ارزیابی روش سرولوژی الیزا با استفاده از آنتی‌ژن فیگوره در تشخیص آزمایشگاهی عفونت لیشمانیای احشایی سگ

دکتر مهدی محبعلی[1] دکتر اسماعیل فلاح[2] دکتر شهرام جمشیدی[3] هما حجاران[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ٥٦، شماره۳، ۳۲- ۲۹ (۱۳۸۰)

در این بررسی تعداد ۱۶ قلاده سگ از مناطق اطراف تهران جمع آوری شده و به مدت ۱۲ ماه در قفسهای جداگانه در بیمارستان دامهای کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری گردیدند. قبل از شروع مطالعه تمامی سگهای مورد مطالعه خونگیری شدند و به روشهای ELISA و IFA مورد آزمایش قرار گرفتند که همگی فاقد آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه لیشمانیا بودند. سپس تمامی سگها به شکل تصادفی به دو گروه ۸ تایی تقسیم شده و حدود ۲/۵ میلیون پروماستیگوت زنده و فعال لیشمانیا اینفانتوم (MCAN/IR/94/Mohebl) به داخل صفاق سگهای گروه اول تلقیح شدند و از ۱ ماه پس از تلقیح تا ۵ ماه به طور منظم ماهی یک مرتبه سرمهای سگهای هر دو گروه با استفاده از روشهای سرولوژی ELISA و IFA مورد آزمایش قرار گرفتند. هفت ماه پس از تلقیح (Challenge) سگهای هر دو گروه تحت مداخله و کنترل کالبدگشایی شده و با استفاده از روشهایانگل شناسی و سرولوژی مورد آزمایش قرار گرفتند. هر ۸ قلاده سگ گروه اول که در آزمایش سرولوژی ELISA مثبت تشخیص داده شده بودند، در آزمایشهای انگل شناسی (مستقیم و کشت) نیز دارای نتایج مثبت بودند ولی تمامی سگهای گروه کنترل که فاقد آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه لیشمانیا بودند با استفاده از آزمایشهای انگل‌شناسی، انگل لیشمانیا دیده نشد. لازم به ذکر است فقط یک قلاده از سگهای عفونت یافته، دارای علایم بالینی شامل ضایعات جلدی و لنفودنوپاتی بود و سگهای گروه کنترل از نظر بالینی هیچ‌گونه علایمی نداشتند.

واژه‌های کلیدی: عفونت لیشمانیای احشایی، سگ، الیزا.

لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) یکی از بیماریهای عفونی - انگلی سیستمیک است که از نظر بهداشتی دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. حداقل سه تیپ هندی، آفریقایی و مدیترانه‌ای برای این بیماری تعریف شده است (۱۲). نوع مدیترانه‌ای لیشمانیوز احشایی دارای انتشار جهانی وسیعی بوده که عامل آن لیشمانیا اینفانتوم (Leishmania infantum) و مخازن اصلی آن را سگ و سگ‌سانان (سگ، روباه و شغال) تشکیل می‌دهند (۱۲). براساس مطالعات انجام شده در ایران، سگها مهمترین منبع لیشمانیوز احشایی خصوصاً در مناطق اندمیک این بیماری، برای انسان به شمار می‌روند (۳و۱). علاوه بر آن لیشمانیوز احشایی در سگها به اشکال حاد، تحت حاد، مزمن و در موارد زیادی بدون علایم بالینی بروز می‌یابند که در اکثر موارد منجر به مرگ حیوان مبتلا می‌شود. (۱۱). استفاده از روشهای سرولوژی معتبر در شناسایی به موقع عفونت احشایی لیشمانیا در سگها دارای اهمیت فراوانی است (۵،۷،۹،۱۱). روش ELISA یکی از این قبیل روشهای سرولوژی است که حساسیت و ویژگی بالایی برای آن گزارش گردیده است و جهت تشخیص سرولوژیک لیشمانیوز احشایی انسان در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی مورد استفاده قرار گرفته است (۷و۴).

در اکثر این مطالعات از آنتی‌ژن محلول لیشمانیا جهت انجام آزمایش ELISA استفاده شده است که با وجود آنکه از حساسیت و ویژگی قابل توجهی برخوردار بوده‌اند ولی تهیه این نوع آنتی‌ژن دشوار و به تعداد بیشتری انگل نیاز است (6×10^8 پروماستیگوت در هر میلی‌لیتر محیط کشت). در سالهای اخیر از آنتی‌ژن فیگوره (Intact) جهت تشخیص لیشمانیوز احشایی انسان استفاده شده است که علاوه بر آن که تهیه آن آسانتر است و به تعداد کمتری انگل نیاز است (10^8 پروماستیگوت در هر میلی لیتر محیط کشت) از حساسیت و ویژگی مشابهی نیز برخوردار بوده است (۸و۶).

در این مطالعه از روش الیزا و با استفاده از آنتی‌ژن فیگوره Intact جهت تشخیص عفونت لیشمانیا اینفانتوم در سگهایی که به طور تجربی آلوده شده بودند استفاده شده است که نتایج حاصله به وسیله یافته‌های پارازیتولوژی مورد تایید قرار گرفته‌اند.

مواد و روش کار

الف. تهیه آنتی‌ژن فیگوره لیشمانیا (۸و۶): آنتی‌ژن مورد نیاز جهت انجام آزمایش الیزا در آزمایشگاه لیشمانیوز واحد تک یاخته‌شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی و براساس روش (El-Amin 1985) تهیه گردید. ابتدا سویه Lieshmania infantum LON49 که از یک قلاده سگ مبتلا به لیشمانیوز احشایی در شهرستان کردان از توابع ساوجبلاغ کرج جدا گردیده بود و در آزمایشگاه لیشمانیوز نگهداری می‌شد در محیط دی‌فازیک NNN + LIT و سپس محیط مونوفازیک RPMI 1640 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو کشت گردید. پس از سانتریفوژ کردن و سه مرتبه شستشو با محلول فسفات بافر PBS، معادل حجم رسوب تهیه شده به آن فرمالین ۲ درصد در PBS اضافه شد. سوسپانسیون حاصله به مدت یک ساعت در حرارت آزمایشگاه نگهداری شده و پس از شستشو به روش فوق، سه مرتبه با بافر کربنات بیکربنات (pH=۹/۶) سانتریفوژ گردید. آنگاه با اضافه نمودن بافر کربنات بیکربنات به رسوب حاصل تعداد پروماستیگوت‌ها به صد میلیون در هر میلی‌لیتر رسانده شدند. جهت پوشینه آنتی‌ژن Coating به پلیتها، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون انگلی تهیه شده به هر یک از حفرات پلیتهای پلی‌استیرن ساخت Dynateck laboratory اضافه شده و به مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سانتیگراد در داخل اطاقک مرطوب نگهداری شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت پلیتهای مذکور سه مرتبه با محلول PBS-T شستشو شده، پس از آبگیری توسط کاغذ خشک‌کن، هر پلیت به طور جداگانه در فویل آلومینیومی پیچیده شده، و بعد از ثبت مشخصات و بسته‌بندی در کسیه‌های نایلونی، تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

ب. جمعیت تحت مطالعه: تعداد ۱۶ قلاده سگ نژادهای مخلوط از مناطق اطراف تهران جمع آوری شده و در بیمارستان دامهای کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در قفسهای جداگانه به مدت ۱۲ ماه نگهداری گردیدند. ابتدا از همه سگهای تحت مطالعه خونگیری شد و سرم آنها به روشهای ELISA و IFA مورد آزمایش قرار گرفتند که همگی فاقد آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه لیشمانیا بودند. سپس سگها به شکل تصادفی به دو گروه ۸ تایی تقسیم شده و حدود ۲/۵ میلیون پروماستیگوت زنده و فعال لیشمانیا اینفانتوم MCAN/IR/94/Mohebl به داخل صفاق هر یک از سگهای گروه اول تلقیح گردید و از یک ماه پس از تلقیح تا ۵ ماه به طور منظم هر ماه یکبار از سگهای هر دو گروه خونگیری شده و به روشهای سرولوژی فوق مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از گذشت ۷ ماه از تلقیح Challenge ، تمامی سگهای گروههای تحت مداخله و کنترل پس از انجام

۱) دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، تهران - ایران.

۲) دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، تبریز - ایران.

۳) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

معاینات بالینی کالبدگشایی شده و به روشهای پارازیتولوژی (آزمایش مستقیم و کشت) و سرولوژی (ELISA و IFA) مورد آزمایش قرار گرفتند.

ج. روشهای انجام ELISA: آزمایش ELISA به روش (Ho et al. 1983) انجام گردید. در این مطالعه از کونژوگه Anti-dog IgG Alkalin Phosphatase ساخت شرکت Sigma استفاده شد که بنا به دستور کارخانه سازنده به میزان ۱:۲۰۰۰ رقیق گردید. سوبسترای مصرفی در این مطالعه PNPP (P-Nitrophenyl Posphate) ساخت کارخانه (Sigma) بوده است. نتایج حاصله توسط دستگاه ELISA Reader ساخت شرکت Labsystem هلند و در طول موج ۴۰۵nm قرائت گردید. جهت تفکیک سرمهای مثبت از منفی، میانگین چگالی نوری (Optical Density = OD) نمونه‌های سرمی تعدادی از سگهای سالم مناطق غیر اندمیک لیشمانیوز احشایی را به دست آورده (X) و با دو انحراف معیار (2SD) جمع گردید و عدد به دست آمده به عنوان Cut off در نظر گرفته شد و لذا در این مطالعه OD ≤۰/۰۳۵ به عنوان نمونه مثبت تلقی گردید.

آزمایش ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم به روش Manciani, 1988 و با استفاده از آنتی‌ژن فیگوره لیشمانیای مورد استفاده در آزمایش ELISA انجام شد و با استفاده از میانگین هندسی عکس عیارهای آنتی‌بادی ضدلیشمانیا (GMRT) عیارهای ۸۰ :۱≤ مثبت در نظر گرفته شدند.

نتایج

در این مطالعه، ۱۶ قلاده سگ که سن آنها از ۷ تا ۳۰ ماه متغیر بود مورد استفاده قرار گرفتند. ۵ قلاده (۳۱/۲٪) از این سگها نر و ۱۱ قلاده (۶۸/۸٪) ماده بودند. نتایج آزمایشهای سرولوژی ELISA و IFA قبل و پس از تلقیح انگل Challange در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. چنانچه در این جداول مشاهده می‌شود، سگهای مورد بررسی قبل از Challange فاقد آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه لیشمانیا بودند، در حالی‌که در زمانهای پس از تلقیح میزان قابل توجهی از آنتی‌بادیهای ضد لیشمانیا، به خصوص در روش ELISA اندازه‌گیری گردید.

تمام سگهای تحت مداخله بعد از ۷ ماه از نظر تستهای سرولوژی ELISA و IFA و همچنین از نظر وجود جسم لیشمن در آزمایش مستقیم محیطهای کشت مثبت شدند. در سگهای کنترل بعد از گذشت ۷ ماه فقط دو مورد مثبت با تست IFA و با عیارهای ۱:۳۲۰ و ۱:۱۶۰ دیده شد و همگی آنها با استفاده از روشهای ELISA و پارازیتولوژی (مستقیم و کشت) منفی تشخیص داده شدند.

بحث

با توجه به اهمیتی که لیشمانیوز احشایی سگ (CVL) در دامپزشکی و بهداشت عمومی دارد و از آنجایی‌که بیش از نیمی از سگهای مبتلا به عفونت لیشمانیایی فاقد علایم بالینی هستند (۱۱و۱۰) لذا تشخیص سریع و دقیق لیشمانیوز احشایی در سگهای صاحبدار دارای اهمیت فراوانی است. علی‌رغم آنکه روشهای انگل‌شناسی هنوز به عنوان قاطعترین وسیله تشخیص لیشمانیوز احشایی مطرح‌اند ولی این روشها به خصوص در زمانی که حیوان مبتلا فاقد علایم بالینی بوده و بار (Load) انگلی در آن کم است از حساسیت پایینی برخوردارند (۱۲) و انجام آنها به خصوص در شرایط صحرایی بسیار دشوار است. اندازه‌گیری آنتی‌بادیهای اختصاصی لیشمانیا خصوصاً IgG در جریان گردش عمومی خون با استفاده از تکنیکهای سرولوژی معتبر به عنوان روش اساسی جهت تشخیص آزمایشگاهی و غربالگری عفونت لیشمانیای احشایی مطرح است (۲،۳،۸،۱۱) تاکنون از روشهای سرولوژی فراوانی به منظور فوق استفاده شده است که در بین آنها روشهای IFA، DAT و ELISA کاربرد بیشتری دارند. علی‌رغم آنکه روشهای DAT و IFA از حساسیت و ویژگی قابل توجهی در تشخیص لیشمانیوز احشایی برخوردارند ولی به علت نیاز به میکروسکوپ ایمونوفلئورسانس و متغیر بودن نتایج در IFA و نیز مشکلات تهیه آنتی‌ژن در DAT، استفاده از روش ELISA می‌تواند بسیار مفید باشد. مطالعات مختلف میزان اعتبار روش ELISA را در تشخیص لیشمانیوز احشایی انسان از ۸۰ تا ۱۰۰درصد گزارش نموده‌اند (۴،۶،۷،۸،۱۱).

از آن جایی‌که به راحتی می‌توان از ELISA در شرایط آزمایشگاهی و در

جدول ۱- نتایج سرولوژی سگهای تلقیح شده با پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم و مقایسه آنها با سگهای گروه کنترل به روش الیزا (ELISA)

گروهها	شماره سگهای تحت بررسی	نتایج آزمایشهای ELISA قبل از تلقیح		نتایج آزمایش ELISA در زمانهای مختلف پس از تلقیح پروماستیگوتهای لیشمانیا اینفانتوم											
				یکماه		دو ماه		سه ماه		چهار ماه		هفت ماه	
		OD	نتیجه	OD	نتیجه	OD	نتیجه	OD	نتیجه	OD	نتیجه	OD	نتیجه
تحت مداخله	۱	٪۱۵	(-)	۰/۰۰۳	(-)	۰/۰۳	(-)	۰/۰۵	(+)	۰/۲۸۹	(+)	۰/۳	(+)
	۲	۰/۰۱۲	(-)	۰/۰۰۲	(-)	۰/۰۲	(-)	۰/۰۶	(+)	۰/۷۹	(+)	۰/۵۴۱	(+)
	۳	۰/۰۳۱	(-)	۰/۰۱۲	(-)	۰/۰۲۱	(-)	۰/۰۷	(+)	۰/۰۹	(+)	۰/۳۲۳	(+)
	۴	۰/۰۲	(-)	۰/۰۰۶	(-)	۰/۰۳۰	(-)	۰/۰۴۴	(+)	۰/۰۷۶	(+)	۰/۴۴۶	(+)
	۵	۰/۰۱۳	(-)	۰/۰۰۵	(-)	۰/۰۰۵	(-)	۰/۰۳۷	(+)	۰/۶۷	(+)	۰/۴۳۷	(+)
	۶	۰/۰۰۷	(-)	۰/۰۲۲	(-)	۰/۰۰۳	(-)	۰/۰۴۸	(+)	۰/۳۰۰	(+)	۰/۴۱۴	(+)
	۷	۰/۰۱۲	(-)	۰/۰۰۲	(-)	۰/۰۰۵	(-)	۰/۰۳۶	(+)	۰/۱۱۳	(+)	۰/۴۹۴	(+)
	۸	۰/۰۱۶	(-)	۰/۰۲	(-)	۰/۰۵۷	(+)	۰/۰۴۳	(+)	۰/۱۸۱	(+)	۰/۳۲۷	(+)
میانگین OD		۰/۰۱۵		۰/۰۰۹		۰/۰۸۵		۰/۰۴۸		۰/۳۱۳		۰/۴۱۰	
کنترل	۱	۰/۰۱۷	(-)	۰/۰۱۶	(-)	۰/۰۱۷	(-)	۰/۰۲۵	(-)	۰/۰۳	(-)	۰/۰۰۹	(-)
	۲	۰/۰۲۶	(-)	۰/۰۰۷	(-)	۰/۰۲۴	(-)	۰/۰۰۷	(-)	۰/۰۰۸	(-)	۰/۰۱۹	(-)
	۳	۰/۰۱۱	(-)	۰/۰۰۸	(-)	۰/۰۵	(-)	۰/۰۰۸	(-)	۰/۰۰۹	(-)	۰/۰۱۳	(-)
	۴	۰/۰۰۴	(-)	۰/۰۱۱	(-)	۰/۰۳	(-)	۰/۰۰۶	(-)	۰/۰۱۲	(-)	۰/۰۱۱	(-)
	۵	۰/۰۲۸	(-)	۰/۰۰۸	(-)	۰/۰۰۷	(-)	۰/۰۳۲	(-)	۰/۰۰۸	(-)	۰/۰۱۲	(-)
	۶	۰/۰۰۵	(-)	۰/۰۱۶	(-)	۰/۰۱۵	(-)	۰/۰۱۹	(-)	۰/۰۱۰	(-)	۰/۰۲۲	(-)
	۷	۰/۰۲۹	(-)	۰/۰۳۷	(-)	۰/۰۲۵	(-)	۰/۰۲۸	(-)	۰/۰۲۹	(-)	۰/۰۲۸	(-)
	۸	۰/۰۱۰	(-)	۰/۰۰۲	(-)	۰/۰۱۳	(-)	۰/۰۰۳	(-)	۰/۰۰۴	(-)	۰/۰۰۳	(-)
میانگین OD		۰/۰۱۶		۰/۰۱۳		۰/۰۲۲		۰/۰۱۶		۰/۰۱۳		۰/۰۱۴	

با توجه به آنکه در جامعه نرمال ۰/۰۱۸۶ = $\bar{x}$ و ۰/۰۰۸۵ = SD و ۰/۰۳۵ = $\bar{x}$ + 2SD محاسبه گردید لذا ۰/۰۳۵ ≤ OD مثبت در نظر گرفته شده است.

جدول ۲- نتایج سرولوژی سگهای تلقیح شده با پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم و مقایسه آنها با سگهای گروه کنترل به روش IFA

گروهها	شماره سگهای تحت بررسی	نتایج آزمایشهای IFA قبل از تلقیح		نتایج آزمایش IFA در زمانهای مختلف پس از تلقیح پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم											
				یکماه		دو ماه		سه ماه		چهار ماه		هفت ماه	
		عیار	نتیجه	عیار	نتیجه	عیار	نتیجه	عیار	نتیجه	عیار	نتیجه	عیار	نتیجه
تحت مداخله	۱	۱:۱۰	(-)	۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۳۲۰	(+)	۱:۶۴۰	(+)
	۲	۱:۱۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۸۰	(+)	۱:۱۶۰	(+)	۱:۲۵۶۰	(+)
	۳	۱:۱۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۸۰	(+)	۱:۱۶۰	(+)	۱:۳۲۰	(+)
	۴	۱:۲۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۸۰	(+)	۱:۸۰	(+)	۱:۱۲۸۰	(+)
	۵	۱:۱۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۱۶۰	(+)	۱:۱۲۸۰	(+)	۱:۶۴۰	(+)
	۶	۱:۱۰	(-)	۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۱۶۰	(+)	۱:۶۴۰	(+)	۱:۱۲۸۰	(+)
	۷	۰	(-)	۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۸۰	(+)	۱:۱۶۰	(+)	۱:۲۵۶۰	(+)
	۸	۱:۱۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۳۲۰	(+)	۱:۳۲۰	(+)	۱:۳۲۰	(+)
میانگین هندسی عکس آنتی‌بادی		۸/۱		۴/۶		۲۳/۷		۴۳/۴		۲۶۶		۸۹۱/۲	
کنترل	۱	۱:۲۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۴۰	(+)	۱:۲۰	(+)
	۲	۱:۱۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۴۰	(+)	۱:۳۲	(+)
	۳	۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۴۰	(+)	۱:۱۴۰	(-)
	۴	۱:۱۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۴۰	(+)	۱:۴۰	(+)
	۵	۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۴۰	(+)	۱:۴۰	(+)
	۶	۰	(-)	۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۴۰	(+)	۱:۲۰	(-)
	۷	۱:۱۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۴۰	(-)	۱:۱۶۰	(+)	۱:۸۰	(+)	۱:۱۶۰	(+)
	۸	۰	(-)	۱:۱۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۲۰	(-)	۱:۴۰	(+)	۱:۲۰	(-)
میانگین هندسی عکس آنتی‌بادی		۳/۴		۱۸/۲		۱۹/۴		۳۶/۵		۴۳/۴		۴۴/۷	

عیار آنتی‌بادی ۱:۸۰ ≤ مثبت تلقی شده است.

مواردی صحرایی استفاده نمود و در مدت کوتاه تعداد قابل توجهی از نمونه‌های سرمی حیوانات مشکوک را مورد آزمایش قرار داد و نتایج حاصل حتی با چشم غیر مسلح نیز قرائت می‌گردند لذا در این بررسی آزمایش ELISA با استفاده از پروماستیگوتهای فیگوره لیشمانیا اینفانتوم که تهیه آن به مراتب ساده‌تر از آنتی‌ژن محلول توصیه شده است، جهت تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی تجربی سگها مورد ارزیابی قرار گرفت که با نتایج انگل شناسی به عنوان آزمایش مبنا همخوانی کاملی مشاهده می‌گردد.

در این مطالعه میزان حساسیت و ویژگی روش ELISA، ۱۰۰ درصد تعیین شده است در حالی‌که در روش IFA میزان حساسیت ۱۰۰ در صد و میزان ویژگی ۸۰ درصد بوده است.

با توجه به همخوانی کامل بین روشهای پارازیتولوژی به عنوان روش مبنا و روش ELISA، می‌توان از ELISA و با استفاده از آنتی‌ژن فیگوره لیشمانیا اینفانتوم به شکل گسترده جهت غربالگری و تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی سگها استفاده نمود. تعیین Cut off صحیح و استفاده از کونژوگه و سوبسترای مطمئن در کاربرد ELISA بسیار مهم و تعیین کننده می‌باشند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از ریاست محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جناب آقای دکتر سید حسین حسینی و ریاست محترم بیمارستان دامهای کوچک جناب آقای دکتر محمد علی راد و پرسنل محترم آن واحد که نهایت همکاری را جهت انجام این مطالعه مبذول داشته‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از اساتید محترم جناب آقای دکتر ادریسیان، جناب آقای دکتر کشاورزی و همکاران محترم واحد سرولوژی بیماریهای تک‌یاخته‌ای واحد تک‌یاخته شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی خانمها سرکیسیان، گروسی و مهاجری که در اجرای این طرح مساعدتهای لازم را داشته‌اند تشکر می‌شود.

این طرح تحقیقاتی با پشتیبانی مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا گردید که بدین وسیله از مساعدت آن معاونت محترم تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

۱. محیطی، م. بهمن رخ، م. موسوی‌فر، الف. ح. (۱۳۷۶): مطالعه انگل‌شناسی و هیستوپاتولوژی لیشمانیوز احشایی در تعدادی از سگهای شهرستان مشکین‌شهر. پژوهش و سازندگی، شماره ۳۷، سال دهم، جلد چهارم، صفحات ۱۲۵- ۱۲۲.

2. Bokaei, S. Mobedi, I. Edrissian, Gh, H. Nadim, A. (1998): Seroepidomiological study of canine visceral leishmaniasis in Meshkin – Shahr, North-west of Iran. Arch. Inst. Razi, 48-49, 41-46.

3. Edrissian, Gh. H. Nadim, A. Alborzi, A. V. Ardehali, S. (1999): Visceral leishmaniasis, The Iranian experience, Arch. Irn, Med. 1 (1): 22-26.

4. Edrissian, Gh. H. Darabian, p. A. (1979): Comparison of enzyme linked immunosorbent assay and indirect fiuorescen antibody test in serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 73: 289-292.

5. Edrissian, Gh. H. Darabian, p. Zovein; Z. (1981): Application of the indirect fluorescent antibody in the serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran Ann. Trop. Med. Parasitol. 75: 19-24.

6. EL. Amin RAM, Wright, EP. (1985): Elisa using intact promastigotes for immuno-diagnosis of Kala-azar. Trans.

R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 344-350.

7. Ho-M. Leeuwenburg, J. Mbugu, G. (1993): An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32 (5): (5): 973-976.
8. Khorshidian, S. Hajjaran, H. Sarkissian, M. T. Edrissian, Gh. H. (1994): Evaluation of ELISA, using intact promastigotes as antigen, for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Irn. J. Med. Sci. 19 (1,2), 15-18.
9. Manciani, F. Meciani, N. (1988): Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, Indirect haemoagglutination and counter- immunoelectrophoresis. Am. J. Vet. Res. 49: 1409-1411.
10. Molina, R. Amela, C. Niet, J. San-Andres, M. (1994): Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to clonized phlebotomus perniciosus. Tran. R. Soc. Med. Hyg. 88: 491-493.
11. Saul, J. Semiao, S. (1996): Canine visceral leishmaniasis in Evora district. Portogal: A sero-epidemiological study. ACP, Academic Pres BV. Amesterdam Publication. 9-74.
12. Technical Report of WHO, (1990): Control of the leishmaniases. No 793, 27-32.

Evaluation of ELISA, using intact promstigotes of *leishmania infantum* as antigen, for immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis

Mohebali, M.[1] Fallah, E.[2] Jamshidi, Sh.[3] Hajjarran, H.[1]

[1]*School of Public Health, University of Tehran Medical Sciences, Tehran – Iran.* [2]*Medical Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz - Iran.* [3]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran.*

Sixteen seronegative dogs were randomly divided into two groups. All of the 8 dogs of group 1 recived an intraperitoneal challenge of 2.5 10^6 infective promastigotes of *L. infantum* (MCAN/IR/94/Moheb 1). All dogs of Group 1 and group 2 were tested from 1 to 5 month after challenge by ELISA and IFA techniques for detecting anti-leishmania antibodies. Necropsy was performed on all dogs to investigate for parasites. A complete correlation was observed between ELISA and parasitological procedures.

Key words: Canine visceral leishmaniasis, ELISA, Immunodiagnosis.