جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی
دوره ۴ شماره ۱ بهار ۱۳۸۵ ، صفحات : ۵۵ – ۴۵

بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) در شهرستان گرمی از استان اردبیل

محمود محامی : دانشجوی کارشناسی ارشد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر مهدی محبعلی : استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران - نویسنده رابط mmohebali@hotmail.com
دکتر حسین کشاورز : استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر هما حجاران : استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
بهناز آخوندی: کارشناس آزمایشگاه گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
ذبیح‌الله زارعی : کارشناس آزمایشگاه ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر
سرور چاره دار : کارمند گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دریافت : ۸۳/۱۲/۱۹ پذیرش : ۸۴/۳/۲

چکیده:

زمینه و هدف : لیشمانیوز احشایی یا کالاآزار در بعضی از نقاط ایران از جمله مناطقی از استان های اردبیل ، آذربایجان شرقی ، بوشهر و فارس به صورت آندمیک دیده می‌شود. این بیماری در سایر استان های کشور به شکل پراکنده و اسپورادیک گزارش شده است. با توجه به گزارش موارد متعدد بیماری کالاآزار از شهرستان گرمی به مراکز بهداشتی استان اردبیل ، انجام مطالعه بر روی بیماری مذکور در این منطقه ضروری به نظر می رسید لذا این بررسی با هدف تعیین وضعیت لیشمانیوز احشایی در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳ به انجام رسید.

روش کار : روش نمونه‌برداری به شکل خوشه ای و گروههای تحت مطالعه شامل کودکان زیر ۱۲ سال و ۱۰٪ بزرگسالان بوده است. در مجموع ۱۱۵۵ نمونهٔ خون از افراد مذکور تهیه شد که با روش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) به منظور اندازه گیری آنتی‌بادی ضد لیشمانیائی مورد آزمایش قرار گرفت. در نهایت با استفاده از روش DA ، ۳۲ نفر (۲/۸٪) دارای آنتی‌بادی اختصاصی ضد لیشمانیا با عیار ۸۰۰ : ۱ ≤ بوده و در کل نمونه‌ها ۷ نفر (۰/۶٪) با عیار ۳۲۰۰ : ۱ ≤ از نظر سرولوژی مثبت بودند. نمونه‌های مثبت و مشکوک DAT با دو تست IFA وELISA نیز بررسی شدند. همچنین از بین سگ های صاحبدار ، ۲۲ قلاده(۲/۶ ٪) سگ علایم دار در این مطالعه مورد آزمایش سرولوژی قرار گرفتند که ۳ قلاده (۱۳/۷ ٪) سگ دارای آنتی بادی ضد لیشمانیا با استفاده از تست های DAT (۳۲۰ : ۱ ≤) و Dipstick rk۳۹ بودند .

نتایج : پس از کالبد گشایی این سه قلاده سگ ، آزمایش پارازیتولوژی یکی از سگ ها مثبت بود. جداسازی و کشت همین ایزوله نیز موفقیت آمیز بوده که با استفاده از روش RAPD-PCR گونهٔ انگل *L.infantum* تعیین شد. در این بررسی اختلاف معنی داری بین جنس مذکر(۲/۷ ٪) و مؤنث(۲/۸ ٪) در ابتلاء به لیشمانیوز احشایی مشاهده نشد (p = ۰/۸) ولی موارد بیماری در کودکان زیر ٤ سال بیشتر بود (p< ۰/۰۵) .

نتیجه گیری : نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیماری کالاآزار یکی از مشکلات بهداشتی شهرستان گرمی بوده و این بررسی ضرورت انجام مطالعات تکمیلی و توسعهٔ امکانات بهداشتی، درمانی و تشخیصی را در منطقه بیان می‌کند.

واژگان کلیدی : لیشمانیوز احشایی ، سرواپیدمیولوژی ، ایران

مقدمه:

لیشمانیوز احشایی یا کالاآزار (بیماری سیاه) یک عفونت سیستمیک ناشی از انگل های لیشمانیا است که از علایم بالینی بارز آن تب، کاهش وزن، بزرگ شدن طحال و کبد و در نتیجه بزرگی شکم، کم خونی با کاهش تمام عناصر سلولی به ویژه گلبولهای سفید و افزایش میزان

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

گاما گلوبولین‌های خون است (Pearson R.K.۱۹۹۰). کالاآزار در ایران از نوع مدیترانه‌ای بوده وعامل آن لیشمانیا اینفانتوم، ناقل آن گونه‌های به خصوصی از پشه خاکی‌های جنس فلبوتوموس و مخزن انگل سگ و سگ‌سانان می‌باشد (ادریسیان ۱۳۷۵، Nadim A. et al. ۱۹۷۸). در ایران اولین مورد لیشمانیوز احشایی انسان در سال ۱۳۲۸ توسط دکتر یحیی پویا در یک پسربچه از استان مازندران گزارش شد (پویا ۱۳۲۸). بعد از آن موارد دیگری از سایر مناطق کشور تشخیص داده شد و تا پایان سال ۱۳٥٤ جمعاً ۱۲۰ مورد تأیید شده با آزمایش انگل‌شناسی از سراسر کشور به جز منطقهٔ جنوب شرقی گزارش گردید(Nadim A. et al. ۱۹۷۸). از سال ۱۳٥٥ که روش های سرولوژی اختصاصی به ویژه تست ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم (IFA) در تشخیص لیشمانیوز احشایی در ایران مورد استفاده قرار گرفت تعداد موارد کشف شدهٔ کالاآزار به سرعت افزایش یافت. در حال حاضر کالاآزار در بعضی از مناطق استان های اردبیل،آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر به شکل آندمیک دیده می‌شود(ادریسیان۱۳۷٥). تا سال ۱۳۷٦ حدود ٥۲٤٤ مورد کالاآزار در ایران تشخیص داده شده است که ۲۲۸۰ مورد مربوط به استان اردبیل ۲۰۲۰ مورد مربوط به استان فارس و ۱۷٥ مورد مربوط به استان آذربایجان شرقی بوده است(Mohebali M. et al. ۲۰۰ ، میرصمدی و همکاران ۱۳۸۲). کانون اصلی بیماری در استان اردبیل، شهرستان های مشکین شهر و مغان (گرمی، بیله‌سوار، پارس‌آباد) بوده است (ادریسیان ۱۳۷٥). روش های سرولوژیک مختلفی در تشخیص بیماری کالاآزار به کار می‌روند که از بین آنها می‌توان به تست‌های IFA، DAT، ELISA، لاتکس آگلوتیناسیون و Dipstick rk۳۹ اشاره نمود. از مجموع تست‌های فوق که همگی در بیماران کالاآزاری استان اردبیل مورد آزمون قرار گرفته‌اند تست DAT از حساسیت و ویژگی بالایی برای مطالعات سرواپیدمیولوژیک برخوردار بوده وبا توجه به سهولت انجام به عنوان یکی از تست‌های انتخابی در تشخیص بیماری به کار می‌رود (سازمان بهداشت جهانی ۱۳۷۸). بر اساس مطالعه ای که توسط دکتر ادریسیان و همکاران در استان آذربایجان شرقی انجام گرفته است ، از بین ۸۳۸ نمونهٔ خون تهیه شده از کودکان ساکن ٥ روستا در شهرستان های مغان و اهر ، ۱۲مورد (۱/٤٪) با استفاده از تست IFA از نظر وجود پادتن لیشمانیا مثبت بوده اند (ادریسیان و همکاران ۱۳٦۹). با توجه به این که به طور مکرر موارد بیماری از شهرستان گرمی گزارش می‌شود و میزان بروز آن در این شهرستان طی سالهای اخیر افزایش چشمگیری داشته است (محمدی خیرآبادی و همکاران ۱۳۸۲)، انجام یک مطالعهٔ سرواپیدمیولوژی در مورد این بیماری یکی از اولویت‌های بهداشتی شهرستان گرمی به نظر می‌رسید. لذا این بررسی با هدف تعیین وضعیت لیشمانیوز احشایی در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳ به انجام رسید.

روش کار:

موقعیت جغرافیایی شهرستان گرمی : شهرستان گرمی در ناحیهٔ شمالی استان اردبیل در ٤۸ درجه و ۳ دقیقهٔ طول شرقی و ۳۹ درجه و ۱ دقیقهٔ عرض شمالی واقع شده است. این شهرستان از طرف شمال به شهرستان های بیله‌سوار و پارس‌آباد، از طرف شرق به کشور جمهوری آذربایجان ، از طرف جنوب به شهرستان مشکین شهر و از طرف غرب به شهرستان های اهر و کلیبر از استان آذربایجان شرقی محدود می‌شود. فاصلهٔ گرمی تا اردبیل ۹۷ کیلومتر است. ارتفاع این شهرستان از سطح دریا ۱۱۰۰ متر می‌باشد و مساحت آن ۱۷۲٥/۲ کیلومتر مربع است. میزان بارندگی متوسط سالیانهٔ آن ۳٥۰-۲٥۰ میلی‌متر می‌باشد. کمترین متوسط حداقل درجهٔ حرارت ماهیانهٔ هوا در شهرستان گرمی ۷/۱- درجهٔ سانتی‌گراد در دی ماه و بیشترین متوسط حداکثر درجهٔ حرارت ماهیانهٔ هوا ۳۲/٥ درجهٔ سانتی‌گراد در تیر ماه بوده است. طبق آمارگیری سال ۱۳۸۰، جمعیت شهرستان گرمی ۹۸٤۸۹ نفر، تعداد خانوار آن ۱۷۲۳۰ ، ٥۰/٥ ٪ کل

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جمعیت مذکر و ۴۹/۵٪ مؤنث بوده است (سازمان برنامه وبودجهٔ استان اردبیل ۱۳۸۰).

روش تهیهٔ نمونه : این بررسی از نوع توصیفی و به روش مقطعی انجام شده است. روش نمونه‌برداری به شکل خوشه ای ، حجم نمونهٔ محاسبه شده ۱۱۵۵ نفر و به این صورت بوده که پس از دریافت اطلاعات مربوط به تعداد موارد بیماری کالاآزار در روستاهای شهرستان گرمی طی سالهای اخیر، با توجه به نقشهٔ شهرستان تعداد ۸ روستا، از روستاهای دارای موارد و ٤ روستا از روستاهای فاقد گزارش مربوط به کالاآزار طوری انتخاب گردیدند که کل شهرستان را از شمال ، جنوب، شرق و غرب تحت پوشش قرار دهد. همچنین حدود ۱۵٪ کل حجم نمونه به خود شهرستان گرمی اختصاص داده شد که این تعداد نمونه از مناطق سه گانهٔ بهداشتی این شهرستان اخذ گردید. در تمام روستاهای انتخاب شده از افراد زیر ۱۲ سال به صورت توتال نمونه‌گیری به عمل آمد و در هر روستا ۱۰٪ حجم نمونه به افراد بالای ۱۲ سال اختصاص داده شد. در خود شهرستان گرمی نیز افراد زیر ۱۲ سال به اضافهٔ ۱۰٪ افراد بزرگسال به میزان ۱۵٪ کل حجم نمونه انتخاب و نمونه‌گیری شد.

در این بررسی تمامی نمونه‌ها در داخل لوله‌های میکروهماتوکریت هپارینه از نوک انگشت وسطی دست چپ افراد مورد مطالعه به میزان ۳ لولهٔ میکروهماتوکریت برای هر نفر تهیه گردید. در نوزادان و بچه‌های زیر یک سال از پاشنهٔ پا و یا انگشت شست پا یا دست نمونه‌گیری می‌شد.

نمونه‌ها همراه با پرسشنامه‌هایی که برای هر یک از افراد جداگانه تهیه می‌گردید در شرایط مطلوب به آزمایشگاه بیمارستان گرمی منتقل و توسط سانتریفوژ میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شد و پس از قرائت میزان هماتوکریت، پلاسمای آنها جداگردیده و فریز می شدند. سپس تمام نمونه های پلاسما در شرایط فریز به آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت انجام آزمایشات لازم حمل گردیده و به روشهای سرولوژی DAT، IFA و ELISA مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. همچنین در این بررسی به هنگام اخذ نمونه، در مورد داشتن سگ ودارا بودن علایم و نشانه های بالینی کالاآزار در آن(ریزش مو ، درازشدن ناخن ها، ضعف و لاغری) از افراد سؤال می‌شد که در صورت وجود سگ‌های علایم دار در هر روستا بعد از اتمام کار نمونه‌گیری از افراد، برای گرفتن نمونه خون از سگ‌های مزبور مراجعه کرده و در صورت مثبت بودن تست سرولوژی ، هماهنگی‌ها و برنامه‌ریزی‌های لازم برای کالبدگشایی سگ مورد نظر پس از توجیه و کسب اجازه از صاحب سگ به عمل می‌آمد.

تست آگلوتیناسیون مستقیم(DAT) : آنتی‌ژن تست DA در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک‌یاخته شناسی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بر اساس روش دکتر هریت تهیه گردید (Harith A. et al. ۱۹۸۹). در این روش آنتی‌ژن در مجاورت رقت‌های مختلف سرم یا پلاسمای فرد مشکوک قرار داده می‌شد که در صورت حضور آنتی‌بادی اختصاصی در سرم بیمار پس از گذشت ۱۸ ساعت آگلوتیناسیون صورت می‌گرفت. ابتدا به کمک محلول رقیق‌کننده و میکروپلیت‌های V شکل (ساخت شرکت DYNATECH) رقت‌های مورد نیاز از پلاسمای بیمار تهیه شد و پس از افزودن آنتی‌ژن در رقت های ۳۲۰۰ : ۱ و ۸۰۰ : ۱ میکروپلیت‌ها در داخل اطاقک مرطوب قرار داده شدند و در یک سطح افقی در حرارت آزمایشگاه تا روز بعد (حداقل ۱۸ ساعت) باقی ماندند. در تفسیر آزمایش چنانچه حفره‌ای که آنتی‌ژن ریخته شده بود انگل ها به صورت یک تکمهٔ کوچک آبی رنگ با حاشیه کاملاً مشخص و در وسط حفرهٔ میکروپلیت ته‌نشین شده بودند دال بر فقدان آگلوتیناسیون بوده ونتیجه آزمایش از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا منفی به حساب می‌آمد. اگر انگل ها 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 آنتی‌بادی لیشمانیا مثبت محسوب می‌گردید. بالاترین رقت از نمونه سرمی که آگلوتیناسیون در آن ایجاد شده به عنوان حداکثر عیار مثبت تست آگلوتیناسیون مستقیم در نظر گرفته شد. در این صورت برای تعیین عیار، نمونه‌ها مجدداً در رقت‌های بالاتری آزمایش شدند. با هر سری از نمونه‌های مورد آزمایش یک سرم یا پلاسمای مثبت به عنوان شاهد مثبت و یک سرم یا پلاسمای منفی به عنوان شاهد منفی به همان ترتیب آزمایش شدند. عیارهای ۳۲۰۰ : ۱ ≤ از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا مثبت و عیارهای ۱۶۰۰ : ۱ مشکوک و ۸۰۰ : ۱ > منفی تلقی شدند (Edrissian Gh.H . et al . ۱۹۹۳).

تست ایمونوفلئورسانس غیرمستقیم(IFAT): آنتی‌ژن فیگوره این تست در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به روش دکتر ادریسیان و همکاران تهیه گردید (Edrissian Gh.H . et al . ۱۹۷۷). ابتدا به کمک PBS (pH =۷/۲) رقت‌های لازم از نمونه‌های مورد آزمایش و کنترل مثبت و منفی تهیه شدند. لام های حاوی آنتی‌ژن کت شده از فریزر $-۷۰^{o}C$ خارج و پس از اینکه به حرارت آزمایشگاه رسیدند در مجاورت رقت‌های مختلف سرم یا پلاسما قرار می‌گرفتند و پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب و طی مراحل شستشو با PBS ، کونژوگهٔ (fluorescent-whole IgG anti–human) ساخت شرکت حاب تک، رقیق شده(۴۰ : ۱) وحاوی اوانس بلو اضافه و دوباره انکوباسیون و مراحل شستشو به طریق گفته شده انجام می گردید. سپس به کمک محلول گلیسیرین ـ تامپون مونته شده و در زیر میکروسکوپ فلئورسانس بررسی شدند (Voller A. and Oneill P. ۱۹۷۱). عیارهای ۱۶۰: ۱ ≤ از نظر تشخیص آنتی‌بادی لیشمانیا مثبت، عیارهای ۸۰ : ۱ مشکوک و عیارهای ۸۰ : ۱ > منفی تلقی شدند.

تست الایزا(ELISA) : در این بررسی ، آنتی‌ژن مصرفی پلیت‌های پوشانده شده با آنتی‌ژن فیگورهٔ فرم پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم بود (Khorshidian S. et al. ۱۹۹۴). ابتدا رقت مورد نیاز از نمونه ، کنترل مثبت و کنترل منفی به کمک PBS حاوی ۲۰ Tween تهیه و به یکی از حفره‌های میکروپلیت ته صاف ELISA (ساخت شرکت NUNC)به مقدار لازم اضافه می شد. در حفرهٔ بلانک فقط PBS-T ریخته می‌شد. پس از انکوباسیون ۵۵ دقیقه‌ای در دمای آزمایشگاه و اتاقک مرطوب مراحل شستشو انجام و سپس کونژوگه-Alkaline phosphatase conjugate anti human IgG (whole molecule) ساخت کارخانه سیگما، با رقت (۱۰۰۰ : ۱) برای هر حفره اضافه و دوباره مراحل انکوباسیون و شستشو انجام می شد. سپس سوبسترای PNP رقیق شده با بافر دی‌اتانول آمین به هر حفره اضافه و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در محل تاریک و اتاقک مرطوب، جهت جلوگیری از ادامه واکنش سود ۳ نرمال به هر یک از حفره ها اضافه شده و نتایج به کمک دستگاه ELISA-reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند (Desjuex P.۱۹۹۶).

تست Dipstick rk۳۹ : در این مطالعه تست های نواری Dipstick rk۳۹ ساخت شرکت (Cypress Diagnostic) بلژیک مورد استفاده گرفت. این تست در حقیقت یک آزمایش کیفی ایمونوکروماتوگرافی است که آنتی بادی های ضد لیشمانیوز احشایی را در سرم نشان می دهد. در این روش آنتی ژن rk۳۹ بر روی خط تست ، Chicken anti protein A بر روی خط کنترل و کونژوگهٔ رنگی در قسمت پایین کاغذ نیترو سلولز کت می شود. در اثر تماس یک قطره خون یا سرم با قسمت پایین کاغذ نیترو سلولز و اضافه نمودن ۳-۲ قطره بافر مخصوص (PBS+FCS) ، مخلوط سرم و کونژوگه رنگی بر اساس خاصیت کروماتوگرافی و مویینگی بر روی استریپ حرکت کرده وپس از ۴-۱ دقیقه در صورت

وجود آنتی بادی های ضد لیشمانیوز احشایی درسرم و واکنش آنها با آنتی ژن rk۳۹ خط قرمز رنگی در ناحیهٔ تست و به منظور کنترل صحت آزمایش خط قرمز رنگ دومی نیز در ناحیهٔ خط کنترل (بالای خط تست) ایجاد خواهد شد (Mohebali M. et al. ۲۰۰٤).

روش RAPD–PCR : استخراج DNA با حداقل تعداد 10^{6} عدد پروماستیگوت کشت داده شده در هر میلی لیتر محیط کشت اشنایدر به اضافهٔ ۱۰ درصد FCS به روش پروتئیناز K و فنل کلروفرم و با استفاده از متد Kelly (Kelly J.M.۱۹۹۳) انجام گردید. مقدار۲۰ نانوگرمDNA ایزولهٔ مورد بررسی در کنار DNA سوش های استاندارد لیشمانیا تروپیکا ، لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم با استفاده از پرایمرAB۱-O۷ و روش RAPD-PCR تعیین گونه گردید (Mauricio I . et al. ۲۰۰۱ ، حجاران ۱۳۸۳).

بررسی مخازن حیوانی(سگ) : سگ های دارای علایم ونشانه های بالینی کالاآزار (ریزش مو ، دراز شدن ناخن ها ، ضعف و لاغری) بعد از انجام تست DAT و Dipstick rk۳۹ در صورت مثبت بودن پس از توجیه و کسب اجازه از صاحبشان برای کالبدگشایی و جداسازی انگل انتخاب می‌شدند. این سگ ها ابتدا با داروی بیهوشی اسپرومازین(Acepromazine : ۰،۳ – ۰،۵ ml / ۱۰kg) بیهوش گشته وپس از انتقال به منطقهٔ بیابانی و دور از روستا کالبد گشایی می‌شدند. سپس بلافاصله با رعایت شرایط استریل و در کنار شعله از طحال و کبد سگ مزبور نمونه‌گیری کرده و به محیطهای کشت Schneider، NNN, RPMI ۱٦٤۰ و Sloppy Evans منتقل می گردید. همچنین از بافت طحال و کبد چندین لام به روش Impression smear جهت بررسی پارازیتولوژیک تهیه می‌شد. پس از انجام عملیات کالبدگشای و کشت ، اجساد سگ ها سوزانده می‌شد.

نتایج :

در این بررسی تعداد ۱۱۵۵ نمونهٔ خون از گروه های سنی مختلف تهیه گردید (جدول ۱) که پس از تعیین میزان هماتوکریت ، پلاسمای تمامی نمونه ها با روش DAT در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکدهٔ بهداشت و انستیتوتحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران به همراه سرم کنترل‌های مثبت و منفی آن مرکز مورد بررسی سرولوژیکی قرار گرفتند . موارد دارای آنتی بادی با تیتر ۸۰۰ : ۱ ≥ و موارد مشکوک در تست DA به همراه تعدادی از نمونه های منفی به جهت تأیید تشخیص با دو تست IFA و ELISA نیز آزمایش شدند. از کل افراد بررسی شده، ٦۰۰ نفر (٥۱/۸٤٪) مؤنث و ٥٥٥ نفر (٤۸/۱٦٪) مذکر بودند (جدول ۱). ۱۱۲۲ نفر (۹۷/۱٪) بدون سابقهٔ ابتلاء قبلی و ۳۳ نفر (۲/۹٪) با سابقهٔ قبلی ابتلا به کالاآزار بوده‌اند. همچنین ۱۱۱۲ نفر (۹٦/۲٪) بدون سابقهٔ ابتلا در افراد خانواده و ٤۳ نفر (۳/۸٪) دارای سابقهٔ ابتلا به کالاآزار در افراد خانواده بودند .

درتست DA کلاً ۳۲ نفر (۲/۸٪) دارای تیتر ۸۰۰ :۱ ≥ بودند (نمودار۱). که از این تعداد یک نفر (۳/۱٪) با تیتر ۱۰۲٤۰۰ : ۱ و یک نفر (۳/۱٪) با تیتر ٦٤۰۰ : ۱ ، ٥ نفر (۱٥/۷٪) با تیتر ۳۲۰۰ : ۱ و ۲٥ نفر (۷۸/۱٪) با تیتر ۸۰۰ : ۱ بوده‌اند. بنابراین از مجموع ۱۱٥٥ نمونهٔ اخذ شده ۷ مورد(۰/٦٪) با عیار۳۲۰۰ : ۱ و بالاتر بودند که در بین آنها ۲ نفر (۲۸/٦٪) دارای علایم بالینی کالاآزار (تب، کم‌خونی وبزرگی شکم) و در کل افراد با تیتر ۸۰۰ : ۱ ≥، ٤ نفر (۱۲/٥٪) علایم فوق را داشتند.

از کل افراد با سابقهٔ قبلی کالاآزار ۷ نفر (۲۱/۲٪) دارای تیتر آنتی‌بادی ۸۰۰ : ۱ ≥ و از کل افراد بدون سابقهٔ قبلی کالاآزار ۲٥ نفر (۲/۳٪) دارای تیتر آنتی‌بادی ۸۰۰ : ۱ ≥ در تست DA بوده‌اند. همچنین از کل افراد دارای سابقهٔ بیماری در افراد خانواده ۳ نفر (۷٪) و از کل افراد بدون سابقهٔ بیماری در افراد خانواده ۲۹ نفر (۲/٦٪) دارای تیتر آنتی‌بادی ۸۰۰ : ۱ ≥ در تست DA بوده‌اند.

از نظر سنی تمامی موارد کالاآزار در کودکان زیر ۹ سال بوده است. ۸۵/۷٪ موارد فوق در کودکان زیر ٤ سال و ۷۱/٤٪ موارد بیماری در کودکان زیر ۲ سال دیده شد. لازم به ذکر است که بر اساس محاسبات انجام شده ، GMRT (Geometric Meand of Reciprocal Titers) برای تست DA در این بررسی ۱۲۳۰ به دست آمد. بالاترین GMRT مربوط به گروه سنی زیر یک سال و برابر با ٤٤٦۷ می باشد(جدول ۱).

در این بررسی میانگین هماتوکریت افراد سالم در جنس مذکر ۵۱/٦٪ و در جنس مؤنث ٤٦/٤٪ ولی میانگین هماتوکریت افراد مبتلا به کالاآزار در جنس مذکر ٤۲/۵٪ و در جنس مؤنث ۳۸/۸٪ محاسبه گردید.

مقایسهٔ نتایج به دست آمده از دو تست DA و IFA نشان می دهد که این دو تست تقریباً با هم همخوانی دارند. به طوریکه ۹٦درصد موارد منفی در تست DA با تست IFA نیز منفی و ۷۱/٤ درصد موارد مثبت در تست DA با تست IFA نیز مثبت گردیدند. همچنین مقایسهٔ نتایج به دست آمده از دو تست DA و ELISA نشان می دهد که این دو تست نیز تقریباً با هم همخوانی دارند. به طوری که ۹۲٪ موارد منفی در تست DA با تست الایزا نیز منفی و ۸۵/۷٪ موارد مثبت در تست DA با تست الایزا نیز مثبت شدند.

مخازن حیوانی (سگ) : در این مطالعه از بین ۱۱۵۵ فرد مورد بررسی ۸٤۰ نفر (۷۳٪) دارای سگ و ۳۱۵ نفر (۲۷٪) فاقد سگ بودند. از بین حدود ۲۲ قلاده(۲/٦٪) سگ صاحبدار و دارای علایم و نشانه های بالینی کالاآزار(ریزش مو ، دراز شدن ناخنها ، ضعف و لاغری) گزارش شده توسط مردم از منطقه که با تست rk۳۹ Dipstick و DAT مورد آزمایش قرار گرفتند، سه قلاده سگ با تست Dipstick rk۳۹ مثبت گردید که از این سه مورد نیز دو مورد با تیتر ۲۰٤۸۰ : ۱ و یک مورد با تیتر ۱۲۸۰ : ۱ درتست DA بودند. بنابراین با توجیه و کسب اجازه از صاحبان سگ ها اقدامات لازم برای کالبدگشایی این سه قلاده سگ به عمل آمد. پس از کالبدگشایی،آزمایش پارازیتولوژی یکی از سگ ها مثبت بود. کشت و جداسازی همین ایزوله نیز موفقیت آمیز بوده که با استفاده از روش RAPD-PCR گونهٔ انگل *L.infantum* تعیین شد.

بحث :

این بررسی با هدف تعیین وضعیت لیشمانیوز احشایی در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳ به انجام رسید. در این مطالعه موارد عفونت ناشی از فرم احشایی لیشمانیا درکودکان زیر ٤ سال بیشتر بود($p<$ ۰/۰۵). در گروه سنی بیش از ۱۲ سال درصد افراد با تیتر آنتی بادی ۸۰۰ : ۱ ≤ نسبت به گروه های سنی دیگر کاهش داشته است که شاید به دلیل ابتلای قبلی، درمان و یا موارد تحت کلینیکی باشد، زیرا آنتی‌بادی‌های علیه لیشمانیا که توسط تست DA شناسایی می‌شوند مدت ۳ تا ٤ سال و حتی بیشتر در خون باقی می‌مانند. بنابراین کاهش تیتر آنتی‌بادی در افرادی که در سنین پایین مبتلا شده‌اند در سن ۹ سالگی و بالاتر مشاهده خواهد شد (خادم عرفان ۱۳۷۷). نتایج حاصل از این بررسی با مطالعات انجام شده در مناطق اندمیک سایر مناطق ایران تا حدود زیادی همخوانی دارد. مطالعه‌ای که توسط دکتر ادریسیان و همکاران در مشکین‌شهر از استان اردبیل انجام شده نشانگر این است که در حدود ۹۷٪ موارد کالاآزار در کودکان زیر ۹ سال و در بیش از ۵۰ ٪ موارد در کودکان زیر ٤ سال دیده می‌شود (Edrissian Gh.H. et al. ۱۹۸۸).

در مطالعهٔ حاضر در شهرستان گرمی، تمامی موارد کالاآزار در کودکان زیر ۹ سال بوده است. ۸۵/۷٪ موارد فوق در کودکان زیر ٤ سال و ۷۱/٤٪ موارد بیماری در کودکان زیر ۲ سال دیده شد. در بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک انجام شده در کانونهای آذربایجان شرقی و فارس درصد موارد مثبت سرولوژی در جنس مؤنث بیشتر از جنس مذکر بوده است ولی از ٤۹۳ مورد کالاآزار تشخیص داده شده در کانونهای آندمیک

مشکین‌شهر و گرمی طی سالهای ۶۸-۱۳۵۹، ۵۷/۲٪ جنس مذکر و ۴۲/۸٪ جنس مؤنث بوده‌اند (ادریسیان۱۳۷۵، میرصمدی وهمکاران ۱۳۸۲).

در این مطالعه با استفاده از نرم افزار ۹ SPSS اختلاف معنی داری بین جنس مذکر(۲/۷ ٪) و مؤنث (۲/۸٪) در ابتلای به لیشمانیوز احشایی مشاهده نشد ($p = ۰/۸$) و از بین موارد دارای آنتی بادی ضد لیشمانیا با تیتر ۸۰۰ : ۱ ≤ ، ۵۳/۲٪ مؤنث و ۴۶/۸٪ مذکر و با تیتر ۳۲۰۰ : ۱ ≤ ، ۷۱/ ۴٪ مؤنث و ۲۸/۶٪ مذکر بودند. علی‌رغم شیوع بالاتر موارد ابتلا به کالاآزار در جنس مذکر، شیوع سرواپیدمیولوژیک عفونت بدون علایم کلینیکی در جنس مؤنث بالاتر بوده و شاید بتوان گفت که این به علت شیوع موارد ساب کلینیکال در جنس مؤنث باشد (ادریسیان ۱۳۷۵; عرشی و همکاران۱۳۸۱).

در مطالعه‌ای که در هندوستان انجام گرفته است ، Sharma و همکارانش نیز اظهار داشته‌اند که بروز کالاآزار در سنین قبل از بلوغ اختلاف معنی‌داری در دو جنس نداشته ولی بعد از بلوغ بروز بیماری در افراد مذکر بیشتر بوده است و محقین مذکور علت این اختلاف را به نقش حفاظتی هورمونهای جنسی زنانه از ابتلا به بیماری منسوب نموده‌اند (Sharma M.C. et al. ۱۹۹۰).

از نظر علایم بالینی تب، آنمی و بزرگی شکم شایع‌ترین علایم بالینی در بیماران مبتلا به کالاآزار در این منطقه می‌باشد. مقایسهٔ میانگین هماتوکریت افراد سالم با میانگین هماتوکریت افراد مبتلا به کالاآزار در این بررسی نشان دهنده وجود کم‌خونی در افراد مبتلا به کالاآزار می‌باشد. همچنین بر خلاف وجود گزارش هایی مبنی بر وجود علایم بالینی غیر متعارفی مثل علایم تنفسی در بیماران کالاآزاری این منطقه، در این مطالعه موردی از این گونه علایم در مبتلایان به کالاآزار مشاهده نشد.

این بررسی با مطالعهٔ دکتر سلیمان زاده (Soleimanzadeh G. et al ۱۹۹۳)، دکتر ادریسیان (Edrissian Gh.H. et al. ۱۹۸۸) دکتر محبعلی (Mohebali M. et al. ۲۰۰۱) و دکتر محمدی خیرآبادی (محمدی خیرآبادی و همکاران ۱۳۸۲) از نظر شایع‌ترین علایم بالینی که شامل تب، آنمی و بزرگی شکم می باشد نیز مطابقت دارد.

دراین مطالعه برای اولین بار سگ های این منطقه نیز مورد بررسی قرار گرفتند . با توجه به این که عامل بیماری از سگ ها جدا گردید و با روش مولکولی RAPD-PCR گونهٔ انگل *L.infantum* تعیین شد (تصویر۱) که احتمالاً با گونهٔ غالب منطقه نیز همخوانی دارد (Mohebali M. et al. ۲۰۰۵).

نتیجه گیری :

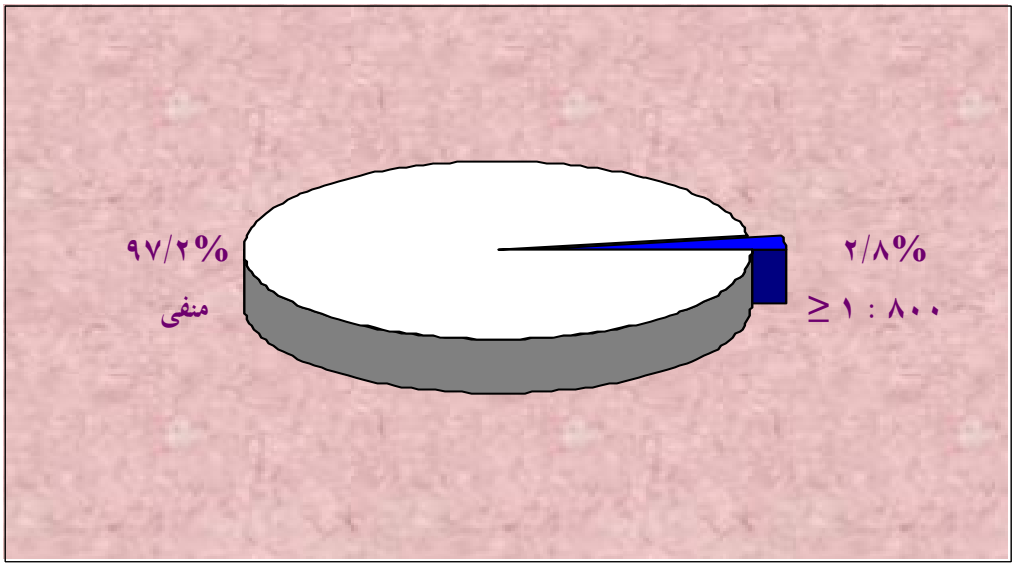
بنابراین می توان نتیجه گرفت که بیماری کالاآزار یکی از مشکلات بهداشتی شهرستان گرمی می باشد. این بررسی ضرورت انجام مطالعات تکمیلی و توسعهٔ امکانات بهداشتی ، درمانی و تشخیصی را در منطقه بیان می‌کند.

تشکر و قدردانی :

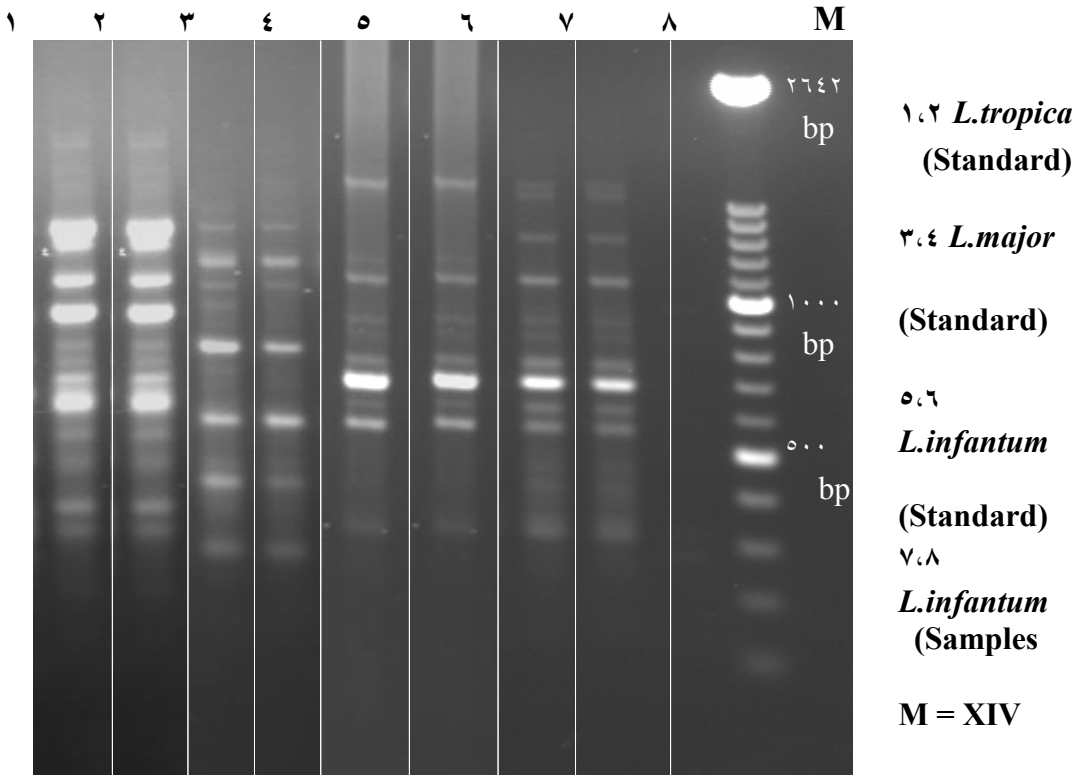
این مطالعه با همکاری مالی انستیتو تحقیقات بهداشتی (طرح شمارهٔ ط – ۵۴/۶ / ۸۲ / ۲۴۱) در شهرستان گرمی و با پشتیبانی ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر انجام گرفته است. بر خود لازم می‌دانیم که از راهنمایی های ارزشمند استاد محترم جناب آقای دکتر ادریسیان تشکر و قدردانی نماییم. همچنین از زحمات آقایان دکتر حسینقلی زاده مدیریت محترم شبکهٔ بهداشت و درمان شهرستان گرمی، دکتر پورزارع مسؤول محترم مرکز مبارزه با بیماریهای شهرستان گرمی، دکتر علوی ریاست محترم بیمارستان گرمی، خانم ها مهاجری و گروسی در آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران و سایر عزیزانی که ما را در اجرای این طرح یاری کردند تشکر و قدردانی می گردد.

جدول ۱- نتایج آزمایش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) برحسب سن وجنس در افراد تحت مطالعه در شهرستان گرمی از استان اردبیل در سال ۱۳۸۳

گروه های سنی	تعداد نمونه			موارد سرم مثبت (عیار ۸۰۰ : ۱ و بیشتر)			موارد سرم و مثبت (عیار ۳۲۰۰: ۱ و بیشتر)			GMRT
	مونث تعداد (درصد)	مذکر تعداد (درصد)	جمع (درصد)	مونث تعداد (درصد)	مذکر تعداد (درصد)	جمع (درصد)	مونث تعداد (درصد)	مذکر تعداد (درصد)	جمع (درصد)	
زیر یک سال	۲۸ (۴/۷)	۱۷ (۳)	۴۵ (۳/۹)	۲ (۷/۱۴)	۰ (۰)	۲ (۴/۴)	۲ (۷/۱۴)	۰ (۰)	۲ (۴/۴)	۴۴۶۷
۲- ۱ سال	۴۷ (۷/۸)	۵۱ (۹/۲)	۹۸ (۸/۵۳)	۴ (۸/۵۱)	۱ (۱/۹۶)	۵ (۵/۱)	۲ (۴/۲۵)	۱ (۱/۹۶)	۳ (۳)	۳۷۱۶
۴-۳ سال	۶۴ (۱۰/۷)	۷۱ (۱۲/۸)	۱۳۵ (۱۱/۷۵)	۳ (۴)۶۸)	۳ (۴/۲)	۶ (۴/۴)	۱ (۱/۵۶)	۰ (۰)	۱ (۰/۷)	۱۰۰۰
۸- ۵ سال	۲۱۰ (۳۵)	۲۰۴ (۳۶/۸)	۴۱۴ (۳۵/۸)	۶ (۲/۸۵)	۵ (۲/۴۵)	۱۱ (۲/۶۵)	۰ (۰)	۱ (۰/۴۹)	۱ (۰/۲۴)	۹۱۲
۱۲- ۹ سال	۱۶۶ (۲۷/۶)	۱۵۷ (۲۸/۳)	۳۲۳ (۲۷/۹)	۲ (۱/۲)	۵ (۳/۱۸)	۷ (۲/۲)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۷۹۵
بیشتر از ۱۲ سال	۸۵ (۱۴/۲)	۵۵ (۹/۹)	۱۴۰ (۱۲/۱۲)	۰ (۰)	۱ (۱/۸۱)	۱ (۰/۷۲)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۷۹۵
جمع کل	۶۰۰ (۵۱/۸۴)	۵۵۵ (۴۸/۱۶)	۱۱۵۵ (۱۰۰)	۱۷ (۲/۸)	۱۵ (۲/۷)	۳۲ (۲/۸)	۵ (۰/۸۳)	۲ (۰/۳۶)	۷ (۰/۶)	۱۲۳۰



نمودار ۱ - توزیع فراوانی تیتر آنتی بادی ضد لیشمانیا با تست DA و عیار ۸۰۰ : ۱ ≥ در افراد تحت بررسی سرولوژی کالاآزار در شهرستان گرمی از استان اردبیل سال ۱۳۸۳



تصویر ۱ : نتایج روش مولکولی RAPD-PCR با پرایمر AB۱-O۷ و ایزولهٔ مربوط به سگ منطقهٔ گرمی استان اردبیل سال ۱۳۸۳

منابع:

ادریسیان، غلامحسین (۱۳۷۵). لیشمانیوز احشایی در ایران و نقش تست‌های سرولوژی درتشخیص و بررسی اپیدمیولوژی آن، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره سوم، شماره ۲، ص ۱۰۸-۹۷.

ادریسیان، غلامحسین. سلیمانزاده ، قشم. حفیظی، عباس. افشار ، عباس . عطائیان ، علی . سرکیسیان ، مارینا‌تر . کنعانی ، اصغر . موحد دانش، عبدالمجید . قربانی ، مهدی(۱۳٦۹). کالاآزار و بررسی سرواپیدمیولوژی آن به روش ایمنوفلوئورسانس در شهرستان مشکین شهر ، استان آذربایجان شرقی ، مجلهٔ علمی سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران ، دورهٔ دهم ، شمارهٔ ۲ ، ص ۸۵-۷۱.

پویا، یحیی (۱۳۲۸). مطالعهٔ لیشمانیوز احشائی در استانهای ۱ و ۲، نامهٔ ماهانهٔ دانشکده پزشکی تهران، سال هفتم، شمارهٔ ۷، ص ٦۱-۳۵۹.

حجاران، هما (۱۳۸۳) جداسازی انگلهای لیشمانیا از انسان و مخازن حیوانی مناطق اندمیک لیشمانیوز شمال غرب و شمال شرق ایران به منظور تعیین گونه و بررسی پلی مرفیسم ژنتیکی آنها با روش مولکولی RAPD-PCR، پایان‌نامه جهت اخذ درجهٔ دکترای تخصصی (Ph.D) انگل شناسی پزشکی از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران.

خـــــادم عـــــرفـــــان، مـــــحمدباقر(١٣٧٧). بررسی سرواپیدمیولوژی لیشمانیوز احشایی در شهرستان کلیبر، استان آذربایجان شرقی با روش DAT ، پایان‌نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره پاپان‌نامه ٢٦٢٥.

سازمان برنامه و بودجهٔ استان اردبیل. آمارنامهٔ استان اردبیل(١٣٨٠).

سازمان بهداشت جهانی (١٣٧٨). روش های اجرایی کنترل لیشمانیوز احشایی، ترجمهٔ دکتر ستاره ممیشی، انتشارات وزارت بهداشت و درمان .

عرشی ، شهنام . محبعلی ، مهدی . آخوندی، بهناز. صادقی بازرگانی، همایون. سپهرام، وحید. زارعی، ذبیح الله. حاجی خانی، سارا. سزاوار، هاشم (١٣٨١). معرفی یک کانون آندمیک جدید کـــــالاآزار در اســـــتان ادربیـــــل و بـــــررسی سرواپیدمیولوژیک عفونت لیشمانیایی احشائی در این منطقه، مجلهٔ دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، سال اول، شمارهٔ دوم ، ص ١٨-٩.

محمدی خیرآبادی، کریم . محبعلی ، مهدی. ممیشی، ستاره. عرشی، شهنام (١٣٨٢). خصوصیات اپیدمیولوژیک کالاآزار در بیماران بستری در بیمارستان های استان اردبیل، مجلهٔ دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، سال دوم، شمارهٔ دوم ، ص ٢٤-١١.

میرصمدی، نسرین. محبعلی، مهدی. عطاری، محمـــــدرضا. ادریـــــسیان، غلامحسین (١٣٨٢). ســـــرولوژی لیـــــشمانیوز احشایی (کالاآزار) در آذرشهر، آذربایجان شرقی، مجلهٔ حکیم ، دوره ششم ، شماره اول ، ص ٢٢-١٧.

Alborzi A. and Ardehali S. (١٩٩٨) Visceral Leishmaniasis the Iranian experience. *Arch Irn Med*. ١(١): ٢٢-٦.

Desjeux P. (١٩٩٦) Manual on visceral Leishmaniasis control. *WHO*. **٤٠:** ١-٧٩.

Edrissian Gh.H., Nadim A., Edrissian Gh.H., Akhavan E. and Samar G., (١٩٧٧) Immunofluorescence as a method of choice in diagnosis of visceral leishmaniasis, *J Irn Med Council*. **٣:** ١٨٥-١٩٠ [In Persian]

Edrissian Gh. H., Ahanchin A.R., Gharachahi A., Ghorbani M., Nadim A. and Ardehali S. (١٩٩٣)Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars province, southern Iran. *Irn J Med Sci.* **١٨:** ٩٩-١٠٥.

Edrissian Gh.H., Hafizi A., Afshar A., Soleiman-Zadeh G., Movahhed-Danesh A.M. and Garoussi A., (١٩٨٨) An endemic focus of visceral Leishmaniasis in Meshkinshahr East Azarbaijan Province North West part of Iran, *Bull Soc Path EX*. **٨١:** ٢٣٨-٤٨.

Harith A., Slappendel RJ., ReiterI., Van Knapen F., De Korte P., Huigen E. and Kolk A.H. (١٩٨٩) Application of a direct-agglutination test for detection of specific anti - leishmania antibodies in the canine reservoir, *J Clin Microbiol*. **٢٧:** ٢٢٥٢-٥٧.

Kelly J.M.(١٩٩٣) Isolation of RNA and DNA from *Leishmania*, In:Methods in molecular biology, *Humana press,New Jersy .USA*. ١٢٣-١٣١.Khorshidian S., Hajjaran H., Sarkissian M.T. and Edrissian Gh.H. (١٩٩٤) Evaluation of ELISA, using intact promastigotes as antigen, for the

diagnosis of visceral Leishmaniasis, *Irn J Med Sci.* **۱۹:** ۱۵-۸.

Mauricio I.L., Gaunt M.W., Stothard J.R. and Miles M.A. (۲۰۰۱) Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp۶۳ interjenic region, *Parasitology.* **۱۲۲:** ۳۹۳-۴۰۳.

Mohebali M., Hajjaran H., Hamzavi Y., mobedi I., Arshi S., Zarei Z., Akhoundi B., Manouchehri-Naeini K., Avizeh R. and Fakhar M. (۲۰۰۵) Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran, *Vet Parasitol.* **۱۲۹**(۳-۴): ۲۴۳-۵۱.

Mohebali M., Hamzavi Y., Edrissian Gh.H. and Forouzani A. (۲۰۰۱) Seroepidemiological study of visceral leishmaniasis among humans and animal reservoirs in Bushehr province, Islamic Republic of Iran, *East Mediterr Health J.* **۷**(۶): ۹۱۲-۷.

Mohebali M., Taran M. and Zarei Z. (۲۰۰۴) Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk۳۹ test and direct agglutination, *Vet Parasitol,* **۲۶**:۱۲۱(۳-۴): ۲۳۹-۴۵.

Nadim A., Navid-Hamidi A., Javadian E., Bidruni G.T. and Amini H. (۱۹۷۸) Present status of kala-azar in Iran, *Am J Trop Med Hygi.* **۲۷:** ۲۵-۸.

Pearson R.K. (۱۹۹۰) *Leishmania* Species, Visceral Kala-azar, **In:** Mandell GL, Doug Las RG, Bennet JE(Eds), Principles and practice of infectious diseases, *۳rd ed, New york, Churchill Livingstone.* ۲۰۶۸-۷۱.

Sharma M.C., Gupta A.K., Saran R. and Sinha S.P. (۱۹۹۰) The effect of age and sex on incidence of kala-azar, *J Commun Dis.* **۲۲**(۴): ۲۷۷-۸.

Soleiman-Zadeh G., Edrissian Gh. H., Movahhed-Danesh AM. and Nadim A. (۱۹۹۳) Epidemiological aspects of Kala-azar in Meshkinshahr, Iran : Human Infection, *Bull world Health Organ.* ۷۱(۶): ۷۵۹-۶۲.

Voller A. and Oneill P. (۱۹۷۱) Immuno-fluorescence method suitable for larg-scale application to malaria, *Bull World Health Organ.* ۴۵(۴):۵۲۴-۹.