شناسایی سروگروپهاوسروواروهای مولد لپتوسپیروز حاد انسانی در استان گیلان با روش MAT

دکتر حمید رضا هنرمند*- دکتر سعید اشراقی *- دکتر محمد رضا خرمی زاده*- دکتر فریبرز منصور قناعی**
***Rudy.A Hartskeerk
* استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
** دانشیار گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
Biomedecal Researsh Center , KIT, Netherland***

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش: ۸۴/۴/۲۱

چکیده

مقدمه: لپتوسپیروز یک بیماری عفونی شایع مشترک انسان و حیوان است که درمناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شیوع بیشتر دارد. مخزن این باکتری در طبیعت جوندگان و بسیاری از حیوانات وحشی و اهلی هستند. اغلب این حیوانات پس از ابتلا به این بیماری تا آخر عمر خود حامل باقی می‌مانند و باکتری را از راه ادرار خود ترشح می‌کنند. باکتری‌های ترشح شده می‌توانند از راه خراش‌های جلدی وارد بدن میزبان دیگر (حیوان و انسان) بشوند و چرخه بیماری راتداوم بخشند.

برای انجام یک مطالعه، همه‌گیری شناسی جامع در یک منطقه آندمیک، شناسایی لپتوسپیراهای شایع و بومی یک قدم اساسی‌ست. به دلیل سخت رشد بودن لپتوسپیرا، جداسازی آن از نمونه‌های بالینی به روش کشت بسیار مشکل، وقت‌گیر و اغلب ناموفق است. به همین دلیل یک روش سرولوژیک به نام آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی(MAT) برای تشخیص این بیماری و نیز شناسایی عامل آن در حد گونه و سروگروپ معتبر ترین روش محسوب می شود و در اغلب آزمایشگاه‌های مرجع لپتوسپیروز، متداول است.

هدف: شناسایی سروگروپهاوسروواروهای مولد لپتوسپیروز حاد انسانی در استان گیلان با روش MAT.

مواد و روش‌ها : این مطالعه در سال ۱۳۸۲ با نمونه‌گیری از خون بیماران بستری در بیمارستان‌های امام خمینی صومعه‌سرا، رازی رشت و ۲۲ آبان لاهیجان که بر اساس علائم بالینی و طبق تشخیص پزشک معالج به بیماری لپتوسپیروز مشکوک بودند آغاز شد. سرم بیماران تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰۰- سانتی گراد نگهداری شده و در تابستان ۱۳۸۳ تمام نمونه سرم‌ها ابتدا با روش الیزای نیمه کمی غربالگری شدند و سپس نمونه‌های مثبت با آزمون MAT مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج: ۲۸۲ نمونه سرم ابتدا توسط آزمون الیزای نیمه کمّی بررسی شدند وتعداد ۱۳۰ مورد تراز IgM مساوی یا بالاتر از ۱:۱۶۰ داشتند که برای آزمون MAT در نظر گرفته شدند. ۷۰ نمونه سرم تراز ≤ ۱۶۰ در هر دو آزمون داشتند که همگی مثبت تلقی شدند و در مورد هر یک از آنها بالاترین تراز سرمی در آزمون MAT ملاک تعیین سروواژ سبب ساز بیماری قرار گرفت.

نتیجه‌گیری : تفسیر نتایج MAT به دلیل واکنش متقاطع زیادی که بین سروگروپ‌های مختلف بویژه در نمونه‌های بالینی مربوط به مرحله حاد بیماری وجود دارد مشکل و پیچیده است. طبق تعریف کنونی CDC، یک تراز سرمی ۲۰۰ ≤ اگر با علائم بالینی مطابقت داشته باشد تشخیص احتمالی را مطرح می کند. در این مطالعه با توجه به اینکه نمونه گیری فقط از بیماران دارای علائم بالینی مشکوک به لپتوسپیروز گرفته شده و پس از غربالگری بایک روش الیزای معتبر، فقط نمونه‌های مثبت با تراز IgM مساوی یا بالاتر از ۱:۱۶۰ مورد بررسی با آزمون MAT قرار گرفته بودند، با در نظر داشتن سه ملاک : مطابقت علائم بالینی، نتیجه الیزا و نتیجه MAT، ضریب اطمینان تشخیصی بالایی در نظر گرفته شده است و می توان سروواروها و سروگروب‌های تعیین شده را در این منطقه شایع تلقی کرد.

کلید واژه‌ها : فنون و روش‌های آزمایشگاهی/ لپتوسپیروز

مقدمه

لپتوسپیروز یکی از شایع ترین بیماریهای مشترک انسان و حیوان است. و اساساً یک بیماری شغلی‌ست که در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل بویژه در نواحی گرم و مرطوب شیوع بیشتر دارد ودر اغلب این مناطق اندمیک است. بسیاری از حیوانات اهلی و وحشی بویژه جوندگان، مخزن این بیماری در طبیعت هستند. این حیوانات پس از ابتلا به بیماری تا آخر عمر خودحامل باقی می‌مانند و به صورت دوره‌ای، باکتری را از ادرار دفع می‌کنند. لپتوسپیراهای دفع شده در آب و خاک مرطوب، به مدت طولانی‌زنده می‌مانند و از خراش‌های جلدی به بدن میزبان دیگر(حیوان و انسان) وارد می‌شوند و بدین ترتیب چرخه بیماری در این مناطق برقرار شده و معمولاً اندمیک می‌گردد. اقدام اساسی برای آشکار شدن چهره همه‌گیر شناختی لپتوسپیروز در مناطق آندمیک همانا شناسایی لپتوسپیراهای شایع‌وبومی آن منطقه است که قدم مهمی در شناسایی‌مخزن‌یامخازن بیماری‌خواهدبود(۱،۲،۳،۴،۵،۶و۷).

نویسنده مسئول: دکتر حمیدرضا هنرمند؛ مرکزتحقیقات سلولی- مولکولی دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی گیلان
Honarmand_36@yahoo.com

در ایران حاشیه دریای خزر شرایط مساعد اقلیمی _ آب و هوایی را برای شیوع بیماری لپتوسپیروز دارد، به ویژه استان گیلان که این بیماری در آنجا آندمیک است. آب و هوای معتدل، وفور حیوانات وحشی، رواج کشت برنج، رواج و نگهداری حیوانات اهلی در روستاها، فراوانی آب‌های سطحی و راکد، رطوبت بالای هوا و خاک همگی شرایط مساعد کننده برای برقراری چرخه این بیماری هستند.MAT (Microscopic Aglutintion Test) مطمئن‌ترین روش تشخیصی لپتوسپیروز و متداول‌ترین روش سروتایپینگ لپتوسپیرها است، زیرا این باکتری بسیار سخت رشد است و جداسازی آن از نمونه‌های بالینی بسیار مشکل، وقت‌گیر و در اغلب موارد ناموفق است. با این روش، شناسایی در حد زیرگونه امکان‌پذیر است (۷، ۸،۹و۱۰) و در آن رقت‌های متوالی از یک نمونه سرم با تعدادی از سویه‌های استاندارد که هر کدام از آنها به یک سروار از یک سروگروپ تعلق دارند مجاورت داده شده و به مدت دو ساعت انکوبه می‌شوند و نتایج آزمون با میکروسکوپ زمینه تاریک بررسی می‌شود. هر رقت سرم که جمعیت میکروبی را به نصف کاهش داده باشد تراز آن سرم علیه آن سویه(۷و۱۰) تلقی شده و ترازهای ۱:۱۶۰ به بالا مثبت درنظر گرفته می‌شوند. در این مطالعه تعدادی از نمونه‌سرم‌های مربوط به بیماران مشکوک به لپتوسپیروز که درسال۱۳۸۲ازسه‌بیمارستان‌عمومی استان گیلان جمع‌آوری شده بودند به روش MAT مورد بررسی قرار گرفتند تا زیرگونه‌های‌شایع‌دراستان‌گیلان درحدامکان‌شناسایی شوند.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری از بیماران در بهار و تابستان سال ۱۳۸۲ از سه بیمارستان رازی رشت، امام خمینی صومعه سرا و ۲۲ آبان لاهیجان انجام شد. از بیماران بستری که طبق تشخیص پزشک معالج و بر اساس علائم بالینی به بیماری لپتوسپیروز مشکوک بودند، ۱۰ میلی لیتر خون وریدی گرفته شد و سرم آنها پس از جدا سازی با سانتریفیوژ، در فریزر ۲۰°- سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

آزمون الیزا و MAT در یک آزمایشگاه مرجع لپتوسپیروز در کشورهلند انجام شد. ۲۸۲ نمونه سرم جمع آوری شده ابتدابا‌روش‌الیزای‌نیمه‌کمّی طبق دستورالعمل‌های آزمایشگاه مرجع و با استفاده از پلیت‌های پوشیده شده از پادگن‌های سویه ویجنبرگ(Wijenberg) متعلق به سرووارکپنهاگنی (Copenhageni) از سروگروپ ایکتروهموراژیه که یک سویه بیماریزاست انجام شد. یک پلیت برای سنجش IgM و پلیت دیگر برای سنجش IgG اختصاص داده می‌شد. در هر پلیت یک ردیف به کنترل مثبت و یک ردیف به کنترل منفی و ٦ ردیف به نمونه سرم بیماران اختصاص داده شده و با بافر رقیق سازی Dilution buffer [PBS PH=7.2 With 0.5% BSA and 0.05% Tween 20] از همه آنها رقت‌های متوالی از ۱:۱۰ تا ۱:۱۰۲۴۰ تهیه می‌شد.

پس از انجام مرحله نهایی آزمایش، نتایج با دستگاه الیزاریدر اتوماتیک با طول موج ٤٩٢ نانومتر خوانده شده وOD آنها اندازه‌گیری وثبت‌می‌گردیدوترازنمونه‌های بالینی طبق دستورالعمل موجود تعیین می‌شد(۱۰).تمام‌نمونه‌هایی که تراز پادتنی مساوی یا بالاتر از ۱:۱٦۰ داشتند مثبت تلقی شده و تحت بررسی با آزمون MAT قرار گرفتند.

آزمون MAT نیز در همان آزمایشگاه مرجع و طبق دستورالعمل موجود انجام شد. در این آزمون از ۳ پانل میکروبی متشکل از ۲۵ سویه بیماریزا و ۳ سویه غیر بیماریزا استفاده گردید(جدول۱). برای هر نمونه سرم، ۳ پلیت در نظر گرفته شد و هر پلیت به یک پانل میکروبی اختصاص داده می‌شد. به تمام حفرات پلیت‌ها مقدار ۵۰µl از PBS با PH= 7.2 ریخته و در ستون دوم مقدار ٤٠µl از همان PBS اضافه می‌شد و به حفرات همین ستون مقدار ۱۰µl از نمونه سرم بیمار را که با ورتکس خوب مخلوط و یکنواخت شده بود اضافه می‌گردید و سپس توسط مالتی پیپت ۸ تایی با تنظیم ۵۰µl از ستون دوم به بعد رقیق سازی انجام‌می گرفت به طوری که درهر ردیف رقت سریالی از ۱: ۲۰ تا ۱:۲۰٤۸۰ بدست می‌آمد و سپس به تمام حفرات پلیت‌هامقدار ۵۰µl از کشت میکروبی اضافه می‌شد. هر ردیف به یک سویه اختصاص داده شده

و هر کشت میکروبی قبل از آزمایش با میکروسکوپ زمینه تاریک بررسی می‌شد تا از مطلوب بودن رشد و کافی‌بودن جمعیت میکروبی آن اطمینان بدست آید.

خواندن نتایج به طور معمول از پلیت مربوط به پانل I و از اولین حفره اولین ردیف شروع می‌شد. بدین منظور یک لام تمیز و خشک را روی میکروسکوپ زمینه تاریک قرار داده و توسط لوپ باکتریولوژیک یک قطره کوچک از حفره اول برداشته شده و روی لکه نورانی موجود بر روی لام قرار داده و با عدسی ۲۰ مشاهده می‌شد و این کار را برای تمام حفرات هر ردیف به ترتیب از چپ به راست ادامه می‌یافت تا به حفره ای برسد که در مقایسه با حفره اول که فاقد سرم است جمعیت میکروبی نصف شده داشته باشد (نصف جمعیت میکروبی آگلوتینه شده و نصف آنها آزاد باشند). در این‌صورت رقت آن حفره تراز آن نمونه سرم علیه سویه میکروبی که به همان ردیف اضافه شده بود در نظر گرفته می‌شد. طبق دستور العمل آزمایشگاه مربوطه که حاصل تجزیه و تحلیل آماری تجربه‌های دراز مدت آنها بر نمونه‌های مثبت و منفی تائید شده، بود ترازهای ۱:۱۶۰ و بالاتر مثبت تلقی شده و تمام ترازهای ۱:۱۶۰ و بالاتر علیه سویه‌ها یادداشت می‌گردید.

جدول ۱: سویه های میکروبی که برای آزمون MAT مورد استفاده قرار گرفتند.

سویه	سروار	سروگروپ	شماره سویه	شماره‌پانل
Jes braeislara	Bratislara	Auseralis	۱	
Mus 127	Baalam	Ballam	۲	
Hond utricht	Canicola	Canicola	۳	
Duyster	Grippityphosa	Grippityphosa	٤	
Mandemakers	Grippityphosa	Grippityphosa	٥	I
Kebdomadis	Hebdimadis	Hebdimadis	٦	
Kantoiowic	Icferihaemorrhagia	Icferihaemorrhagia	۷	
Wijberg	Copenhayeni	Icferihaemorrhagia	۸	
Poi	Poi	Jatanica	۹	
Pomona	Pomona	Pomona	۱۰	
116U	Pricchimys	Pomona	۱۱	
Hardjopyjinto	Hardjo	Swjroe	۱۲	
Lely 607	Hardjo type boris	Swjroe	۱۳	II
Mus 24	Sakkoebihng	Swjroe	۱٤	
M 84	Sejroe	Swjroe	۱٥	
Putoc 1	Patoc	Semaranga	۱٦	
Ch 11	Andaman	Andaman	۱۷	
Ballico	Australis	Australis	۱۸	
Rachmae	Rachmati	Andaman	۱۹	
Swart	Batariae	Batariae	۲۰	
Celledoni	Celledoni	Celledoni	۲۱	
3522 C	Cynopteri	Cynopteri	۲۲	III
CZ= 14K	Mini	Mini	۲۳	
Salonem	Panama	Panama	۲٤	
Veldat sem 173	Pyrogns	Pyrogns	۲٥	
1324 K	Semeranga	Semeranga	۲٦	
Per epelicin	Shermani	Shermani	۲۷	
	Tarassori	Tarassori	۲۸	

جدول ۲: **نتایج آزمون MAT بر روی نمونه سرم بیماران در آزمون MAT**

ترتیب	سویه	سرو وار	سروگروپ	تعداد تکرار موارد تراز سرمی مساوی و یا بالاتر از ۱:۱۶۰ در آزمون MAT
۱	M 84	Sejroe	Sejroe	۲۲
۲	Duyster	Gryppotyphosa	Gryppotyphosa	۲۱
۳	Mus 24	Sakkoebing	Sejroe	۱۸
٤	Mandemakers	Gyppotyphosa	Gyppotyphosa	۱٦
٥	Rachmat	Rachmat	Autumnalis	۱٤
٦	Kantorowic	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	۱۱
۷	3522 C	Cynopteri	Cynopteri	۱۱
۸	Wijnberg	Copenhayeni	Icterohaemorrhagiae	۱۰
۹	Celledoni	Celledoni	Celledoni	۱۰
۱۰	Sari	Mini	Mini	۱۰
۱۱	1342K	Shermani	Shermani	۹
۱۲	1161 uu	Proechimys	Pomona	۸
۱۳	Lelty 607	Hardjo Type bovis	Sejroe	۷
۱٤	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	٥

نتایج

از مجموع ۲۸۲ نمونه سرم که در ابتدا با آزمون الیزای نیمه کمّی مورد بررسی قرار گرفته بودند، ۱۳۰ مورد تراز IgM مساوی یا بالاتر از ۱:۱٦۰ داشتند که برای آزمون MAT مناسب تشخیص داده شدند. تعداد ۱۱ نمونه سرم IgM کمتر از ۱:۱٦۰ ولی IgG بالاتر از ۱:۱٦۰ داشتند که برای اجتناب از اغتشاش نتایج، این تعداد با آزمون MAT بررسی شدند زیرا بالا بودن IgG بدون بالا بودن IgM دال بر عفونت قبلی‌ست و چون تعدّد عفونت‌های قبلی موجب تعدّد تراز سرمی بالا علیه چندین سروار از چندین سروگروپ مختلف می‌شود،در تفسیر نتایج مشکل ایجاد می کند.

در آزمون MAT تعداد ۱۰٤ نمونه سرم، تراز سرمی مساوی و یا بالاتر از ۱:۱٦۰ و ۵۹ نمونه تراز سرمی (مساوی و یا بالاتر از ۱:٦٤۰) داشتند(جدول ۲).

در مجموع ۷۰ نمونه سرم، تراز ≤ ۱۶۰ در هر دو آزمون MAT و الیزا داشتند که همگی مثبت تلقی شدند و در مورد هر یک از آنها بالاترین تراز سرمی در آزمونMAT ملاک تعیین سروار سبب ساز بیماری قرار گرفت. در بعضی از موارد، تراز یک نمونه سرم علیه چند سویه از چند سروار نزدیک به هم که به یک سروگروپ متعلق بودند، بالا نشان می‌داد. در این موارد همه آنها مثبت در نظر گرفته شدند تا فرکانس ترازهای سرمی بالا علیه هر سویه بدست آید. جدول ۳ و۴ این نتایج را نشان می‌دهد.

جدول ۳: **سروگروپهای شایع در استان گیلان در سال ۱۳۸۳ بر اساس نتایج آزمون MAT بر روی نمونه سرم بیماران مبتلا به لپتوسپیروز**

سروگروپ	تعداد تکرار موارد بالاترین تراز سرمی
Sejroe(4)	۲۷
Grippotyphosa(2)	۱۵
Icterohaemorrhagiae, Mini	۱۰
Celledoni	۶
Automnalis	۵
Cynopteri	۴
Pomona, Javanica,	۳
Canicola	۲

جدول۴: سرووارهای شایع در استان گیلان در سال ۱۳۸۳ براساس نتایج آزمون MAT بر روی نمونه سرم بیماران مبتلا بهلپتوسپیروز

سروگروپ	تعدادتکرارموارد بالاترین تراز سرمی
Sejroe	۲۰
Grippotyphosa	۱۵
Mini,saxkoebing	۱۰
Copenhageni, Celledoni	۵
Icterohaemorrhagiae,Rachmat,Cynopteri	۴
Proechimys	۳
Canicola,Hadjotypebovis,Shermani,Poi,Panam,	۲
Ballum, ,Tarasovi,Hebdomadis	۱

بحث و نتیجه‌گیری

تفسیر نتایج MAT بدلیل واکنش متقاطع زیادی که بین سروگروپ‌های مختلف، بویژه در نمونه‌های بالینی مربوط به مرحله حاد بیماری وجود دارد مشکل و پیچیده است. معمولاً بیماران ترازهای سرمی بالا در حد مشابه علیه تمام سرووارهای یک سروگروپ دارند. گاهی اوقات واکنش‌های مغایر هم دیده می‌شود بدین‌صورت که بالاترین ترازها علیه سروگروپ غیرمرتبط با عامل عفونت بدست می‌آید.گستردگی‌واکنش‌متقاطع‌درمرحله‌حادبیماری، ویژگی نسبی سروگروپی را در مرحله نقاهت بدنبال خواهد داشت که علت آن اندازه‌گیری هم‌زمان پادتن‌های IgMو IgG در آزمون MAT و حضور هم‌زمان پادتن‌های مشترک بین انواع لپتوسپیراهاست(۷،۱۰،۱۱و۱۲).

به طور کلی سرم جفت ضریب اطمینان را بالا می‌برد. یک افزایش تراز لااقل ۲ برابر در نمونه دوم که لااقل یک هفته پس از نمونه اول اخذ گرفته شده باشد، تبدیل سرمی ارزیابی می‌شود و می‌توان سرووارى که تبدیل سرمی (Seroconversion) نشان داده‌است را مسئول عفونت دانست. ولی یک تراز سرمی منفرد خیلی بالا هم می‌تواند نمایانگر عفونت حاد باشد، اما مقدار آن به سطح زمینه‌ای مواجهه با عامل عفونت در هر جمعیت یعنی به شیوع سرمی(Seroprevalence) آن بستگی دارد. طبق تعریف کنونی CDC، یک تراز سرمی ۲۰۰ ≤ اگر با علائم بالینی مطابقت داشته باشد تشخیص احتمالی را مطرح می‌کند. این تعریف برای جمعیت‌هایی که مواجهه با لپتوسپیرا در آنها شایع نیست صدق می‌کند ولی برای بسیاری از نقاط گرمسیری بویژه مناطقی که لپتوسپیروز در آنجا اندمیک است باید ترازهای بالاتر را ملاک قرار داد (۱۱و۱۲).

در این مطالعه با توجه به این‌که نمونه‌ها فقط از بیماران دارای علائم بالینی مشکوک به لپتوسپیروز گرفته شده و پس از غربالگری با یک روش الیزای معتبر، فقط نمونه‌های مثبت با تراز IgM مساوی یا بالاتر از ۱:۱۶۰ مورد بررسی با آزمون MAT قرار گرفته شدندبنابراین با در نظر گرفتن سه ملاک: مطابقت علائم بالینی، نتیجه الیزا و نتیجه MAT، ضریب اطمینان تشخیصی بالایی در نظر گرفته شده است.

برخی بیماران شواهد عفونت‌های قبلی با سروگروپ‌های مختلف لپتوسپیرا دارند. در این موارد به دلیل پاسخ ایمنی خاطره‌ای، تشخیص سرووار مسئول عفونت مشکل‌تر می‌شود زیرا اولین افزایش تراز سرمی علیه سرووار سبب‌ساز عفونت قبلی بوجود می‌آید و مدتی طول خواهد کشید تا کاهش پیدا کند و بتوان سروگروپ و سرووار عامل عفونت کنونی را تشخیص داد. واکنش مغایر در این موارد نیز اتفاق می‌افتد که سیر نتایج MAT را دشوار می‌سازد (۲،۷،۸،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴و۱۶).

به دلایل مزبور در این مطالعه تمام مواردی که IgG بالا ولی IgM پایین‌تر از ۱:۸۰ داشتند یعنی احتمال عفونت قبلی را مطرح می‌کردند را کنار گذاشتیم و برای آنها MAT انجام ندادیم.

أزمونMAT برایمطالعهسرواپیدمیولوژیکیهممناسباست ومعمولاً تراز ۱۰۰≥ ملاک مواجهه قبلی قلمداد می‌شود. به طور کلی با MAT می‌توان برآورد کرد که کدام سروگروپ در یک جمعیت حضور دارد (۷،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳ ،۱۴،۱۵و۱۶). در این مطالعه با توجه به نتایج مندرج در جدول شماره ۲ و با در نظر گرفتن سرووارهای مشترک متعلق به یک سروگروپ توانستیم سروگروپ‌های و سرووارهای شایع را برآورد کنیم (جدول ۳و۴)

منابع

1. Feigin RD, Anderson DC Human Leptospirosis Crit Rev clin Lab Sci 1975; 5: 413-467.

2- Levet, PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 296-326.

3- Vinetz JM. Leptospirosis. Curr Opin Infec Dis 1997;10:357-361.

4- Levet PN. Leptospirosis: Re-emerging or Re–discorered disease?. JMed Microbiol 1999; 48:417-418.

5- Vinetz JM.Leptospirosis Tropical and Travele Associated Disease 2001; 14 :527-538.

6. Plank R, Dean D. Overview of Epidemiology , Microbiology and Pathogenes of Leptospira spp in Humans. Microbs and Infection. 2000; 2:1265-1276.

7.World Health Organization, Human Leptospirosis: Guidance for Diagno sis, Surveilance, and Control. Geuva; WHO,2003.

8. Alexander AD. Serological Diagnosis of Leprospirosis. In: N.R.Rose NR, H Friedman H, Fathey JL(ed). Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rded. American Societ of Microbiology.

3 rd ed . American Society

9. Sulzer CR, Jones. Leptospirsis. Methods in Laborarory Diagnosis. U.S Department of Health, Eduction and Welfare, 1978.

10. Hartskeer I RA et al . Manual of Laborarory Methods for the Diagnosis of Leptospirsis. , KIT, Netherland . 2004: 43-58.

11. Adler B. Faines. The Anribodies Involved in the Human Immune Response to Leptospiral Infection J Med Microdel .1978; 11:387-400.

12 .Tong MJ, et al. Immunological Responses in Leptospirosis. Report of Three Cases. Am.J Trop Med Hyg 1971; 20:625-630.

13.Cumberland PC, Everard, C.R Levet PN. Assesment of the Efficacy of the IgM- ELISA and MAT for Diagnosis of Leptospirosis.ÁmJTrop Med Hyg 1999; 61:371-374.

14.Cole JR, et al. Improved Microtechnique for the Leptospiral Microscopic Agglutination Test. APPL Microbiol 1973; 25:376-980.

15..Robeto A Boulganger P. Comparison of Complenent Fixation Test and MAT for the Detection of Leptospiral Serogroup Antibodies. Can J Comp Med 1963; 27:113-130.

16.Romereo EC, et al. The Persistence of Leptospiral Agglutinin Titers in Human Sera Diagnosed by MAT. Rev Inst Med Trop Sao paulo 1998; 183-184.

Identifying Serogroup and Serve rs of Acute Human Leptospirosis In Gillan Province by MAT Method

Honarmand H.R.(Ph.D), Eshraghy S.(MD), Khorami Zadeh M.R.(Ph.D), Mansour Ghanaie F.(MD),

Hartskeerk R.A. (Ph.D)

Abstract

Introduction: Leptospirosis is a common Zoonosis, which is more prevalent in tropical and temperate regions. Rodents, wild and domestic animals are reservoir of Leptospirosis. Usually the infected animals are carriers for the rest of their lives and the bacteri is secreted from their urine. The secreted bacteria can enter a host (animal or human) and continue the circle of disease.

Objective: Diagnosis of leptospirsis according to clinical symptoms is difficult due to lack of pathogenic sign(s) and the similarities of its clinical features to some common febrile diseases, so laboratory is important in diagnosis. Leptospira is fastidious and its isolation from other clinical specimens is difficult, time consuming and usually unsuccessful, so MAT is the gold standard for diagnosis and serotyping of leptospira and is usual in all reference laboratories.

Materials and Methods: We performed this study in 1383 by taking blood sample from patients hospitalized in Emam Khomeini Hospital in Some- e-sara, Razi and 22 Aban Lahijan and had clinical symptoms and were suspected of leptospirosis. Sampling was done in spring and summer, which are prevalent seasons of leptospirosis in Gailan prorince. We stored all serums in- 200ºc until examination, and in summer of 1383 serum samples were screened by a Quantitative Elisa method to detect positive samples for doing MAT, and performed MAT to determine causative serogroups.

Results: 282 serum sample were all tested by quantitative Elisa and 130 cases had IgM titer equal or greater than 1:60 which were considered for MAT test. Seventy serum samples had titer ≤160 in both tests and all were positive and highest serum titer in MAT test was the determining criteria for causing disease.

Conclusion: Analyzing the results of MAT was hard and complex due to alternate reactions happening between different serogroups specially in clinical samples related to acute disease. According to CDC, a serum titer of≥ 200 and if it correlates with clinical symptoms can present probable diagnosis. In this study, considering the samples were only taken from patients with clinical symptoms and suspected of leptospirosis and then after screening by Elisa, only positive samples with IgM titer equal or greater than 1:16 were assessed by MAT; keeping in mind three criteria (Correlating clinical symptoms Elisa and MAT results) there is a high efficacy of diagnosis and determines servoirs and serogroups are prevalent in this area.

Key words: Laboratory Techniques and Procedures/ Leptospirosis