

ارزیابی دوروش الایزای نیمه کمی خانگی و کیفی تجاری در تشخیص لپتوسپیروز

دکتر حمیدرضا هنرمند* - دکتر سعید اشراقی** - دکتر محمدرضا خرمی زاده*** - دکتر فریبرز منصور قناعی****

Dr Rudy Hareskeerl *****

* استادیار دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات سلولی-ملکولی

**دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

***استاد یار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

****دانشیار گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات بیماری های گوارشی و کبد

***** مرکز تحقیقات بیماری های گرمسیری و موسسه KIT، هلند

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۹/۲۸

تاریخ پذیرش: ۸۴/۷/۲۰

مقدمه

بعدی (حیوان یا انسان) وارد شوند. انتقال باکتری از راه مخاط تنفسی با آئروسول های آلوده و نیز از طریق ملتحمه امکان پذیر است (۷،۵ و ۸). انسان میزبان تصادفی این باکتری است (۷). در ایران لپتوسپیروز انسانی در مناطق ساحلی شمال کشور که آب و هوای معتدل و مرطوب دارد شایع و در استان گیلان اندمیک است. این بیماری بطور عمده در کشاورزان شالیکار و در فصول گرم سال شیوع دارد. تشخیص لپتوسپیروز با اتکا بر علائم بالینی مشکل است و الیزا می تواند به عنوان روش

لپتوسپیروز شایع ترین بیماری مشترک انسان و حیوان در جهان است که در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدله مرطوب شیوع بیشتری دارد و در اغلب این مناطق نیز اندمیک است (۳-۱). چهارپایان اهلی و وحشی و جوندگان، مخزن این بیماری هستند. این حیوانات پس از ابتلا معمولاً تا آخر عمر خود حامل باقی می ماند و باکتری را بطور مرتب یا دوره ای، از ادرار دفع می کنند (۷-۴). باکتری ها مدت طولانی در آب یا خاک مرطوب می توانند زنده بمانند و از راه خراش های جلدی، به خون میزبان

سپس اعداد OD نمونه‌های سرم بیماران با این دو عدد مقایسه می‌شد. تمام نمونه‌هایی که ODهای بین این دو عدد داشتند را حد مرزی (Borderline) و ODهای بالاتر از high cut off را مثبت و پایین تر از Low cut off را منفی در نظر گرفتیم.

آزمون الیزای نیمه کمی با استفاده از پلیت‌های پوشیده شده با آنتی‌ژن‌های استخراج شده از لپتوسپیراهای سویه Wijnberg (که متعلق به سرووار کپنهاگنی از سروگروپ ایکتر و هموراژی است) انجام شد. یک ردیف پلیت به نمونه مثبت و یک ردیف به نمونه منفی و سایر ردیف‌ها به نمونه سرم بیماران اختصاص داده می‌شد. در هر ردیف رقت‌های سریالی ۱:۲۰ تا ۱:۱۰۲۴۰ تهیه می‌شد. برای تعیین cut off ابتدا بالاترین عدد OD نمونه مثبت را بر عدد ۲ تقسیم کرده و آن را عدد معیار در نظر می‌گرفتیم و اعداد OD هر ردیف مربوط به هر نمونه سرم را با آن مقایسه و اولین عدد OD بالاتر از آن را معین کرده و رقت مربوط را تراز آن نمونه سرم در نظر می‌گرفتیم. ترازهای کمتر از ۱:۸۰ منفی، ۱:۸۰ حد مرزی و تراز ۱:۱۶۰ به بالا را مثبت در نظر گرفتیم. این توصیه در نتیجه تجزیه و تحلیل آماری تجربه‌های درازمدت انجام این آزمون بر تعداد بسیار زیاد نمونه‌ها در مقایسه با نتایج MAT بدست آمده است. (۹) در هر دو روش الیزای کمی و کیفی از دستگاه الیزا و اشر با نام تجاری SLT96PW ساخت شرکت SLTL abinstruments اتریش برای شستشوی پلیت‌ها و از دستگاه الیزا ریدر اتوماتیک با نام تجاری SUNRISE ساخت TECAN اتریش برای خواندن نتایج با طول موج ۴۹۲ نانومتر استفاده شد و در هر دو روش از کونژوگه‌های ضد IgM و ضد IgG انسانی متصل به پراکسیداز ساخت شرکت BIO-RAD استفاده شد.

تمام سرم‌ها به روش MAT کمی و با استفاده از سه پانل، متشکل از ۲۵ سرووار از لپتوسپیراهای بیماریزا و سه سرووار لپتوسپیرای غیر بیماریزا مورد آزمایش قرار گرفتند. در این روش برای هر نمونه سرم سه میکروپلیت ۹۶ حفره‌ای برای سه پانل میکروبی مزبور در نظر گرفته

سرولوژی متداول تشخیصی، بویژه در مناطق شایع، مناسب باشد. زیرا اغلب آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مایل به انجام MAT به دلیل هزینه بالا و دردسر و خطرهای نگهداری سویه‌های زنده نیستند و روش‌های راحت‌تر و کم‌هزینه‌تر را ترجیح می‌دهند. در این مطالعه توانایی تشخیص دو روش الیزای تجاری کیفی و غیرتجاری (خانگی) نیمه کمی ارزیابی شده است. هدف مطالعه دستیابی به یک روش تشخیصی ارزشمند، مطمئن و ارزان‌تر بوده است. با توجه به ارزان‌تر بودن انجام روش الیزای خانگی، اگر ارزش تشخیصی آن برابر یا نزدیک به الیزای تجاری باشد، می‌توان آن را عنوان روشی رایج تلقی و توصیه کرد.

مواد و روش‌ها

ابتدا بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های رازی رشت، امام خمینی صومعه سرا و ۲۲ آبان لاهیجان در فاصله زمانی اول اردیبهشت تا پایان شهریور ۱۳۸۲ از لحاظ علائم بالینی توسط پزشک معالج مورد بررسی قرار گرفتند و بیمارانی که لااقل چهار تا از علائم عمومی ذکر شده در آخرین راهنمای WHO برای لپتوسپیروز (۵) از قبیل: تب، سردرد شدید، قرمزی ملتحمه، درد عضله‌ها و مفاصل، زردی، بیماری عمومی، ضعف و بی‌اشتهایی، تهوع و استفراغ، سفتی گردن و نارسایی کلیه و حداقل یکی از موارد سابقه کار در شالیزار، تماس با حیوانات اهلی یا وحشی یا آب‌های راکد محیطی را داشتند مشکوک به لپتوسپیروز تلقی شده و از آن‌ها ۱۰ ml خون وریدی گرفته شده و سرم آنها پس از جداسازی در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری می‌شد. آزمون الیزای کیفی با کیت الیزای تجاری با نام Serion Elisa Classic Leptospira IgG/IgM ساخت آلمان انجام شد. با این کیت امکان سنجش جداگانه IgG و IgM وجود دارد. طبق راهکار دفترچه راهنمای آن، ابتدا معدل ODهای دو نمونه مثبت موجود در هر کیت محاسبه شده و در ضریب استاندارد مندرج در دفترچه راهنمای هر کیت ضرب می‌شد تا دو عدد high cut off و low cut off بدست آید.

تابلوی ۲: مقایسه نتایج آزمون‌های الیزای نیمه کمی و کیفی در

قیاس با نتایج MAT

نتایج الیزای کمی			نتایج MAT
مثبت	منفی	حدمرزی	
۹۳ (۸۹/۴٪)	۸ (۷/۷٪)	۳ (۲/۹٪)	موارد مثبت (۱۰۴ مورد)
۲۳ (۱۲/۳٪)	۱۵۱ (۸۰/۷٪)	۱۳ (۷/۰٪)	موارد منفی (۱۸۷ مورد)
نتایج الیزای کیفی			موارد مثبت (۱۰۴ مورد)
۹۱ (۸۷/۵٪)	۱۳ (۱۲/۵٪)	۰ (۰٪)	
۱۰۴ (۵۵/۶٪)	۶۹ (۳۶/۹٪)	۱۴ (۷/۵٪)	موارد منفی (۱۸۷ مورد)

تابلو ۳: مقایسه دو روش الیزای نیمه کمی و کیفی براساس

ملاک‌های ارزشیابی تشخیصی

نوع آزمون	حساسیت	ویژگی	ارزش اخباری مثبت	ارزش اخباری منفی
الیزای کمی	۸۹/۴۲٪	۸۷٪	۸۰/۱۷٪	۹۳/۳۷٪
الیزای کیفی	۸۷/۵۰٪	۴۱/۵۷٪	۴۶/۶۶٪	۸۵/۰۵٪

بحث و نتیجه‌گیری

تابلوی بالینی لپتوسپیروز مشابه بسیاری از عفونت‌های باکتریایی یا ویروسی دیگر است. چون علائم بالینی اختصاصی ندارد، تشخیص بالینی آن مشکل و در اغلب موارد غیرممکن است. بنابراین تشخیص آزمایشگاهی آن اهمیت دارد. اگر لپتوسپیروز زود تشخیص داده شود براحتهی مداوا می‌شود ولی در غیر این صورت احتمال پیشرفت بیماری به سمت نارسایی کلیوی وجود خواهد داشت (۱۰). در تشخیص لپتوسپیروز انجام آزمون‌های سرولوژی جایگاه مهمی دارند (۱۱) زیرا مشاهده مستقیم باکتری در نمونه‌های بالینی با میکروسکوپ زمینه تاریک بسیار مشکل است و حساسیت و ویژگی بالایی ندارد. از طرف دیگر، جداکردن باکتری نیز از نمونه‌های بالینی با انجام کشت بسیار مشکل و وقت‌گیر بوده و اغلب ناموفق است (۶ و ۵). به همین دلیل آزمون MAT برای تشخیص این بیماری استاندارد طلایی محسوب می‌شود ولی انجام این آزمون به

می‌شد و شماره نمونه و شماره پانل روی پلیت‌ها درج می‌شد. از سرم رقت‌های سریالی با کمک PBS با $PH = 7/2$ تهیه شده و هر ردیف از پلیت به یک سویه استاندارد اختصاص داده می‌شد. ۵۰ لانداسوسپانسیون میکروبی به حفرات ردیف مربوطه اضافه شد. سپس پلیت‌ها در دمای 30° سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شده و نتایج با میکروسکوپ زمینه تاریک خوانده می‌شد. هر رقت که جمعیت میکروبی آن نصف شده بود یعنی ۵۰ درصد باکتری‌های آن آگلوتینه شده بودند، تراز آن نمونه سرم نسبت به آن سویه در نظر گرفته می‌شد. طبق توصیه آزمایشگاه مرجع که حاصل تجزیه و تحلیل آماری تجربه‌های دراز مدت آنها بر تعداد کثیری از نمونه‌های بالینی مثبت و منفی است (۹)، ترازهای ۱:۱۶۰ به بالا را مثبت و کمتر از آن را منفی تلقی کرده و این آزمون را به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته و نتایج حاصل از آزمون‌های الیزای نیمه کمی و کیفی را با آن سنجیدیم.

نتایج

از ۲۸۲ نمونه سرم آزمایش شده، ۱۰۴ نمونه با آزمون MAT مثبت (۳۶/۹ درصد) و ۱۷۸ نمونه منفی شدند (۱۲/۶۳ درصد). نتایج آزمون‌های الیزای کمی و کیفی در تابلوی ۱ نشان داده شده است.

تابلوی ۱: نتایج آزمون‌های الیزای نیمه کمی و کیفی برای ۲۸۲

نمونه سرم مربوط به بیماران مشکوک به لپتوسپیروز

نوع آزمون الیزا	نتایج			مجموع
	مثبت درصد تعداد	منفی درصد تعداد	حد مرزی درصد تعداد	
الیزای کمی	۱۱۶ (۴۱/۱٪)	۱۵۹ (۵۶/۴٪)	۷ (۲/۵٪)	۲۸۲
الیزای کیفی	۱۹۵ (۶۹/۱٪)	۸۲ (۲۹/۱٪)	۵ (۱/۸٪)	۲۸۲

مقایسه نتایج آزمون‌های الیزای کمی و کیفی در قیاس با نتایج MAT در تابلوی شماره ۲ مندرج است.

با در نظر گرفتن ۱۰۴ مورد مثبت با آزمون MAT و مقایسه نتایج دو روش الیزای مزبور، مقادیر حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی آنها را محاسبه کردیم که در تابلوی ۳ نشان داده شده است.

ارزش‌های تشخیصی دو روش الیزای کمی و کیفی در تشخیص لپتوسپیروز براساس مقادیر حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی (تابلوی ۳) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. تمام مواردی که IgM و IgG مقادیری حد مرزی داشتند، سرانجام حد مرزی در نظر گرفته شدند و مواردی که تراز یک نوع پادتن صفر و یا دیگری حد مرزی بود، منفی و مواردی که لااقل یک نوع پادتن مثبت داشتند، مثبت در نظر گرفته شد. در محاسبه مقادیر حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، تمام موارد حد مرزی جزو موارد منفی در نظر گرفته شدند و محاسبه فقط براساس موارد مثبت انجام شد.

مقادیر مندرج در تابلوی ۳ نشان می‌دهند که دو روش الیزای مزبور از نظر حساسیت و ارزش اخباری منفی به هم نزدیک هستند ولی از لحاظ ویژگی و ارزش اخباری مثبت تفاوت قابل توجهی دارند و می‌توان نتیجه‌گیری کرد که الیزای نیمه کمی از ارزش تشخیصی و اطمینان بیشتری برخوردار است. نتایج مطالعات مشابه در تابلوی ۴ درج شده است.

تابلوی ۴: بررسی نتایج الیزا در چند مطالعه مشابه دیگر

ویژگی	حساسیت	نوع الیزا	مطالعه
۹۵٪	۱۰۰٪	Pan Bio IgM – ELISA	ایتالیا (۱۴)
۹۷٪	۸۷/۵٪	Microplate IgM-ELISA	امریکا (۱۵)
۹۴/۱٪	۹۷/۶٪	Deoxycolate Extracted IgM-ELISA	تایلند (۱۶)
-	۲۸/۱٪	IgM-ELISA روز ۳-۲ بیماری	هندوستان (۱۷)
-	۵۴٪	IgM-ELISA روز ۵-۴ بیماری	
-	۷۷/۸٪	IgM-ELISA روز ۶-۵ بیماری	

به این ترتیب، روش الیزا در اغلب مطالعه‌ها از حساسیت و ویژگی قابل توجهی برخوردار بوده است و حساسیت آن به زمان نمونه‌برداری بستگی تام دارد و از اواخر هفته اول بیماری می‌توان آن را به عنوان روشی حساس، سریع و قابل اطمینان در تشخیص لپتوسپیروز، بکار برد.

داشتن و نگهداری دائمی تعداد کافی از سویه‌های استاندارد و پاساژ دائمی آنها نیاز دارد، ضمن آن که خواندن نتایج این آزمون نیز نیاز به داشتن تخصص و تجربه کافی دارد (۱۱ و ۶،۵).

آزمون الیزا یک روش سرولوژی رایج برای تشخیص لپتوسپیروز است. پادتن‌های اختصاصی ضد پادگن‌های سطحی لپتوسپیرا، اغلب از روز ششم بیماری در خون قابل سنجش خواهند بود (۴ و ۱۳). برای تشخیص و سنجش پادتن‌های اختصاصی لپتوسپیرا به روش الیزا، فرآورده‌های پادگنی مختلفی تولید شده و راهکارهای متنوعی نیز ارائه شده است (۴ و ۱۲). بطور کلی روش‌های الیزا دارای حساسیت هستند ولی در مقایسه با MAT ویژگی سروواری کمتری دارند (۴ و ۱۲). با روش الیزا، IgM ضد پادگن‌های سطحی را در اواخر هفته اول بیماری می‌توان تشخیص داد ولی IgG دو هفته پس از شروع عفونت تولید و در خون پدیدار می‌شود اما پایدارتر است و ماه‌ها دوام می‌یابد (۱۱ و ۱۳). الیزاهایی که برای تشخیص لپتوسپیروز انسانی تکامل داده شده اند طیف گسترده‌ای دارند و قادر به تشخیص سرووار سبب ساز عفونت نیستند اما روشی سریع و مطمئن برای تشخیص این بیماری محسوب می‌شوند (۴ و ۱۲).

لپتوسپیروز حیوانی در نقاطی از ایران که دامداری غیرمکانیزه و سنتی رواج دارد شایع است ولی لپتوسپیروز انسانی فقط در استان گیلان و مازندران شیوع دارد که در استان گیلان اندمیک است. شرایط اقلیمی - آب و هوایی، وفور حیوانات وحشی، رواج کشت برنج، فراوانی آب‌های محیطی جاری و راکد و بالاخره رواج نگهداری حیوانات اهلی به شیوه سنتی همگی از عوامل شیوع بیماری در این استان هستند. به رغم شیوع لپتوسپیروز در این استان، تشخیص آن در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی متداول نیست و هنوز یک روش تشخیصی راحت، ارزان و مطمئن برای آن بدست نیامده است. بنابر این دستیابی به آن یک ضرورت انکار ناپذیر خواهد بود. در این مطالعه

1. Joseph M Vinet Z. Leptospirosis. Tropical and Travel Associated Disease 2001; 14: 527-538.
2. Rebeca Plank, Deborah Dean Overview of the Epidemiology, Microbiology and Pathogenesis of Leptospira SPP in Humans. Microbes and Infection 2000; 2: 1265-1276.
3. Paul N Levett Leptospirosis. Clin Microbiol Review 2000; 14(2): 296-326.
- 4- Terpstra WJ, Lighthare GS. G.J.Schoone; ELISA for Detection of Specific IgM and IgG in Human Leptospirosis. Journal of General Microbiology 1985; 131: 377-385.
5. World Health Organization. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Geneva; WHO, 2003.
6. Merien FG Baranton, Perolat P; Comparison of PCR with MAT and Culture for Diagnosis of Leptospirosis. Journal of Infectious Disease 1996; 172: 281-285.
7. Vinetz JM Leptospirosis. Curr Opin Infect Disease 1997; 10: 357-361.
8. Van Creel R, Speelman P, Gravekamp C, Terpstra WJ Leptospirosis in Travelers. Clin Infect Dis 1994; 19: 132-134.
9. Hartskeerl RA, et al. Manual for Diagnosis of Leptospirosis KIT Biomedical Research. Hit Bromedvcal Research, Amsterdam 2004.
10. Dupont H, Dupont perdrizert D, Perie JL, et al. Leptospirosis: Prognosis Factors Associated with Mortality. Clin Infect Dis 1997; 25: 270-274.
11. Ryu E. Rapid Agglutination Test for Leptospira without non-Specific Reaction. Bull of Int Epiz 1970; 73 (1-2) : 49-58.
12. Adler B, Murphy AM, Locamini SA, Fain S. Detection of Specific Anti-Leptospira Immunoglobulins M and G in Human Serum by Solid Phase Enzym Linked Immunosorbant Assay. Journal of Clinical Microbiology 1980; 11: 452-457.
13. Adler B, Farine S. Antibody Response in Human Leptospira B, Bucharest Leptospirosis and other Spirochaeta, 1975; 271-76.
14. Vitale G, et al. Evaluation of an IgM-ELISA Test for Diagnosis of Human Leptospirosis. New Microbiol AP 2004; 27: 149-154.
15. Bajani, et al. Evaluation of four Commercially Available Rapid Tests for diagnosis of Leptospirosis. J Clin Microbiol 2003; 41(2): 803-809.
16. Nakarin, et al. Evaluation of Enzym-Immuno Sorbent Assay and Indirect Hemagglutination on Assay for Detection of Leptospiral antibodies by Using Three Different Antigens. J Med Assoc. Thai 2004; 2004, (10): 1218-1224.
17. Vijayachari P, Sugunan AP, Sehgal SC. Evaluation of Lepto Dri Dot as a Rapid Test for Diagnosis of Leptospirosis. Epidemiol Infect 2002; 129(3):-617-621.

Evaluation of Two Commercial Qualitative and Semi Quantitative ELISA Methods for Diagnosis of Acute Human Leptospirosis

Honarmand H.(Ph.D), Eshraghi S.(Ph.D), Khorami zadeh M.R(Ph.D) Ghanaei F.M.(M.D), Hareskeerl R.(Ph.D)

Abstract

Introduction: Leptospirosis is most widespread Zoonosis in the world, especially in Tropical and temperate regions with moist climate. Diagnosis of Leptospirosis according to clinical symptoms is difficult and uncertain due to lack of specific sign (s). *Leptospira* is a fastidious bacterium. Isolation of these bacteria by culture is difficult, time consuming and hence does not contribute to an early diagnosis. Specific antibodies against *Leptospira* appear from 6th day of disease onset. The Microscopic Agglutination Test (MAT) is most reliable assay but generally requires paired sera for detection of seroconversion and is considered too complex for routine use.

Objective: We performed this study to find a simple and reliable method for diagnosis of acute human leptospirosis. ELISA is another common method for diagnosis of Leptospirosis .

Materials and Methods: In summer of 2004, we examined 282 single sera of patients who were suspected of Leptospirosis by a commercial quantitative and an in-house semi quantitative ELISA assays and compared their results with MAT.

Results: Mean time of first taking blood samples were 6:36 after onset of symptoms. All specimens with titers ≥ 640 against a pathogenic serovar in MAT were regarded as confirmed leptospirosis (104 from 282). All specimens which were positive in any IgM-ELISA assays were compared with the results of MAT. In our study, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of in house ELISA were 89.4%, 87%, 80.2% and 93.4% consequently but were 87.5%, 41.5%, 44.6% and 85% for commercial IgM-ELISA assay consequently.

Conclusion: The results of our study show that IgM- ELISA assay is a reliable and sensitive method for diagnosis of acute leptospirosis and also show that in house semi quantitative IgM ELISA was more specific and commercial qualitative IgM- ELISA was more sensitive.

Key words: Enzyme – Linked Immunosorbent Assay/ Leptospirosis