

تعیین حساسیت و ویژگی آزمون لاتکس آگلوتیناسیون تجربی در تشخیص لیتوسپیروز با استفاده از سویه های بومی

حمید رضا هنرمند مطهره نظافت طبالوندی ابراهیم میرزا جانی بهرام سلطانی

چکیده

سابقه و هدف: لیتوسپیروز یکی از بیماری های شایع مشترک بین انسان و حیوان در جهان می باشد که هر ساله در استان گیلان و به ویژه در شالیکاران شیوع فصلی دارد. تشخیص لیتوسپیروز با اتکا به علائم بالینی، به دلیل تشابه آن با اغلب عفونت های حاد مشکل است. لذا آزمون های سرولوژیکی در تشخیص لیتوسپیروز جایگاه مهمی دارند و میکرو آگلوتیناسیون (MAT)، استاندارد طلایی محسوب می شود ولی چون در آزمایشگاه های تشخیص طبی، معمول و قابل اجرا نیست، توسل به روش های آسان تر یک ضرورت محسوب می شود. لذا این مطالعه به منظور راه اندازی و تعیین حساسیت و ویژگی یک آزمون لاتکس آگلوتیناسیون تجربی در تشخیص لیتوسپیروز انجام گرفته است.

مواد و روش ها: تعداد ۹۸ نمونه مثبت و ۵۴ نمونه منفی که با MAT آزموده شده بودند و ۳۰ نمونه شاهد، توسط یک سوسپانسیون آنتی ژنی از نوع آنتی ژن تام، که از چهار سویه شایع بومی تهیه شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: تعداد موارد مثبت کاذب ۱۵ عدد و موارد منفی کاذب ۱۲ عدد بوده است. مقادیر حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی و بالاخره درستی آزمون لاتکس آگلوتیناسیون راه اندازی شده به ترتیب ۸۹، ۸۴/۵، ۸۶/۷، ۸۷/۲ و ۸۷ درصد بدست آمد.

استنتاج: باتوجه به حساسیت و ویژگی نسبتا بالای این آزمون که به مطالعات قبلی انجام شده توسط محققان دیگر نزدیک است و با توجه به این نکته که انجام آن به تجهیزات آزمایشگاهی اختصاصی نیاز ندارد و در نقاط دور افتاده نیز قابل اجرا می باشد، لذا می توان آن را برای غربالگری اولیه با ارزش دانست.

واژه های کلیدی: لیتوسپیروز، سرولوژی، آزمون لاتکس آگلوتیناسیون

مقدمه

هستند و باکتری را از طریق ادرار خود دفع می کنند. این باکتری ها می توانند در آب و یا خاک مرطوب زنده مانده و از طریق خراش جلدی، به بدن میزبان بعدی (حیوان یا انسان) وارد گردند (۱، ۴، ۵، ۶). لیتوسپیروز انسانی

لیتوسپیروز یکی از شایع ترین بیماری های مشترک انسان و حیوان در جهان است که در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدله مرطوب، شیوع دارد (۱-۳). چهارپایان اهلی و وحشی و جوندگان، مخزن این بیماری

E-mail: honarmand_36@yahoo.com

مؤلف مسئول: حمیدرضا هنرمند - گیلان: دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۸/۴/۲۱ تاریخ تصویب: ۸۸/۶/۲۵

در ایران، در حاشیه دریای خزر، بویژه در استان گیلان و بطور عمده در کشاورزان شالیکار و معروف به تب شالیزار و در فصول گرم سال، شیوع دارد (۸،۷) و تشخیص آن از معضلات بهداشتی شایع این منطقه می باشد. تشخیص لپتوسپیروز با اتکا به علائم بالینی مشکل است زیرا تابلوی بالینی آن با اغلب عفونت های باکتریایی یا ویروسی حاد تشابه داشته (۴،۳) و بنابراین تشخیص آزمایشگاهی آن اهمیت زیادی دارد (۴). این بیماری اگر زود تشخیص داده شود براحتی مداوا می شود، در غیر اینصورت احتمال پیشرفت بیماری به سمت نارسایی کلیوی و حتی مرگ وجود خواهد داشت (۹). آزمون های سرولوژیکی برای تشخیص لپتوسپیروز جایگاه مهمی دارند (۹،۱۰،۱۱،۱۲) زیرا مشاهده مستقیم باکتری در نمونه های بالینی توسط میکروسکوپ زمینه تاریک بسیار مشکل است و از حساسیت و ویژگی بالایی نیز برخوردار نمی باشد و جدا کردن باکتری نیز از نمونه های بالینی با روش کشت بسیار مشکل، وقت گیر و طولانی بوده و اغلب ناموفق می باشد (۴،۲). به همین دلیل آزمون میکرو آگلوتیناسیون (MAT) برای تشخیص این بیماری استاندارد طلایی محسوب می شود. این آزمون که یک تست سرولوژیکی است بعنوان استاندارد طلایی تشخیص لپتوسپیروز پذیرفته شده است (۳،۴،۱۳) و در تمام آزمایشگاه های فرانس برای تأیید تشخیص و نیز برای تشخیص نوع لپتوسپیرا استفاده می شود (۴) ولی انجام این آزمون به داشتن و نگهداری دائمی تعداد کافی از سویه های استاندارد و پاساژ دائمی آنها نیاز دارد که پرهزینه بوده و برای کارکنان آزمایشگاه خطر آفرین می باشد. ضمناً خواندن نتایج این آزمون به تخصص و تجربه زیاد نیاز دارد (۲،۴،۵). گرچه این روش در تمام آزمایشگاه های مرجع دنیا و در آزمایشگاه های تحقیقاتی که در مورد این بیماری مطالعه می کنند متداول است ولی به عنوان یک آزمایش روتین برای آزمایشگاه های تشخیص طبی مناسب نیست (۷) و بناچار باید به روش های آسان تر و دارای حساسیت و

ویژگی بالاتر از جمله الیزا، ایمونو فلورسانس و لاتکس آگلوتیناسیون متوسل شد (۴،۱۱).

آنتی بادی های کلاس IgM اختصاصی ضد آنتی ژن های سطحی لپتوسپیرا اغلب از روز ششم بیماری در خون قابل سنجش هستند (۱۲،۱۳،۱۴) ولی IgG دو هفته پس از شروع عفونت پدیدار شده و ماه ها دوام می یابد (۱۵). آزمون لاتکس آگلوتیناسیون که می تواند آنتی بادی های آگلوتینه کننده از هر دو کلاس را بسنجد، در چندین مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفته و حساسیت و ویژگی بالایی از آن گزارش شده است (۲۰-۱۶). علیرغم معرفی شدن چندین کیت تجاری در سال های اخیر و ارزیابی آنها در برخی مطالعات، متأسفانه هیچکدام از آنها در کشور ما در دسترس نبوده و حتی ورود کیت های الیزا که بیشتر از آلمان وارد می شدند، از سه سال قبل ممنوع شده است و تمام مراکز تشخیصی دولتی و خصوصی استان گیلان با مشکل جدی مواجه هستند. راه اندازی روش های تشخیصی رایج و ساده از قبیل لاتکس آگلوتیناسیون، الیزا و ایمونو فلورسانس، با استفاده از سویه های بومی و امکانات موجود، حرکت مفیدی در راستای بر طرف کردن این مشکل بهداشتی خواهد بود.

این مطالعه به منظور راه اندازی و همچنین تعیین و مقایسه ارزش های تشخیصی (حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی و درستی) یک آزمون لاتکس آگلوتیناسیون تجربی با استفاده از آنتی ژن های استخراج شده از چهار سویه بومی شایع در منطقه، در تشخیص لپتوسپیروز در مقایسه با روش مرجع (MAT)، انجام گرفته است.

مواد و روش ها

در پاییز سال ۱۳۸۶ 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 راه اندازی

ابتدا تمام نمونه سرم‌ها با انجام تست آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT)^۲ که آزمون استاندارد طلایی برای تشخیص لپتوسپیروز است غربالگری شده و موارد مثبت و منفی تعیین شدند. در این مطالعه از همان ۴ سویه بومی برای انجام تست MAT استفاده شد. طبق توصیه مندرج در راهنمای WHO تیرهای ۱:۴۰۰ برای یک نمونه سرم و یا افزایش تیر ۴ برابر در دو نمونه سرم متوالی، ملاک قطعی مثبت بودن آن نمونه سرم از نظر بیماری لپتوسپیروز می‌باشد (۴). ولی سرم‌های بررسی شده در این مطالعه تمام زوج نبودند. بدین ترتیب تعداد ۹۸ سرم مثبت و ۵۲ سرم منفی انتخاب گردیدند. ضمناً ۳۰ نمونه سرم شاهد که به بیماران مبتلا به هپاتیت B، تیفوئید و بروسلوز متعلق بودند نیز به عنوان نمونه‌های شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام تست لاتکس آگلوتیناسیون، در مورد هر نمونه مقدار ۵۰ میکرو لیتر از سرم رقیق نشده را روی یک کارت که با روش ذکر شده آماده شده بود، ریخته شد و با یک خلال چوبی بمدت ۴ دقیقه مخلوط گردید و نتایج بصورت آگلوتیناسیون بارز (مثبت) و عدم آگلوتیناسیون (منفی) یادداشت شد. در این مورد نیز برای هر نمونه دو بار تست انجام شد. نتایج تمام آزمایشات در نرم‌افزار EXCEL, 2003 ذخیره شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. 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.

یافته ها

از تعداد ۹۸ نمونه مثبت، تعداد ۷۱ مورد مثبت قوی، ۱۵ مورد مثبت ضعیف (در مجموع ۸۶ مورد) و تعداد ۱۲ مورد نیز منفی شدند ولی برای ۸۲ مورد منفی -

تست لاتکس آگلوتیناسیون تجربی تعداد چهار سویه بومی بیماری‌زای شایع در منطقه، متعلق به سرووارهای: ایکترو همورازی، پومونا، هارجو و گریپو تیفوزا 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 شد و کشت‌های با OD بالاتر از ۰/۶، مورد استخراج آنتی‌ژن قرار گرفتند. بدین منظور، محیط کشت‌ها بصورت جداگانه به لوله‌های فالکون ۱۵ ml انتقال داده شد و با دور ۶۰۰۰ rpm، بمدت یک ساعت سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله، با بافر فسفات نمکی دوبار شستشو شد، سپس تمام آنها به یک لوله انتقال داده شد و ۵ مرتبه به وسیله روش ذوب و انجماد، یک سوسپانسیون آنتی‌ژنی یکنواخت تهیه شد که از نوع آنتی‌ژن تام^۱ بوده و برای تست لاتکس آگلوتیناسیون قابل استفاده بود. برای استانداردسازی، OD آنها در طول موج ۵۵۰ نانومتر، با افزودن آب مقطر به حد ۰/۷ رسانده شد (۱۳).

برای پردازش آنتی‌ژن، جهت انجام تست لاتکس آگلوتیناسیون، مقدار معینی از سوسپانسیون آنتی‌ژن مخلوط مزبور را به نسبت ۱:۱۰ با سوسپانسیون ذرات خام لاتکس به ابعاد ۰/۸ میکرون اضافه نموده و بمدت ۲ ساعت روی شیکر قرار داده شد تا سطح ذرات لاتکس با ماکروملکول‌های آنتی‌ژنی مفروش گردند. این سوسپانسیون آنتی‌ژنی را با افزودن آزید سدیم (یک دهم درصد) پایدار کرده و با اضافه نمودن فنل بلو به مقدار ۰/۱ گرم در لیتر برمول، آنرا رنگی نموده و مقدار ۵۰ میکرو لیتر از آن را بر روی قسمت وسط یک تکه کاغذ گلاسه کلفت مربع شکل ریخته تا فیکس شود و پس از خشک شدن، دور آن فویل آلومینیومی پیچیده شد و در شرایط خشک و در دمای اتاق قرار داده می‌شد (۱۳).

1. Whole antigen
2. Microscopic Agglutination Test

شاهد، تعداد ۶۷ مورد منفی و ۱۵ مورد مثبت (۸ مورد مثبت قوی و ۷ مورد مثبت ضعیف) حاصل شد. با این نتایج تعداد موارد مثبت کاذب ۱۵ عدد و موارد منفی کاذب ۱۲ عدد بوده است. با توجه به نتایج حاصله و طبق فرمول‌های مربوطه، مقادیر حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی و بالاخره درستی آزمون لاتکس آگلوتیناسیون بومی، محاسبه گردید (جدول شماره ۱).

شایان ذکر است که میزان توافق یا همبستگی آزمون لاتکس آگلوتیناسیون راه‌اندازی شده با آزمون استاندارد پلائی (MAT) ۰/۷۴ بوده است.

جدول شماره ۱: مقادیر ملاک‌های ارزیابی آزمون لاتکس آگلوتیناسیون راه‌اندازی شده در این مطالعه

ملاک ارزیابی	درصد	حدود اطمینان ۹۵٪
حساسیت	۸۹	٪۸۲/۲-٪۹۳/۹
ویژگی	۸۴	٪۷۶/۳-٪۹۰/۷
ارزش اخباری مثبت	۸۶/۷	٪۷۹/۵-٪۹۲/۱
ارزش اخباری منفی	۸۷/۲	٪۹۲-٪۷۹/۳
درستی (Accuracy)	۸۷	٪۸۱/۸-٪۹۱

بحث

به دلیل فقدان علائم پاتوگنومیک و اختصاصی، تشخیص آزمایشگاهی لپتوسپیروز جایگاه مهمی دارد (۴،۳). لاتکس آگلوتیناسیون یکی از ساده‌ترین روش‌های متداول تشخیص سرولوژیکی است که برای تشخیص برخی از بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود و در اغلب مطالعات حساسیت و ویژگی قابل توجهی از آن گزارش شده است. در سال‌های اخیر چندین کیت تجاری معرفی شده و در برخی از آزمایشگاه‌ها مورد مصرف قرار گرفته‌اند ولی در مقایسه با MAT، حساسیت و ویژگی کمتری داشته و نتوانستند سرو و ار مسوول بیماری را تشخیص دهند با اینحال از چندین مزیت دیگر برخوردار بودند که از جمله می‌توان به سهولت اجرا و قابلیت انجام در مراکز غیر مجهز، عدم

لزوم کار کردن با کشت زنده باکتریایی و بالاخره سهولت خواندن نتایج اشاره کرد (۴،۱۱،۱۰،۱۳). اصولاً اگر از سوسپانسیون آنتی‌ژنی استخراج شده از یک و یا ترجیحاً از چند سویه بومی و بیماری‌زای شایع در محل بجای سویه‌های استاندارد و سویه‌های غیر بیماری‌زا استفاده شود، حساسیت و ویژگی تست به مراتب افزایش می‌یابد (۴،۱۴). این نکته در مطالعات مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته، از جمله: Camargo و همکاران در مطالعه خود، تست آگلوتیناسیون ماکروسکوپی را همراه با Igm-ELISA بر روی ۱۰۸ نمونه سرم زوج بیماران مبتلا به لپتوسپیروز که مثبت بودن آنها با افزایش تیترا ۴ برابر یا بیشتر در MAT تأیید شده بود و نیز برای ۲۴۵ نمونه سرم منفی و شاهد، قیاس نمودند و حساسیت و ویژگی هر دو تست را برابر و بالا (۹۹ درصد) گزارش کردند (۱۶). Smits و همکاران در مطالعه خود، تست لاتکس آگلوتیناسیون را با Igm-ELISA در مورد ۱۸۷ نمونه سرم بیماران مبتلا به لپتوسپیروز که مثبت بودن آنها در آزمون MAT تأیید شده بود و نیز برای ۲۴۵ نمونه سرم منفی و شاهد بکار بردند و حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی لاتکس آگلوتیناسیون را به ترتیب ۸۲/۳، ۹۴/۶، ۷۳/۴ و ۹۶/۷ درصد و برای تست Igm-ELISA به ترتیب ۸۵/۵، ۹۷/۹، ۸۷/۶ و ۹۷/۴ درصد مشخص نمودند (۱۷). Naigowit و همکاران در یک مطالعه، تست آگلوتیناسیون ماکروسکوپی را با دو تست الیزای سریع (Dipstick) و ایمونو فلورسانس غیر مستقیم (IFA) با استفاده از ۷۵ نمونه سرم مثبت و نیز ۷۵ نمونه سرم منفی مورد مقایسه قرار دادند و حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی لاتکس آگلوتیناسیون را به ترتیب ۹۴/۷، ۹۳/۳، ۹۳/۴ و ۹۴/۶ درصد و درستی (Accuracy) آنرا ۹۴ درصد، مثبت کاذب را ۶/۷ درصد و منفی کاذب را ۵/۳ درصد گزارش کردند (۱۸) که با مقادیر بدست آمده برای دو تست دیگر بسیار نزدیک و در مقایسه با مطالعه حاضر، بیشتر بود.

در آن با بیشتر مطالعات بیان شده شباهت نزدیک داشت. تفاوت مهم آزمون راه‌اندازی شده در این مطالعه با کیت‌های تجاری خارجی، استفاده از سوسپانسیون آنتی‌ژنی استخراج شده از چند سویه بومی و بیماری‌زای به جای استفاده از یک سویه استاندارد غیر بیماری‌زا، است تا حساسیت و ویژگی آزمون افزایش یابد ولی نتایج این مطالعه این فرضیه را تأیید نمود. در مجموع نتایج حاصله از این مطالعه و مطالعات مشابه معرفی شده نشان می‌دهند که تست لاتکس آگلوتیناسیون در تشخیص لپتوسپیروز انسانی محاسن و معایبی دارد، از جمله: این تست آنتی‌بادی‌های IgG و IgM را با هم می‌سنجد و نمی‌تواند موارد بیماری را با مواجهات قبلی تفکیک دهد ولی انجام آن به تجهیزات آزمایشگاهی اختصاصی نیاز ندارد و در مراکز فاقد امکانات آزمایشگاهی مجهز و در نقاط دور افتاده نیز قابل اجرا می‌باشد، ولی در خواندن نتایج آن ذهنیت دخالت داشته و قابلیت سنجش آنتی‌بادی‌ها در آن با گذشت زمان کاهش چشمگیر می‌یابد. بنابراین با توجه به حساسیت و ویژگی نسبتاً بالای این تست که با مطالعات قبلی انجام شده توسط محققان دیگر نزدیک است و با توجه به این نکته که انجام آن به تجهیزات آزمایشگاهی اختصاصی نیاز ندارد و در مراکز فاقد امکانات آزمایشگاهی مجهز و در نقاط دور افتاده نیز قابل اجرا می‌باشد، لذا می‌توان تست لاتکس آگلوتیناسیون را برای غربالگری اولیه با ارزش دانست.

References

1. Vinetz JM. Leptospirosis. Tropical & Travel Associated Disease 2001; 14: 527-538.
2. Plank R, Dean D. Overview of the Epidemiology, Microbiology and Pathogenesis of Leptospira Spp in humans. Microbes Infection 2000; 2: 1265-1276.
3. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Review 2000; 14(2): 296-326.

Hull-Jackson و همکاران در مطالعه خود یک تست لاتکس آگلوتیناسیون تجاری را در تشخیص لپتوسپیروز انسانی، در مورد ۴۰ نمونه سرم بیماران مبتلا به لپتوسپیروز که مثبت بودن آنها در آزمون MAT تأیید شده بود و نیز برای ۱۱۲ نمونه سرم منفی و شاهد بکار بردند و حساسیت و ویژگی آن را ۸۵ و ۸۱ درصد مشخص نمودند و دو باره آن را برای ۲۵ نمونه سرم با تشخیص نهایی لپتوسپیروز و ۱۶۱ نمونه سرم بیماران مبتلا به بیماری‌های دیگر ارزیابی نموده و این بار حساسیت را ۸۸ و ویژگی را ۹۸ درصد بدست آوردند (۱۹). Pradutkanchana و همکاران در مطالعه خود تست آگلوتیناسیون ماکروسکوپی را در تشخیص لپتوسپیروز انسانی با آزمون آن بر روی نمونه سرم‌های جفت مربوط به ۸۵ بیمار، که مثبت بودن آنها با افزایش تیترا ۴ برابر یا بیشتر در MAT تأیید شده بود مورد ارزیابی قرار دادند و از ۱۰۰ نمونه سرم افراد سالم و ۱۰۲ نمونه سرم مربوط به بیماری‌های دیگر بعنوان شاهد استفاده نمودند و حساسیت، ویژگی، درصد مثبت کاذب، درصد منفی کاذب، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی و درستی تست لاتکس آگلوتیناسیون را به ترتیب ۹۴/۱، ۹۷، ۳، ۵/۹، ۹۳، ۹۷/۵ و ۹۶/۲ درصد بدست آوردند که از اعداد مشابه مطالعه ما کمی بالاتر می‌باشد (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

4. WHO last Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control of Human Leptospirosis. Geneva: World Health Organization; 2003. P 5-28.
5. Vinetz J M. Leptospirosis. Curr Opin Infect Disease 1997; 10: 357-361.
6. Van Creel R, Speelman P, Gravekamp C, Terpestra WJ. Leptospirosis in Travelers. Clin Infec Dis 1994; 19: 132-134.

7. Honarmand H, Mansour Ghanaei F. Leptospirosis in Guilan province. Ilia publisher, Iran; 2005. (Persian).
8. Honarmand H, Eshraghi S, khormizadeh MR, Hareskeerl RA, Ghanati FM, Abdolapour MR, et al. Distribution of human leptospirosis in Guilan province, Northern Iran. *J Pub Heal* 2007; 36(1): 68-73.
9. Dupont H, Dupont perdrizert D, Perie JL, Zehner-Hansen S, Jarrige B, Daijardin JB, et al. Leptospirosis: Prognosis Factors Associated with Mortality. *Clin Infec Dise* 1997; 25: 270-274.
10. Terpstra WJ, Lighthare GS, Schoone GJ. ELISA for detection of specific IgM and IgG in human Leptospirosis. *J General Microbiol* 1985; 131: 377-385.
11. 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. *J Clinl Microbiol* 1980; 11: 452-457.
12. Adler B, Faine S. Antibody response in human leptospirosis *Nat Symp Leptospira, Leptospirosis and other Spirochaeta*. Abstract book of National Symposium *Leptospira, Leptospirosis and other Spirochaeta*, Bucharest. 1975. 271-276.
13. Hartskeerl RA, Smits H, Korver H, Terpestra WJ, Goris MG, smith H, et al. Manual for diagnosis of leptospirosis. KIT Biomedical Research, Netherland; 2004: 61-4.
14. Ryu E. Rapid agglutination test for leptospira without non-specific reaction. *Bull Int Epiz* 1970; 73(1-2): 49-58.
15. Jeandel P. Late positive blood cultures in leptospirosis. *Trans Res Soc Trop Hyg* 1984; 78: 143-145.
16. Camargo ED, Angela PB, Emilson DS, Marcos VS, Rui VA. Macroscopic Agglutination Test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3138-3142.
17. Smith H, Menno AWG, Hoorn V, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C. Simple Latex Agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1722-1725.
18. Naigowit P, Luepaktra O, Yasang S, Biklang M, Warachit P. Development of a screening method for serodiagnosis of leptospirosis. *Intern Med J Thai* 2001; 17(3): 182-186.
19. Hull-Jackson C, Glass MB, Ari MD, Bragg SL, Branch CU, Whittington CN. Evaluation of a commercial latex agglutination assay for serological diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2001; 44(5): 1853-1855.
20. Pradutkanchana S, Nakarin J. The use of latex agglutination for the diagnosis of acute human leptospirosis. *J Med Assoc Thai* 2005; 88(10): 13495-13499.