

An Overview of the Laboratory Diagnostic Procedures of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar)

Fakhar, M. (PhD)

Assistant Professor of Parasitology,
Department of Parasitology and
Mycology, Molecular and Cellular
Biology Research Center, Mazandaran
University of Medical Sciences, Sari,
Iran

Ahmad Pour, E. (MSc)

PhD Student of Parasitology, Department
of Parasitology and Mycology,
Mazandaran University of Medical
Sciences, Sari, Iran

Corresponding Author: Fakhar M
Email: Mahdif53@yahoo.com

Received: 15 Aug 2012

Revised: 19 Nov 2012

Accepted: 26 Nov 2012

Abstract

Visceral leishmaniasis (Kala-azar) is a systemic infection disease that can be diagnosed by some invasive procedures such as splenic, liver biopsy or bone marrow aspiration, which are determined as the gold standards for diagnosing of this disease. At present, a variety of noninvasive tests having different specificities and sensitivities are available for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Direct agglutination test (DAT) can be an appropriate and applicable method provided that proper antigens are prepared. The rapid rK39 strip test (for detection of antigen) can be used for diagnosis of visceral leishmaniasis (VL), which is suitable for acute forms of disease in the field. Other tests, such as rapid KATEX strip test (for detection of antigen) and polymerase chain reaction (PCR), which are recently recommended for diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis, are the simple, inexpensive and easily available under field conditions. This review article focuses on different, novel and current procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis.

Key words: Laboratory diagnosis, visceral leishmaniasis, Kala-azar, rK39, Katex, PCR

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

مروری بر روش های تشخیص ارمايشگاهی لیستمانیوز احشایی (کالاآزار)

مهدی فخار

استادیار انگل شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

احسان احمدپور

دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

نویسنده مسئول: مهدی فخار

تلفن: ۰۹۱۲۲۵۲۲۷۸۲

پست الکترونیک: mahdif53@yahoo.com

آدرس: ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزر

آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)

دانشکده پزشکی، صندوق پستی: ۱۶۶۵-

۴۸۱۷۵

چکیده

لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) نوعی بیماری عفونی سیستمیک است که روش های تهاجمی بیوپسی طحال، کبد و یا اسپیراسیون مغز استخوان بعنوان روش استاندارد طلایی برای تشخیص آن تعیین شده اند. در حال حاضر روشهای تشخیصی غیر تهاجمی مختلفی با ویژگی و حساسیت های متفاوت برای تشخیص کالاآزار وجود دارد. در این میان روش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) به شرط تهیه آنتی ژن مطلوب، روش مناسبی بوده و به آسانی و در شرایط فیلد انجام پذیر می باشد. همچنین تست نواری و سریع rk39 (به منظور شناسایی آنتی بادی) که برای تشخیص اشکال حاد بیماری کالاآزار کاربرد دارد، در شرایط میدانی قابل انجام است. از روشهای دیگری که اخیراً برای تشخیص و برآورد پیش آگهی بیماری لیشمانیوز احشایی طراحی شده اند می توان به تست نواری KATEX (به منظور شناسایی آنتی ژن) و روش های ملکولی ساده، ارزان و قابل دسترس در فیلد اشاره نمود. در این مقاله مروری به انواع روش های تشخیصی رایج و نوین لیشمانیوز احشایی اشاره شده است.

واژه های کلیدی: تشخیص آزمایشگاهی، لیشمانیوز احشایی، کالاآزار، rk39، KATEX، PCR

وصول مقاله: ۹۱/۵/۲۵

اصلاح نهایی: ۹۱/۸/۲۹

پذیرش مقاله: ۹۱/۹/۶

آدرس مقاله:

فخار م، احمدپور ا "مروری بر روش های تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی (کالاآزار)". مجله علوم آزمایشگاهی بهار

۱۳۹۲، دوره هفتم (شماره ۱): ۴۵-۵۴

مقدمه

لیشمانیوز یکی از بیماری های عفونی مهم انگلی است که توسط تک یاخته جنس لیشمانیا ایجاد می شود و به سه شکل عمده جلدی، جلدی- مخاطی و احشایی در انسان دیده می شود. نوع احشایی بیماری یا کالاآزار در بیشتر مناطق ایران به صورت تک گیر و در مناطق مشکین شهر، دشت مغان، کلیر، براجان، خورموج، فیروزآباد، جهرم، نورآباد، داراب و قم به صورت بومی دیده می شود (۱-۶). عامل اصلی بیماری کالاآزار در منطقه وسیع حوزه مدیترانه از جمله ایران، لیشمانیا اینفانتوم (*Leishmania infantum*) می باشد. کالاآزار در ایران اغلب در کودکان زیر ۱۲ سال و بیشتر در عشایر و روستاییان گزارش می شود (۷و۲و۱). لیشمانیوز احشایی ممکن است از عفونت فاقد علامت تا بیماری با بروز علائم متغیر باشد به طوری که در برخی از مناطق عفونت بدون علائم بسیار شایع تر از بیماری بالینی است. علائم اصلی بیماری شامل تب، اسپلنومگالی و کم خونی بوده و یافته های آزمایشگاهی غیر طبیعی مانند پان سایتونی، هیپرگاماگلوبینمی و هیپوآلبومینمی نیز ممکن است در بیماران مشاهده شود (۷و۱). مخازن این بیماری در ایران شامل سگ و سگ سانان (روباه، شغال و گرگ) بوده و ناقلین آن گونه های مختلف پشه خاکی جنس فلوتوموس می باشد که گونه غالب ناقل در ایران فلوتوموس ماژور است (۲و۶و۷). در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع بیماری در انسان، ممکن است تا ۹۸٪ باعث مرگ و میر بیماران بویژه در کودکان گردد. بنابراین تشخیص دقیق و به موقع بیماری و در نهایت درمان بیماران از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۲و۵و۶). همچنین با توجه به شیوع بیماری ایدز در جوامع بشری و از جمله ایران و گزارش های متعدد عفونت توام ایدز و لیشمانیوز احشایی از دنیا به خصوص جنوب اروپا، به نظر می رسد استفاده از روش های تشخیص سریع، آسان و غیر تهاجمی از جایگاه خاصی برخوردار بوده و آشنایی با آنها امری ضروری است (۸-۱۰).

انواع روش های تشخیصی و تعیین هویت عوامل ایجاد کننده بیماری کالاآزار در این مقاله مرور شده است که

شامل روش های پارازیتولوژی، ایمونولوژی، سرولوژی، ملکولی، بیوشیمیایی و سایر روش ها می باشند.

روش های پارازیتولوژی:

الف- روش تهیه گسترش مستقیم (Direct Smear): در این روش از نمونه های آسپیراسیون مغز استخوان، طحال و کبد گسترش های تماسی یا (Impression smear) تهیه می شود و پس از تثبیت با متانول توسط رنگ های گیمسا و رایت، رنگ آمیزی می گردد. حساسیت روش تهیه اسمیر از مغز استخوان ۶۰ تا ۸۵٪ و طحال بیش از ۹۵٪ می باشد (۱۰-۱۲). البته با وجود حساسیت بالای آسپیراسیون طحال، به علت اسپلنومگالی ناشی از بیماری و در نتیجه احتمال پارگی طحال و ایجاد خونریزی شدید، در حال حاضر از این روش استفاده نمی شود. نمونه های بیوپسی کبد و طحال را می توان با رنگ های روتین بافت شناسی مانند هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی نمود. در روش مستقیم، آماستیگوت های انگل لیشمانیا را می توان در داخل ماکروفازها یا خارج از آنها مشاهده نمود که دارای یک هسته و یک کینتوپلاست مشخص می باشند.

ب- روش کشت (Culture Method): برای کشت انگل لیشمانیا، مقداری از نمونه حاصل از آسپیراسیون را که قبلاً در گسترش مستقیم توضیح داده شد، می توان وارد محیط های کشت نمود. محیط های کشت مورد استفاده معمول شامل M199, Schneider's, Evans, RPMI1640، Grace's، N.N.N و غیره می باشند. دمای مناسب جهت نگهداری انگل لیشمانیا در محیط کشت، ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتیگراد می باشد. بعضی از محیط های کشت فوق الذکر از جمله M199, RPMI, Schneider's و Grace's تک فازی بوده و بیشتر به منظور کشت انبوه انگل از آنها استفاده می شود و برخی دیگر مانند NNN و Evans جزو محیط های کشت دو فازی بوده و برای جداسازی اولیه و حمل انگل از نقطه ای به نقطه دیگر مورد استفاده قرار می گیرد (۱۰). همچنین Allahverdiyev و همکارانش روش کشت میکروکالچر را در کشور ترکیه با استفاده از لوله های

دالتون و ۱۲۳ کیلو دالتون را در ادرار بیماران کالآزاری گزارش نموده است که حساسیت و ویژگی بخش ۷۵-۷۲ کیلو دالتونی به ترتیب ۹۶٪ و ۱۰۰٪ بود. از طرف دیگر با توجه به اینکه این آنتی ژن ها، در مدت سه هفته پس از درمان بیمار، از ادرار حذف می شوند، لذا آزمون بسیار مناسبی برای ارزیابی روند درمان در بیماران می باشد (۱۴). یک آزمون بر مبنای آگلوتیناسیون لانتکس برای شناسایی آنتی ژن لیشمانیایی در ادرار بیماران کالآزاری با حساسیت بین ۶۸ تا ۱۰۰٪ و ویژگی ۱۰۰٪ معرفی شده است. در این روش آنتی ژن ۱۵-۵ کیلو دالتونی موجود در ادرار بیماران کالآزاری با استفاده از روش Capture-ELISA و کاربرد آنتی بادی مونوکلونال علیه این آنتی ژن، ردیابی می گردد (۱۵).

ب- شناسایی آنتی بادی (Antibody detection): روش های غیر اختصاصی تشخیص کالآزار بر اساس شناسایی آنتی بادی موجود در سرم، چندین دهه مورد استفاده قرار گرفته که Napier's formol gel یا Aldehyde test و Chopra antimony نمونه هایی از این روش ها می باشد. پایین بودن ویژگی و حساسیت این آزمایش ها آنها را تا حد زیادی غیر قابل اعتماد می کند، البته چندین روش شناسایی آنتی بادی با ویژگی و حساسیت بالا نیز وجود دارد (۱۶). در فرد بیمار با فعال شدن لئوسیت های B، سطوح بالایی از آنتی بادی های IgG و IgM علیه هاپتن و پروتئین های غیراختصاصی مختلف تولید می گردد که وجود سطوح بالای آنتی بادی علیه آنتی ژن های انگل، تشخیص کالآزار را آسان می کند. روش های سرولوژیکی متنوعی برای تشخیص آنتی بادی های سرمی وجود دارد که بر اساس اختصاصی بودن واکنش آنتی بادی علیه آنتی ژن و یا اپی توپ طراحی شده اند. حساسیت این آزمایش ها به روش آزمایش و ویژگی آن فقط به آنتی ژن بستگی دارد، از این روش های تشخیصی می توان به: ژل دیفیوژن، ثبوت مکمل، هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA)، ایمونوفلورسنت آنتی بادی (IFA) و کانتر کارنت ایمونوالکتروفورز (CCIE) اشاره نمود که به جز آزمایش IFA بقیه آزمایش ها به

میکروهماتوکریت حاوی محیط کشت، در نمونه های اخذ شده از مغز استخوان و خون محیطی، مورد بررسی قرار داده و حساسیت این روش را ۷۷/۸-۱۰۰٪ گزارش نمودند (۱۳).

ج - روش تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی: این روش به طور معمول به عنوان یک روش تشخیصی نبوده و بیشتر در کارهای تحقیقاتی از آن بهره می برند، زیرا رشد و تکثیر انگل در بدن حیوان ممکن است چندین هفته یا ماه طول بکشد، اما به هر حال از حیواناتی نظیر هامستر، موش و خوکچه هندی برای این منظور می توان استفاده نمود. هامستر طلایی بهترین حیوان آزمایشگاهی برای حفظ و نگهداری انگل های کمپلکس لیشمانیا دنووانی (L.infantum, L.donovani, L.chagasi) می باشد. برای انجام این روش نمونه های مشکوک آلوده به انگل (مانند مغز استخوان بیمار و یا نمونه های آسپیراسیون از کبد) تحت شرایط استریل و از طریق داخل صفاقی یا داخل قلبی به حیوان حساس تزریق می گردند. لازم به ذکر است که هر دو فرم آماستیگوت و پروماستیگوت انگل برای حیوان حساس آزمایشگاهی، آلوده کننده می باشد، به همین سبب از محیط های کشت حاوی انگل (پروماستیگوت) نیز می توان به حیوان حساس تزریق کرده و عفونت زائی بیماریزایی انگل را مورد بررسی قرار داد. در این روش به طور معمول یک ماه پس از تلقیح، علائم بیماری از جمله ضعف، لاغری، گوشه گیری و ژولیده شدن موهای حیوان ظاهر می گردد که پس از آن می توان حیوان آلوده را با روش اخلاقی کشته و از اندام های مختلف، انگل را جداسازی نمود (۱۲،۱۰).

روش های تشخیص ایمونولوژی (Immunodiagnosis):

الف- شناسایی آنتی ژن (Antigen detection): این روش از روش های شناسایی آنتی بادی اختصاصی تر بوده و از دلایل برتری آن می توان به عدم وجود واکنش متقاطع، پیگیری بیماران پس از درمان و استفاده از آن در تشخیص بیماری در افراد با نقص ایمنی مانند بیماران ایدز که دچار نقص در تولید آنتی بادی هستند، اشاره نمود.

De Colmenares دو بخش پلی پتیدی شامل ۷۵-۷۲ کیلو

ندرت برای تشخیص روزمره بیماری کالآزار استفاده می شوند (۲۰-۱۶). در سال ۱۹۸۸ آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) اصلاح شده ای برای تشخیص کالآزار در چندین کشور بومی مورد استفاده قرار گرفت. جهت انجام این آزمایش پروماستیگوت های انگل با تریپسین مخلوط و سپس در فرمالین تثبیت شده و با رنگ آبی کوماسی رنگ آمیزی و در پایان سرم بیمار در مجاورت آنتی ژن قرار گرفته و روز بعد، در صورت وجود بیماری آگلوتیناسیون مشاهده می گردد. بر اساس مطالعات گسترده در کشورهای مختلف آزمایش DAT دارای حساسیت ۱۰۰-۹۱٪ و ویژگی ۱۰۰-۷۲٪ می باشد (۲۱-۲۵). در مطالعه متآنالیز پس از بررسی ۳۰ مطالعه انجام شده با استفاده از روش DAT حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب ۹۴/۸ و ۸۵/۹٪ برآورد گردیده است (۲۲). از معایب این آزمایش می توان به شکنندگی آنتی ژن، نیاز به زنجیره سرما برای حمل آنتی ژن و گوناگونی دسته های آنتی ژنی (Batch-to-batch variations) اشاره نمود (۲۲).

روش الایزا به عنوان یک آزمایش سرولوژیک تقریباً برای تشخیص همه بیماری های عفونی از جمله لیشمانیوز کاربرد دارد. این آزمایش دارای حساسیت بالایی است اما ویژگی آن به آنتی ژن مورد استفاده بستگی دارد که به طور معمول آنتی ژن محلول خالص می باشد. این آنتی ژن از انجماد و ذوب مکرر (۴-۶ بار) سوسپانسیون پروماستیگوت ها در بافر فسفات سالین (PBS) و به دنبال آن سانتریفوژ سرد با دور ۲۰۰۰-۱۰۰۰۰ به دست می آید. مایع رویی به عنوان آنتی ژن محلول استفاده می شود و در چاهک های الایزا بعد از تخمین میزان پروتئین (۱۰۰-۵۰۰۰ ng/ml) پوشانده می شود. حساسیت این آزمایش با استفاده از این غلظت از آنتی ژن محلول خالص ۱۰۰-۸۰٪ است اما واکنش های متقاطع با سرم بیماران تریپانوزومیازیس، توبرکلوزیس و توکسوپلاسموز گزارش شده است (۱۷)، از سوی دیگر با استفاده از سایر آنتی ژن ها (۶۶KDa - 72KDa - 116KDa) ویژگی ۱۰۰٪ بدست می آید، اما حساسیت آزمایش ۳۷/۵٪ می باشد (۱۷ و ۱۹). براساس گزارش Palatnik-de-Souza و

همکاران، استفاده از اتصال مانوز-فوکوز که یک گلیکوپروتئین 36 kDa بیان شده در سراسر چرخه زندگی لیشمانیا (آماستیگوت و پروماستیگوت) است به عنوان آنتی ژن در آزمایش الایزا، حساسیت آزمایش را به ۱۰۰٪ و ویژگی آن را به ۹۶٪ می رساند (۲۶). همچنین در مطالعه ای دیگر گزارش شده است که حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا با استفاده از آنتی ژن های محلول بدست آمده از پروماستیگوت های کشت داده شده در محیط فاقد پروتئین افزایش می یابد (۲۰). در مطالعه میکائیلی و همکاران در ایران حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا با استفاده از آنتی ژن های محلول به ترتیب ۸۳/۶ و ۹۰/۵٪ بدست آمد (۲۰). آنتی ژن نوترکیب rK39 که در ژن ناحیه Kinesin انگل محفوظ است، برای آنتی بادی های بیماران مبتلا به کالآزار با عوامل L. donovani complex اختصاصی و بسیار حساس بوده و نشان دهنده شروع بیماری حاد می باشد (۲۷، ۲۸). ویژگی و حساسیت این آنتی ژن در تشخیص کالآزار و PKDL در آزمایش الایزا ۱۰۰٪ است (۲۷). میزان آنتی بادی علیه rK39 به طور مستقیم با فعالیت بیماری در ارتباط است و برای پیگیری بیماران پس از درمان مناسب است به طوری که با درمان موفق، میزان آن به سرعت پائین آمده و با بازگشت بیماری این میزان به سرعت دوباره افزایش می یابد (۲۹، ۳۰). به خاطر موقعیت های خاص جغرافیایی که در مناطق بومی وجود دارد و عدم امکان دسترسی و استفاده گسترده از روش های پیچیده تشخیص، نیازمند بکارگیری روش تشخیصی مناسب، سریع و ساده با حساسیت و ویژگی بالا می باشد. لذا آزمایش ایمونوکروماتوگرافی بر اساس آنتی ژن rK39 در موقعیت های مشکل میدانی استفاده می شود، به این صورت که آنتی ژن نوترکیب بر روی نوار کاغذی نیتروسلولزی مستطیل شکلی به صورت باندی از قبل پوشانده می شود و آنتی پروتئین A نیز در بالای باند آنتی ژنی روی کاغذ اضافه می شود، سپس از نوک انگشت بیمار به اندازه نیمی از یک قطره خون، سرم یا پلاسما در نوک نوار قرار داده می شود پس از آن نوک نوار را در ۴-۵ قطره PBS غوطه ور کرده

1-Recombinant kinesin 39

2-Post Kala azar Dermal Leishmaniasis

3- Delayed-Type Hypersensitivity

استفاده از آنتی بادی نشاندار افزایش می یابد، اما این روش وقت گیر، پرهزینه و از نظر تکنیکی سخت می باشد (۳۲).
 ج- آزمون پوستی (Skin testing): واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری (DTH) یا ایمنی اختصاصی است. آزمون پوستی مونته نگر و پاسخ ایمنی اختصاصی است. آزمون پوستی مونته نگر و (آزمایش پوستی لیثمانین) نوعی روش تشخیصی بر اساس واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری ویژه لیثمانیوز است، اما استفاده از این آزمایش دارای محدودیت هایی است (۳۳ و ۱۱ و ۱۰). در این روش ۰/۵ سی سی از پروماستیگوت های *L. major* کشته شده توسط فنول (حدود ۱۰۷*۵ پروماستیگوت) را در داخل پوست ساعد بیمار تزریق و بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت، قطر تورم ایجاد شده اندازه گیری می گردد، به عنوان شاهد در ساعد دیگر بیمار سرم فیزیولوژی به همراه فنول تزریق می شود. این آزمایش در موارد حاد کالآآزار به خاطر عدم واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری منفی است و تنها در مواردی که کالآآزار بهبود یافته است، مثبت می شود که مهمترین محدودیت و اشکال آن به حساب می آید ولی می تواند برای مطالعات اپیدمیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد (۳۳ و ۱۱).

روش های ملکولی:

از سال ۱۹۸۰ به بعد تکنیک های جدید برای شناسایی انگل ها از جمله روش هیبریداسیون DNA، واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) و غیره توسعه یافت (۳۵ و ۳۴). انجام روش PCR برای تشخیص و تعیین هویت عوامل ایجاد کننده لیثمانیوز احشایی از سال ۱۹۹۰ به بعد آغاز و بر روی نمونه های خون، مغز استخوان، طحال و غدد لنفاوی بیماران انجام گرفته است (۳۴-۳۸). محققین با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی های ثابت موجود در حلقه های کوچک DNA کینتوپلاست گونه های مختلف انگل لیثمانیا در بافت های مختلف بیمار به این نتیجه رسیدند که استفاده از DNA کینتوپلاست انگل لیثمانیا برای تشخیص و بررسی های ملکولی لیثمانیا بسیار مناسب است. در مطالعه ای در سودان، روش PCR نسبت به روش میکروسکوپی برای شناسایی انگل در غدد لنفاوی و مغز استخوان

روی اسلاید شیشه ای تمیزی قرار داده می شود. در صورت وجود آنتی بادی در نمونه بیمار با کونژوگه (پروتئین A کلئوئیدال طلائی) واکنش داده و با حرکت توسط خاصیت موئینگی و واکنش با آنتی ژن rK39 باند صورتی رنگی را ایجاد می نماید. باید توجه کرد که در نوار فرد بیمار، دو باند صورتی رنگ ایجاد می شود که یک باند مربوط به شاهد و باند دیگر مربوط به آنتی بادی بیمار است. حساسیت این آزمایش ۱۰۰٪ و ویژگی آن ۹۸٪ می باشد (۳۱، ۲۷ و ۱۱). طبق مطالعه ای در سودان همه بیماران مبتلا به کالآآزار که آزمایش نواری rK39 آنها منفی بود علیه IgG علیه rK39 را توسط میکروالایزا نشان دادند (در تیتراهای پائین)، همچنین در مطالعه دیگری در جنوب اروپا آزمایش نواری rK39 فقط در ۷۱/۴٪ بیماران مثبت بود، که این تفاوت در حساسیت آزمایش احتمالاً به علت تفاوت در پاسخ های آنتی بادی در نژادهای مختلف است (۲۵، ۲۴). از آنجایی که IgG ضد rK39 در سرم بیماران مدتی بعد از درمان هم وجود دارد، این آزمایش برای تشخیص بیمارانی با عود کالآآزار که تاریخچه ای هم از بیماری دارند، نباید استفاده شود. مشکل دیگر آزمایش نواری rK39، نتایج مثبت کاذبی است که ممکن است در مبتلایان به بیماری های دیگر از جمله مالاریا، تب تیفوئید و توبرکلوزیس دیده شود. با وجود این محدودیت ها، مناسب بودن این آزمایش برای تشخیص آلودگی های حاد لیثمانیوز به اثبات رسیده و تنها روش تشخیصی موجود برای کالآآزار است که دارای ویژگی و حساسیت قابل قبولی بوده و همچنین در هر شرایطی به سادگی قابل انجام و کم هزینه می باشد (۲۶-۳۱). آنتی بادی های اختصاصی توسط روش وسترن بلات نیز می توانند ردیابی شوند، به طوری که در این آزمایش پروماستیگوت های *L. donovani* را پس از رشد و رسیدن به فاز لگاریتمی لیز و پروتئین محلول را بر روی ژل دودسیل سولفات پلی آکریلامید الکتروفورز نموده و پروتئین های جدا شده را بر روی نوار نیتروسولوز قرار می دهند و با سرم بیمار مجاور می نمایند، حساسیت این روش در صورت

و تعیین گونه انگل اشاره نمود از معایب روش PCR نیز می توان نیاز به امکانات و تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی و افراد با تجربه اشاره نمود، شاید مهمترین محدودیت روش PCR استفاده آن در مناطق بومی باشد. در این نواحی گاهی نتیجه آزمایش افراد سالم نیز به صورت کاذب مثبت می شود. ممکن است چنین مواردی به اشتباه کالاآزار تشخیص داده شوند. به همین دلیل توصیه می شود که در مناطق بومی بیماری، جهت تشخیص نهایی از هر دو روش سرولوژی و مولکولی به طور همزمان استفاده شود (۴۱). تنوع ژنتیکی در میان کمپلکس لیشمانیا دونوانی به موضوع جالبی تبدیل شده که به دنبال آن بسیاری از روش های ملکولی از جمله RAPD-PCR, RFLP-PCR, آنالیز Microsatellite،

تعیین توالی ITS1, ITS2، جایگاه های mini-exon (mRNA) و چندین ژن کد کننده پروتئین به کار گرفته شده اند (۳۴،۴۱). نتایج مطالعه فخار و همکاران نشان می دهد که در میان روش های تایپینگ انگل های لیشمانیا (فنوتیپی و ژنوتیپی) روش تایپینگ ریزماهواره (Microsatellite) که برای اولین بار بر روی نمونه های ایران و برای اولین بار در جهان بر روی اسلایدهای میکروسکوپی انجام گرفت ابزاری ارزشمند، دقیق، سریع و قابل اعتماد برای مطالعات ژنتیک جهت اپیدمیولوژی ملکولی می باشد (۴۲). اخیراً "روش ملکولی جدیدی به نام LAMP برای تشخیص بیماری های عفونی از جمله لیشمانیوز احشایی مورد استفاده قرار گرفته است (۴۳). از مزایای این روش نسبت به سایر روش های ملکولی نظیر PCR، انجام تمامی واکنش ها در داخل یک میکروتیوب و عدم نیاز به دستگاه ترمو سایکلر و الکتروفورز می باشد. در صورت انجام واکنش و تکثیر ژن مورد نظر در دمای ۶۰- ۶۵ درجه سانتی گراد، ماده ای رنگی ایجاد شده که مثبت یا منفی بودن واکنش را نشان می دهد (۴۳).

روش های بیوشیمیایی: این روش بر اساس الکتروفورز لیشمانیا ایزو آنزیم های MDH, PGM, NH1, NH2، GPI, PGD بر روی ژل های استات سلولز، پلی آکرلامید و یا نشاسته و تعیین زایموم های انگل می باشد. ابتدا انگل

حساس تر گزارش شده است (۳۴). همچنین مطالعات فراوانی به منظور تشخیص کالاآزار و تعیین هویت انگل در خون محیطی بیماران با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفته است که نتایج مطلوبی را به همراه داشته است. در مجموع حساسیت و ویژگی روش PCR بر روی خون محیطی در نقاط مختلف دنیا به ترتیب ۷۰-۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ و در ایران ۸۵-۸۲٪ و ۱۰۰٪ گزارش شده است، که این تفاوت به عوامل مختلفی از جمله نوع پرایمر مورد استفاده، گونه انگل، میزان تراکم انگل در خون و غیره بستگی دارد (۳۴-۳۸). در استفاده از روش خون محیطی برای بررسی های ملکولی، بهتر است از بافی کوت استفاده شود، چرا که حساسیت روش را تا ده برابر افزایش خواهد داد، همچنین می توان از خون محیطی جمع آوری شده با استفاده از کاغذ صافی نیز در این روش استفاده نمود (۳۷). تکنیک PCR-ELISA روش بسیار حساسی است که علاوه بر تشخیص کالاآزار، می توان با استفاده از آن سوش های L.donovani complex را نیز شناسایی نمود، این روش توانایی شناسایی ۰/۱ پروماستیگوت یا ۱ فمتوگرم (fg) از مواد حاوی ژنوم انگل را دارد (۳۹). تکنیک دیگر Fluorogenic-PCR (F-PCR) می باشد. اساس این روش استفاده از پروب فلورسنت DNA می باشد که ویژه نواحی ثابت واحدهای کوچک RNA ریبوزومی (rRNA) انگل لیشمانیا و استفاده از یک جفت پرایمر می باشد. این روش با حساسیت و ویژگی بالا و بسیار سریع در طی کمتر از ۲۴ ساعت انجام می شود (۴۰). تکنیک بعدی RFLP-PCR است که می توان از این روش در تعیین هویت انگل های جدا شده از بیماران و همچنین جهت تفکیک عود (Relapse) و عفونت مجدد (Re-infection) در بیماران بهبود یافته از کالاآزار استفاده نمود (۳۵). از جمله مزایای PCR در تشخیص کالاآزار، می توان به مواردی از قبیل تشخیص زودرس بیماری به خصوص در افراد بودن علامت بالینی و دارای عفونت مخفی، حساسیت و ویژگی بسیار بالا، غیر تهاجمی بودن روش جهت تشخیص بیماری در افراد دچار نقص سیستم ایمنی، ارزیابی درمان پس از دارو درمانی

هموگلوبینوپاتی‌ها، اشتباه شده و منجر به تشخیص نادرست و در نتیجه درمان اشتباه و نامناسب می‌گردد که در بسیاری از این موارد، تشخیص نادرست منجر به مرگ بیمار خواهد شد (۵۰). با توجه به اینکه عدم تشخیص و درمان به موقع ممکن است تا ۱۰۰ درصد باعث مرگ و میر بیماران به ویژه کودکان گردد، لذا تشخیص دقیق و زودرس بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنابراین دستیابی به روش‌های کارآمد، دقیق، آسان، کم هزینه و در عین حال سریع در خصوص تشخیص و شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری امری ضروری است (جدول ۱). لذا توصیه می‌کنیم در مناطق بومی بیماری کالآزار در موارد مشکوک به لوکمی علاوه بر آزمایش مغز استخوان و جستجوی دقیق از نظر اجسام لیشمن، از آزمون‌های سرولوژی و PCR جهت رد یا تایید نمودن بیماری کالآزار استفاده گردد، تا تشخیص به تاخیر نیفتد زیرا آزمایش مغز استخوان از حساسیت پایینی برخوردار است و شانس مشاهده آماستیگوت کم است. همچنین به منظور جلوگیری از آسپیراسیون و بیوپسی‌های متعدد مغز استخوان جهت ارزیابی درمان و بررسی پیش‌آگهی بیماری، از روش PCR اختصاصی بر روی خون محیطی (۵۱) و یا روش PCR کمی (Real-time PCR) استفاده گردد. همچنین در میان روش‌های سرولوژی، روش IFA دارای بیشترین حساسیت و روش DAT دارای بیشترین ویژگی است. امادر حال حاضر برای غربالگری جمعیت‌های انسانی و مخازن حیوانی در مطالعات سرواپیدمیولوژیک کالآزار در مناطق بومی ایران از روش DAT استفاده می‌شود که روشی موثر در پایش بیماران بصورت فعال و پاسیو می‌باشد (۲۱، ۴۱، ۵۱ و ۵۲).

روش PCR اختصاصی جنس، ابزاری ارزشمند در تشخیص زودرس بیماری، تأیید موارد مشکوک به بیماری، شناسایی موارد بدون علامت (۳۸ و ۴۸ و ۵۳) و دارای علامت بیماری و غربالگری جمعیت انسانی (۵۱) و مخازن حیوانی بویژه سگهای اهلی مناطق بومی (۵۲) در مطالعات اپیدمیولوژی می‌باشد. همچنین می‌توان این روش را به طور مستقیم بر روی نمونه‌های مختلف بالینی (خون، سرم، ادرار، مغز استخوان)

را در محیط‌های کشت به تولید انبوه رسانده و سپس با جمع‌آوری انگل الکتروفوز انجام می‌شود. روش‌های بیوشیمیایی هنوز روش استاندارد و قابل قبول جهت تعیین هویت انگل لیشمانیا و تعیین سوش‌های آن می‌باشد (۴۵ و ۴۴).

وجود تظاهرات بالینی غیر معمول کالآزار در بیماران ایدزی و همچنین افراد دچار نقص سیستم ایمنی یک چالش تشخیص در این بیماران می‌باشد. تب، اسپلنومگالی و هپاتومگالی در کمتر از نیمی از این بیماران دیده شده است. در این افراد، لیشمانیوز به همراه درگیری معده-روده‌ای، آب آوردگی شکم، جنب یا پریکار، ابتلاء ریه‌ها، لوزه‌ها، پوست و حتی به صورت بیماری منتشره وجود دارد. اصول تشخیصی برای این بیماران همانند روش‌هایی است که برای بیماران کالآزار غیر آلوده به ایدز به کار می‌رود، آماستیگوت‌ها ممکن است در محل‌های غیر معمول از جمله در نمونه‌هایی از شستشوی مایع برونش-آلوئولار (BAL)، مایع جنب و یا بیوپسی نمونه‌هایی از دستگاه گوارش و بافی کوت خون محیطی دیده شوند. باید توجه کرد که حساسیت آزمایش‌های ایمونولوژیکی مثل IFA و ELISA برای بیماران ایدزی مبتلا به کالآزار به دلیل کاهش سطح ایمنی پائین است، از این روی PCR خون و یا بافی کوت روش تشخیصی مفیدی برای این بیماران می‌تواند باشد (۴۶-۴۹).

نتیجه‌گیری

بطور کلی تشخیص بیماری لیشمانیوز احشایی یا کالآزار پیچیده است چرا که تظاهرات بالینی آن با سایر بیماری‌های شایع از قبیل مالاریا، تیفوئید و سل مشابه بوده و گاهی این بیماری‌ها بطور هم‌زمان به عنوان عفونت توأم در شخص مبتلا به کالآزار دیده می‌شوند. از سوی دیگر به دلیل وجود هایپرسلولاریتی و معکوس شدن رده میلوئید به اریتروئید، پلاسماستیتوز، مگاکاریوسیت‌ها، نکروز و فیبروز در آسپیراسیون و بیوپسی مغز استخوان در بسیاری از موارد بیماری کالآزار با انواع لوکمی‌ها، لمفووما، آنمی‌ها (همولیتیک، مگالوبلاستیک)، اختلالات میلوپرولیفراتیو و

در طبقه بندی و تعیین سوش این انگل ها می باشد. البته اخیراً از روش پروتئومیکس نیز جهت بررسی تقابل بین لیشمانیا و میزبان، تفاوت های پروتئین ها در بین گونه های مختلف و نیز مکانیسم های مقاومت دارویی استفاده شده است (۵۳).

در پایان پیشنهاد می کنیم مطالعاتی در مورد انتخاب روش PCR به عنوان روش استاندارد طلایی در تشخیص، ارزیابی درمان و پیش آگهی کالاآزار در مناطق بومی ایران صورت گیرد. همچنین اطلاع رسانی مناسبی برای پزشکان در زمینه روش های مختلف تشخیصی به منظور جلوگیری از تشخیص اشتباه بیماری کالاآزار و تفریق آن از سایر بیماریها انجام گیرد.

جدول شماره ۱- حساسیت و ویژگی روش های مختلف تشخیص کالاآزار

| انواع روش ها | نوع آزمون | حساسیت (%) | ویژگی (%) | منبع |
|----------------------|---|-------------------|-----------|--------------------------------------|
| روش های تشخیص ایمنی: | کانترکارنت ایمونوالکتروفورز | ۷۵-۷۰ | ۹۵-۹۰ | ۳۱ و ۱۶ |
| ۱- شناسایی آنتی بادی | ایمونوفلورسانت غیرمستقیم آگلوتیناسیون مستقیم | ۷۵-۷۳ | ۹۰-۸۰ | ۲۴ و ۲۰ و ۱۶ |
| | الیزا با آنتی ژن rk39 | ۹۱-۱۰۰ | ۷۲-۱۰۰ | ۲۴ و ۲۲ و ۲۰ و ۱۶ و ۱۲ |
| | تست نواری سریع با rk39 | ۱۰۰ | ۹۵-۷۲ | ۲۴ و ۲۰-۱۶ |
| | | ۱۰۰ | ۹۸-۸۸ | ۳۰ و ۲۹ و ۲۷ |
| ۲- شناسایی آنتی ژن | KATEX | ۱۰۰-۶۸ | ۱۰۰ | ۱۵ |
| ۳- شناسایی DNA | PCR با پرایمرهای عمومی RV1/RV2 | ۸۵-۸۲ (خون) | ۱۰۰ | ۳۶ و ۳۴ و ۳۱ و ۱۱ ۵۱ و ۳۸ |
| | PCR با پرایمرهای عمومی RV1/RV2 | ۱۰۰ (مغز استخوان) | ۱۰۰ | ۳۸-۳۶ و ۳۴ و ۳۱ و ۱۱ ۳۶ و ۳۱ و ۱۱ |
| | PCR با پرایمرهای عمومی RV1/RV2 | ۹۶.۸ (ادرار) | ۴۷ | ۴۷ |
| پارازیتولوژی | اسمیر مغز استخوان | ۸۵-۶۰ | ۱۰۰ | ۵۱ و ۱۲ و ۱۱ |
| | اسمیر طحال | >۹۵ | ۱۰۰ | ۱۲ و ۱۱ |

بکار برد. برای تایید تشخیص موارد مشکوک به بیماری کالاآزار، استفاده هم زمان از دو آزمون IFA و PCR از کارآیی بسیار بالایی برخوردار است (۵۱). روش PCR اختصاصی گونه، روش دقیق، سریع و آسان برای تعیین گونه انگل های لیشمانیا با استفاده از نمونه های بافتی (مغز استخوان، کبد و روده) می باشد و همچنین حساسیت آن از روش های انگل شناسی (کشت، تلقیح به حیوان حساسیت آزمایشگاهی و روش مستقیم) بیشتر است و علاوه بر آن نیاز به کشت انگل ندارد. روش تایپینگ میکروستلایت نیز ابزاری دقیق، سریع و قابل اعتماد برای مطالعات اپیدمیولوژی و ژنتیک جمعیت گونه های مختلف لیشمانیا بوده و جایگزین بسیار مناسبی برای روش الکتروفورز ایزوآنزیم ها

References

- Fakhar M, Rahmati B. *Visceral leishmaniasis in Mazandaran Province and review on its current situation in Iran*. JBUMS. 2011; 13(2): 68-75.[Persian]
- Motazedian H, Noyes H, Maingon R. *Leishmania and Sauroleishmania: the use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates*. Exp Parasitol. 1996; 83(1):150-154.
- Fakhar M, Mohebbali M, Barani M. *Identification of endemic focus of Kalka-azar and seroepidemiological study of visceral leishmania infection in human and canine in Qom Province*. Armaghane-danesh. 2004; 9(3): 43-52.[Persian]
- Fakhar M, Motazedian MH, Asgari Q, Mohebbali M, Mehrabani D. *A New Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Southern Iran*. Armaghane-Danesh. 2006; 11(2): 104-110. [Persian]
- Sarkari B, Fakhar M, Ebrahimi S, Motazedian MH, Hatam GH, Kalantari M, et al. *Characterization of Leishmania parasites isolated from Kala-azar patients in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad, using semi-nested PCR*. Armaghane-Danesh. 2006; 11(1): 27-32. [Persian]
- Mohebbali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. *Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran*. Vet Parasitol. 2005; 129(3-4): 243-251.
- Alborzi AAV, Pouladfar GHR, Aalami MH. *Visceral leishmaniasis; literature review and Iranian experience*. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2007; 2(2): 99-108.
- Albrecht H. *Leishmaniasis: new perspectives on an underappreciated opportunistic infection*. AIDS. 1998; 12(16): 2225-2226.
- Sundar S, Pai K, Kumar R, Pathak-Tripathi K, Gam AA, Ray M, et al. *Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from Northeast India*. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65(3): 193-196.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. *Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?* Nat Rev Microbiol. 2007; 5(11): 873-82.
- Sundar S, Rai M. *Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis*. Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9(5): 951-958.
- Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. *Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992; 86(5): 505-507.
- Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabas E, et al. *The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood*. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73(2): 276-280.
- De Colmenares M, Portus M, Riera C, Gallego M, Aisa MJ, Torras S, et al. *Detection of 72-75 kD and 123 kD fractions of leishmania antigen in urine of patients*. 15. Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, et al. *Latex agglutination test for the detection of Urinary antigens in visceral leishmaniasis*. Acta Trop. 2001; 78(1): 11-16
- Sinha R, Sehgal S. *Comparative evaluation of serological tests in Indian kala-azar*. J Trop Med Hyg. 1994; 97(6): 333-340.
- Choudhry A, Guru PY, Saxena RP, Tandon A, Saxena KC. *Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Bhadohi (Varanasi), India*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990; 84(3): 363-366.
- Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. *Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis*. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8(6): 1220-1224.
- Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. *Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis*. J Clin Microbiol. 2002; 40(3): 1037-1043.
- Mikaeili F, Fakhar M, Sarkari B, Motazedian MH, Hatam G. *Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain*. Iranian Journal of Immunology. 2007; 4(2): 116-21.
- Harith AE, Kolk AH, Leewenburg J, Muigai R, Huigen E, Jelsma T, et al. *Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis*. J Clin Microbiol. 1988; 26(7): 1321-1325.
- Mohebbali M, Edrissian GhH, Nadim A, Hajjaran H, Akhoundi B, Hooshmand B, et al. *Application of direct agglutination test (DAT) for the diagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis in Iran*. Iranian Journal of Parasitology. 2006; 1(1): 15-25.
- Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. *Direct agglutination test for diagnosis and seroepidemiological survey of kala-azar in the Sudan*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991; 85(4): 474-476.
- Sunder S, Singh GS, Singh VP, Singla N, Kumar K, Vinayak VK. *Comparative evaluation of DAT, IFAT and micro-ELISA in the serodiagnosis of Indian kala-azar*. J Parasitic Dis. 1996; 20(1): 41-43.
- Edrissian GH, Hajjaran H, Mohebbali M, et al. *Application and evaluation of direct agglutination test in serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in man and canine reservoir in Iran*. Iran J Med Sci. 1996; 21: 119-24.
- De-Sousa CBP, Gomes EM, De-Souza EP, Palatnik M, Luz K, Borojevic R. *Leishmania donovani: titration of the antibodies to the fucose mannose ligand as an aid in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis*. Elsevier. 1995; 89(4): 390-393.
- Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG. *Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis*. J Parasitol. 1995; 81(6): 1000-1003.

28. Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PCK, Murray HW. *Rapid accurate field diagnosis of visceral leishmaniasis*. Lancet 1998; 351(9102): 563–565.
29. Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J. *Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan*. Trop Med Int Health. 2001; 6(2): 108–113.
30. Jelinek T, Eichenlaub S, Loscher T. *Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18(9): 669–670.
31. Singh S. *New developments in diagnosis of leishmaniasis*. Indian J Med Res. 2006; 123(3): 311–330.
32. Singh S. *Recent advances in the laboratory diagnosis of leishmaniasis*. Indian kala-azar. Khandelwal Offsets, Varanasi, India. 1996; 39–56.
33. Haldar JP, Ghose S, Saha KC, Ghose AC. *Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis*. Infect Immun. 1983; 42(2): 702–707.
34. Andresen K, Gasim S, Elhassan AM, Khalil EA, Barker DC, Theander TG, et al. *Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymphnode samples from patients from the Sudan*. Trop Med Int Health. 1997; 2(5): 440–444.
35. Morales MA, Chicharro C, Ares M, Canavate C, Barker DC, Alvar J. *Molecular tracking of infections by Leishmania infantum*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95(1): 104–107.
36. Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, et al. *Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis*. J Clin Microbiol. 1997; 35(10): 2454–2457.
37. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastein P. *Comparison of various sample preparation methods of PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood*. J Clin Microbiol. 2001; 39(2): 613–617.
38. Fakhar M, Motazedian MH, Asgari Q, Kalantari M, Hatam GR, Akbarpoor MA, et al. *Efficacy of PCR for early diagnosis and detection of asymptomatic cases of visceral leishmaniasis in human and dog*. J Jahrom Univ Med Sci. 2010; 8(2): 1-7. [In Persian]
39. Martin Sanchez J, Lopez-Lopez MC, Acedo-Sanchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Marquez F. *Diagnosis of infection with Leishmania infantum using PCR-ELISA*. Parasitology. 2001; 122: 607–615.
40. Wortmann G, Sweeney C, Houng HS, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, et al. *Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction*. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65(5): 583–587.
41. Mohebbali M, Edrissian GH, Shirzadi MR, Akhoundi B, Hajjaran H, Zarei Z, et al. *An observational study on the current distribution of visceral leishmaniasis in different geographical zones of Iran and implication to health policy*. Travel Med Infect Dis. 2011; 9(2): 67–74.
41. De Colmenares M, Portus M, Riera C, Gallego M, Aisa MJ, Torras S, et al. *Detection of 72–75 kD and 123 kD fractions of leishmania antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg. 1995; 52(5):427–428.
42. Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, Lowe C, Noyes HA. *An integrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for Leishmania donovani complex, Leishmania braziliensis and Leishmania major*. Parasitol. 2008; 135(5): 567-74.
43. Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Ekram AR, Hashighuchi Y, et al. *Sensitive, Specific, and Rapid Detection of Leishmania donovani DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification*. Am J Trop Med Hyg. 2009; 81(4): 578–582.
44. Hatam GR, Riyad M, Bichichi M, Hejazi SH, Guessous-Idrissi N, Ardehali S. *Isoenzyme characterization of Iranian Leishmania isolates from cutaneous Leishmaniasis*. Iranian J Sci Trans. 2005; 29(A1): 65-70.
45. Fakhar M, Mikaeili F, Motazedian MH, Hatam GR, Motazedian MH, Habibi P, et al. *Application of superior enzymatic systems for characterization of causative agents of visceral leishmaniasis (kala-azar) using Isoenzyme electrophoresis in Iran*. J Mazandaran Univ Med Sci. 2009; 19(70): 41-48.[In Persian]
46. Rosenthal E, Marty P, Poizot-Martin I, Reynes J, Pratlong F, Lafeuillade A, et al. *Visceral leishmaniasis and HIV co-infection in Southern France*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995; 89(2): 159–162.
47. Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. *A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 60(2): 151-154.
48. Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Asgari Q, Kalantari M, Mohebbali M. *Asymptomatic human carriers of Leishmania infantum: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran*. Ann Trop Med Parasitol. 2008; 102(7): 577-83.
49. Geramizadeh B, Fakhar M, Motazedian MH. *Visceral leishmaniasis with duodenal involvement: three immunocompetent cases from Southern Iran*. Ann Trop Med Parasitol. 2006; 100(7): 637-40.
50. Fakhar M, Asgari Q, Motazedian MH, Monabati A. *Mediterranean Visceral Leishmaniasis Associated with Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)*. Parasitol Res. 2008; 103(2): 473-5.
51. Fakhar M, Motazedian M H, Hatam Gh R, Asgari Q, Monabati A , Keighobadi M. *Comparative performance of DAT, IFAT, PCR and bone marrow aspiration methods for diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis (MVL)*. African J Microbiol Res. 2012; 6(28): 5777-5781.
52. Fakhar M, Motazedian M H, Asgari Q, Kalantari M. *Asymptomatic domestic dogs are carriers of Leishmania infantum: possible reservoirs host for human visceral leishmaniasis in southern Iran*. Comp Clin Pathol. 2012; 21(5): 801–807.