بسمه تعالی

دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوزهای جلدی(سالک) و احشائی(کالاآزار)

آزمایشگاه مرجع سلامت

اداره مدیریت آزمایشگاههای بهداشتی

سال ۱۳۸۸

نهایی شده در کمیته انگل شناسی آزمایشگاه مرجع سلامت :

اعضاء کمیته :

- **آقای دکتر مهدی محبعلی (استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران)**
- **آقای دکترمصطفی رضائیان (استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران)**
- **آقای دکترجعفر مسعود (استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران)**
- **آقای دکتربهرام کاظمی (استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)**
- **آقای دکترحمید اطهری (استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)**
- **آقای دکتر محمد رضا نظری پویا (استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)**
- **آقای دکتر رامتین حدیقی (استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایران)**
- **خانم دکتر فاطمه غفاری فر (دانشیار دانشگاه تربیت مدرس)**
- **آقای دکترمحمد رضا شیرزادی (رئیس اداره زئونوز مرکز مدیریت بیماری ها)**
- **خانم دکتر شهلا فارسی (اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت)**
- **خانم مریم میر محمد علی رودکی (اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت)**

پیش نویس اولیه دستور العمل تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوزها توسط جناب آقای دکتر محبعلی تهیه و در کمیته انگل شناسی نهایی گردیده است.

فهرست مطالب: **صفحه**

مقدمه	**۴**
چرخه زندگی انگل در بدن ناقل و میزبان مهره دار	**۸-۷**
الف - لیشمانیوز پوستی (سالک)	**۱۶-۸**
ب: لیشمانیوز احشائی(کالاآزار)	**۲۳-۱۶**
تشخیص لیشمانیوز احشایی در مبتلایان به ایدز	**۲۴-۲۳**
منابع	**۲۴**

دستور العمل تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوزهای پوستی و احشائی

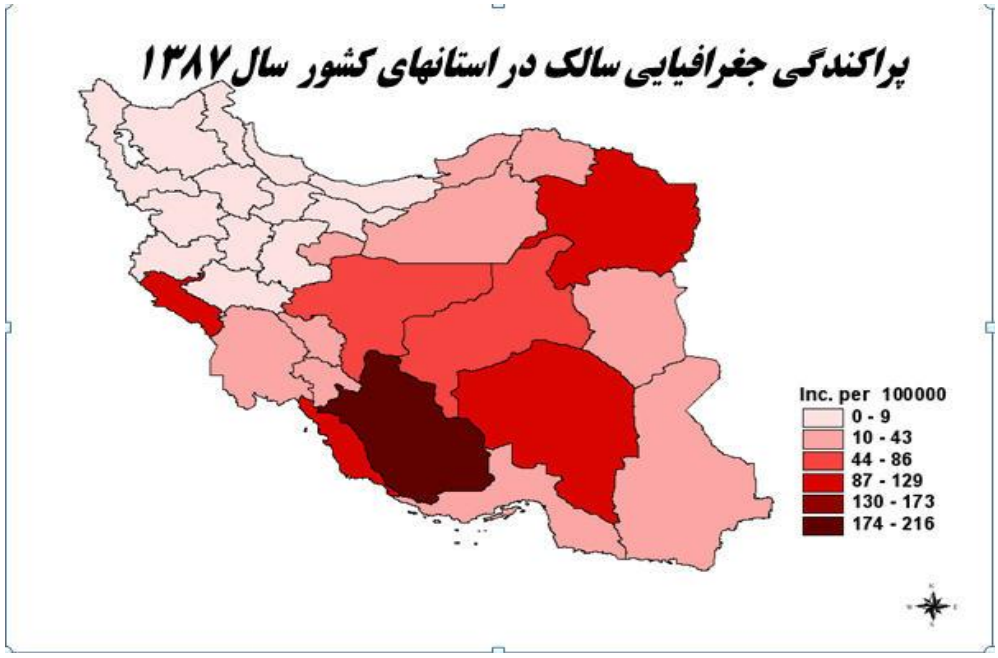
مقدمه :

لیشمانیوز ها مجموعه ای ازبیماری های انگلی ناشی ازگونه هایی از جنس لیشمانیا می باشند که درمناطق گرمسیری امریکا، آفریقا و شبه قاره هند و درنواحی نیمه گرمسیری آسیای جنوب غربی وناحیه مدیترانه به شکل آندمیک وجود دارند. لیشمانیوزها به اشکال بالینی پوستی (سالک)، مخاطی _پوستی (اسپوندیا) و احشائی (کالاآزار)مشاهده می شوند(شکل شماره ۱). لیشمانیوزاحشائی با مرگ ومیربالا همراه بوده، اما معمولاً مرگ ومیردر بیماری سالک مشاهده نمی شود ولی بدلیل میزان ابتلاء زیاد، ایجاد ضایعات بد شکل پوستی نموده که دربرخی موارد تا بیش ازیکسال باقی می مانند و معمولا باعث ایجاد جوشگاه (اسکار) شده که حتی با استفاده ازدرمان تا آخرعمر بر روی بدن باقی می ماند.. از طرف دیگر عفونت های باکتریائی و قارچی ثانویه شامل عفونت های نسوج سطحی وعمقی، آبسه، سپتی سمی، وحتی کزاز ازعواض زخم سالک می باشد که ممکن است گاهی موجب ناتوانی وحتی مرگ بیمار گردد. اگرچه میزان بروزاین عوارض ناچیز است ولی با توجه به گستردگی بیماری سالک، تعداد بیمارانی که دچار این عوارض می گردند، قابل توجه خواهند بود. تخمین زده میشود که بیش از۱۲ میلیون نفردردنیا مبتلا به سالک باشند و ۳۵۰ میلیون نفردر مناطقی زندگی می کنند که احتمال ابتلاء آنها وجوددارد و سالانه ۱/۵ تا ۲ میلیون نفر به مبتلایان این بیماری اضافه می شوند که متاسفانه بسیاری از آنها ثبت و گزارش نمی شوند. این بیماری دربرخی موارد ضایعات متعدد (تا بیش از۳۰۰ عدد) ایجاد می کند.

گرچه سالانه حدود ۲۰ هزار مورد بیماری لیشمانیوز جلدی درایران گزارش می شود ولی موارد حقیقی بیماری حدود ۴ تا ۵ برابر این تعداد است. سالک درایران به شکل روستائی (مرطوب) و شهری (خشک) مشاهده میشود. نوع روستائی دراکثرمناطق روستائی نیمی از استان های کشورشایع است و نوع شهری در بسیاری از نقاط شهری کشور به صورت اندمیک وجود دارد.

میزان بروز لیشمانیوزاحشائی در کشورحدود ۲۰۰تا ۳۰۰ مورد در سال است و این بیماری از تمامی استان های کشورگزارش شده است (شکل شماره ۲).

شکل شماره ۱: اشکال مختلف بالینی لیشمانیوز ها در انسان

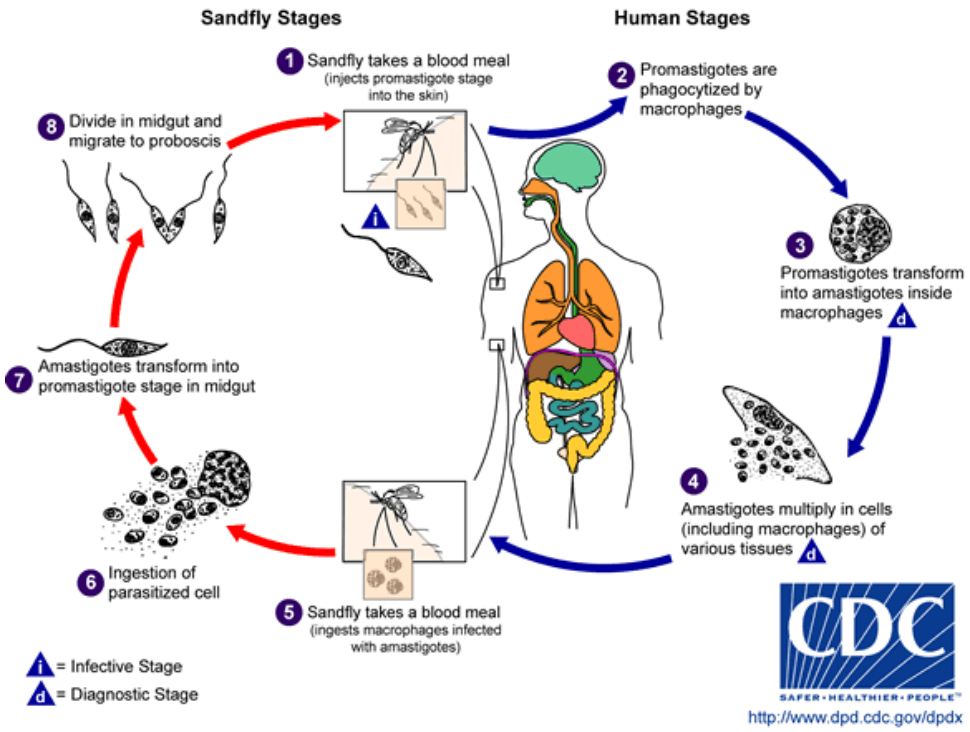


شکل شماره ۲: .پراکندگی جغرافیایی سالک در استانهای کشور

چرخه زندگی انگل در بدن ناقل و میزبان مهره دار

زندگی انگل لیشمانیا حداقل دارای دو مرحله اصلی لیشمانیائی ولپتومونائی می باشد، انگل درمرحله لیشمانیائی (آماستیگوت) بصورت ارگانیسم فاقد تاژک آزاد ودارای بدن گرد یا بیضوی وگاهی دوکی شکل است که درداخل سلولهای بیگانه خوار(ماکروفاژ) پستانداران(Leishman body) مشاهده می شود. مرحله لپتومونائی (پروماستیگوت) از تغییرشکل حالت لیشمانیائی ایجادمی شود. انگل دراین مرحله درقسمت قدامی دارای یک تاژک است. پروماستیگوت دردستگاه گوارش پشه خاکی و برخی محیط های کشت آزمایشگاهی دیده می شود. پشه خاکی جنس ماده خونخوار است و با مکیدن خون، آماستیگوت را می بلعد. آماستیگوت دردستگاه گوارش پشه به پروماستیگوت تبدیل می شود و تکثیر آن با روش تقسیم غیر جنسی دوتایی انجام می گیرد و بعد از ۴ الی ۱۸ روز، عفونت زائی آن افزایش می یابد به طوری که با گزش پشه خاکی ماده آلوده، پروماستیگوت به انسان سالم منتقل می شود. بطورکلی انگل های لیشمانیا بوسیله انواع پشه خاکی های ماده آلوده به صورت سه چرخه زیر به طور طبیعی می توانند در گردش باشند:

۱- انسان- پشه خاکی- انسان ۲ - حیوان- پشه خاکی- حیوان ۳- حیوان- پشه خاکی- انسان (شکل شماره ۳)



شکل ۳ : چرخه زندگی انگل های لیشمانیا

با توجه به اینکه اشکال پوستی واحشایی جزء شایعترین اشکال بالینی لیشمانیوزدرکشورما به شمار می‌روند، لذا دراین قسمت، خصوصیات مختلف این بیماری ها با تاکید برروشهای تشخیص آزمایشگاهی آن ها به اختصار شرح داده می‌شوند.

الف - لیشمانیوز پوستی (سالک)

عامل بیماری لیشمانیوز جلدی (سالک) در ایران: به تظاهرات بالینی ناشی از انگل لیشمانیا درپوست، لیشمانیوز جلدی یا سالک گفته می شود که دردنیای قدیم ازجمله ایران عمدتاً به دلیل لیشمانیا مـــاژورویا لیشمانیا تروپیکا ایجاد می شود. به لیشمانیوز پوستی ناشی از لیشمانیا تروپیکا ، نوع شهری یا نوع خشک گفته می شود که به دلیل ظاهرضایعه به این نام خوانده می شود و به لیشمانیوزپوستی ناشی از لیشمانیا ماژور؛ نوع روستائی یا نوع مرطوب اطلاق می گردد که بدلیل وجود ترشح درضایعه می باشد، البته تظاهرات بالینی همیشه با ابتلاء به نوع انگل مطابقت ندارد وتشخیص بیماری براساس شکل ضایعه و محل آن قابل اعتماد نیست.

بیماری ناشی از لیشمانیا ماژور بدلیل داشتن مخزن جونده، بنام نوع زئونوتـیک (Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis) وبیماری ناشی ازلیشمانـیا تروپـیکا چون عمدتاً مخزن آن انسان های مبتلامی باشند به نام آنتروپـــونوتیک

(Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis) گفته میشود.

روش های انتقال : عمده ترین روش انتقال سالک، گزش پشه خاکی است ولی راه های فرعی دیگری نیز گزارش شده که شامل خاراندن زخم و انتقال مکانیکی توسط سایر بندپایان می باشد که فاقد اهمیت اپیدمیولوژیک می باشند.

اشکال بالینی:با توجه به عامل بیماری و علائم بالینی عفونت در انسان، لیشمانیوز پوستی به اشکال بالینی خشک (شهری)، مرطوب (روستائی)، عودکننده (لوپوئید Recidivans)، منتشر واشکال غیرمعمول (اسپوروتریکوئید، زردزخمی، توموری، زگیلی، بادسرخی، محو شونده و ...) مشاهده می شود. همچنین لیشمانیوز پوستی ممکن است به اشکال حاد و یا مزمن دیده شود.

تشخیص آزمایشگاهی :

اصولاً پیش‌ازاستفاده ازروشهای آزمایشگاهی برای تشخیص انواع لیشمانیوزها، بررسی سابقهٔ بیماری و اطلاع ازمحل سکونت و مسافرت به مناطق بومی این بیماری درکشورونیزتوجه به خصوصیات بالینی بیماری، بسیارمهم و کمک کننده خواهد بود.

در آزمایشگاه سه نمونه (گسترش) ازنقاط مختلف ضایعه (ها) جلدی تهیه می شود. بهتراست از بیمارانی که دارای چند ضایعه هستند، چند نمونه ازضایعات مختلف گرفته شود.

نمونه ها بایستی دراسرع وقت مورد بررسی قرارگیرند، درصورتی که یک نمونه منفی باشد، نمونه دوم و سپس نمونه سوم بررسی می شود ولی اگر یک نمونه مثبت باشد نیاز به بررسی نمونه های دوم و سوم نمی باشد.

- **روش نمونه برداری از ضایعات مشکوک به سالک و بررسی میکروسکپی :**

- لبه های ملتهب ومتورم ضایعه مهم ترین قسمتی است که بیشترین تراکم آماستیگوت ها را دارند. نکته مهم آنکه هر چه نمونه بیشتری از بافت برداشت شود احتمال مشاهده انگل درنمونه بیشتر است. ازآنجایی که ضایعات پوستی ممکن است دچارعفونت های ثانویه باکتریایی و یا قارچی شده باشند، لازم است محلی از ضایعه را که قصد برداشت نمونه از آن وجود دارد، کاملاً تمیز نموده و اگر لازم باشد چندین مرتبه با پنبه الکل (اتانل ۷۰ درصد) ضد عفونی گردد(شکل شماره ۴) .

روش صحیح نمونه برداری و رنگ آمیزی به شرح زیر است:

۱ - رعایت اصول ایمنی در هنگام نمونه گیری ونیز استفاده از وسایل حفاظتی مانند دستکش وغیره

۲ - حذف کبره های روی ضایعه و هر گونه چرک روی آن

۳ - انتخاب محل مناسب برای نمونه برداری شامل لبه خارجی قسمت متورم و ملتهب ضایعه پوستی و اجتناب از نمونه برداری از محل های باز و زخمی ضایعه.

۴ - استفاده ازاتانول ۷۰ درصد برای استریل کردن وشستشوی ضایعه (قبل ازنمونه برداری باید صبر کرد که الکل خشک شود)

۵ – توجه به عدم استفاده از موادی مانند مرکورکوروم (ترکیبات جیوه) در محل ضایعه(زیرا ممکن است باعث تغییر شکل آنها شود). درصورت استفاده ازترکیبات ید دار برای ضدعفونی ضایعه، قبل ازنمونه برداری محل ضایعه بایستی به کمک پنبه آغشته به الکل ، ازاین ماده پاک شود.

۶ – محلی از ضایعه که برای نمونه برداری در نظر گرفته می شود بایستی توسط دو انگشت شست و سبابه محکم گرفته شده و ثابت گردد.

۷ – با استفاده از واکسینواستیل استریل (یا لانستی که اطراف آن بریده و باریک شده باشد) و یا یک اسکالپل استریل نوک باریک (کند شده)، شکافی به عمق یک میلی متر درمنطقه گرفته شده با انگشتان ایجاد گردد.

۸ – توسط وسایل فوق ازعمق محل شکافته شده به طرف سطح ومرکزضایعه چند خراش (برای برداشت مقدارمناسب بافت و خونابه) داده شود.

۹ – وسیله نمونه گیری را بیرون آورده واز ترشحات حاصله برروی لام گسترش تهیه شود و مشخصات بیمار با قلم الماس روی لام حک گردد. (درصورت نیاز به کشت، در کنار شعله ابتدا نمونه به محیط کشت منتقل شود)

– روش رنگ آمیزی گیمسا:

رنگ گیمسا بصورت محلول تجارتی غلیظ به فروش می رسد. این ماده قبل ازاستفاده باید مورد کنترل کیفیت قرار گیرد. بطور معمول اگر گلبول های سفید و قرمز خون با کیفیت مطلوب رنگ پذیری داشته باشند، رنگ گیمسابرای رنگ پذیری انگل نیزمناسب است.

روش رنگ آمیزی :

۱– باید گسترش تهیه شده بدون استفاده از شعله و در هوای اتاق خشک شود.

۲– متانول، به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه قبل از رنگ آمیزی روی گسترش ریخته شود .

۳– گسترش در مجاورت هوا خشک شود.

۴– با توجه به نوع گیمسا آنرا به نسبت ۱ به ۱۰با آب با pH تنظیم شده ۷/۲ رقیق شود (اگر رنگ رسوب کندباید با کاغذ صافی صاف شود)

۵– لام را روی پل رنگ آمیزی قرار داده و به مدت ۳۰ دقیقه برروی آن محلول گیمسا ی رقیق شده ریخته می شود ویا لام را در ظرف محتوی رنگ با همین مدت زمان قرار می دهیم (باید توجه داشت که در ارتباط با رقت محلول رنگ آمیزی و نوع آن، مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه برای رنگ آمیزی لازم است و هر آزمایشگاه بایستی در حین اجرای برنامه کنترل کیفیت مدت زمان مطلوب را نیزجهت رنگ مورد استفاده، ازقبل بدست آورد)

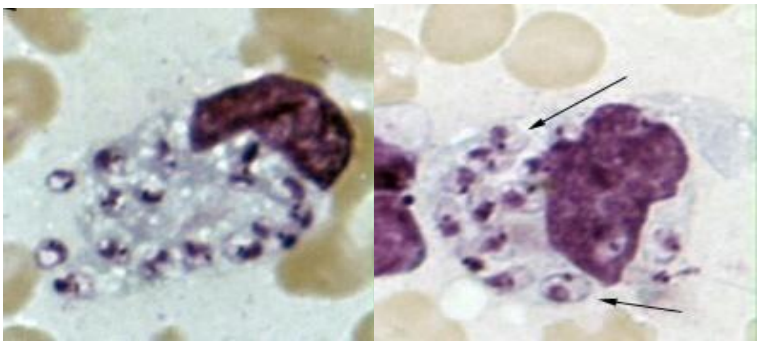
۶- لام برای مدت کوتاهی در آب با pH تنظیم شده ۷/۲ فرو برده شده به سرعت خارج شود و در هوا خشک گردد.

گزارش نتایج :

لام (با استفاده ازعدسی چشمی ۱۰ و عدسی شیئی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون و بدون استفاده از لامل) درزیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار می گیرد، تشخیص مثبت، شامل دیدن انگل لیشمانیا بطورواضح می باشد (شکل شماره ۵). درهرلام تا زمان مشاهده جسم لیشمن باید حداقل ۳۰ شان مناسب که دارای سلول های ماکروفاژ باشد، بررسی گردد تا شانس مشاهده انگل بیشترشود ودرصورت منفی بودن نمونه، لام دوم و یا سوم مورد بررسی قرارگیرد، شایان ذکراست که درصورت مشاهده گلبول قرمز فراوان و ندیدن جسم لیشمن، این نمونه مناسب ارزیابی نبوده و نمونه جدید عاری از خون و حاوی ماکروفاژ بایستی تهیه شود.

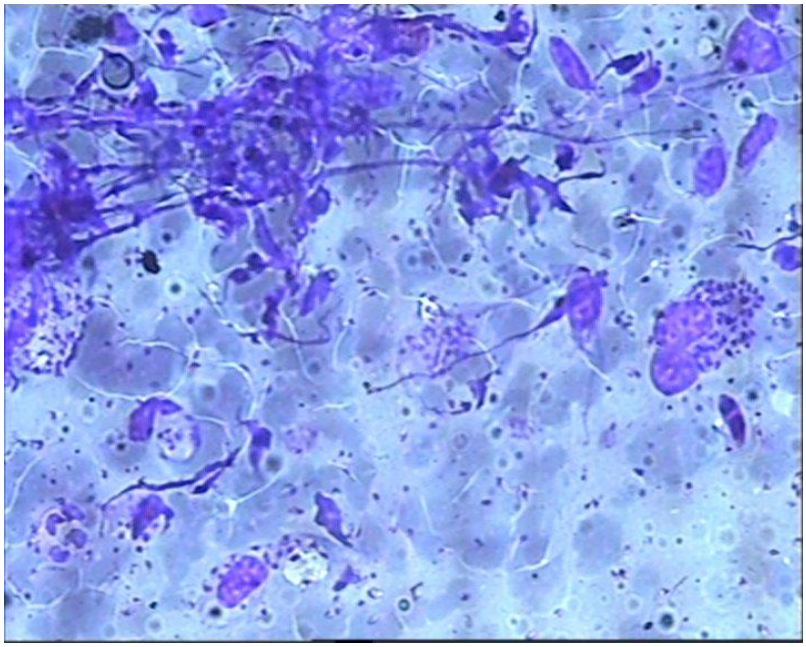
نحوه تهیه نمونه از ضایعات پوستی مشکوک به لیشمانیوز

شکل ۴: نحوه تهیه نمونه از ضایعات پوستی لیشمانیا



شکل ۵: آماستیگوت های مشاهده شده در ماکروفا ژ های ضایعات پوستی

جسم لیشمن



کشت نمونه :

درصورتی که سه نمونه گرفته شده منفی باشند ولی شواهد اپیدمیولوژیک و یا وجود سابقه قبلی ابتلا درهمان محل ضایعه، احتمال وجود بیماری را افزایش دهد، نمونه لازم برای کشت گرفته می شود و براساس نتایج آزمایشات تکمیلی، بیماری تشخیص داده خواهد شد.

روش تهیه محیط کشت دوفازی Novy-Mac Neal-Nicolle (NNN) :

محیط آگار غذایی :

باکتو آگار ۱۴ گرم

مک طعام ن (NaCl) ۶ گرم

آب مقطر ۹۰۰ میلی لیتر

آب را تا دمای جوش حرارت داده و نمک و آگار به مقدار ذکر شده به آن اضافه کنید. آنقدرمحلول را بجوشانید تا دانه های آگار حل شود، سپس این محلول را داخل لوله آزمایش درپیچ دار بریزید (حدود یک سوم حجم لوله)، درب آن را بسته وبا اتوکلاو(دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه) استریل نمائید. این لوله ها را میتوان تا زمان استفاده در یخچال نگهداری کرد.

هنگام استفاده، لوله را درآب جوش قرار داده تا محیط مایع شود، سپس تا حرارت ۴۰ تا ۵۰ درجه خنک کنید. به هر لوله حدود یک سوم حجم محیط۱۵٪ خون دفیبرینه خرگوش اضافه کنید، درب لوله را ببندید و بین دو کف دست بخوبی بچرخانید تا کاملا محتویات آن مخلوط شود، پس ازآن در درجه حرارت اطاق بصورت مایل (Slant) قرار دهید تا سفت شود، وآنگاه به یخچال (۴ تا ۸ درجه) منتقل نمائید، جهت اطمینان از آلوده نبودن؛ یکی از لوله ها را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.محیط تهیه شده تا ۴ هفته قابل استفاده می باشد و آماده انتقال نمونه است. بدین ترتیب فاز جامد محیط NNN تهیه می شود

(شکل شماره ۶) .

فاز مایع معمولا شامل سرم فیزیولوژی نرمال یا RPMI استریل می باشد که به فاز جامد اضافه می شودو برای ممانعت از رشد باکتریها از پنی سیلین و استرپتومایسین با غلظتهای ۱۰۰ IU/ml و ۱۰۰ g/ml اضافه می شوند. فاز مایع در هنگام کار به فاز جامد اضافه می شود و سطح شیبدار را می پوشاند نمونه های بیوپسی ضایعات، خون محیطی، مغزاستخوان، یا نمونه تهیه شده ازحاشیه ضایعات و حتی مواد آسپیره شده ازبستر ندول را می توان دراین محیط کشت داد. نمونه ها به عمق ۲ میلیمتری از انتهای سطح شیب دار وارد آگار مغذی می شوند، پس ازانتقال نمونه، محیط کشت را دردمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد (انکوباتور) نگهداری کنید. انگل ها درمایع جمع شده در قسمت شیب دارمحیط، رشد می کنند.

لوله ها ۲-۳ روز درمیان تا یک ماه مورد بررسی قرار می گیرند (در ارتباط با گونه انگل و شرایط کشت متفاوت می باشد) و درصورت عدم مشاهده انگل با میکروسکوپ فازکنتراست، کشت منفی درنظر گرفته می شود. اما اگر تعداد انگل کم باشد زمان بیشتری را برای رشد نیاز دارد. در صورت وجود آلودگی با باکتری ها و قارچها، انگل توانائی رشد در محیط را ندارد

(شکل شماره ۷) .

تذکر ۱: از آنجائیکه میزان آنتی بادی ایجاد شده در لیشمانیوز پوستی بسیار ناچیز است، لذا استفاده از آزمایشات سرولوژی به علت حساسیت پائین آن جهت تشخیص لیشمانیوز پوستی به جز در موارد خاص توصیه نمی شود.

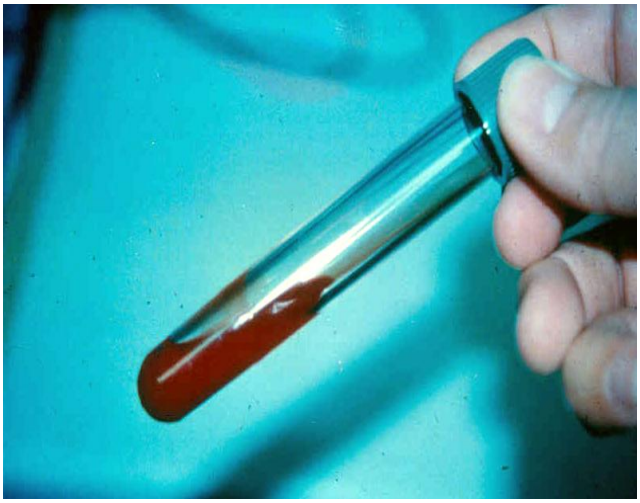
تذکر ۲: به علت افزایش حساسیت تاخیری (Delayed- Type Hypersensitivity) = DTH در لیشمانیوز نوع لوپوئید در مواردی که انگل لیشمانیا در ضایعات پوستی دیده نمی شود می توان از تست پوستی لیشمانین (تست مونته نگرو)، کشت و در صورت امکان آزمایش مولکولی PCR بمنظور تایید تشخیص آزمایشگاهی این شکل از بیماری استفاده نمود. ایندوراسیون(سفتی) ایجاد شده با میانگین اندازه ۵ میلی متر ویا بیشتر پس از گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت از تزریق لیشمانین به عنوان نتیجه مثبت تلقی می گردد.

مورد قطعی تشخیص لیشمانیوز پوستی (سالک) مشروط به موارد زیر است :

۱- دیدن انگل در گسترش تهیه شده از ضایعه پوستی.

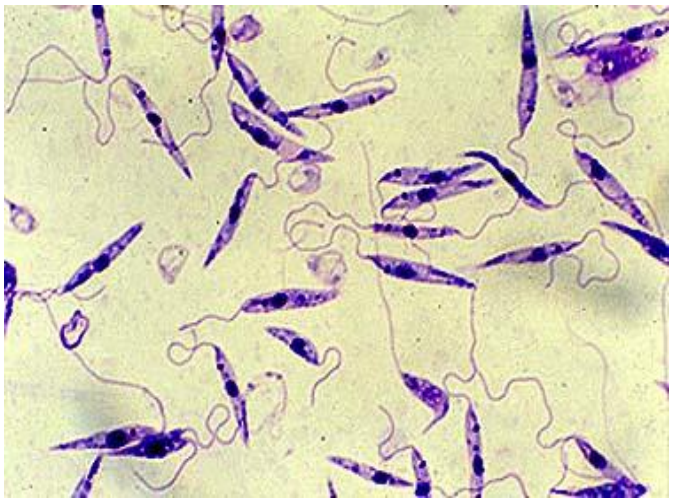
۲- کشت مثبت انگل یا نتیجه مثبت آزمایشات تخصصی دیگر (مانند PCR و ....) که در آزمایشگاههای تخصصی (رفرانس) انجام شده باشد.

محیط کشت NNN



شکل ۶: محیط کشتNNN

پروماستیگوت های لیشمانیا در محیط کشت NNN (درشتنمائی 400)



شکل ۷: پروماستیگوت های لیشمانیا در محیط کشتNNN

ب: لیشمانیوز احشائی(کالاآزار):

لیشمانیوز احشائی در اثر گونه هائی از مجموعه لیشمانیا دونووانی ایجاد می شود واز نظر اپیدمیولوژی به اشکال هندی، مدیترانه ای ؛ آفریقائی و آمریکائی مشاهده می شود. لیشمانیوز احشایی ایران که نوع مدیترانه ای می باشد یک بیماری زئونوز است که عامل آن لیشمانیا اینفانتوم می باشد و توسط پشه خاکی از سگ و سگ سانان به انسان منتقل میشود. تاکنون لیشمانیوز احشائی از تمامی استان های کشور گزارش شده است. بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک که تا کنون انجام شده است ؛ این بیماری درمناطقی از استان های اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر به شکل آندمیک وجود دارد.

روش انتقال:

مهمترین راه انتقال این بیماری از طریق گزش پشه خاکی های آلوده می باشد ولی مواردی از انتقال بیماری از طریق جفت از مادر به جنین، تماس جنسی، وسائل تزریقی آلوده و به طور نادر از طریق خون آلوده گزارش شده است.

علائم بالینی:

لیشمانیوز احشائی ممکن است به اشکال بدون علامت، تحت بالینی، علامت دار، سندرم پوستی پس از کالاآزار، اشکال احشائی تروپیکال و نیز اشکال بالینی آتیپیک در مبتلایان به بیماری ایدز مشاهده شود.

تشخیص آزمایشگاهی:

در حال حاضر معتبرترین روش تشخیصی انواع لیشمانیوزها، استفاده از روشهای انگل‌شناسی است و ارجح آن است که همهٔ موارد لیشمانیوز توسط مشاهدهٔ انگل تأیید گردند. از روشهای انگل‌شناسی به‌عنوان «استاندارد طلایی» برای ارزیابی دیگر روشهای تشخیصی نیز استفاده می‌شود. متأسفانه تهاجمی‌بودن روش نمونه‌برداری برای مطالعات انگل‌شناسی در مورد این بیماری ، استفاده از این روشها را تا حدود زیادی با محدودیت روبه‌رو ساخته است.

***۱ - نمونه‌برداری از ضایعات احشایی*وانجام آزمایش های انگل شناسی:**

برای مشاهدهٔ مستقیم اجسام لیشمن می‌توان از سیستم رتیکولوآندوتلیال خصوصاً از طحال، مغزاستخوان، کبد و غدد لنفاوی فرد بیمار نمونه‌برداری کرد. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت میزان حساسیت طحال برای مشاهدهٔ انگل لیشمانیا،۹۰ تا ۹۸٪، مغز استخوان ۵۴ تا ۸۶٪، کبد حدود ۶۰٪ و غدد

لنفاوی حدود ۶۴ ٪ است. علیرغم آنکه احتمال مشاهدهٔ آماستیگوت‌ها در نمونهٔ تهیه‌شده از طحال بیمار بسیار زیاد است ولی به‌علت خطرات و عوارض ناشی‌از نمونه‌برداری طحال، در حال حاضر در ایران، از نمونه‌های تهیه‌شده از مغزاستخوانهای ایلیاک، استرنوم و تیبیا استفاده می‌شود. حساسیت تشخیص انگل درنمونه‌های تهیه‌شده از مغزاستخوان به نحوهٔ نمونه‌برداری و تجربهٔ فرد آزمایش کننده بستگی دارد. با توجه به اینکه در برشهای هیستوپاتولوژی اجسام لیشمن تغییر شکل می دهند، استفاده از این روش برای تشخیص قطعی بیماری با محدویتهایی همراه است. گسترشهای تهیه‌شده راابتدا با متانول خالص به‌مدت ۰/۵ تا ۱ دقیقه ثابت نموده و سپس با رنگ گیمسا (۱۰٪) به‌مدت ۳۰ دقیقه آنها را رنگ‌آمیزی می نمایند. پس‌از شستشوی آنها با آب معمولی، با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگترین درشتنمایی (۱۰۰۰X) به جستجوی اجسام لیشمن می‌پردازند. اگر پروماستیگوت‌ها در شرایط استانداردکشت داده شوند، این روش حساسیت زیادی دارد، لذا توصیه می شود همراه با آزمایش مستقیم، کشت در محیط های اختصاصی خصوصا محیط NNN نیز انجام شود.

جهت کشت، مقداری از نمونه‌های تهیه‌شده را با رعایت کلیه شرایط آسپتیک به محیط کشت منتقل و در دمای ۲۴ـ ۱۸ درجه سانتیگراد نگهداری می‌کنند. با توجه به گونه لیشمانیا و خصوصیات محیط کشت مورد استفاده، پس‌از چند روز تا چند هفته شکل پروماستیگوت انگل در محیط رشد می‌کند. برای جلوگیری از تاثیر عوامل بازدارنده بر رشد انگل بهتر است مقدار کمی از نمونه(یک یا دو قطره) به محیط کشت منتقل شود. چنانچه پس‌از دوهفته پروماستیگوت در محیط کشت مشاهده نشد، توصیه می‌شود مجدداً یک پاساژکور انجام شود و چنانچه پس‌از دو هفتهٔ دیگر، انگلی در محیط کشت دیده‌نشد، نتیجه کشت منفی تلقی شود. برای جلوگیری ازآلودگیهای باکتریایی و قارچی استفاده از آنتی‌بیوتیکهای مناسب توصیه می شود.

۲- روش های سرولوژی:

در حال حاضر از روشهای سرولوژی به شکل گسترده جهت تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی استفاده می شود.

الف - روشهای سرولوژی اختصاصی

در روشهای سرولوژی اختصاصی به میزان کمی سرم یا پلاسمای خون (حدود ۱۰ میکرولیتر) نیاز است که آن را می‌توان به‌وسیله لانست از نوک انگشت و یا پاشنهٔ پای کودکان در لوله‌های میکروهماتوکریت تهیه کرد. روشهای مختلف سرولوژی برای جستجوی پادتن‌های اختصاصی بر علیه لیشمانیا استفاده شده است که از بین آنها با توجه به حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، کارایی، سهولت انجام آزمایش و صرفهٔ اقتصادی روشهای زیر پیشنهاد می

شوند. لازم به یادآوری است درآزمایشهای سرولوژی معمولاً از پروماستیگوت‌های کمپلکس *لیشمانیا دونووانی* خصوصا *لیشمانیا اینفانتوم* ، که در محیطهای کشت اختصاصی به تولید انبوه رسیده اند، به‌عنوان آنتی ژن استفاده می شود.

۱ -روش ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم (Indirect Fluorescent Antibody)=IFA

کاربرد

حساسیت و ویژگی این روش حدود۹۰٪ می باشد و در شرادط آزمایشگاهی مناسب است.

اصول آزمایش

در سرم فرد مبتلا به لیشمانیوز احشایی پادتن اختصاصی ایجاد می‌شود و این پادتن با پادگن لیشمانیا که به‌صورت دایره‌هایی به قطر یک سانتیمتر روی لام میکروسکوپی قرارداده شده است، مجموعه پادگن ـ پادتن ایجاد می‌کند. در صورت افزودن پادتن ضدگلوبولین انسانی که با مادۀ فلوئورسین ایزوتیوسیانات نشاندار شده است (کونژوگه)، مجموعۀ حاصله در زیر نور میکروسکوپ فلوئورسنت به رنگ سبز درخشان مشاهده می‌شود.

تفسیر آزمایش

تعیین عیار مرزی به نوع آنتی ژن تهیه‌شده، روش انجام آزمایش و حتی فرد قرائت‌کننده بستگی خواهد داشت و لذا نتایج حاصله در مراکز گوناگون ممکن است با یکدیگر قابل مقایسه نباشند. مطالعات انجام‌شده دردانشکدۀ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نشان داده‌اند که عیارهای ۱:۱۲۸ و بالاتر همراه با علایم اختصاصی لیشمانیوز احشایی می‌توانند نمایانگر بیماری لیشمانیوز احشائی باشند.

آزمایش IFA ممکن است با انگل ها ویا باکتری هایی مانندمالاریا، تریپانوزوما، سل و حصبه واکنش متقاطع داشته باشد و وجود عامل روماتوئید در خون و نیز پادتن‌های ضد هسته سلولها (لوپوس اریتماتوس سیستمیک) ممکن است باعث نتایج مثبت کاذب شوند.

جهت انجام IFA می توان از کیت های تهیه شده داخلی ویا خارجی مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت و مطابق دستور العمل های مربوطه استفاده نمود.

۲ - روش الایزا ELISA = (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

کاربرد

حساسیت این روش بین ۸۰ تا ۱۰۰٪ است ولی ویژگی آزمایش به فاکتور های زیادی از جمله نوع آنتی ژن مورد استفاده بستگی دارد.

اصول آزمایش

اصول این روش مشابه ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم است، با این تفاوت که از یک سیستم آنزیمی (آلکالن فسفاتاز و یا پراکسیداز) و سوبستراهای اختصاصی استفاده می‌شود.

در این روش از پلیت‌های ته‌صاف مخصوص الایزا استفاده می شود و ۱۰۰ میکرولیتر از پادگن تهیه‌شده در بافر پوشش‌دهنده (رقت ۱:۲۰۰) به هر چاهک می‌افزاییم و یک شب دردمای ۴ درجه سانتیگراد و در اتاقک مرطوب نگهداری می‌کنیم و پس‌از شستشو با بافر شستشو، هر پلیت را جداگانه در کاغذ آلومینیومی می‌پیچیم و پس‌از بسته‌بندی در کیسهٔ نایلونی در برودت ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان مصرف نگهداری می‌کنیم. پلیت‌های مذکور را معمولاً تا مدت ۶ ماه می‌توان مورد استفاده قرار داد.

جهت انجام ELISA می توان از کیت های تهیه شده داخلی ویا خارجی مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت و مطابق دستور العمل های مربوطه استفاده نمود. عیار های مرزی بر اساس دستورالعمل هر کیت و نیز برخی محاسبات آماری خاص در نظر گرفته می شود.

۳- آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم = DAT (Direct Agglutination Test)

کاربرد

آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم روشی ساده برای تشخیص لیشمانیوز احشایی می باشد و مطالعاتی که در مناطق بومی بیماری درایران و جهان انجام گرفته حساسیت این روش ۱۰۰- ۹۵ ٪ و ویژگی آن ۱۰۰- ۸۶٪ تعیین گردیده است.

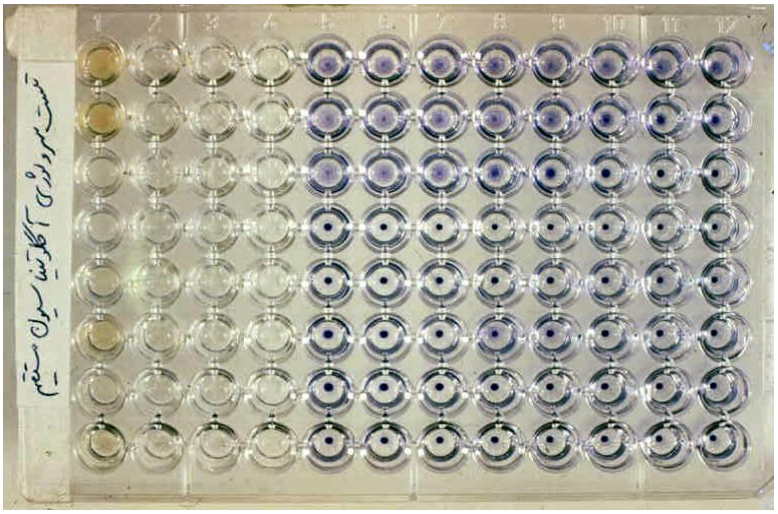
اصول آزمایش

در این روش از فرم تاژکدار انگلهای *لیشمانیا اینفانتوم* بعنوان آنتی ژن استفاده می‌شود. آنتی ژن در مجاورت رقتهای گوناگون سرم یا پلاسمای فرد مشکوک به بیماری قرار داده می‌شوند که در صورت وجود پادتن اختصاصی پدیدهٔ آگلوتیناسیون ایجاد می‌شود(شکل شماره ۸) .

تفسیر آزمایش

آخرین حفره‌ای که در آن حلقهٔ آبی کامل تشکیل شده باشد، به‌عنوان عیار نهایی در نظر گرفته می‌شود. طبق مطالعات فراوانی که در واحد تک‌یاخته‌شناسی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است، عیارهای ۱:۳۲۰۰ و به بالا همراه با علایم بالینی اختصاصی به‌عنوان ابتلای فرد به کالاآزار تلقی می‌شود. عیارهای ۱:۸۰۰ و به پایین منفی و عیار ۱:۱۶۰۰ به‌عنوان عیار مشکوک تلقی می‌شود که برای تأیید باید یک‌بار دیگر به فاصله۳ـ۲ هفته نمونه‌برداری انجام شود و چنانچه افزایش قابل توجه عیار پادتن ملاحظه شود و در صورت بروز علایم بالینی اختصاصی، بیماری کالاآزار تأیید می‌شود.

تذکر: از سال ۱۳۷۵ آنتی ژن آگلوتیناسیون مستقیم(DAT) به طور فعال در ازمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه می شود و به کمک مرکز مدیریت بیماری ها جهت تشخیص آزمایشگاهی و مطالعات سرواپیدمیولوژی در مناطق اندمیک لیشمانیوز احشائی مورد استفاده گسترده قرار می گیرد.



شکل شماره ۸ : نتایج آزمایش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم بر روی سرم خون افراد مشکوک به کالاآزار

با استفاده از آنتی ژن تهیه شده در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران.

رسوب نقطه ای آنتی ژن در ته چاهک های پلیت = منفی

باز شدن توری مانند آنتی ژن در چاهک های پلیت= مثبت

۳ -آزمایش سریع سرولوژی با استفاده از استریپ های تهیه شده از آنتی‌ژن نوترکیب rK39

از روش‌های سریع جستجوی آنتی‌بادی جهت تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشائی می‌توان به دیپ‌استیک‌های حاوی آنتی‌ژن نوترکیب rK39 اشاره نمود. از محاسن این روش‌ها سرعت انجام آزمایش است که معمولاً در مدت حدود ۲ تا ۱۰ دقیقه نتیجه آزمایش مشخص می‌گردد.

اخیراً کیت های مخصوصی از آنتی‌ژن نوترکیب rK39 توسط شرکت های مختلف ساخته شده است که با یک قطره سرم یا خون کامل و یک قطره بافر یا سرم فیزیولوژی آزمایش انجام می‌شوند.

مخلوط حاصله با استفاده از خاصیت کروماتوگرافی پس از برخورد با کونژوگه رنگی[1] به سمت بالا حرکت می‌کند و در صورت وجود آنتی‌بادی اختصاصی با آنتی‌ژن rK39 ایجاد کمپلکس رنگی می‌کند که به شکل یک خط بنفش رنگ دیده می‌شود. نمونه مورد نظر علی‌رغم نتیجه مثبت و یا منفی به سیر خود ادامه می‌دهد تا به ناحیه‌ای که بوسیله ضد پروتئین Aپوشانیده شده است برخورد نماید و ایجاد خط رنگی دیگری می‌نماید. این خط به عنوان خط شاهد در نظر گرفته می‌شود و وجود آن دلیل بر کافی بودن حجم نمونه وصحت انجام آزمایش است(شکل شماره ۹).از محاسن آزمایش Dipstick rK39 سرعت بالا و سادگی آزمایش است و جهت غربالگری لیشمانیوز احشائی علائم دار کاربرد دارد.

کیت Dipstick rK39 جهت تشخیص لیشمانیوز احشائی
بالا (مثبت)
پائین (منفی)

شکل ۹: نتایج روش Dipstick rK39 با نمونه های سرمی مثبت و منفی

ب) روشهای سرولوژی غیراختصاصی

این روشها بر پایهٔ افزایش ایمونوگلوبولین‌های سرم خون استوار است و به هر دلیلی که میزان پادتن در خون افزایش یابد، نتایج حاصل از این روشها مثبت خواهند شد، لذا به‌عنوان روشهای غیراختصاصی تلقی می‌شوند. یکی از مهمترین این روشها عبارتند از:

آزمایش فرمل ـ ژل یا ناپیرآلدئید

در این روش یک میلی‌لیتر از سرم را با یک قطره فرمالین تجارتی (۳۷٪) مخلوط می‌کنند. چنانچه پس‌از گذشت ۳ تا ۲۰ دقیقه سرم مورد نظرکدرشد و یا به‌شکل لخته درآمد، نتیجهٔ حاصله مثبت است و در غیر این صورت منفی تلقی می‌شود. این آزمایش غیراختصاصی است و به هر علت که پادتن‌های سرم افزایش یابند (مالاریا، حصبه، تب مالت و غیره) نتیجه این آزمون مثبت می‌شود.

در مناطق دورافتاده و بومی بیماری، در صورتی که آزمایشهای اختصاصی انگل‌شناسی و سرم‌شناسی امکانپذیر نباشد، از این آزمایش اختصاصی می‌توان استفاده کرد و در صورت وجود علایم بالینی و شواهد اپیدمیولوژیک، بیماررا می‌توان تحت درمان و مراقبت قرار داد. لوکوپنی همراه با افزایش نسبی مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌های خون محیطی را نیز می‌توان به‌عنوان یک روش غیراختصاصی برای تشخیص کالاآزار مد نظر قرار داد.

ج) روشهای مولکولی

در حال حاضر از روشهای مولکولی خصوصاً PCR برای تعیین گونهٔ انگلهای لیشمانیا استفاده می‌شود. در سالهای اخیر از روشهای PCR، PCR-ELISA و Rapid fluorogenic PCR برای تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوزها استفاده شده است که اکثراً نتایج مطلوبی به‌همراه داشته‌اند.

در حال حاضر روشهای مولکولی برای تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز بیشتر جنبه پژوهشی دارند.

تشخیص لیشمانیوز احشایی در مبتلایان به ایدز

لیشمانیوز احشایی به‌عنوان یک عفونت فرصت‌طلب مهم در میان افراد آلوده به HIV-1 به‌شمار می‌رود. مطالعات اخیر نشان می‌دهند تعداد سلولهای CD4 در ۹۰٪ مبتلایان کمتر از ۲۰۰ عدد در هر میکرولیتر خون است. پادتن ضد لیشمانیا ممکن است در این بیماران، قابل ردیابی نباشد، به‌خصوص اگر ابتلا به بیماری ایدزپیش‌از ابتلای فرد به لیشمانیوز ایجاد شده باشد.

روشهای سرولوژی اختصاصی در بیماران با عفونت همزمان لیشمانیوز و ایدز، نسبت به بیماران با سیستم ایمنی سالم حساسیت پایین تری دارد.(حساسیت این روش ها در این بیماران حدود ۵۰٪ می باشد در صورتی که حساسیت این روش ها در بیمارانی که به عفونت HIVمبتلا نیستند، بیش از ۹۰٪می باشد).

اصولاً جستجوی آنتی‌ژن جهت تشخیص لیشمانیوز احشائی خصوصا در **مبتلایان به ایدز** بسیار اختصاصی‌تر از جستجوی آنتی‌بادی است . یکی از روش‌های سریع جهت جستجوی آنتی‌ژن لیشمانیا روش کاتکس (KAtex) است . آنتی‌ژن هدف در این روش مولکول کربوهیدراتی است (۲۰KDa–۵) که جزئی از ساختمان دیواره پروماستیگوت و آماستیگوت انگل است .

در حال حاضر کیت تجاری توسط شرکت Kalon Biological ,UK با نام KAtex ساخته شده است.جهت انجام آزمایش، نمونه ادرار فرد مشکوک به لیشمانیوز احشائی را برای حذف موادی که باعث نتایج مثبت کاذب می‌شوند به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده و پس از سرد شدن یک قطره (۵۰ میکرولیتر) از آن را با یک قطره لاتکس مخلوط نموده که در صورت مثبت بودن نتیجه، واکنش آگلوتیناسیون پس از دو دقیقه ایجاد می‌شود که با چشم غیرمسلح قابل رؤیت است.

تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی در مبتلایان به ایدز از طریق انگل‌شناسی به‌کمک نمونه‌برداریهای غیر تهاجمی مانند آزمایش خون محیطی بیماران، آسان تر و حساس تر است. انگلهای لیشمانیا در این‌گونه بیماران معمولا در سیتوپلاسم مونوسیت‌های خون یافت می‌شوند. در گسترش خون محیطی رنگ‌شده با گیمسا حدود ۵۰٪ و در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده و یا کشت‌شده بافی‌کوت حدود ۷۰ تا

۷۵٪ موارد ممکن است انگلهای لیشمانیا مشاهده شوند. روشهای تهاجمی تشخیص انگل از قبیل پونکسیون مغز استخوان در این قبیل افراد از حساسیت بسیار بالایی برخوردار است، زیرا بار انگلی در این بیماران بسیار بالاست.

منابع:

۱ -دکتر مهدی محبعلی"روش های تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز ها در انسان" در کتاب انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها تالیف دکتر ابوالحسن ندیم؛ دکتر عزت الدین جوادیان؛ دکتر مهدی محبعلی ؛ دکتر علی ضامن مومنی . انتشارات مرکز نشر دانشگاهی؛ تحریر سوم؛ سال ۱۳۸۷.

۲ -دکتر مهدی محبعلی"تاژکداران خون و نسج" در کتاب " تک یاخته شناسی پزشکی تالیف دکتر غلامحسین ادریسیان؛دکتر مصطفی رضائیان؛ دکتر مهدی قربانی؛ دکتر حسین کشاورز و دکتر مهدی محبعلی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران؛ چاپ اول؛ سال ۱۳۸۶.

۳- World Health Organization. *Control of leishmaniasis*, Technical report series 793 of WHO Expert Committee, Geneva. 1990.

کمیته انگل شناسی آزمایشگاه مرجع سلامت

اداره مدیریت آزمایشگاههای بهداشتی