۷ توسط کبیری و همکاران به منظور تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی در شیراز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل از آن رضایت‌بخش بود (۱۰). بنابراین در بررسی حاضر، اقدام به استفاده از روش جدید لاتکس آگلوتیناسیون به منظور تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی کالاآزار گردید که می‌تواند مشکلات ذکر شده را تا حدود زیادی کاهش دهد.

مواد و روش کار

روش کار شامل تهیه آنتی‌ژن و ارزشیابی آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون است.

۱- تهیه آنتی‌ژن لاتکس آگلوتیناسیون

جهت تهیه آنتی‌ژن لاتکس آگلوتیناسیون از سوش سودانی لیشمانیا دونووانی (S-1) که توسط دکتر هاریت به واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت ارسال شده بود، استفاده گردید. بدین ترتیب که سویه مذکور پس از کشت در محیط NNN، بر روی محیط RPMI 1640 پاساژ داده می‌شد و به میزان ۱۰-۵ درصد سرم جنین گوساله (Fetal calf serum) به آن افزوده می‌گردید. پس از ۳ روز در دمای ۲۷°C، انگل‌ها در حالت رشد لگاریتمی (یعنی به فرم کشیده بادامی شکل و فعال تاژکدار) وارد حجم بیشتری از محیط RPMI شده و پس از ۳ یا ٤ مرتبه پاساژ، در همان مرحله رشد، برداشت می‌شدند. پس از سانتریفوژ و دوبار شستشو با PBS در pH=۸ پروماستیگوت‌ها با استفاده از لام توما، شمارش شده و تعداد آنها به یک میلیارد پروماستیگوت در هر میلی‌لیتر رسوب نهایی می‌رسید. سپس سوسپانسیون‌های انگلی به تعداد ۱۲ تا ۱۵ مرتبه بین دمای ۲۵°C-۲۰ ذوب و منجمد می‌شدند. آنگاه به کمک سانتریفوژ یخچال‌دار، سوسپانسیون انگلی به مدت ۵ دقیقه با دور ۱٤۰۰۰ هر دقیقه در دمای ٤°C سانتریفوژ و پس از جدا شدن محلول رویی با استفاده از روش لوری (Lowry) میزان پروتئین آن اندازه‌گیری می‌شد که معمولاً به ۲/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌رسید (۱۱).

جهت انجام آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون ابتدا باید نسبتی از آنتی‌ژن که سطح ذرات لاتکس مورد نظر را بپوشاند و بهترین جواب را بدهد، به دست آورد که در این مطالعه مجاورت ۲ حجم آنتی‌ژن و ۱ حجم لاتکس به مدت ۳۰ تا ٤۵ دقیقه در دمای ۵٦°C، نتیجه مطلوب را در برداشت.

لاتکس مورد استفاده سوسپانسیون ۱۰٪ لاتکس، ساخت شرکت سیگما بود که قطر متوسط ذرات آن حدود ۰/۸ میکرون

بود و بهترین رقت لاتکس در این بررسی، ۱:۱۰۰ تعیین گردید.

روش انجام آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون

یک قطره سرم کنترل مثبت و یک قطره سرم کنترل منفی که قبلاً با روش‌های IFA و DAT تأیید شده بودند، در دو طرف یک لام میکروسکوپی قرار می‌گرفت، سپس به هر یک از این رقت‌ها یک قطره آنتی‌ژن لاتکس اضافه می‌گردید. پس از مخلوط کردن کامل، رقت‌های ۱:۸، ۱:۱۶ و ۱:٦٤ از سرم‌های مذکور با استفاده از بورات سالین (PH=۸/۲) تهیه می‌شد. ۱۰μl از هر رقت سرم روی لام میکروسکوپی قرار می‌گرفت و پس از اضافه کردن ۱۰μl آنتی‌ژن لاتکس روی هر یک از محلول‌های رقیق شده، آنها را به خوبی مخلوط کرده و نتیجه آزمایش به شرح زیر قرائت می‌گردید:

آگلوتیناسیون ++++ = به شکل قالب چین‌خورده و توده ابر مانند
آگلوتیناسیون +++ = به شکل کلافه بزرگ
آگلوتیناسیون ++ = خیلی ریز
آگلوتیناسیون + = چند آگلوتیناسیون ریز و پراکنده
عدم آگلوتیناسیون = شیری رنگ

سرم‌های مثبت که در آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون تیتر آنتی‌بادی، حداکثر ۱:٦٤ داشتند، در روش DAT تیترهای ۱:٦٤۰۰ و در آزمایش IFA، ۱:۱۲۸۰ را نشان می‌دادند.

ارزشیابی آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون

جهت ارزشیابی LAT، بر روی ۲۱۰ نمونه پلاسمای انسان که همراه با پرسش‌نامه‌های مربوطه از شهرستان مشکین شهر به آزمایشگاه واحد تک‌یاخته شناسی دانشکده بهداشت، ارسال شده و به وسیله روش‌های DAT و IFA مورد آزمایش قرار گرفته بودند و ۹۲٤ نمونه پلاسمای جمع‌آوری شده از روستای کردان از توابع ساوجبلاغ کرج، آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون به عمل آمد. همچنین روی ۵۷ نمونه از پلاسمای سگ ارسالی از روستای قورت تپه شهرستان مشکین شهر و ۱۵ نمونه پلاسمای سگ‌های کردان کرج لاتکس آگلوتیناسیون انجام شد که پلاسمای سگ‌ها قبلاً به روش‌های ELISA و DAT مورد آزمایش قرار گرفته بودند.

لازم به یادآوری است که آنتی‌ژن آگلوتیناسیون مستقیم به روش Harith (۸)، آنتی‌ژن الیزا به روش Roffi (۱٤) و آزمایش ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم به روش Camargo (۲)، تهیه می‌گردید.

نتایج

الف : موارد انسانی

در مجموع ۲۱۰ نمونه پلاسمای افراد مشکوک به کالاآزار شهرستان مشکین شهر که قبلاً به روش‌های DAT و IFA آزمایش شده بودند و ۹۲٤ نمونه پلاسمایی که به شکل توتال از بچه‌های بزرگتر از ۹ سال روستای کردان از شهرستان ساوجبلاغ کرج تهیه گردیده بودند به روش LAT مورد آزمایش قرار گرفتند.

مشاهده اشکال آماستیگوت در احشاء بیماران، پاسخ قطعی مبنی بر آلودگی بیمار کالاآزاری را فراهم می‌سازد ولی از چندین سال پیش به دلیل مشکلات نمونه‌برداری از مغز استخوان و اندام‌های دیگر و نیز پیشرفت سریع سایر روش‌های تشخیصی و مطمئن بودن آزمایش‌های سرمی، روش پونکسیون از مغز استخوان کمتر انجام می‌گیرد و تشخیص بیشتر براساس علایم بالینی و آزمایش سرمی مثبت، استوار است. البته چون هر آزمایش سرولوژیک محدودیت‌های خاص خود را دارد لذا تصمیم گرفته شد که بیمار

جدول ۱ : *مقادیر حساسیت، ویژگی و قدرت پیش‌گویی مثبت و منفی، کارآیی و اعتبار آزمایش‌های IFA, LAT, DAT در موارد انسانی آزمایش شده شهرستان مشکین شهر و روستاهای اطراف*

شاخص / تست	حساسیت	ویژگی	کارآیی	قدرت پیش‌گویی مثبت	قدرت پیش‌گویی منفی	اعتبار	مثبت واقعی	مثبت کاذب	منفی واقعی	منفی کاذب
IFA	۷۸/۱۸	۸۱/۲۵	۷۰	٦۴/۱۸	۸۹/٦٦	۷۹/۷۲	۴۳	۲۴	۱۰۴	۱۲
DAT	۱۰۰	۱۰۰	۸۸/۰۹	۱۰۰	۱۰۰	۹۴/۰۵	۵۵	۰	۱۳۰۰	۰
LAT	۸۹/۰۹	۷۳/۹	۸۰	۵۳/۸۴	۹۵/۲	۸۱/۵	۴۹	۴۲	۱۱۹	٦

* از نظر کارآیی : IFA<LAT<DAT
** از نظر اعتبار : IFA<LAT<DAT

جدول ۲ : مقادیر حساسیت، ویژگی، کارآیی، قدرت پیشگویی مثبت و منفی و اعتبار سه آزمایش DAT, ELISA و LAT در مورد سگ‌های روستای قورت‌تپه مشکین شهر

شاخص / تست	حساسیت	ویژگی	کارآیی	قدرت پیش‌گویی مثبت	قدرت پیش‌گویی منفی	اعتبار	مثبت واقعی	مثبت کاذب	منفی واقعی	منفی کاذب
LAT	۹۶	۸۴/۸۵	۹۱/۲۳	۸۵/۷۱	۹۶/۵۵	۹۰/۴۲	۲۴	۲۸	۵	۱
ELISA	۹۶/۱۵	۸۲/۷۶	۸۵/۹۶	۸۳/۳	۹۶	۸۹/۴۵	۲۵	۲۴	۵	۱
DAT	۹۱/۶۷	۹۶/۸۸	۹۲/۹۹	۹۵/۶۶	۹۳/۹۴	۹۴/۲۷	۲۲	۳۹	۱	۲

* از نظر کارآیی : ELISA<LAT<DAT

** از نظر اعتبار : ELISA<LAT<DAT

یا سالم بودن افراد، بر اساس هماهنگی میان تست‌ها در نظر گرفته شوند. به این ترتیب و با توجه به هماهنگی بسیار بالا میان دو تست LAT و DAT قرار شد افرادی که عیار سرمی آنها در DAT بیشتر از ۳۲۰۰ است، با توجه به مثبت بودن حتی یکی از علایم بالینی (عمدتاً تب) بیمار تلقی گردند و افرادی که عیار سرمی آنها در آزمایش DAT زیر ۳۲۰۰ بود (البته بدون توجه به اینکه ممکن است بیماری دیگری غیر از کالاآزار داشته باشند) از نظر سرولوژی کالاآزار منفی در نظر گرفته شوند. در مجموع با استفاده از DAT، ۵۵ بیمار کالاآزاری تأیید شدند که همگی از نمونه‌های ارسالی از شهرستان مشکین شهر بودند. آنگاه توسط LAT مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج به دست آمده به صورت جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده است.

لازم به ذکر است LAT با دو مورد سرم افراد مبتلا به توکسوپلاسموز، دو مورد بروسلوز، یک مورد سل، یک مورد روماتیسم، یک مورد CRP مثبت و یک مورد لیشمانیوز پوستی انجام شد که نتایج همه آنها از نظر لیشمانیوز احشایی منفی بودند.

هماهنگی LAT با DAT ۸۰٪ بوده در حالی که این هماهنگی با تست IFA بیش از ۶۰٪ نبوده است.

ب : موارد حیوانی

در مجموع ۵۷ نمونه پلاسمای سگ که از روستای قورت تپه واقع در شهرستان مشکین شهر و ۱۵ نمونه پلاسمای سگ که از روستای کردان واقع در شهرستان ساوجبلاغ کرج تهیه شده بود به روش ELISA, LAT و DAT مورد آزمایش قرار گرفتند.

هماهنگی LAT با DAT در نمونه‌های مربوط به سگ ۸۹/۴٪ بوده است، در حالی که این هماهنگی با ELISA بیش از ۸۶٪ نبوده است.

بحث و نتیجه‌گیری

مشکلی که در ارتباط با تفسیر نتایج وجود داشت، فقدان مرجعی کاملاً موثق جهت تعیین قاطع فرد مبتلا به کالاآزار بود.

اصولاً کلیه واکنش‌های سرولوژیک با فراهم آوردن امکان برخورد میان آنتی‌ژن و آنتی‌بادی میسر می‌باشد. برای برقراری اینگونه برخوردها لازم است که یکی از این دو جزء بر روی تکیه‌گاهی ثابت گردند تا جزء دیگر امکان برخورد با آن را داشته باشد. بر این اساس و با توجه به اینکه تکیه‌گاه مذکور نباید هیچ‌گونه اثر تداخلی در واکنش سرولوژی داشته باشد، عده‌ای از محققین از جمله کومینز (Cummins) و همکاران در سال ۱۹۹۴ تصمیم گرفتند روش جدید، سریع و نسبتاً مطمئنی جهت تشخیص کالاآزار راه‌اندازی و ارزشیابی نمایند (۳). این محققین جهت نیل به هدف مذکور، از نوعی ذرات پلیمر خنثی موسوم به ذرات لاتکس پلی‌استیرن (Polystyrene latex particles) استفاده کردند. به طور کلی نحوه عملکرد آنها چنین بود که از انگل لیشمانیا دونووانی سویه SU (S-1) با روش ذوب و انجماد، پروتئین محلول تهیه کردند و پس از آماده‌سازی و پردازش ذرات لاتکس، پروتئین محلول به دست آمده و ذرات لاتکس را با یکدیگر مجاور ساخته واز آنها به عنوان آنتی‌ژن لاتکس استفاده کردند. آنها روش LAT را بر روی ۱۴ نمونه سرم مشکوک به کالاآزار ارزشیابی کرده و با نتایج حاصل از سه تست IFA, DAT و CIEP مقایسه نمودند. در این مطالعه مشخص شد که حساسیت DAT از همه بالاتر یعنی ۱۰۰٪ و حساسیت IFA, LAT و CIEP به ترتیب ۹۳٪، ۸۶٪ و ۸۶٪ بوده است (۳). البته قبلاً محقق دیگری به نام دوکورت (De-korte) در سال ۱۹۹۰ LAT را در نمونه‌های سرم تهیه شده از سگ‌های جنوب فرانسه به کار برده و چنین نتیجه گرفته بود که هماهنگی بسیار بالایی میان نتایج LAT و DAT

وجود دارد (٤).

نکته‌ای که تذکر آن لازم است آن است که میزان پروتئین به دست آمده در روش کومینز و همکاران ٦/٥mg/ml بود، حال آن که در بررسی حاضر، با وجود کوشش‌های فراوانی که جهت تولید پروتئین محلول به عمل آمد عملاً میزان پروتئین آنتی‌ژن محلول به دست آمده از ۲/۲mg/ml تجاوز نکرد. بنابراین حساسیت LAT در این بررسی، حداکثر ۸۹٪ بوده است که در مقایسه با روش کومینز و همکاران که حساسیت LAT را ۹۳٪ به دست آورده بودند به میزان ۳/۹۱٪ اختلاف وجود دارد.

جهت کمی کردن روش LAT از روش Jacques و همکاران در سال ۱۹٥٦ استفاده شد. این محققین از روش LAT جهت تشخیص آرتریت روماتوئید استفاده نمودند. آنها از ذرات لاتکس با قطر ۰/8u رقت‌های مختلفی تهیه کردند که بهترین رقت برای ذرات لاتکس، ۱:۱۰۰ بود. ضمناً این رقت قادر بود در اسپکتروفوتومتر Coleman ٦٪ نور را از خود عبور دهد (۹). در این بررسی نیز، مطابق روش اخیر رقت ۱:۱۰۰ لاتکس که ٦٪ عبور نوری داشت، انتخاب گردید و نتیجه مطلوب را به همراه داشت. در این مطالعه، هم سرم و هم پلاسمای بیماران مورد استفاده قرار گرفت ولی عملاً هیچ‌گونه تفاوتی در نتایج آنها دیده نشد. به علاوه انکوبه کردن سرم یا پلاسما در دمای بیشتر از ٥٦٥ به مدت نیم‌ساعت جهت از بین بردن کمپلمان نیز تأثیری در نتیجه آزمایش نداشت. بنابراین با استفاده از تلفیق دو روش کومینز و Jacques، روش لاتکس آگلوتیناسیون به صورت کمی بر روی ۲۱۰ نمونه پلاسمای انسان و ٥۷ نمونه پلاسمای سگ شهرستان مشکین شهر و ۹۲٤ نمونه پلاسمای انسان و ۱٥ نمونه پلاسمای سگ روستای کردان از شهرستان ساوجبلاغ کرج انجام گردید.

در ارزشیابی تست لاتکس مشخص شد که هم در نمونه‌های انسانی و هم در نمونه‌های مربوط به سگ، بین LAT و DAT هماهنگی بالایی وجود دارد که یکی از دلایل عمده بالا بودن میزان هماهنگی بین این دو تست، اساس سرولوژیکی مشترک بین آنها یعنی پدیده آگلوتیناسیون می‌باشد، با این تفاوت که در DAT، شاخص‌های آنتی‌ژنی که بر روی پیکره انگل قرار دارند، در روش LAT از آنتی‌ژن محلول انگل که در روی ذرات لاتکس سوار شده‌اند، استفاده می‌شود.

اصولاً ارتباط کلیه تست‌ها با بیمار بودن یا نبودن اشخاص کاملاً معنی‌دار بوده است یعنی با استفاده از این تست‌ها می‌توان افرادی را که دارای سابقه بیماری و علایم بالینی بوده‌اند، بیمار و افرادی را که فاقد علایم بالینی بوده‌اند سالم تلقی نمود. در این راستا میانگین عیار هندسی (GMRT) سه تست IFA,LAT و DAT به ترتیب ۱۱/٤، ٤۰۷ و ۳۲۸ به دست آمد که در مورد تست لاتکس عیار سرمی ۱:۸ ≤ و در تست DAT عیار سرمی ۱:۳۲۰۰ ≤ و در تست IFA عیار سومی ۱:۱٦۰ ≤ مثبت در نظر گرفته شد.

جدول‌های ۱ و ۲ حساسیت، ویژگی، پیشگویی مثبت و منفی، کارآیی و اعتبار تست‌های DAT, LAT, IFA و ELISA را در نمونه‌های انسانی و سگ نشان می‌دهند. از نظر پارامترهای مقایسه‌ای در مورد انسان حساسیت DAT و در نمونه‌های مربوط به سگ‌ها حساسیت LAT بیشتر بوده است ولی در هر دو مورد ویژگی تست DAT از LAT بیشتر بوده است. از نظر کارآیی در موارد انسانی و سگ LAT بعد از DAT در مرتبه دوم اهمیت قرار دارد و از نظر اعتبار که در واقع نصف حاصل جمع دو پارامتر حساسیت و ویژگی است تست LAT در درجه دوم اهمیت قرار دارد.

ذکر این نکته لازم به نظر می‌رسد که تمامی نمونه‌های انسانی و حیوانی تهیه شده از شهرستان کردان از توابع ساوجبلاغ کرج با همه روش‌های سرولوژی بالا منفی بوده‌اند. علت انتخاب شهرستان کردان در این بررسی مطالعه و تأیید یک مورد لیشمانیوز احشایی در یک قلاده سگ نژاد دابرمن بود که قبلاً به وسیله تست‌های پارازیتولوژی و سرولوژی تأیید شده و انگل L. infantium از آن جدا گردیده بود (۱). این بررسی نشان می‌دهد مورد اخیر در آن منطقه کاملاً انفرادی (Sporadic) بوده است.

چون لاتکس آگلوتیناسیون دارای مزایایی از قبیل تهیه آسان آنتی‌ژن، انجام سریع، عدم نیاز به وسایل و تجهیزات گران قیمت، دیدن نتیجه در اسرع وقت و با چشم غیرمسلح، کارآیی در نمونه‌های انسانی و حیوانی و حساسیت و ویژگی مطلوب می‌باشد لذا می‌توان از این روش به منظور تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در نمونه‌های سرم یا پلاسمای انسان و سگ خصوصاً در شرایط محیطی به شکل مطلوب استفاده نمود.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر یدخشان هوشمند مسؤول واحد زئونوزهای اداره کنترل و مراقبت بیماری‌ها، آقای اصغر کنعانی نوتاش کارشناس ارشد رشته انگل‌شناسی پزشکی و خانم هما حجاران مربی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و همچنین رئیس و معاونت محترم بهداشتی شهرستان ساوجبلاغ کرج که در انجام این پژوهش همکاری داشته‌اند صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نماییم.

Summary

Preparation and Evaluation of Latex Agglutination Technique for Diagnosis and Seroepidemiological Studies of Visceral Leishmaniasis

M. Mohebali, MPH, PhD[1]; and M. Mohammadi, MS[2]

1. Associate Professor of Medical Parasitology, 2. Master of Medical Parasitology, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

In this study which has been carried out from 1996 until 1997 soluble latex agglutination antigen was prepared from L. donovani, Sudan (s-1) by culturing in special media, harvesting, and later solubilizing by freezing and thawing. The antigen were further prepared by high speed centrifugation. After measurement of the protein (lowry method) concentration of the antigen was set at 2.2 mg/ml, the antigen was coated in 2 to 1 ratio with latex beads (0.8 μm) and further diluted 1:100. Following preparation of latex agglutination antigen, 210 human plasma samples and 57 dog plasma samples from Meshkin-Shahr district were tested by latex agglutination test (LAT), direct agglutination test (DAT) and indirect flourescence antibody test (IFAT). Also 924 plasma samples from children >9 years old and 15 dog plasma samples from Kordan village, Savegbolagh district, located in Karaj in west of Tehran were tested by LAT, DAT and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The results show that the sensitivity of the LAT in human samples was 89% and in dog samples 96%. Concordance between LAT and DAT in human samples is 80% and in dog samples is 89.4%.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1998; 5(1): 17-23

Key Words: *Latex Agglutination, Visceral leishmaniasis, Diagnosis, Seroepidemiology*

منابع

۱. ساسانی، فرهنگ، جمشیدی، شهرام و محبعلی، مهدی. گزارش یک مورد لیشمانیوز احشایی سگ از روستای کردان کرج، سومین کنگره ملی بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان. ۱۳۷۵.

2. Camargo ME and Rebonat C. Cross reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am J Trop Med Hyg* 1969; 18(4): 500-505.
3. Cummins AJ, Moody AH, Lalloo K and Chiodini PL. Development of a rapid latex agglutination test for the detection of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(3): 300.
4. De-Korte PM, Harith AE, Dereure J, Huigen E, Faucherre V and Van-der-kaay HJ. Introduction of an improved direct agglutination test for detection of Leishmania infantum infection in southern France. *Parasitol Res* 1990; 76(6): 526-530.
5. Edrissian GH. Kala-azar in Iran. *Med J Islam Rep Iran* 1990; 4(3): 235-238.
6. Edrissian GH. Visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in its diagnosis and epidemiological studies. 8th International Congress of parasitology. Ismir, Turkey, 1994.
7. Hamidi AN, Nadim A, Edrissian GH, Tahvildar Bidruni G and Javadian E. Visceral leishmaniasis of jackals and dogs in northern Iran. *Tran R Soc Trop Med Hyg* 1982; 76(6): 756-757.
8. Harith AE, Kolk AH, Kager PA, *et al.* A simple and economical direct agglutination

test for serodiangnosis and seroepidemiologi -cal studies for visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80(4): 583-587.

9. Jacques M, Singer MD and Charles M. The latex fixation test. Application to the serological diagnosis of rheumatoid artritis. *Am J Med* 1956; 888-891.
10. Kabiri M and Kahanteb J. Latex agglutination test. A respective laboratory test for diagnosis of visceral leishmaniasis. Congress of Geographical Medicine. Shiraz, Iran. 1987; p25.
11. Lowry OHI, Rosenbrough MJ and Farr AL. Protein measurement with folinphenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
12. Mohebali M, Nasiri Kanari M, Kanani A, Edrissian GH, Anvari S and Nadim A. Cricetulus migratorus (Gray Hamster), another possible animal reservoir of Kala-azar in Meshkin Shahr, Iran. *Iranian J Publ Health* 1995; 24(3,4): 31-34.
13. Neva F and Sacks D. Leishmaninasis. In: Warren KS and Mahmoud AF (Eds). Tropical and Geographical Medicine. 2nd ed., New york, Mc Graw-Hill., 1990; pp290-308.
14. Roffi J, Dedet JP, Desjeux P and Garre MT. Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29(2):183-189.
15. Soleimanzadeh G, Edrissian GH, Movahed-danesh AM, *et al.* Epidemiological aspects of kala-azar in Meshkin-Shahr, Iran Human infections. *Bull WHO,* 1993; 71(6): 756-762.
16. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. *WHO Tech Rep Ser* 1990; 793: 1-158.