

لیشمانیوز احشایی در ایران و نقش تست‌های سرولوژی در تشخیص و بررسی اپیدمیولوژی آن^۱

دکتر غلامحسین ادریسیان^۱

خلاصه

کالاآزار در بعضی از مناطق استان‌های فارس و اردبیل به صورت یک بیماری آندمیک وجود دارد. در سایر استان‌های کشور، کالاآزار به شکل پراکنده و اسپورادیک گزارش شده است. جمع موارد تشخیص داده شده از سال ۱۳۲۸ که اولین مورد بیماری از مازندران گزارش گردید تا آخر سال ۱۳۷۲ بیش از ۴۳۰۰ مورد از مناطق مختلف کشور بوده است. تیپ کالاآزار در ایران از نوع مدیترانه‌ای و عامل آن لیشمانیا اینفانتوم (*L. infantum*) است و ناقلین بیماری به احتمال قوی گونه‌های پشه خاکی *Ph. perfiliewi*, *Ph. kandelakii*, *Ph. major* می‌باشند که آلوده به فرم پروماستیگوت لیشمانیا در مناطق آندمیک کالاآزار یافت شده‌اند. در بعضی از مناطق ایران سگ، شغال و روباه و اخیراً بعضی از چوندگان مبتلا به عفونت لیشمانیوز احشایی دیده شده‌اند. در مناطق آندمیک کالاآزار، سگ نقش اصلی را به عنوان مخزن انگل دارد. ۱۵ تا ۲۰٪ از سگ‌های شهرستان‌های مشکین شهر و گرمی از استان اردبیل از نظر سرولوژی مثبت بوده‌اند و در تعداد نسبتاً زیادی از موارد مثبت سرولوژی، در آزمایش انگل شناسی هم اماستیگوت در طحال و کبد آنها یافت شده است. کالاآزار در ایران اکثراً در بچه‌ها دیده می‌شود. در استان‌های اردبیل و فارس به ترتیب ۹۳/۴٪ و ۹۹/۳٪ موارد بیماری در بچه‌های تا سن ۱۲ سال گزارش شده است و بیشترین درصد موارد به ترتیب ۵۳/۳٪ و ۵۴/۴٪ در گروه سنی ۱ تا ۲ سال بوده است. نسبت جنس مذکر به جنس مؤنث ۱/۳۴ در استان اردبیل و ۱/۳۷ در استان فارس گزارش شده است، ولی در مطالعات سرولوژی با استفاده از تست‌های ایمونوفلورسانس و آگلوتیناسیون مستقیم درصد مثبت سرولوژی در دختر بچه‌های ساکن مناطق آندمیک بیشتر از پسر بچه‌های این مناطق بوده است. از روش‌های سرولوژی اختصاصی مانند ایمونوفلورسانس، الیزا و اخیراً تست آگلوتیناسیون مستقیم اکثراً برای تشخیص و در مناطق آندمیک جهت بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در انسان و مخازن حیوانی با نتایج مطلوب استفاده شده است. در حقیقت افزایش سریع موارد تشخیص داده شده لیشمانیوز احشایی در سال‌های اخیر در ایران بیشتر به علت استفاده از روش‌های سرولوژی اختصاصی می‌باشد که در مقایسه با آزمایش انگل شناسی حساس تر و عملی تر هستند. از بین تست‌های سرولوژی، آگلوتیناسیون مستقیم ساده تر و نتایج آن به اندازه کافی قابل اعتماد است، به این ترتیب می‌توان گفت در مناطق آندمیک کالاآزار، تست مثبت سرولوژی در بچه‌هایی که علائم بالینی بیماری را دارند مجوز خوبی برای شروع درمان است.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز احشایی، تست‌های سرولوژی، ایران

۱- استاد دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

● این مقاله تکمیل شده مطالب ارائه شده توسط نویسنده در هشتمین کنگره بین‌المللی پارازیتولوژی ازیر است که در فصل هفتم کتاب

Ozcel, M.A. & Ziya, A. (1996). Parasitology for the 21st. century. pp: 63-78 تحت عنوان Visceral leishmaniasis in Iran منتشر شده است.

مقدمه

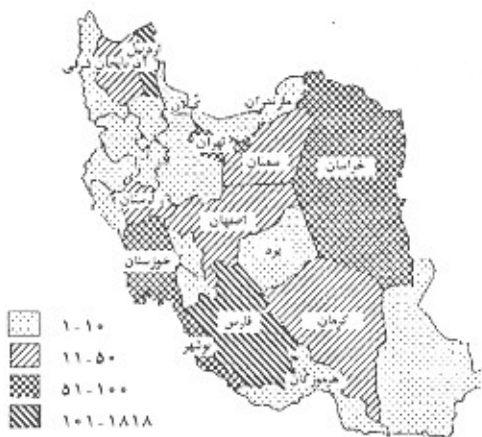
لیشمانیوز از مشکلات بهداشتی بیش از ۸۰ کشور دنیا می‌باشد و نزدیک به ۳۱۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا به این عفونت هستند. تعداد مبتلایان در دنیا حدود ۱۲ میلیون نفر و میزان بروز سالانه ۲ میلیون نفر تخمین زده می‌شود (۲۱).

لیشمانیوز احشایی یا کالآزار (بیماری سیاه) یک عفونت سیستمیک لیشمانیا است که از علایم بالینی بارز آن تب، کاهش وزن، بزرگ شدن طحال و کبد و در نتیجه بزرگی شکم، کم‌خونی با کاهش تمام عناصر سلولی بویژه گلبول‌های سفید و افزایش میزان گاما گلوبولین‌های خون است. این بیماری اکثراً در کودکان و نوجوانان و بیشتر در افرادی که دچار فقر یا سوء تغذیه هستند، دیده می‌شود. دوره نهفتگی در کالآزار از ۱۰ روز تا ۳۴ ماه گزارش شده است. در اکثر موارد این دوره ۳ تا ۸ ماه طول می‌کشد. در صورتی که تشخیص و درمان به موقع در کالآزار انجام نگیرد اکثر مبتلایان به این بیماری تلف می‌شوند و با وجود درمان هم میزان مرگ و میر از ۲ تا ۱۷٪ گزارش شده است (۲۹). لیشمانیوز احشایی در یک طیف وسیع، از موارد بدون علایم تا بیماری حاد پیشرفته دیده می‌شود. زمینه ایمنی فرد در تظاهرات و میزان شدت بیماری نقش دارد. در مبتلایان به نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) تعداد قابل ملاحظه‌ای از موارد لیشمانیوز احشایی گزارش شده است که درمان این موارد معمولاً به سختی انجام می‌گیرد (۲۴).

در ایران اولین مورد لیشمانیوز احشایی انسان در سال ۱۳۲۸ توسط دکتر یحیی پویا در یک پسر بچه از استان مازندران گزارش شد (۵)، بعد از آن موارد دیگری از سایر مناطق کشور تشخیص داده شد و تا پایان سال ۱۳۵۴ جمعاً ۱۲۰ مورد تأیید شده با آزمایش انگل‌شناسی از سراسر کشور به جز منطقه جنوب شرقی گزارش گردید (۲۷).

از سال ۱۳۵۵ که روش‌های سرولوژی اختصاصی به ویژه تست ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFAT) در تشخیص لیشمانیوز احشایی در ایران مورد استفاده قرار گرفت، (۱، ۱۴، ۱۵، ۲۳) تعداد موارد کشف شده کالآزار به سرعت افزایش یافت. افزایش موارد کالآزار و گزارش آنها توسط محققین چند مرکز پژوهشی دانشگاهی سبب آگاهی بیشتر پزشکان به ویژه متخصصین کودکان و سایر افراد گروه پزشکی در زمینه‌های اپیدمیولوژی و روش‌های عملی تشخیص آزمایشگاهی این بیماری گردید. در نتیجه موارد کالآزار تشخیص داده شده در ایران، روند افزایشی داشته است.

در حال حاضر کالآزار به صورت یک بیماری بومی (آندمیک) حداقل در بعضی از مناطق دو استان کشور یعنی شهرستان‌های فیروزآباد و جهرم از استان فارس در جنوب ایران و شهرستان‌های مشکین شهر و گرمی از استان اردبیل در شمال غربی ایران شیوع دارد (۱۶، ۱۷) و در هر یک از این دو استان تا آخر سال ۱۳۷۲ حدود ۱۸۰۰ مورد کالآزار تشخیص داده شده است. در سایر استان‌ها تعداد موارد تشخیص داده شده از یک مورد در دو استان کردستان و یزد تا ۸۸ مورد در استان‌های بوشهر و خوزستان متغیر بوده است. جمعاً تا آخر سال ۱۳۷۲ بیش از ۴۳۰۰ مورد کالآزار حداقل در ۱۱۳ محل و شهرستان از ۲۵ استان کشور تشخیص داده شده است (شکل ۱). تعداد موارد



شکل ۱: انتشار جغرافیایی موارد تشخیص داده شده کالآزار در ایران طی سال‌های ۱۳۲۸-۱۳۷۲

تشخیص داده شده طی ۵ سال (۱۳۶۸-۱۳۷۲) حدود ۳۰۰۰ مورد و بیش از دو برابر کل موارد تشخیص داده شده در طی چهار دهه گذشته (۱۳۶۷-۱۳۲۸) می‌باشد. روند افزایشی سریع موارد کشف شده کالآزار در نمودار ۱ نشان داده شده است.

با توجه به تعداد نسبتاً زیاد موارد تشخیص داده شده کالآزار در استان‌های بوشهر، خوزستان (۹)، خراسان (۷)، کرمان (۱۰) و آذربایجان شرقی (۱۶) احتمالاً بیماری در بعضی از مناطق این استان‌ها هم به صورت آندمیک شیوع دارد.

نتایج مطالعات سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی که در انسان و مخازن حیوانی (سگ و سگ‌سانان) در کانون‌های آندمیک استان‌های اردبیل و فارس انجام گرفته است، بومی بودن این عفونت را به میزان نسبتاً زیاد در این مناطق نشان می‌دهد (۴، ۸، ۱۶، ۱۷).

احتمال وجود لیشمانیوز احشایی در سگ توسط Wenyon (۱۹۱۴) در ایران مطرح گردید (۳۴). لیشمانیوز احشایی در سگ بوسیله دکتر یحیی پویا در سال ۱۳۲۸ در استان مازندران یعنی همان منطقه‌ای که اولین مورد کالآزار انسانی توسط همین محقق گزارش شده بود مشاهده شد (۶) و بعد از آن چند سگ آلوده به لیشمانیا در تهران گزارش گردید (۲۵،۳۰). آلودگی در سگ‌سانان وحشی مانند شغال و روباه نیز در بعضی از مناطق ایران گزارش شده است (۱۸). به احتمال قوی شغال و روباه منبع آلودگی برای انسان بویژه در موارد پراکنده و تک‌گیر (اسپورادیک) کالآزار و همچنین منشأ آلودگی سگ‌ها در مناطق آندمیک می‌باشند. در کانون‌های آندمیک مشکین شهر و مغان، سگ نقش اصلی را به عنوان مخزن بیماری دارد. در این مناطق، آلودگی احشایی به لیشمانیا در روباه (۸) و بعضی از چونندگان مانند هامستر خاکستری (*Cricetulus migratorius*) نیز گزارش شده است (۲۶).

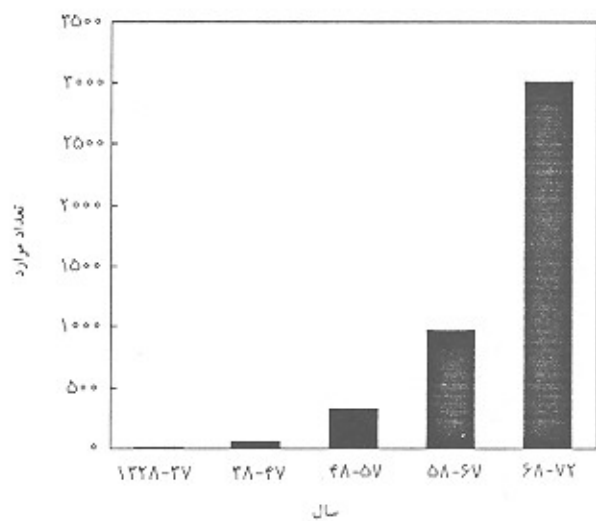
نتایج مطالعات سرولوژی لیشمانیوز احشایی با استفاده از تست‌های آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFAT) و آزمایش‌های انگل‌شناسی (PE) در مخازن مشکوک حیوانی لیشمانیوز احشایی (سگ، شغال و روباه) در فیروزآباد و جهرم در استان فارس و سگ در مشکین شهر و گبرمی از استان اردبیل نشان می‌دهد که آلودگی در این حیوانات نسبتاً بالا است (۴،۱۷).

آلودگی در انسان

سن و جنس مبتلایان به کالآزار

کالآزار در ایران بیشتر در بچه‌ها دیده می‌شود. بیماری در مناطق اندمیک استان اردبیل در افراد مذکر از ۳ ماه تا ۴۰ سال و در افراد مؤنث تا ۳۵ سال مشاهده شده است (۱۶). از ۴۹۳ بیمار کالآزاری در این مناطق ۵۳/۳ درصد در گروه سنی ۱ تا ۲ سال و ۹۳/۴ درصد تا سن ۱۲ سال بوده‌اند (نمودار ۲). در کانون اندمیک استان فارس سن بیماران بین ۱/۵ تا ۴۰ سال گزارش شده است (۳). از ۲۷۵ بیمار، ۵۴/۴ درصد در گروه سنی ۱ تا ۲ سال و ۹۹/۳ درصد از بیماران تا سن ۱۲ سال بوده‌اند (۱۷).

نسبت جنس مذکر به مؤنث در بیماران کانون‌های آندمیک فوق‌الذکر به ترتیب ۱/۳۴ و ۱/۳۷ بوده است ولی نتایج مطالعات سرولوژی با استفاده از DAT و IFAT در بچه‌های این دو کانون نشان می‌دهد نسبت درصد موارد مثبت سرولوژی (Sero Positive Rate - SPR) در جنس مذکر به جنس مؤنث به



نمودار ۱: افزایش سریع موارد تشخیص داده شده کالآزار در ایران طی ۱۳۲۸-۱۳۷۲

عامل بیماری

شواهد اپیدمیولوژیکی لیشمانیوز احشایی نشان می‌دهد که کالآزار در ایران از نوع مدیترانه‌ای و عامل آن به احتمال قوی *Leishmania infantum* است (۱۶). سه سویه لیشمانیا در اواخر سال ۱۳۶۷ از بیماران کالآزاری مشکین شهر جدا شد و از طریق مرکز تحقیقاتی بیماری‌های گرمسیری سازمان بهداشت جهانی (TDR) جهت تشخیص نوع انگل به مراکز بین‌المللی تشخیص لیشمانیا در لندن (انگلستان) و مون پلیه (فرانسه) ارسال گردید که هر سه سویه به روش ایزوآنزیمی، *L. infantum* MON-1 تشخیص داده شدند.

ناقلین بیماری

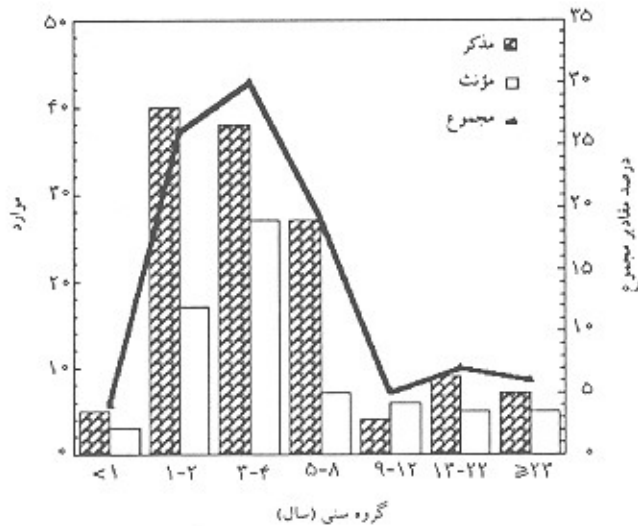
در بین پشه خاکی‌های تحت جنس *Phlebotomus* احتمال ناقل بودن *Ph. major* بر اساس شواهد اپیدمیولوژیکی از همه بیشتر به نظر می‌رسید (۲۷). در سال‌های اخیر *Ph. kandelakii* و *Ph. perfiliewi* در مشکین شهر و مغان از استان اردبیل (۲۸) و *Ph. major* در فیروزآباد از استان فارس (۳۱) که آلوده به اشکال تاژک‌دار لیشمانیا (promastigotes) بوده‌اند گزارش شده است.

مخازن حیوانی انگل

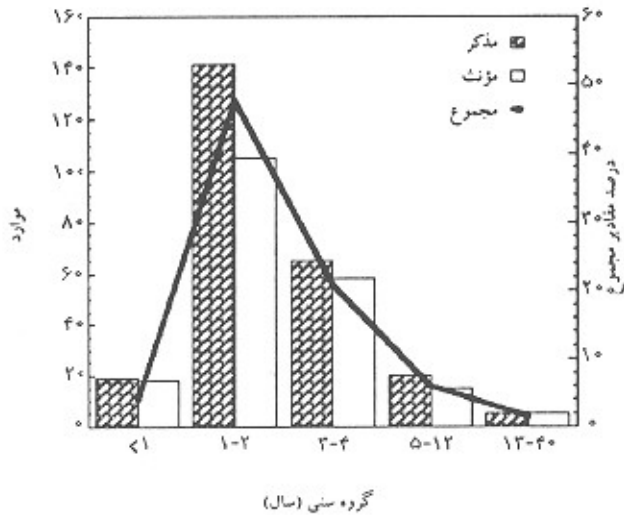
در سال ۱۹۱۳ که Neligan اجسام لیژمن را در احشاء یک سگ که دارای زخم جلدی لیشمانیوز در ناحیه سر بود پیدا کرد،

نیست احتمالاً عامل این لیشمانیوز جلدی لیشمانیا اینفانتوم است (مشاهدات دکتر ابوالحسن ندیم و دکتر مهدی محبعلی ۱۳۷۲). تعیین عامل و علت لیشمانیوز جلدی در چنین مواردی نیاز به بررسی بیشتری دارد.

ترتیب ۰/۳۸ و ۰/۷۶ در DAT و ۰/۱۷ و ۰/۸۰ در IFAT در کانون‌های اردبیل و فارس بوده است. با این ترتیب به نظر می‌رسد که میزان آلودگی در جنس مؤنث بیشتر از جنس مذکر باشد گرچه تظاهرات بالینی بیماری در جنس مذکر بیشتر است (۱۶، ۱۷).



نمودار ۳: توزیع سنی و جنسی ۲۴۰ مورد کالآآزار اسپورادیک در ایران، (۶۴ درصد جنس مذکر و ۳۶ درصد جنس مؤنث)



نمودار ۲: توزیع سنی و جنسی ۴۹۳ مورد کالآآزار تشخیص داده شده در کانون‌های آندمیک مشکین شهر و گرمی طی سال‌های ۶۸-۱۳۵۹، (۵۷/۲ درصد جنس مذکر و ۴۲/۸ درصد جنس مؤنث)

توزیع فصلی موارد کالآآزار

توزیع ماهیانه ۶۰۷ مورد کالآآزار در کانون آندمیک استان اردبیل طی سال‌های ۷۲-۱۳۷۰ با در نظر گرفتن مراجعه اول آنان به پزشک یا بیمارستان در شهرستان مشکین شهر در نمودار ۴ نشان داده شده است. بیشتر موارد در ماه‌های سرد سال و از بهمن ماه تا فروردین ماه مراجعه کرده‌اند. با توجه به مرحله دوم فعالیت پشه خاکی در منطقه که حداکثر آن در شهریور ماه است، دوره نهفتگی کالآآزار در این استان حدود ۶ ماه تخمین زده شده است (۳۲).

میزان مرگ و میر کالآآزار

آمار صحیحی از میزان مرگ و میر کالآآزار در ایران در دسترس نیست. در چند گزارش قدیمی میزان مرگ و میر این بیماری در بین بیمارانی که معمولاً در بیمارستان بستری بوده‌اند از ۱۰ تا ۳۰ درصد (۲۰، ۲۷، ۳۳) گزارش شده است. به نظر می‌رسد علت میزان مرگ و میر نسبتاً زیاد در بین بیمارانی که اغلب تحت درمان اختصاصی کالآآزار بوده‌اند تأخیر در مراجعه به مراکز درمانی مجهز با افراد مجرب بوده است. در سال‌های اخیر با

از ۲۴۰ مورد کالآآزار تشخیص داده شده در مناطق غیرآندمیک که به صورت اسپورادیک دیده شده‌اند، سن بیماران در افراد مذکر بین ۵ ماه تا ۵۰ سال و در افراد مؤنث تا ۵۲ سال متغیر بوده است. حداکثر موارد بیماری (۳۰/۸ درصد) در گروه سنی ۳ تا ۴ سال و ۸۵/۹ درصد تا ۱۲ سال بوده‌اند و نسبت جنس مذکر به جنس مؤنث ۱/۷۹ بوده است (نمودار ۳). این یافته‌ها نشان می‌دهد که با توجه به سن و جنس تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای بین بیماران کالآآزاری مناطق آندمیک با موارد اسپورادیک وجود دارد. در مناطق اسپورادیک نسبت به مناطق آندمیک، بیماران با گروه سنی بالاتر بیشتر دیده می‌شوند، همچنین نسبت جنس مذکر به مؤنث در بچه‌های کالآآزاری موارد اسپورادیک بیشتر از نسبت مشابه دیده شده در مناطق آندمیک است (۱۳).

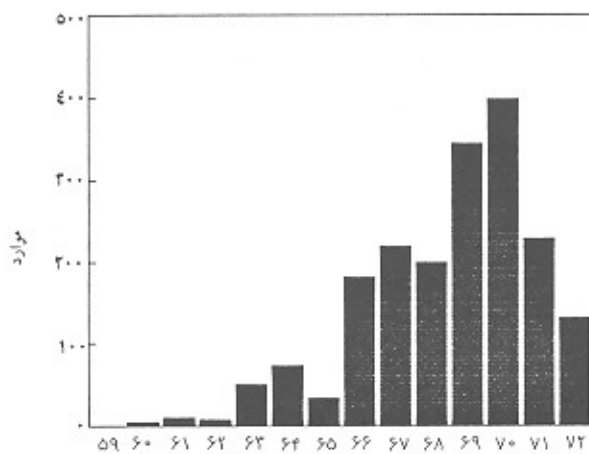
در کانون آندمیک لیشمانیوز احشایی گرمی در استان اردبیل تعداد معدودی موارد لیشمانیوز جلدی به صورت زخم‌های کوچک در صورت بچه‌هایی که سابقه ابتلا به کالآآزار و درمان آن را داشتند، دیده شده است. از آنجا که در این مناطق سالک شایع

درمان کالآزار در کانون آندمیک مشکین شهر و گرمی معمولاً با ترکیب پنج ظرفیتی آنتیموان meglumine antimonate (Glucantime) به صورت تزریق داخل عضلانی به مقدار روزانه ۲۰ mg/kg به مدت ۲۰ روز انجام می‌گیرد.

تشخیص سرولوژی کالآزار

تست ساده سرولوژی غیر اختصاصی فرمول ژل (FGT) در مواردی برای تشخیص کالآزار در ایران مورد استفاده قرار گرفته است. طی بررسی مقایسه‌ای FGT با آزمایش انگل‌شناسی و جستجوی جسم لیشمن در گسترش‌های تهیه شده از مغز استخوان (PE) و تست سرولوژی اختصاصی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFAT) که در ۹۶ بیمار مشکوک به کالآزار انجام گرفت در ۸۴ مورد (۸۷/۵ درصد) جواب FGT با PE و IFAT مطابقت داشت ولی در ۱۲ بیمار (۱۲/۵ درصد) با وجود مشاهده جسم لیشمن در آزمایش انگل‌شناسی (۱۱ مورد) و یا مثبت بودن IFAT با عبارهای $1:206 \geq$ (۶ مورد) FGT منفی بود.

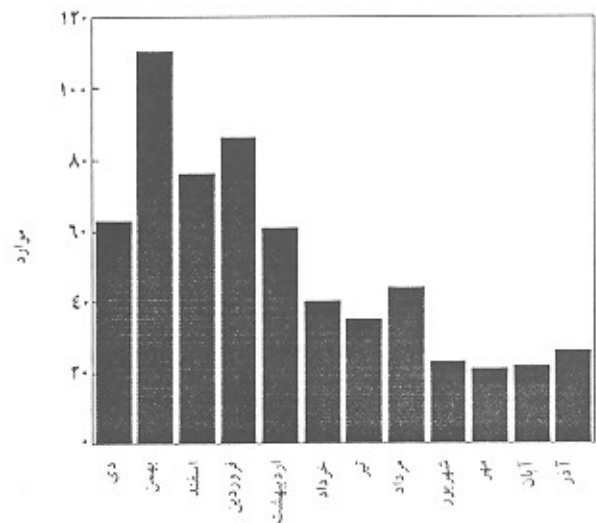
معمولاً FGT موقعی مثبت می‌شود که بیماری به صورت حاد یا مزمن پیشرفت کرده و میزان گلوبولین سرم بیمار به مقدار لازم افزایش یافته باشد. بنابراین جواب مثبت تست فرمول ژل همراه با علائم بالینی کالآزار و شواهد اپیدمیولوژیکی در مناطقی که تسهیلات لازم برای آزمایش انگل‌شناسی و یا انجام تست‌های سرولوژی اختصاصی وجود ندارد به تشخیص لیشمانیوز احشایی کمک می‌کند.



سال

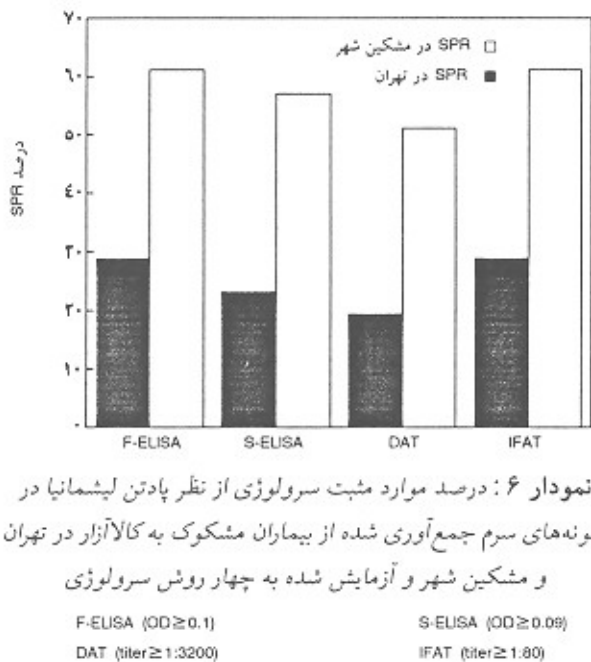
نمودار ۵: توزیع سالیانه ۱۸۸۵ مورد کالآزار که اغلب آنها به بیمارستان مشکین شهر طی سال‌های ۷۲-۱۳۵۹ مراجعه کرده‌اند

وجود افزایش موارد کالآزار تشخیص داده شده در ایران، مرگ و میر به ویژه در مناطق آندمیک کم اتفاق افتاده است. علت آن احتمالاً در دسترس بودن تست‌های سرولوژی اختصاصی برای تشخیص به موقع و آگاهی بیشتر گروه‌های پزشکی در زمینه اپیدمیولوژی، تشخیص و درمان بیماری در مناطق آندمیک است. ساکنین مناطق آندمیک نیز کم و بیش با علائم ظاهری کالآزار و عواقب آن در بچه‌ها آشنایی دارند و معمولاً با مشاهده این علائم به موقع به مراکز درمانی یا پزشکی که تجربه کافی در تشخیص و درمان کالآزار دارند مراجعه می‌نمایند و با این ترتیب میزان مرگ و میر ناشی از بیماری در ایران نسبت به بعضی از مناطق آندمیک لیشمانیوز احشایی در دنیا ناچیز است. ایجاد تسهیلات لازم برای تشخیص و درمان کالآزار در شهرستان مشکین شهر و بیماریابی فعال در این منطقه موقتاً سبب افزایش موارد کالآزار در سال‌های ۱۳۷۰-۱۳۶۹ گردید، ولی با اجرای طرح تجریمی کنترل کالآزار که با حمایت مرکز تحقیقاتی بیماری‌های گرمسیری سازمان بهداشت جهانی (TDR) از اردیبهشت ماه ۱۳۷۰ در منطقه شروع شد، از طریق مبارزه با بیماری به صورت بیماریابی و درمان، از بین بردن سگ‌های آلوده و ولگرد، سم‌پاشی با DDT در منازل که بیمار کالآزاری یا سگ آلوده وجود داشت و نیز خانه‌های همجوار آنها و در حد محدودی آموزش بهداشت، تعداد موارد لیشمانیوز احشایی از سال ۱۳۷۰ به بعد کاهش پیدا کرد (نمودار ۵).



نمودار ۴: توزیع ماهانه ۶۰۷ مورد کالآزار تشخیص داده شده در بین مراجعین به بخش کودکان بیمارستان شهرستان مشکین شهر طی سال‌های ۷۲-۱۳۷۰

خون تهیه شده از بیماران مبتلا به مالاریا، توکسوپلاسموز، سل، تب مالت و تیفوئید با آنتی‌ژن لیشمانیا دونوانی در DAT دیده نشد ولی در سه تست دیگر واکنش متقاطع در ۳ تا ۵٪ از عفونت‌های فوق با آنتی‌ژن لیشمانیا مشاهده گردید.



از چهار تست فوق‌الذکر به نظر می‌رسد بعد از DAT تست F-ELISA از سایر تست‌ها عملی‌تر و قابل اعتمادتر باشد (نمودار ۶) (۲۲).

طی سال‌های ۶۹-۱۳۶۴ در بین بیماران مشکوک به کالآزار که به بیمارستان مشکین شهر مراجعه کرده‌اند در ۴۷۹ مورد که آزمایش سرولوژی DAT با عیارهای ۱:۳۲۰۰ مثبت بوده است در پونکسیون مغز استخوان که جهت جستجوی انگل انجام گرفته است، فقط در ۶۹٪ موارد جسم لیشتن مشاهده شده است. از آنجا که بیماران مثبت سرولوژی با آزمایش DAT در بیمارستان مشکین شهر در اکثر موارد دارای علائم بالینی کالآزار می‌باشند، معمولاً در این مراکز تشخیص و درمان بر اساس تست مثبت DAT و علائم بالینی کالآزار انجام می‌گیرد (۳۲). در مطالعات فوق در موارد نادر، جسم لیشتن در آزمایش انگل‌شناسی بیمارانی دیده شد که از نظر سرولوژی به روش‌های IFAT و DAT منفی بودند یا پادتن لیشمانیا با عیاری پایین‌تر از حد مثبت در نمونه خون آنان قابل تشخیص بود. به طور کلی تست‌های سرولوژی اختصاصی مانند DAT و IFAT و F-ELISA بیشتر به تشخیص لیشمانیوز

روش‌های سرولوژی اختصاصی مانند ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFAT) و الیزا (ELISA) در سال‌های ۶۶-۱۳۵۵ برای تشخیص سرولوژی لیشمانیوز احشایی در بیماران مشکوک به کالآزار با نتایج مطلوب مورد استفاده و ارزشیابی قرار گرفته است (۱۰، ۱۱، ۱۴، ۱۵). طبق این مطالعات در مواردی واکنش متقاطع آنتی‌ژن لیشمانیا در هر دو تست IFAT و ELISA با بعضی از بیماری‌های عفونی دیگر مانند مالاریا، تیفوئید و آبه کبدی با عیارهای پایین وجود دارد. ولی در لیشمانیوز احشایی معمولاً عیار پادتن لیشمانیا در اکثر موارد به اندازه کافی بالا است و در موارد نادری ممکن است واکنش متقاطع در تشخیص سرولوژی کالآزار با تست‌های فوق‌الذکر ایجاد اشکال نماید.

از آنجا که کالآزار در ایران معمولاً در مناطق روستایی و دور افتاده که فاقد امکانات لازم برای تشخیص آزمایشگاهی به روش‌های انگل‌شناسی یا سرولوژی اختصاصی IFAT و ELISA هستند، شیوع دارد، سعی شده است که از یک روش سرولوژی قابل اعتماد که انجام آن در چنین مناطقی عملی باشد مثل روش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) که به وسیله هاریت (Harith) و همکارانش در سال ۱۹۸۶ برای تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی پیشنهاد شد استفاده شود (۱۹).

در ایران DAT از سال ۱۳۶۶ در سطح وسیعی در تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در انسان و مخازن حیوانی انگل مورد استفاده قرار گرفته است (۲، ۴، ۱۷، ۳۲). از ۲۶۵ بیمار مشکوک به کالآزار که از مراکز مختلف پزشکی و درمانی تهران جهت آزمایش‌های سرولوژی IFAT و DAT به واحد تک یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت معرفی شدند و در ۳۸ نفر از آنان پونکسیون مغز استخوان انجام گرفته و در ۱۸ مورد جسم لیشتن در آزمایش میکروسکوپی دیده شده بود، تمام ۱۸ مورد با هر دو تست IFAT و DAT مثبت بودند. ولی در ۴ مورد که تست‌های IFAT و DAT هر دو با عیار بالا مثبت بودند انگل در گسترش مغز استخوان بیماران مشاهده نشد.

در ۳۳۱ بیمار مشکوک به کالآزار که بیشتر آنان از کانون آندمیک مشکین شهر بودند، تست IFAT و DAT و همچنین ELISA با استفاده از آنتی‌ژن محلول (S-ELISA) و آنتی‌ژن فیگوره (F-ELISA) تهیه شده از اشکال پروماستیگوت لیشمانیا دونوانی مقایسه و ارزشیابی شده است. نتایج این بررسی نشان داد که DAT از تمام تست‌ها اختصاصی‌تر است ولی حساسیت آن از سایر تست‌ها کم‌تر می‌باشد. واکنش متقاطع در آزمایش ۱۰۰ نمونه

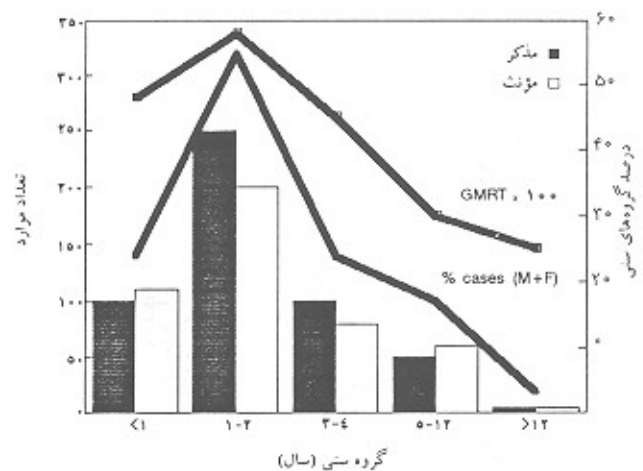
بررسی های سرواپیدمیولوژی در انسان

در یک بررسی سروولوژی لیشمانیوز احشایی که در سال ۱۳۵۶ با استفاده از IFAT در منطقه ایذه استان خوزستان انجام گرفت و نمونه خون، اکثراً از عشایر ایل بختیاری که قبلاً مواردی از کالآزار در میان آنان گزارش شده بود (۹,۲۷) تهیه شد، از ۱۲۳۰ نمونه خون تهیه شده روی کاغذ صافی از افراد در گروه های سنی مختلف جمعاً ۳/۴ درصد دارای پادتن لیشمانیا با عیارهای ۱:۸۰ تا ۱:۳۲۰ بودند. از آنجا که مینیمم (۰/۴ درصد) و ماکزیمم (۴/۷ درصد) این موارد ضعیف مثبت سروولوژی به ترتیب در بین جوان ترین (<۴ سال) و مسن ترین (>۲۰ سال) گروه سنی افراد تحت بررسی دیده شد، به نظر می رسد پادتن های مشاهده شده در این بررسی بیشتر واکنش متقاطع بعضی از بیماری های عفونی دیگر مانند مالاریا که در آن زمان کم و بیش در این منطقه شیوع داشته است با آنتی ژن لیشمانیا باشد (۱۲).

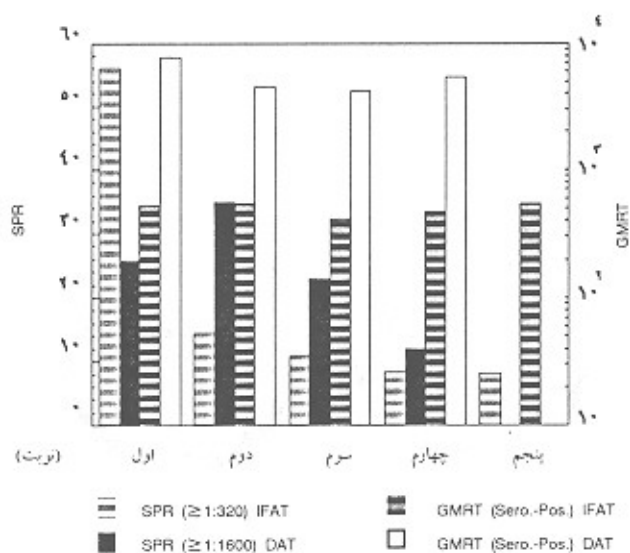
در مطالعات سروولوژی کالآزار که طی سال های ۶۸-۱۳۶۵ با استفاده از تست IFA در کانون های آندمیک مشکین شهر و گرمی در استان اردبیل انجام گرفت، SPR از ۰/۸۰ تا ۳/۲ درصد با عیارهای ۱:۸۰ تا ۱:۶۴۰ در دهات مختلف متغیر بود. در این بررسی SPR متناسب با تعداد موارد کالآزار تشخیص داده شده قبلی در این مناطق بود. در ۳۹۵ نفر که سابقه کالآزار و درمان آن را داشتند ۲۳/۳ درصد با عیارهای ۱:۳۲۰ \geq از نظر سروولوژی مثبت بودند (۱۶).

در طرح تجربی کنترل کالآزار در کانون آندمیک مشکین شهر که طی سال های ۷۲-۱۳۷۰ به وسیله بهورزان خانه های بهداشت این شهرستان به صورت بیماریابی فعال (ACD) در تعدادی از دهات انتخاب شده و به صورت بیماریابی پاسیو (PCD) در بیماران مشکوک به کالآزار که به بخش کودکان بیمارستان مشکین شهر یا پزشک متخصص کودکان مراجعه کرده بودند با استفاده از تست سروولوژی آگلوتیناسیون مستقیم انجام گرفت، در ۱۸۹۷۴ نمونه خون جمع آوری شده در بیماریابی ACD و ۱۷۹۱ نمونه تهیه شده در بیماریابی PCD به ترتیب ۸۵۵ مورد (۴/۵ درصد) و ۶۸۷ مورد (۳۸/۳ درصد) از نظر وجود پادتن لیشمانیا با عیارهای ۱:۳۲۰ \geq مثبت بودند. از ۳۰۴۳ نمونه خون تهیه شده در منطقه شاهد گرمی که در بیماریابی فعال جمع آوری شد، ۹۶ مورد (۳/۱۵ درصد) مثبت بودند. در بیماریابی فعال مشکین شهر ۱۴ مورد (۰/۷۴ درصد) و در منطقه گرمی ۳۴ مورد (۱/۱۲ درصد) بیمار کالآزاری کشف گردید. در بیمارانی که به بخش کودکان بیمارستان مشکین شهر در بیماریابی پاسیو مراجعه کرده

احشایی به ویژه در مناطق آندمیک کمک می کنند و در عین حال در مقایسه با آزمایش انگل شناسی و جستجوی انگل انجام آنها عملی تر است.



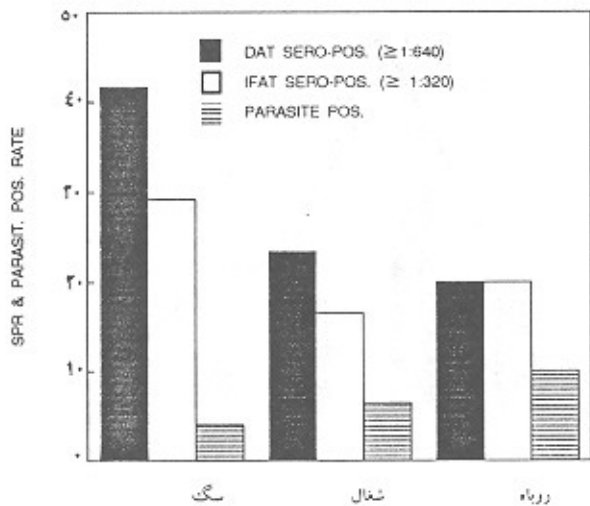
نمودار ۷: توزیع سنی و جنسی در ۸۵۰ مورد مثبت سروولوژی آزمایش شده با DAT در بین بیماران مشکوک به کالآزار در استان اردبیل طی سال های ۷۲-۱۳۷۰. (۵/۵۶٪ جنس مذکر و ۵/۲۵٪ مؤنث). GMRT میانگین هندسی عیارهای پادتن لیشمانیا ($\geq 1:3200$) را نشان می دهد.



دفعات آزمایش در توت های ۲ ماهه

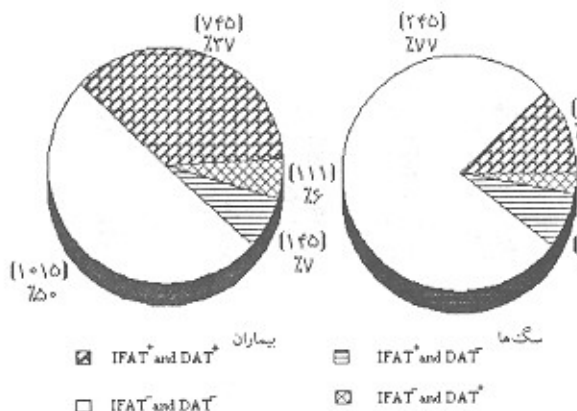
نمودار ۸: سیر عیارهای پادتن لیشمانیا در تست های IFA و DA در موارد مثبت سروولوژی شهرستان های فیروزآباد و جهرم از استان فارس (۷۰-۱۳۶۹)

داشته‌اند مدت طولانی‌تری نسبت به پادتن‌های قابل تشخیص با IFAT در بدن باقی می‌مانند. در بیماران درمان شده کالآزار در کانون آندمیک مشکین شهر که معمولاً هر دو ماه یک بار پی‌گیری می‌شدند و آزمایش DAT انجام می‌گرفت در بعضی موارد پادتن



نمودار ۱۰: نتایج آزمایش‌های سرولوژی و انگل‌شناسی ۶۴ حیوان مخزن احتمالی لیشمانیوز احشایی در مناطق فیروزآباد و جهرم از استان فارس (۷۰-۱۳۶۹)

لیشمانیا بدون کاهش عیار تا بیش از دو سال مشاهده می‌شد. این افراد هیچ‌گونه نشانه‌های بالینی کالآزار را نداشته و در چند مورد که پونکسیون مغز استخوان به منظور جستجوی جسم لیشتن انجام گرفت، انگل دیده نشد.

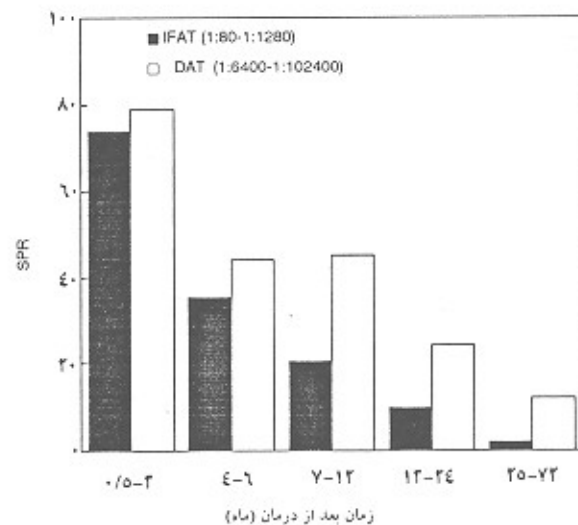


نمودار ۱۱: مقایسه نتایج تست‌های IFAT و DAT در تشخیص لیشمانیوز احشایی در آزمایش ۲۰۱۶ بیمار مشکوک به کالآزار و ۳۱۷ سگ در مشکین شهر

بودند ۶۰۷ نفر (۳۳/۹ درصد) هیچ‌گونه سابقه قبلی ابتلا به کالآزار نداشتند.

توزیع سنی و جنسی کودکانی که با DAT در کانون آندمیک مشکین شهر مثبت بودند و میانگین هندسی عیار پادتن (GMRT) در گروه‌های سنی این افراد، در نمودار ۷ نمایش داده شده است. نمودار ۷ بسیار شبیه نمودار ۲ است که نمایانگر توزیع سنی و جنسی بیماران کالآزاری این منطقه است، می‌باشد.

IFAT و DAT در مطالعات سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در شهرستان‌های فیروزآباد و جهرم استان فارس در سال‌های ۷۰-۱۳۶۹ نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۱۷).



نمودار ۹: درصد موارد مثبت سرولوژی در بیماران کالآزاری درمان شده در مشکین شهر بر حسب طول مدت بعد از درمان

به طور کلی از ۱۷۶۶ نمونه خون آزمایش شده در این مناطق SPR در IFAT، ۴/۲ درصد و در DAT، ۱/۸ درصد بوده است. در افرادی که سابقه کالآزار و درمان آن را داشتند SPR در IFAT، ۲۰/۳ درصد و در DAT، ۱۵/۲ درصد بوده است. این بررسی نشان داد که کاهش SPR طی ۸ ماه در DAT کندتر از کاهش SPR در IFAT بوده است و GMRT در بین موارد مثبت DAT بیشتر از IFAT در طی این مدت ثابت مانده است (نمودار ۸).

در کانون آندمیک مشکین شهر SPR طی ۷۲ ماه از ۷۳/۷ درصد به ۲ درصد در IFAT و از ۷۸/۹ به ۱۲ درصد در DAT کاهش یافته است (نمودار ۹).

این یافته‌ها نشان می‌دهد که پادتن‌های قابل تشخیص لیشمانیا با DAT در افرادی که سابقه کالآزار و درمان آن را

مخازن حیوانی

آزمایش‌های سرولوژی IFAT، DAT و آزمایش انگل‌شناسی که در ۶۶ مخزن حیوانی مشکوک به لیشمانیوز احشایی شامل ۲۴ سگ، ۳۰ شغال، ۱۰ روباه و ۲ موش خرمایی در سال‌های ۷۰-۱۳۶۹ در کانون‌های آندمیک کالآآزار فیروزآباد و چهارم استان فارس انجام گرفت، نشان داد که سگ، شغال و روباه به میزان بالایی دارای عفونت لیشمانیوز احشایی هستند (نمودار ۱۰).

در کانون‌های آندمیک مشکین شهر و گرمی از ۳۱۷ نمونه خون که به طور تصادفی از سگ‌های این مناطق تهیه شد SPR در IFAT با عبارهای $\geq 1:640$ و در DAT با عبارهای $\geq 1:320$ به ترتیب ۱۹/۹ و ۱۴/۸ درصد بوده است (۴). در سگ‌هایی که علایم بالینی لیشمانیوز احشایی داشتند در آزمایش انگل‌شناسی و جستجوی جسم لیشمن در غدد لنفاوی بزرگ شده آنها انگل در ۵

مورد مشاهده شد. چهار مورد از این سگ‌ها از نظر سرولوژی با هر دو تست مثبت بودند ولی در یک مورد با وجود مشاهده جسم لیشمن آزمایش‌های سرولوژی منفی بود. فقط ۱۳/۶ درصد از سگ‌هایی که با تست DAT مثبت بودند علایم بالینی لیشمانیوز احشایی را داشتند (۴).

نتایج مقایسه میزان تطابق DAT و IFAT در بیماران مشکوک به کالآآزار و سگ‌های تحت بررسی در استان اردبیل در نمودار ۱۱ نشان داده شده است. آلودگی سگ‌ها به لیشمانیوز احشایی در مناطق آندمیک استان اردبیل از مشکلات مهم کنترل کالآآزار در این استان است. به طور کلی نتایج مطالعات فوق‌الذکر نقش اصلی و مفید تست‌های سرولوژی اختصاصی به ویژه آگلوتیناسیون مستقیم را در تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در انسان و مخازن حیوانی نشان می‌دهد.

Summary

Visceral Leishmaniasis in Iran and The Role of Serological Tests in The Diagnosis and Epidemiological Studies

Gh. Edrissian, Pharm D, BMLS, MSC¹

1. Professor of Parasitology, School of Public Health and Institute of Public Health Researches, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

Kala-azar is known as an endemic disease in some areas of Fars province (in south) and Ardabil province (in north-west) of Iran. In other provinces the disease has been reported, mostly, in sporadic form. However since 1949 when the first case of kala-azar was reported in Mazandaran province, to the end of 1993 more than 4300 cases had been diagnosed in at least 113 cities and districts. Kala-azar in Iran is of Mediterranean type and the causative agent is Leishmania infantum. Phlebotomus major, Ph. kandelakii and Ph. perfiliewi that have been found infected with promastigotes in the endemic areas are most probably the main vectors of the disease. Dog is the main reservoir in the endemic areas. Jackals and foxes have also been infected with Leishmania in the endemic areas as well as in some other areas of Iran where kala-azar cases have been found in sporadic form. 15% to 20% of the dogs in Meshkinshahr and Garmi from the province of Ardabil have been sero-positive also parasitic examinations in most of these cases reveals amastigotes in spleen and liver of these dogs. Recently, gray hamster has been found visceraally infected with Leishmania in the Meshkinshahr - Kala - azar endemic areas. The disease occurs mostly in children. In the endemic areas of Ardabil and Fars provinces 93.4% and 99.3% of the cases were found in children of ≤ 12 years old and the highest number of cases were 53.3% and 54.4% in age group of 1-2 years, respectively. Male/Female ratio in Ardabil and Fars provinces were 1.34 and 1.37, respectively. However, in serological surveys of kala-azar, sero-positive rates (SPR), in both direct

agglutination (DAT) and indirect fluorescent antibody (IFAT) tests were higher in females than males. Serological tests such as IFAT, ELISA and recently DAT have been applied in sero-diagnosis and sero-epidemiological surveys of visceral leishmaniasis (VL) in man and animal reservoirs in Iran with satisfactory results. In fact the rapid increase of the incidence of VL in Iran, during recent years, particularly, in the kala-azar endemic areas is mainly due to increase in application of such serological techniques, which in comparison to parasitological methods are more sensitive and quite specific and practical. The DAT among serological tests applied in Iran is a simple as well as a reliable test. In the suspected kala-azar pediatric patients from the endemic areas, a positive DAT result along with clinical symptoms could be considered as a good indication for specific treatment of the disease.

Journal of Kerman University of Medical Sciences 1996; 3(2): 97-108

Key Words: Visceral leishmaniasis, Serological Tests, Iran

منابع

۱. ادریسیان، غلامحسین، اخوان، اسکندر، نمر، گیتی، حفیظی، مهدی و زوار، ابوالحسن. ایمنوفلورسانس به عنوان روش انتخابی در تشخیص لیشمانیوز احشایی و معرفی چهار بیمار. مجله نظام پزشکی، شماره ۳، ص ۱۹۰-۱۸۵.
۲. ادریسیان، غلامحسین، حجاران، هما، عطائیان، علی، کتعی، اصغر، افشار، عباس و سرکییان، ماریناز: استفاده از تست آگلوتیناسیون مستقیم در تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژی کالآآزار در ایران. ارائه شده در اولین کنگره سراسری بیماری‌های انگلی در ایران. (دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ۲۰ تا ۲۲ آذرماه ۱۳۶۹).
۳. البرزی، عبدالوهاب: کالآآزار در جنوب ایران. ارائه شده در چهارمین کنگره بیماری‌های عفونی و گرمسیری، (تهران، ۲۳-۲۱ مهرماه ۱۳۷۲)، ص ۲۴-۲۸.
۴. بکاکی، سعید: بررسی سرواپیدمیولوژیک سگت‌های کانون لیشمانیوز احشایی شهرستان مشکین شهر و ارزش‌یابی عملیات کنترل بیماری در انسان. پایان‌نامه تخصصی در رشته اپیدمیولوژی. دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۲.
۵. پویا، یحیی: کالآآزار در ایران. نامه ماهانه دانشکده پزشکی تهران، ۱۳۲۸، سال هفتم، شماره ۳، ص ۱۲۱-۱۱۶.
۶. پویا، یحیی: مطالعه لیشمانیوز احشایی در استان‌های ۱ و ۲. نامه ماهانه دانشکده پزشکی تهران، ۱۳۲۸، سال هفتم، شماره ۷، ص ۳۶۱-۳۵۹.
۷. طبرستانی، مجتبی، الهی، رضا، فتی، عبدالمجید: مطالعه رتروسپکتیو و پرسپکتیو کالآآزار در ۴۰ بیمار از بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی مشهد. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۳۷۰، شماره ۳۷، ص ۲۰-۵.
۸. عبائی، محمدرضا: تعیین فون فعالیت‌های پشه خاکی‌ها و مخازن حیوانی لیشمانیوز احشایی در مشکین شهر. پایان‌نامه فوق لیسانس علوم بهداشتی، رشته حشره‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۶۸.
۹. مراغی، شریف، ادریسیان، غلامحسین و ابراهیم‌زاده، عادل: کالآآزار در خوزستان (قسمت اول ۱۹۷۱ تا ۱۹۸۰) مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ۱۳۷۱، سال اول، شماره ۴، ص ۷-۱.
۱۰. نیکت‌نفس، پدram، داعی پاریزی، محمدحسین و احمدی، اکبر: گزارش چهل مورد کالآآزار در استان کرمان. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۷۲، دوره اول، شماره ۱، ص ۳۷-۳۰.

11. Behforouz N, Rezai HR and Gettner S. Application of immunofluorescence to detection of antibody in Leishmania infections. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1976; 70(3): 293-301.
12. Edrissian Gh.H. Sero-epidemiology in leishmaniasis. 2nd *Asian Congress of Parasitology*. Lucknow, 13-16 February 1988.

13. Edrissian Gh.H. Kala-azar in Iran. *Medical Journal of Islamic Republic of Iran* 1990; 4: 235-238.
14. Edrissian Gh.H and Darabian P. A comparison of enzyme linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. *Transactions of the*

- Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1979; 73(3): 289-292.
15. Edrissian Gh.H, Darabian P, Zovein Z, Seyedi-Rashti MA and Nadim A. Application of the indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1981; 75(1): 19-24.
 16. Edrissian Gh.H, Hafizi A, Afshar A, Soleiman-Zadeh G, Movahed-Danesh, AM and Garoussi A. An endemic focus of visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr, East Azarbaijan Province, North-West part of Iran and IFA serological survey of the disease in this area. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1988; 81(2): 238-248.
 17. Edrissian Gh.H, Ahanchin AR, GhaRachahi AM *et al.* Sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars Province, Southern Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences* 1993; 18: 99-105.
 18. Hamidi AN, Nadim A, Edrissian Gh.H, Tahvildar-Bidruni G and Javadian E. Visceral leishmaniasis of jackals and dogs in northern Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1982; 76(6): 756-757.
 19. Harith AE, Kolk AH, Kager PA *et al.* A simple and economical direct agglutination test for sero-diagnosis and sero - epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1986; 80(4): 583-587.
 20. Hashemi-Nassab A and Zadeh-Shirazi H. Visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fars Province, Iran: Study of 130 cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1982; 76: 756-757.
 21. International Fedration of Pharmaceuti-cal Manufacturers Associations Arms in the battle against leishmainasis. File of Health Horisons 1995; 26: 11.
 22. Khorshidian S, Hajaran H, Sarkissian MT and Edrissian, Gh.H. Evaluation of ELISA using intact promastigotes as antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis and its comparison with IFAT. *Iranian Journal of Medical Sciences* 1994; 19: 15-18.
 23. Kohanteb J, Rezai HR and Ardehali S. Application of electro-immunodiffusion and crossed electroimmunodiffusion tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis (kala-azar). *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1984; 87(5): 201-205.
 24. Lookwoid DNG and Pasvol G. Kala-azar is now a common opportunistic infection in HIV infected patients. *British Medical Journal* 1994; 308: 1560-1561.
 25. Mobedi I, Nadim A, and Sadeghi V. Canine visceral leishmaniasis in Tehran. 8th *International Congress of Tropical Medicine and Malaria*, Tehran, 7-15 September 1968.
 26. Mohebbali M, Nassiri-Konary M, Kanani A *et al.* *Grocetulus migratorius* (gray hamster) another probable reservoir of Kala-azar in Meshkin-Shahr, North West Iran. *Iranian Journal of Public Health* (in press).
 27. Nadim A, Navid-Hamidi A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni Gh and Amini H. Present status of kala-azar in Iran. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1978; 27: 25-28.
 28. Nadim A, Javadian J, Tahvildar-Bidruni Gh, Mottaghi M and Abai A. Epidemiological aspects of kala-azar in Meshkin-Shahr, Iran: Investigation on vector. *Iranian Journal of Public Health* 1992; 21: 61-68.
 29. Pearson RD. *Leishmania* species, visceral kala-azar. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE (Eds). Principles and practice of infectious diseases. 3rd ed., New York, Churchill Livingstone, 1990; pp2068-2071.
 30. Rafyi A, Niak A and Naghshineh R.

- Canine visceral leishmaniasis in Iran. *Veterinary Record* 83: 269-710.
31. Sahabi Z, Seyedi-Rashti MA, Nadim A, Javadian E, and Kazemini MR. Preliminary report on the natural leptomnad infection of *Phlebotamus major* in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Fars Province, Southern Iran. *Iranian Journal of Public Health* 1992; 21: 87-93.
32. Soleiman-Zadeh G, Edrissian Gh.H, Movahed-Danesh AM, and Nadim A. Epidemiological aspects of kala-azar in Meshkin-Shahr, Iran: Human infection. *Bulletin of the World Health Organization* 1993; 71: 759-762.
33. Tahernia AC and Jalayer T. Visceral leishmaniasis in children in southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1968; 62: 171-173.
34. Wenyon CM. Some aspects of surgery in the tropics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1914; 7: 214-216.