مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۹، شماره ٤ (پیاپی ۲۸) ، تابستان ۱۳۸۷

تعیین حساسیت و ویژگی روش‌های الیزای خانگی در تشخیص لپتوسپیروز در سرم

حمیدرضا هنرمند [۱*](Ph.D)، مطهره نظافت‌طبالوندی [۲](M.Sc)، آبتین حیدرزاده [۱](Ph.D)، بهرام سلطانی [۱](Ph.D)، ابراهیم میرزاجانی [۱](Ph.D)، مهدی آسمار [۲](Ph.D)

۱ - *دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی*

۲ – *دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان*

چکیده

سابقه و هدف: لپتوسپیروز یک بیماری مشترک انسان- حیوان بسیار شایع در جهان است و در استان گیلان شیوع فصلی و به ویژه در شالی‌کاران دارد. تشخیص لپتوسپیروز با اتکا به علائم بالینی به دلیل تشابه آن با اغلب عفونت‌های حاد مشکل است. چون مشاهده مستقیم حساسیت اندکی دارد و کشت نیز به دلیل کند رشد بودن باکتری بسیار وقت‌گیر بوده و موارد منفی کاذب زیادی دارد، آزمون‌های سرولوژیکی در تشخیص لپتوسپیروز جایگاه مهمی دارند. میکرو آگلوتیناسیون (MAT) استاندارد طلایی محسوب می‌شود ولی یک آزمایش روتین و قابل اجرا در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیست و توسل به روش‌های آسان‌تر و دارای حساسیت و ویژگی بالا یک ضرورت است. هدف این مطالعه راه‌اندازی و ارزیابی یک روش الیزای غیرتجاری کمی، با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده از چند گونه بومی شایع در ایران بوده است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۹۸ نمونه مثبت و ۵۴ نمونه منفی که باMAT آزموده شده بودند و ۳۰ نمونه شاهد در این مطالعه با روش ذکر شده بررسی شدند. جهت تعیین cut off برای الیزای خانگی، از یک کیت الیزای تجاری معتبر به نام SERION ELISA classic leptospeira. IgM استفاده شد و نتایج حاصله با آن مقایسه، برابر سازی و استاندارد گردید.

یافته‌ها: برای الیزای تجاری یک مورد منفی کاذب و یک مورد مثبت کاذب حاصل شد. در الیزای خانگی تعداد موارد مثبت کاذب ۱۰ و موارد منفی کاذب یک عدد بود. مقادیر حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی و بالاخره درستی تمام الیزای خانگی به ترتیب ۹۹، ۸۹/۱، ۹۰/۷ ، ۹۸/۸ و ۹۴/۲ تعیین شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به حساسیت و ویژگی بالای الیزای خانگی راه‌اندازی شده در این مطالعه و تشابه نزدیک آن با مطالعات قبلی انجام شده توسط محققان دیگر که اغلب آن‌ها از کیت‌های تجاری استفاده نموده بودند، می‌توان تست IgM-ELISA را در تشخیص لپتوسپیروز انسانی ارزشمند تلقی نمود.

واژه‌های کلیدی: لپتوسپیروز، الیزا، حساسیت، ویژگی

مقدمه

لپتوسپیروز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مشترک انسان- حیوان در جهان است که در مناطق گرم‌سیری، نیمه گرم‌سیری و معتدله مرطوب شیوع دارد [۱-۴]. چهارپایان اهلی و وحشی و جوندگان مخزن این بیماری هستند و باکتری از طریق ادرار خود دفع می‌کنند که می‌توانند در آب و یا خاک مرطوب زنده مانده و از طریق خراش جلدی، به بدن میزبان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۳۴۱۰۱۱ نمابر: ۶۶۹۰۰۰۷ - ۰۱۳۱

Email: honarmand_36yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۹/۳

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-19]

بعدی (حیوان یا انسان) وارد گردند [۶،۵،۲،۱]. لپتوسپیروز انسانی در ایران در حاشیه دریای خزر به‌ویژه در استان گیلان و به‌طور عمده در کشاورزان شالی‌کار و در فصول گرم سال شیوع دارد [۷ ، ۸] و تشخیص آن از معضلات بهداشتی شایع این منطقه است. تشخیص لپتوسپیروز با اتکا به علائم بالینی مشکل است زیرا تابلوی بالینی آن با اغلب عفونت‌های باکتریایی یا ویروسی حاد تشابه دارد [۴،۳]، بنابراین تشخیص آزمایشگاهی آن اهمیت زیادی دارد [۴]. این بیماری اگر زود تشخیص داده شود به‌راحتی مداوا می‌شود وگرنه احتمال پیشرفت بیماری به سمت نارسایی کلیوی وحتی مرگ وجود خواهد داشت [۹]. آزمون‌های سرولوژیکی برای تشخیص لپتوسپیروز جایگاه مهمی دارند [۱۱،۱۰] زیرا مشاهده مستقیم باکتری در نمونه‌های بالینی توسط میکروسکوپ زمینه تاریک بسیار مشکل است وحساسیت و ویژگی بالایی ندارد و جدا کردن باکتری نیز از نمونه‌های بالینی با روش کشت بسیار مشکل، وقت‌گیرو طولانی بوده و اغلب ناموفق است [۴،۲]. به همین دلیل آزمون میکرو آگلوتیناسیون (MAT) برای تشخیص این بیماری استاندارد طلایی محسوب می‌شود ولی انجام این آزمون به داشتن و نگهداری دائمی تعداد کافی از سویه‌های استاندارد و پاساژ دائمی آنها نیاز دارد که پرهزینه بوده و برای کارکنان آزمایشگاه خطرآفرین است. ضمناً اندازه‌گیری نتایج این آزمون به تخصص و تجربه زیادی نیاز دارد [۲ ، ۴ ، ۵] بنابراین به عنوان یک آزمایش روتین برای آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مناسب نیست [۷]، ناچار باید به روش‌های آسان‌تر که ضمناً از حساسیت و ویژگی بالائی برخوردارند از جمله الیزا متوسل شد [۱۱،۴].

پادتن‌های IgM اختصاصی ضدپادگن‌های سطحی لپتوسپیرا اغلب از روز ششم بیماری در خون قابل سنجش هستند [۱۳،۱۲] ولی IgG دو هفته پس از شروع عفونت پدیدار شده و ماه‌ها دوام می‌یابد [۱۲]. در اغلب مطالعات برای الیزا حساسیت و ویژگی قابل توجهی گزارش شده است، حساسیت آن به زمان نمونه‌برداری بستگی تام داشته و در مجموع به‌عنوان یک روش حساس، سریع و قابل اطمینان برای تشخیص لپتوسپیروز، از اواخر هفته اول بیماری کاربرد دارد [۱۱،۱۰]

هدف این مطالعه تعیین و مقایسه ارزش‌های تشخیصی (حساسیت و ویژگی و...) یک الیزای خانگی راه‌اندازی شده با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده از سویه‌های بومی شایع در منطقه، در تشخیص لپتوسپیروز در مقایسه با روش مرجع (MAT) بوده است.

مواد و روش‌ها

در پاییز سال ۱۳۸۵ تعداد ۲۰۰ نمونه سرم متعلق به بیماران مشکوک به لپتوسپیروز، موجود در مرکز بهداشت استان گیلان، با موافقت مسئولین مربوطه، جهت انجام این مطالعه اخذ گردید. برای راه‌اندازی تست الیزای خانگی، ۴ سویه بومی بیماری‌زای شایع در منطقه، متعلق به سروارهای: ایکترو هموراژی، پومونا، هارجو و گریپوتیفوزا انتخاب شدند. کشت انبوه از سویه‌های مزبور در محیط کشت مایع EMJH که یک محیط کشت اختصاصی و غنی برای رشد دادن لپتوسپیراها است تهیه شد. پس از کدر شدن هر محیط کشت، جمعیت باکتریایی آن توسط اسپکتروفتومتر، در طول موج ۴۵۰ نانومتر و با رجوع به منحنی استاندارد مربوطه، محاسبه و OD بالاتر از ۶٪ مورد استخراج آنتی‌ژن قرار می‌گرفتند. سپس محیط کشت‌ها به‌صورت جداگانه به لوله‌های فالکون ml ۱۵ انتقال داده شده و با دور rpm ۶۰۰۰، به‌مدت یک ساعت سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شده و رسوب حاصله با PBS دوبار شستشو می‌شد. سپس تمام آن‌ها را به یک لوله انتقال داده و با روش ذوب و انجماد، به تکرار ۵ بار، یک سوسپانسیون آنتی‌ژنی یک‌نواخت تهیه می‌شد که از نوع آنتی‌ژن تام بوده و برای مصارف تست الیزا قابل استفاده است. برای استانداردسازی OD آن‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر با افزودن آب مقطر به ۷ ٪ رسانده می‌شد.

در این مطالعه از پلیت‌های الیزا خام از جنس پلی استیرن با کف مسطح استفاده شد. مقدار ml ۱۰۰ از سوسپانسیون آنتی‌ژن را به هرحفره اضافه کرده و پلیت را در دمای ۳۷

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-19]

درجه در انکوباتور قرار می‌دادیم تا پس از تبخیر شدن، پلیت از آنتی‌ژن پوشانده شود.

ابتدا تمام نمونه سرم‌ها با انجام تست آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) که آزمون استاندارد طلایی برای تشخیص لپتوسپیروز است غربال‌گری شدند و موارد مثبت و منفی تعیین شد. در این مورد نیز از همان ۴ سویه بومی برای انجام تست MAT استفاده شد. طبق توصیه مندرج در راهنمای WHO تیترهای ۱:۸۰۰ برای یک نمونه سرم و یا افزایش تیتر ۴ برابر در دو نمونه سرم متوالی، ملاک قطعی مثبت بودن آن نمونه سرم از نظر بیماری لپتوسپیروز است [۴]. بدین ترتیب تعداد ۹۸ نمونه مثبت که ملاک‌های ذکر شده را داشتند و تعداد ۵۲ نمونه سرم منفی که کم‌ترین تیتر را داشتند انتخاب گردیدند. ضمناً ۳۰ نمونه سرم شاهد که به بیماران مبتلا به هپاتیت B، تیفوئید، و بروسلوز متعلق بودند نیز استفاده شدند. جهت استانداردسازی و تعیین cut off برای الیزای خانگی، از یک کیت الیزای تجاری معتبر با معروفیت بین‌المللی به نام SERION ELISA classic leptospeira IgM ساخت شرکت Gebrauchanweisung کشور آلمان استفاده شد. تمام نمونه‌های مثبت و منفی و شاهد با کیت الیزای فوق و طبق دستورالعمل کارخانه سازنده مورد آزمایش قرار گرفتند و سپس توسط الیزای خانگی بررسی شدند و برای این‌که یکسان‌سازی به نحو مطلوب صورت گیرد، برای اجرای الیزای خانگی نیز از یک نوع کونژوگه تجاری (Antihuman IgM conjugated with alkalin phosphatase.Bethyl,lot A80-100AP) و نیز از یک نوع سوبسترای تجاری (Paranitrophenol pyrophosphate.Sigma,lot 010k-8200) مشابه انواعی که در الیزای تجاری موجود بودند استفاده شد. بدین منظور یک نمونه سرم که در MAT مثبت قوی و در الیزای تجاری تیتر بالا داشت را در نظر گرفته از آن رقت‌های ۱:۱۰ تا ۱:۴۰۹۶۰ تهیه و برای تمام رقت‌های ذکر شده، الیزای تجاری و خانگی انجام و مقایسه شد. در این مطالعه برای تعیین cut off الیزای خانگی میانگین تیتر نمونه‌های منفی را با دو برابر مقدار انحراف معیار جمع نموده و آن‌را به‌عنوان مبنا (cut off) در نظر گرفتیم. شایان ذکر است که نتایج تمام آزمایشات در نرم افزار EXCEL ,OFFICE 2003 ذخیره شده، پردازش گردیده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای تعیین حساسیت از فرمول تقسیم مقدار مثبت واقعی بر مجموع مقادیر منفی کاذب با مثبت واقعی ضرب در ۱۰۰ و برای تعیین ویژگی از فرمول تقسیم مقدار منفی واقعی بر مجموع مقادیر منفی کاذب با منفی واقعی ضرب در ۱۰۰ استفاده شد.

نتایج

از تعداد ۹۸ نمونه مثبت و مجموع۸۲ نمونه منفی و شاهد که با روش‌های الیزای تجاری، الیزای خانگی و لاتکس آگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفته شدند، در تست الیزای تجاری از ۹۸ عدد مثبت تعداد ۹۷ مورد مثبت و یک عدد مورد منفی گردید. و از تعداد ۸۲ مورد منفی– شاهد، تعداد ۸۱ مورد منفی و یک عدد مثبت به‌دست آمد و بدین ترتیب یک مورد منفی کاذب و یک مورد مثبت کاذب با روش مزبور حاصل ثبت شد. در الیزای خانگی از ۹۸ مورد مثبت، تعداد ۹۷ مورد مثبت و یک مورد منفی حاصل شد و از ۸۴ مورد منفی– شاهد تعداد ۷۴ مورد منفی و ۱۰ عدد مثبت به‌دست آمد. بنابراین با روش مزبور، تعداد موارد مثبت کاذب ۱۰ و موارد منفی کاذب یک عدد بود. با توجه به نتایج حاصله و طبق فرمول‌های مربوطه، مقادیرحساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی و بالاخره درستی تمام تست الیزای خانگی محاسبه شد (جدول ۱).

جدول۱. ارزیابی تست‌های الیزا و لاتکس آگلوتیناسیون بر اساس ملاک‌های استاندارد

نوع تست	حساسیت	ویژگی	ارزش اخباری مثبت	ارزش اخباری منفی	درستی تام*
الیزای خانگی	۹۹	۸۹/۱	۹۰/۷	۹۸/۸	۹۴/۲

* Accuracy

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-19]

بحث و نتیجه‌گیری

لپتوسپیروز علائم پاتوگونومیک و اختصاصی که با تکیه به آن تشخیص بالینی امکان‌پذیر شود را ندارد و به همین دلیل اتکا به آزمایشگاه الزامی است [۴،۳] ولی تشخیص آزمایشگاهی آن نیزدشوار است. مشاهده مستقیم نمونه بالینی، حساسیت کمی دارد زیرا تعداد باکتری در نمونه اندک بوده و شکل ظاهری آن به گونه‌ای است که با رشته‌های فیبرینی موجود در خون و مایع مغزی- نخاعی اشتباه می‌شود و در ادرار نیز به سرعت تجزیه می‌گردد [۱۵]. از طرف دیگر، کشت روش مناسب و حساسی برای تشخیص لپتوسپیروز نیست زیرا موارد منفی کاذب آن زیاد است و زودتر از ۶ هفته جواب نمی‌دهد و به همین دلیل آزمون MAT به‌عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص لپتوسپیروز پذیرفته شده است [۱۳،۴،۳] و در تمام آزمایشگاه‌های رفرانس، برای تائید تشخیص و نیز برای تایپینگ لپتوسپیرا استفاده می‌شود [۴]. روش مزبور یک تست سرولوژیکی است. آزمون‌های سرولوژیکی از تنوع زیادی برخوردار بوده و از نظر سهولت اجرا، حساسیت، ویژگی، درستی تام، و نیاز به تجهیزات تفاوت زیادی دارند. تعدادی از آن‌ها در سال‌های اخیر در تشخیص بیماری‌های عفونی جایگاه مستحکمی یافته‌اند. الیزا یکی از متداول‌ترین تست‌های تشخیص سرولوژیکی است و برای تشخیص بیماری‌های عفونی بسیار رایج شده است و با توجه به حساسیت و ویژگی قابل توجهی که در اغلب مطالعات نشان داده است به جانشین مناسبی برای MAT که به دلایل متعدد به ویژه لزوم نگه‌داری دائمی پانلی متشکل از کشت زنده سویه‌های استاندارد و بومی قابل اجرا در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیست، تبدیل شده است [۱۱،۱۰،۵]. در سال‌های اخیر چندین کیت تجاری معرفی شده و در اغلب آزمایشگاه‌ها مورد مصرف قرار گرفته‌اند. الیزا در مقایسه با سایر روش‌های سرولوژیکی از نظر هزینه، سهولت اجرا، حساسیت، ویژگی، و نیاز به تجهیزات برتری داشته و در مقایسه با MAT گرچه حساسیت و ویژگی کم‌تری دارد و نمی‌تواند سروار مسوول بیماری را تشخیص دهد ولی از چندین مزیت برخوردار است از جمله: قابلیت سنجش جداگانه IgM و IgG ، عدم لزوم کار کردن با کشت زنده باکتریایی و بالاخره سهولت خواندن نتایج [۱۳،۱۱،۱۰،۴]. حساسیت و ویژگی الیزا به چندین عامل وابسته است به ویژه به روز نمونه‌برداری و به مجموعه آنتی‌ژنی که پلیت با آن پوشانده شده است [۱۳]. چون لپتوسپیروز یک بیماری باکتریایی حاد است، تنها سنجش IgM برای آن ارزش تشخیصی دارد و تیتر IgM بعد از روز ششم بیماری به حد قابل سنجش می‌رسد بنابراین حساسیت IgM-ELISA در هفته اول بیماری کم و از هفته دوم افزایش می‌یابد [۱۱،۱۰] و اگر پلیت‌ها با مجموعه آنتی‌ژنی استخراج شده از یک و یا ترجیعاً از چندسویه بومی و بیماری‌زای شایع در محل به جای سویه‌های استاندارد و سویه‌های غیربیماری‌زا استفاده شود، حساسیت و ویژگی تست به مراتب افزایش می‌یابد [۱۳]. الیزا در مطالعات مختلف مورد ارزیابی قرار گفته شدند از جمله: در مطالعه Camargo و همکاران (۱۹۹۸) IgM-ELISA با آزمودن بر روی ۱۰۸ نمونه سرم جفت بیماران مبتلا به لپتوسپیروز که مثبت بودن آن‌ها با افزایش تیتر ۴ برابر یا بیش‌تر در MAT تائید شده بود و ۲۴۵ نمونه سرم منفی و شاهد بررسی شد که حساسیت و ویژگی آن را ۹۹٪ به‌دست آوردند [۱۶]. Smits و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه خود، تست IgM-ELISA را برای ۱۸۷ نمونه سرم بیماران مبتلا به لپتوسپیروز که مثبت بودن آن‌ها در آزمون MAT تائید شده بود و نیز برای ۲۴۵ نمونه سرم منفی و شاهد به‌کار بردند و حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی، تست IgM-ELISA را به ترتیب ۸۵/۵، ۹۷/۹، ۸۷/۶، و۹۷/۴ مشخص نمودند [۱۷]. در مطالعه Vitale و همکاران (۲۰۰۴) نیز تست IgM-ELISA در تشخیص لپتوسپیروز انسانی با آزمودن آن بر روی ۱۹ نمونه سرم بیماران مبتلا به لپتوسپیروز که تشخیص آن‌ها در آزمون MAT تائید شده بود ارزیابی شد که حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ است برای آن به‌دست آمد [۱۸]. در مطالعه Ooteman و همکاران (۲۰۰۶) تست‌های MAT و PCR و IgM-ELISA را در تشخیص لپتوسپیروز انسانی با آزمودن سرم‌های ۱۲۵بیمار دارای علائم بالینی لپتوسپیروز مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-19]

حساسیت و ویژگی الیزا به ترتیب ۹۶/۶ و ۹۳/۳ ٪ اعلام شد [۱۹]. در یک مطالعه جامع که توسط Banjani و همکاران (۲۰۰۳) که بر روی ۱۲۸ نمونه سرم جفت مربوط به بیماران مبتلا به لپتوسپیروز و ۶۴۲ نمونه سرم افراد سالم با آزمودن آن‌ها توسط ۴ تست سرولوژیکی: IgM-ELISA، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA) ،IgM-Dipstick- dot ELISA IgM صورت گرفت، حساسیت و ویژگی IgM-ELISA به ترتیب ۸۶/۵ و ۹۷ ٪ به‌دست آمد. در این مطالعه نیز از MAT به‌عنوان تست استاندارد طلائی استفاده شد [۲۰].

در مطالعه ما از سرم‌های مربوط به اواخر هفته اول و هفته دوم بیماری و از آنتی‌ژن‌های استخراج شده از ۴ سویه بومی استفاده شد و ملاک‌های ارزیابی در آن با بیش‌تر مطالعات بیان شده مشابهت نزدیک داشت.

نتایج حاصله از این مطالعه و مطالعات مشابه که معرفی شدند نشان می‌دهند که تست IgM-ELISA در تشخیص لپتوسپیروز انسانی ارزشمند است و در مقایسه با MAT به عنوان استاندارد طلائی تشخیص، قابل اعتماد است ولی مثل هر تست دیگر، محاسن و معایبی دارد از جمله:

۱- انجام آن به تجهیزات آزمایشگاهی اختصاصی و زیادی نیاز ندارد و در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی معمولی و غیرمجهز نیز قابل اجرا می‌باشد.

۲-تست IgM-ELISA چون قادر است IgM را جداگانه بسنجد می‌تواند موارد جدید و فعال بیماری را با مواجهات قبلی تفکیک دهد.

۳- تست IgM-ELISA قادر نیست سرووار سبب‌ساز بیماری را تشخیص دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آقایان دکتر رضوانی و مهندس رسایی و از آقای محمود خوش‌سرور کارشناس آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد به خاطر همکاری صمیمانه در جمع‌آوری نمونه‌ها کمال تشکر را دارند.

منابع

[1] Vinet JM. Leptospirosis. tropical and travel associated disease. Micobiol Rev 2001; 14: 527-538.
[2] Plank R, and Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of Leptospira SPP in humans. Microbes Infec 2000; 2: 1265-1276.
[3] Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2000; 14: 296-326.
[4] Fain S. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization Publishing 2003; p:1-23.
[5] Vinetz JM. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 2001;14: 527-538.
[6] Van Creel R, Speelman P, Gravekamp C, and Terpestra WJ. Leptospirosis in Travelers. Clin Infec Dise 1994; 19: 132-134.
[7] Mansor Ghanaeh F, and Honarmand H. Leptospirosis and Prevalence of the disease in Guilan. Researech Division of Guilan University of Medical Sciences University 2006; First edition: 89-99.
[8] Honarmand H, Mansor Ghanaeh F, Eshraghi S, and Khoramizadeh MR. Study on prevalence of Leptospirosis in Guilan in 2004. J Gorgan Uni Med Sci 2005; 7 :52-56 (Persian).
[9] Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, Zehner-Hansen S, Jarrige B, and Daijardin JB. Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. Clin Infect Dis 1997; 25: 720-724.
[10] Terpstra WJ, Lighthare GS, and Schoone GJ. ELISA for detection of specific IgM and IgG in human Leptospirosis. J Gen Microbiol 1985; 131: 377-385.
[11] Adler B, Murphy AM, Locamini SA, Fain S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1980; 11: 452-457.
[12] Adler B, and Faine S. Antibody Response in Human Leptospirosis. Nat Symp Leptospira, Leptospirosis and other Spirochaeta, Bucharest 1975: 271-276.
[13] Hartskeerl R.A. Manual for Diagnosis of Leptospirosis. KIT Biomedical Research. Netherland. 2004; 34-60.
[14] Ryu E. Rapid Agglutination Test for Leptospira without non-specific reaction. Bull of Int Epizoot 1970; 73: 49-58.
[15] Merien F, Baranton G, and perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J Infect Dis 1995; 172: 281-285.
[16] Camargo ED, Angela PB, Emilson DS, Marcos VS, and Rui VA. Macroscopic Agglutination Test for rapid diagnosis of human leptospirosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 3138-3142.
[17] Smits HL, van der Hoorn MA, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, Terpstra WJ, and Hartskeerl RA. Simple Latex Agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. J Clin Microbiol 2000; 38 : 1275-1275.
[18] Vitale G, La Russa C, Galioto A, Chifari N, Mocciaro C, Caruso R, Micalizzi A, Mansueto P, Di Rosa S, and Mansueto S. Evaluation of an IgM-ELISA test for the diagnosis of human leptospirosis. New Microbiol. 2004; 27: 149-154.
[19] Ooteman Mc, Vago AR, and Koury MC. Evaluation of MAT, IgM_ELISA, and PCR for the diagnosis of acute human leptospirosis. J Microbiol Methods 2006; 65: 247-257.
[20] Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, and Weyant RS. Evaluation of four commercially available rapid test for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 803-809.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-19]

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-19]

Evaluation an in–house IgM-ELISA for the diagnosis of human *leptospirosis*

Hamidreza Honarmand (Ph.D) [1], Motahare Nezafat Tabalvandi(M.Sc)[2], Abtin Heidarzadeh (Ph.D)[1], Bahram Soltani (Ph.D)[1], Ebrahim Mirzajani (Ph.D)[1], Mahdi Asmar (Ph.D)[2]

1 - Cellular and Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Guilan, Iran.
2 - Azad University of Lahijan, Larijan, Iran.

(Received 9 May, 2008 Accepted 24 Nov, 2008)

Background: *Leptospirosisis* a very common zoonosis in the world. Culture is low sensitive with high rate false negative. So, serological assays are best alternative way for its diagnosis. Microscopic agglutination test (MAT) is gold standard but performing it requires a panel of some standard strains and need periodic subculturing of them, and also requires double sera with at least two weeks interval to investigate seroconversion. Furthermore, other serological methods should be investigated. The aim of this study was to evaluate an in-house IgM-ELISA developed by using antigen extracted from endemic isolates.

Material and Method: I4 endemic isolates belonged to the serogroups: *Icterohaemorrahgia, Pomona, Hardjo, and Gripotyphosa,* were inoculated in EMJH to take well grown cultures. Whole antigen was extracted from each culture by Freezing-Thawing method in distilled water. Same amount of extraction of each culture with same OD number in 550nm were mixed together and were used for coating Elisa plates. Antihuman IgM conjugated with alkaline phosphatase were used in this assay. We used a commercial quantitative IgM-ELISA (SERION ELISA classic) for cut off determination. MAT was used for confirmation positive and negative cases. Sera with titer ≥ 1:100 in MAT and positive criteria in commercial quantitative IgM-ELISA were considered as positive cases.

Results: 98 positive cases and 54 negative cases were chosen by screening 200 sera of patients suspected to leptospirosis by using MAT and commercial quantitative IgM-ELISA. We also used 30 sera of patients affected by hepatitis B, salmonelosis, and brucellosis as control cases. 88 of 98 positive cases were positive (false negative=10), 1 of 54 negative and all control case were negative (false positive =1) in the test. Sensitivity, specificity, PPV, NPV, and accuracy of the test were evaluated :99.0% , 89.1% , 90.75 , 98.8% , and 94.25 , respectively.

Conclusions: ELISA for measuring specific IgM to leptospires antigen(s) could be a good alternative to MAT, which is not a routine diagnostic assay to perform in clinical diagnostic laboratories and only is reliable when there is paired sera. Sensitivity and specificity of the assay is dependent to several factors, especially to the type of antigen coated on plates, quality of assay materials, and also to the time of sampling. Sera of days ≥ 6 of the disease has enough antibodies to measure and a common antigen extracted from several common pathogenic leptospires, especially from endemic isolates, could be more helpful to increase accuracy of the assay.

Keywords: Leptospirosis, IgM-ELISA, Sensitivity, Specificity

* Corresponding author: Tel : +98 911 3410110 Fax : +98 131 6690007
honarmand_36@yahoo.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-19]