Archive of SID

ارزیابی دو روش الایزای نیمه کمّی 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 بیماری‌های گرمسیری و موسسه KIT، هلند

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۹/۲۸
تاریخ پذیرش:۸٤/۷/۲۰

مقدمه

لپتوسپیروز شایع‌ترین 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 تاآخر عمر خود حامل باقی می‌مانند و باکتری را بطور مرتب یا دوره‌ای، از ادرار دفع می‌کنند (۷-٤). باکتری‌ها مدت طولانی در آب یا خاک مرطوب می‌توانند زنده بمانند و از راه خراش‌های جلدی، به خون میزبان بعدی (حیوان یا انسان) وارد شوند. انتقال باکتری از راه مخاط تنفسی با آئروسل‌های آلوده و نیز از طریق ملتحمه امکان پذیر است (۵،۷و۸).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 می‌تواند به عنوان روش

نویسنده مسئول: دکتر حمیدرضا هنرمند؛ دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی گیلان مرکز تحقیقات سلولی- ملکولی
honarmand_36@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

سـرولوژی مـتداول تشخیصـی، بویـژه در مـناطق شـایع، مناسـب باشـد. زیـرا اغلب آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مـایل بـه انجـام MAT بـه دلـیل هزیـنه بـالا و دردسـر و خطـرهای نگهـداری سـویه‌های زنده نیستند و روش‌های راحت‌تروکم‌هزینه‌تررا ترجیح‌می‌دهند.دراین مطالعه‌توانایی تشـخیص دو روش الـیزای تجـاری کیفـی و غـیرتجاری (خانگی) نیمه‌کمّی‌ارزیابی شده‌است. هدف مطالعه‌دستیابی بـه یـک روش تشخیصی ارزشمند، مطمئن و ارزان‌تر بوده اسـت. باتوجه به ارزان‌تر بودن انجام روش الیزای خانگی، اگـر ارزش تشخیصی آن برابر یا نزدیک به الایزای تجاری باشد، می‌توان آن راعنوان روشی رایج تلقی و توصیه کرد.

مواد و روش‌ها

ابـتدا بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های رازی رشت، امـام خمینـی صـومعه سـرا و ۲۲ آبـان لاهیجان در فاصله زمانـی اول اردیبهشـت تـا پایـان شـهریور 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، سـردرد شـدید، قرمـزی ملـتحمه، درد عضله‌ها و مفاصل، زردی، بـیماری عمومـی، ضـعف و بـی‌اشـتهایی، تهوع و اسـتفراغ، سـفتی گـردن و نارسـایی کلیه و حداقل یکی از مـوارد سـابقه کـار در شـالیزار، تماس با حیوانات اهلی یا وحشـی یـا آب‌هـای راکـد محیطی را داشتند مشکوک به لپتوسـپیروز تلقـی شـده و از آن‌هـا ۱۰ ml خـون وریدی گرفـته شـده و سـرم آنها پس از جداسازی در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری می‌شد.

آزمـون الـیزای کیفـی با کیت الیزای تجاری با نام Serion Elisa Classic Leptospira IgG/IgM ساخت آلمان انجام شد.با این کیت امکان سنجش جداگانه IgM و IgG وجود دارد. طبق راهکاردفترچه راهنمای آن، ابتدا معدل ODهای دو نمونـه مثبـت موجـود در هـر کیت محاسبه شده و در ضریب‌استاندارد مندرج دردفترچه راهنمای هر کیت‌ضرب می‌شد تا دوعدد high cut off و low cut off بدست آید. سپس‌اعدادOD نمونه‌های‌سرم بیماران با این دوعددمقایسه می‌شد. تمام‌نمونه‌هایی‌که ODهای بین این دو عدد داشتند را حد مرزی(Borderline) و OD های بالاتر از high cut off را مثبـت و پاییـن تر از Low cut off را منفی در نظر گرفتیم.

آزمـون الـیزای نـیمه کمّـی با استفاده از پلیت‌های پوشیده شـده بـا آنتی‌ژن‌های استخراج شده از لپتوسپیراهای سویه Wijnberg (کـه متعلق به سروار کپنهاگنی از سروگروپ ایکـتروهموراژی اسـت) انجـام شـد. یـک ردیف پلیت به نمونـه مثبت و یک ردیف به نمونه منفی و سایر ردیف ها به نمونه سرم بیماران اختصاص داده می‌شد. در هر ردیف رقـت‌هـای سـریالی ۱:۲۰ تـا ۱:۱۰۲۴۰ تهیه می‌شد. برای تعییـن cut off ابـتدا بالاتریـن عدد OD نمونه مثبت را بر عدد ۲ تقسیم کرده و آن را عدد معیار در نظر می‌گرفتیم و اعـداد OD هـر ردیـف مـربوط به هر نمونه سرم را با آن مقایسه و اولین عدد OD بالاتر از آن را معین کرده و رقت مـربوط را تـراز آن نمونه سرم در نظر می‌گرفتیم. ترازهای کمتر از ۸۰ : ۱ منفی، ۱:۸۰ حد مرزی و تراز ۱:۱۶۰ به بالا را مثبـت در نظـر گرفتـیم. ایـن توصیه در نتیجه تجزیه و تحلـیل آمـاری تجـربه‌های درازمدت انجام این آزمون بر تعـداد بسـیار زیـاد نمونـه هـا در مقایسـه با نتایج MAT بدست آمده است.(۹) در هر دو روش الیزای کمی و کیفی از دسـتگاه الـیزا واشـر بـا نام تجاری SLT96PW ساخت شـرکت SLTL abinstruments اتـریش بـرای شستشـوی پلیـت‌هـا و از دسـتگاه الـیزا ریـدر اتوماتیک با نام تجاری SUNRISE سـاخت TECAN اتریش برای خواندن نتایج با طول موج ۴۹۲ نانومتر استفاده شد و در هر دو روش از کونـژوگه‌هـای ضـد IgM و ضـد IgG انسـانی متصـل به پراکسیداز ساخت شرکت BIO-RAD استفاده شد.

تمـام سرم‌ها به روش MAT کمّی و با استفاده از سه پانل، متشـکل از ۲۵ سـرووار از لپتوسـپیراهای بـیماریزا و سـه سـرووار لپتوسـپیرای غـیر بـیماریزا مـورد آزمـایش قـرار گرفتـند. در این روش برای هر نمونه سرم سه میکروپلیت ۹۶ حفـره‌ای بـرای سه پانل میکروبی مزبور در نظر گرفته

www.SID.ir

Archive of SID

مـی‌شـد و شـماره نمونه و شماره پانل روی پلیت ها درج مـی شـد. از سـرم رقـت هـای سـریالی با کمک PBS با PH = ۷/۲ تهـیه شـده و هـر ردیف از پلیت به یک سویه اسـتاندارد اختصـاص داده مـی‌شد. ۵۰ لاندا سوسپانسیون میکروبـی بـه حفـرات ردیـف مـربوطه اضـافه شد. سپس پلیـت‌ها در دمای ۳۰° سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شـده و نتایج با میکروسکوپ زمینه تاریک خوانده می‌شد. هر رقت که جمعیت میکروبی آن نصف شده بود یعنی ۵۰ درصـد باکـتری‌های آن اگلوتینه شده بودند، تراز آن نمونه سـرم نسبت به آن سویه در نظر گرفته می‌شد. طبق توصیه آزمایشـگاه مـرجع کـه حاصـل تجـزیه و تحلـیل آمـاری تجـربه‌هـای دراز مدت آنها بر تعداد کثیری از نمونه‌های بالینـی مثبـت و منفی است (۹)، ترازهای ۱:۱۶۰ به بالا را مثبـت و کمتر از آن را منفی تلقی کرده و این آزمون را به عـنوان اسـتاندارد طلایـی در نظر گرفته و نتایج حاصل از آزمون های الیزای نیمه کمّی و کیفی را با آن سنجیدیم.

نتایج

از ۲۸۲ نمونـه سـرم آزمـایش شـده ، ۱۰۴ نمونه با آزمون MAT مثبت (۳۶/۹ درصد) و ۱۷۸ نمونه منفی شدند (۱۲/ ۶۳ درصـد). نـتایج آزمـون‌هـای الـیزای کمّـی و کیفی در تابلوی ۱ نشان داده شده است.

تابلوی ۱: نتایج آزمون‌های الیزای نیمه کمّی و کیفی برای ۲۸۲ نمونه سرم مربوط به بیماران مشکوک به لپتوسپیروز

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

مقایسـه نـتایج آزمون‌های الیزای کمّی و کیفی در قیاس با نتایج MAT در تابلوی شماره ۲ مندرج است.

با در نظر گرفتن ۱۰۴ مورد مثبت با آزمونMAT و مقایسه نـتایج دو روش الـیزای مـزبور، مقادیر حساسیت، ویژگی، ارزش اخـباری مثبت و منفی آنها را محاسبه کردیم که در تابلوی ۳ نشان داده شده است.

تابلوی ۲: مقایسه نتایج آزمون‌های الیزای نیمه کمّی و کیفی در قیاس با نتایج MAT

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

تابلو ۳: مقایسه دو روش الیزای نیمه کمّی و کیفی براساس ملاک‌های ارزشیابی تشخیصی

نوع آزمون	حساسیت	ویژگی	ارزش‌اخباری 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

تـابلوی بالینـی لپتوسپیروز مشابه بسیاری از عفونت‌های باکتریایـی یـا ویروسـی دیگـر اسـت. چـون علائم بالینی اختصاصـی نـدارد، تشخیص بالینی آن مشکل و در اغلب مـوارد غیرممکن است. بنابراین تشخیص آزمایشگاهی آن اهمیـت دارد. اگـر لپتوسـپیروز زود تشـخیص داده شـود براحتـی مـداوا مـی‌شود ولی در غیر این صورت احتمال پیشـرفت بـیماری بـه سـمت نارسـایی کلـیوی وجـود خواهدداشـت (۱۰). در تشـخیص لپتوسـپیروز انجـام آزمـون‌هـای سـرولوژی جایگـاه مهمـی دارنـد (۱۱) زیرا مشـاهده مسـتقیم باکـتری در نمونـه‌هـای بالینـی بـا میکروسـکوپ زمیـنه تـاریک بسـیار مشـکل اسـت و حساسیت و ویژگی بالایی ندارد. از طرف دیگر، جداکردن باکـتری نـیز از نمونـه‌هـای بالینـی بـا انجام کشت بسیار مشـکل و وقـت‌گـیر بوده و اغلب ناموفق است (۵و۶). به همیـن دلـیل آزمـون MAT بـرای تشـخیص ایـن بیماری استاندارد طلایی محسوب می‌شود ولی انجام این آزمون به

www.SID.ir

Archive of SID

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 (٥،٦و١١).

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(٤ و ١٣). برای تشخیص و سنجش پادتن‌های اختصاصی لپتوسپیرا به روش الیزا، فراورده‌های پادگنی مختلفی تولید شده و راهکارهای متنوعی نیز ارائه شده است (٤و١٢). بطور کلی روش‌های الیزا دارای حساسیت هستند ولی در مقایسه با MAT ویژگی سرورواری کمتری دارند (٤و١٢). 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 (١١و١٣). الیزاهایی که برای تشخیص لپتوسپیروز انسانی تکامل داده شده اند طیف گسترده‌ای دارند و قادر به تشخیص سرووار سبب ساز عفونت نیستند امّا روشی سریع و مطمئن برای تشخیص این بیماری محسوب می‌شوند (٤ و ١٢).

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 ارزش‌های تشخیصی دو روش الیزای کمّی و کیفی در تشخیص لپتوسپیروز براساس مقادیر حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی (تابلوی ٣) 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 گرفته‌شد. 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 ٣ نشان می دهند 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 نتیجه گیری کرد که الیزای نیمه کمّی از ارزش تشخیصی و اطمینان بیشتری برخوردار است. نتایج مطالعات مشابه در تابلوی ٤ درج شده است.

تابلوی٤: بررسی نتایج الیزا در چند مطالعه مشابه دیگر

مطالعه	نوع الیزا	حساسیت	ویژگی
ایتالیا(١٤)	Pan Bio IgM – ELISA	١٠٠٪	٩٥٪
امریکا(١٥)	Microplate IgM-ELISA	٨٦/٥٪	٩٧٪
تایلند (١٦)	Deoxycolate Extracted IgM-ELISA	٩٧/٦٪	٩٤/١٪
هندوستان(١٧)	IgM-ELISA روز ٣-٢ بیماری	٢٨/١٪	–
	IgM-ELISA روز ٥-٤ بیماری	٥٤٪	–
	IgM-ELISA روز ٦-٥ بیماری	٧٧/٨ ٪	–

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.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Joseph M VinetZ. 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, Surveilance and Control.Genva;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, Terpestra WJ Leptospirosis in Travelers. Clin Infec Dise 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 Infec Dise 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. Jouranl of Clinical Microbiology 1980; 11: 452-457.

13. Adler B, Farine S. Antibody Response in Human Leptospiro 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-Imm uno Sorbent Assay and Indirect Hemagglutination on Assay for Detection of Leptospiral antibodies by Using Three Different Antigenes. 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 doses 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 final 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 282single sera of patients who were suspected of Leptospirosis by a commercial none quantities and an in-house semi quantative 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 , specifity, 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 comerical 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 quantative IgM ELISA was more specific and commercial qualitative IgM- ELISA was more sensitive.

Key words: Enzyme – Linked Immunosorbent Assay/ Leptospirosis

www.SID.ir