مقاله يژوهشي

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره هشتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸، ۱۸۴–۱۷۳

جداسازی و تعیین سروتایپهای لپتوسپیراهای بومی نواحی مرکز و غرب منطقه جلگهای استان گیلان

حميدرضا هنرمند ، فريبرز منصور قناعي ، آبتين حيدرزاده ، مهدى آسمار ،

دريافت مقاله: ۸۷/۳/٦ ارسال مقاله به نويسنده جهت اصلاح: ۸۷/۱۲/۲۱ دريافت اصلاحيه از نويسنده: ۸۸/۲/۲۹ پذيرش مقاله: ۸۸/۳/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: لپتوسپیروز یک بیماری شایع مشترک بین انسان و حیوان در جهان به ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری بوده و در استان گیلان آندمیک است. آبهای سطحی، مخزن طبیعی گونههای ساپروفیت و حیوانات حامل، مخزن گونههای بیماریزا هستند. معمولاً در هر منطقه آندمیک، تعداد اندکی از سرووارها شایع هستند و شناسایی آنها به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی کمک میکند. این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی سروتایپهای بومی لپتوسپیراها از آب شالیزارها، کانال و رودخانههای نواحی مرکز و غرب منطقه جلگهای استان گیلان که موارد سالیانه بروز قابل توجهی از لپتوسپیروز انسانی را دارند، انجام شده است.

مواد و روشها: در این مطالعه توصیفی، در مجموع تعداد ۵۰۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. نمونهبرداری از آبهای سطحی شهرستانهای منطقه در فاصله زمانی اردیبهشت تا پایان شهریور سال ۱۳۸۶ انجام شد. مقدار ۱ میلی لیتر از آب فیلتر شده هر نمونه، در محیط کشت مایع EMJH حاوی ۵- فلورواورسیل تلقیح شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شد و هر ۲ هفته یک بار با میکروسکوپ زمینه تاریک مورد مشاهده قرار گرفت. موارد مثبت با استفاده از ۳۰ نوع آنتی سرم ضد سویههای استاندارد، شناسایی شدند.

یافتهها: تعداد۱۱۳ نمونه مثبت و ۳۸۷ نمونه منفی بودند. هویت گونهای و زیر گونهای ایزولههای مشخص شده به ترتیب شامل سروگروپ آندامان و سمارانگا متعلق به گونه ساپروفیت بیفلکسا و سروگروپ ایکتروهموراژی، پومونا، سجروئه، پیروژنز، بالوم، هارجو، کانیکولا، و گریپوتیفوزا متعلق به گونههای بیماریزای اینتروگانس،کیرشنری و بورگ پترسنی بودند. گونههای بیماریزا در شالیزارها و گونههای غیر بیماریزا به ترتیب در شالیزار، رودخانه و کانال فراوان تربودند.

نتیجهگیری: علت بیشتر بودن حضور گونههای بیماریزا در شالیزارها را به رفت و آمد حیوانات به ویژه جوندگان و به توقف طولانی مدت آب در شالیزارها میتوان نسبت داد. وجود گونههای غیر بیماریزا در تمام منابع آبهای سطحی مطالعه شده طبیعی و مورد انتظار بود. به نظر میرسد که با بالا بردن آگاهی شالیکاران در مورد راه انتقال بیماری و استفاده از وسایل حفاظتی در هنگام تماس با آب مزرعه، بتوان بروز بیماری را کاهش داد.

واژههای کلیدی: لپتوسپیرا، سرو تایپینگ، سروگروپ

۱– (نویسنده مسؤول) استادیار گروه آموزشی میکروبشناسی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارشی و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان تلفن: ۱۱۹-۵۰۳۵۱۸ دورنگار: ۰۱۳۱-۵۰۳۶۹۵ پست الکترونیکی: honarmand_36@yahoo.com

۲- استاد گروه آموزشی داخلی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارشی و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

٣- استاديار گروه آموزشي اپيدميولوژي، دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي گيلان

٤- استاد گروه أموزشي ميكروبيولوژي، دانشگاه أزاد، واحد لاهيجان

مقدمه

لپتوسپیروز یک بیماری شایع مشترک بین انسان و حیوان در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که توسط گونههای بیماریزای لپتوسپیراها به وجود میآید [۱]. این باکتریها طیف میزبانی وسیعی دارند [۲]. تعداد زیادی از پستانداران اهلی و وحشی و جوندگان میزبان طبیعی انواع بیماریزا هستند و اغلب آنها پس از ابتلا به بیماری به مدت طولانی و معمولاً تا پایان عمر، حامل باقی میمانند و به صورت دورهای باکتری را با ادرار خود دفع میکنند [۳-۲]. باکتریهای دفع شده از حیوانـات حامـل اگر در آب و یا خاک مرطوب ریخته شوند، در pH و دمای مناسب به مدت طولانی زنده مانده و در همین دوره می توانند از طریق زخمهای جلدی به بـدن میزبـان دیگـر (حیوان یا انسان) وارد شده و بیماری به وجود آورند [۳-۲]. آبهای سطحی از قبیل رودخانه، نهر، مرداب و دریاچههای آب شیرین، مخزن لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند [۳]. استان گیلان به دلیل شرایط جغرافیایی خاص خود، آب و هوای معتدل و مرطوب، رواج کشت برنج که همواره به رطوبت بالای خاک نیاز دارد و متداول بودن نگهداری سنتی حیوانات اهلی به ویژه گاو، شرایط مناسبی برای بروز این بیماری دارد [۵-۴]. لپتوسپیروز در اغلب روستاهای ناحیه جلگهای استان گیلان شیوع دارد و همه ساله موارد بسیار زیادی از بیماری از اواسط بهار تـا اواخـر تابستان به ویژه در شالیکاران بروز می کند ولی اطلاعات قطعی در مورد میزان شیوع آن در شالیکاران و کارگران فصلی شالیزارها که بیشترین کار در شالیزارهای منطقه را انجام می دهند در دست نیست. اغلب مبتلایان، سابقه کار در مزرعه برنج و یا تماس با آبهای سطحی راکـد را ذکـر می کنند [۲–۴]. لیتوسپیراها به ۷ گونه بیماریزا دارای

۲۳ گــروه ســرولوژیکی و ۳ گونــه ســاپروفیت شــامل ۱۰ سروگروپ دستهبندی شدهاند و در مجموع ۲۵۰ سرووار را شامل می گردند [۳-۱]. معمولاً در هـر منطقـه آنـدمیک، تعداد اندکی از سرووارهای بیماریزا شایع هستند و شناسایی آنها به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی بیماری کمک میکند و شناسایی مخازن بیماری گام بزرگی در کنترل آن است [۳٬۸]. این مطالعه بـه منظـور جداسازی لپتوسپیراها از آب شالیزارها، کانال و رودخانههای نواحی مرکزی و غرب منطقه جلگهای استان گیلان که بیشترین بروز سالیانه لپتوسپیروز انسانی را دارد [۷] و به منظور شناسایی گروههای سرولوژیکی بومی انجام شده است. این یافتهها می توانند در شناسایی مخزن و یا مخازن این بیماری مؤثر بوده و به تهیه بانک میکروبی از سویههای بومی بیانجامد و خود میتواند تهیه آنتیژن مـشترک از آنها و راهانـدازی تـستهای تشخیـصی اختصاصی تر و تهیه واکسن را در آینده امکان پذیر نماید.

مواد و روشها

این مطالعه که از نوع توصیفی مقطعی است در فاصله زمانی اردیبهشت تا پایان شهریور سال ۱۳۸۶ انجام شد. نمونهبرداری از آبهای سطحی (رودخانه، شالیزار، کانال آبیاری) شهرستانهای نواحی مرکزی و غرب منطقه جلگهای استان گیلان شامل خشکبیجار، رشت، سنگر، خمام، انزلی، فومن، صومعهسرا، شفت، رضوانشهر، پرهسر، تالش، اسالم و آستارا صورت گرفت. از هر شهرستان حدود ۴۰ نمونه جمعآوری شد. مقدار ۱ میلیلیتری از آب هر نمونه، پس از فیلتراسیون با فیلتر سرنگی ۲۲ میکرومتری، به لوله فالکون ۱۵ میلیلیتری حاوی ۱۲ میلیلیتری محیط کشت مایع EMJH که به آن آنتیبیوتیک ۵-میکرواوراسیل به نسبت ۲۰۰ میکروگرم در میلیلیتر برای

۱۷۵

طور جداگانه با آنتی سرمهای مربوطه مواجهه شدند. سروتایپینگ به روش میکرو آگلوتیناسیون استاندارد انجام شد [۱۱-۱۲]. مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت جوان و پر جمعیت هر ایزوله با مقدار مساوی از آنتی سرمها در سه ردیف از یک پلیت الیزا مخلوط و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت دو ساعت انکوبه شده و پس از ۵ دقیقه مخلوط کردن دورانی، نتایج با استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک خوانده می شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر حفره به روی لام منتقل شده و به دقت میکرولیتر از هر حفره به روی لام منتقل شده و به دقت زیر میکروسکوپ مشاهده گردید. آگلوتیناسیون بیش از دیر میکروسکوپ مشاهده گردید. آگلوتیناسیون بیش از عنوان هویت گونهای و زیر گونهای ایزوله مربوطه تلقی می شد. در این روش، محلول آنتی ژنی اولیه که فاقد آنتی سرم است به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

نتايج

در مجموع تعداد ۵۰۰ نمونه از شالیزارها، کانالها و رودخانههای حوزههای ۱۳ شهرستان مناطق غرب و مرکز ناحیه جلگهای استان گیلان ظرف ۵ ماه جمعآوری شد (جدول ۱).

ممانعت از رشد سایر باکتریها افزوده شده بود، وارد شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ هفته در انکوباتور قرار داده شد و هر ۲ هفته یک بار با میکروسکوپ زمینه تاریک مورد مشاهده قرار گرفت. پس از ۳ ماه، موارد منفی حذف شده و موارد مثبت به یک لوله فالکون دیگر حاوى ١٢ ميليليتر محيط كشت مايع EMJH فاقد آنتی بیوتیک و غنی شده با سرم جنین گاو (با غلظت نهایی ۵٪) انتقال یافته و در شیکر انکوباتور و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند تا به رشد پویا و پرجمعیت برسند. سپس با انجام آزمون رشد و عدم رشد در حـضور ۸-آزاگوانین، لپتوسپیراهای بیماریزا با انواع ساپروفیت تفکیک داده شدند. وجود این ماده به مقدار ۲۲۵ میکروگرم در میلی لیتر در محیط کشت، رشد انواع بیمــاریزا را متوقــف مــینمــود [۱۰-۹]. بــرای تعیــین سرو تایپها از ۳۰ آنتیسرم اهدا شده از آزمایشگاه رفرانس لپتوسپيروز وابسته به مؤسسه ملي تحقيقات بیماریهای گرمسیری کشور هلند (KIT)، ضد ۳۰ سرووار مختلف که که هر یک نماینده شاخص یک سروگروپ هستند، استفاده شد. ایزولههای بیماریزا و غیربیماریزا به

جدول ۱- تعداد نمونهها بر اساس مکان و منبع جمع آوری

منطقه	شهرستان	شاليزار	کانال	رودخانه	جمع
	خمام	74	17	۴	۴.
	خشکبیجار	١٩	17	٩	4.
	رشت	74	٢	۴	٣.
مركز گيلان	انزلى	71	17	۶	49
	فومن	۲۸	٧	۵	۴.
	صومعه سرا	70	۵	۴	44
	شفت	4	٧	٢	٣٨
	سنگر	۲.	١.	١.	4.
	رضوانشهر	77	١٢	۶	۴.
	پره سر	77	11	۶	۴.
غرب گیلان	تالش	77	18	۵	۴.
	اسالم	77	14	۴	4.
	آستارا	۲۳	11	۵	49
جمع		٣٠٢	۱۲۸	٧٠	۵۰۰

تعداد نمونههای جمع آوری شده در ماههای اردیبهشت، خرداد، تیر، مرداد و شهریور به ترتیب ۹۰، ۱۰۲، ۹۷، ۱۱۰ و ۱۱۰ مورد بوده است. از مجموع ۵۰۰ نمونه، تعداد ۳۰۲ نمونه از آب شالیزارها، ۷۰ نمونه از رودخانه و ۱۲۸ نمونه از کانالهای آبیاری شالیزارها اخذ گردید. دامنه دمای

نمونه آبها ۲۸–۱۵ درجه سانتی گراد (میانگین ۱۸/۱) و دامنه pH نمونهها $1/\Lambda - 1/\Lambda$ (میانگین $1/\Lambda$) بوده است. $1/\Lambda$ تمام نمونهها با استفاده از $1/\Lambda$ آنتی سرم ضد $1/\Lambda$ سرووار استاندارد که هر یک نماینده شاخص یک سروگروپ بودند، غربالگری شدند (جدول $1/\Lambda$).

جدول ۲- فهرست آنتی سرمهای استفاده شده برای سروتایپینگ ایزولهها

نمونهها	سروگروپ	سرووار	سويه	
L. Interrogans	Icterohaemorrhagia	icterohaemorrhagia	RGA	
L. Interrogans	Icterohaemorrhagia	copenhageni	M20	
L. Interrogans	Hebdomadis	hebdomadis	Hebdomadis	
L. Interrogans	Autumnalis	rachmati	Rachmat	
L. Interrogans	Pyrogenes	pyrogenes	Salinem	
L. Interrogans	Bataviae	bataviae	Swart	
L. Kirschneri	Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva IV	
L. Interrogans	Canicola	canicola	Hond utrecht IV	
L. Interrogans	Australis	australis	Balico	
L. Interrogans	Pomona	pomona	Pomona	
L. Borgpetersenii	Javanica	javanica	Veldrat Baraviae H6	
L. Interrogans	Sejroe	hardjo	Hardjoprajitno	
Noguchii	Panama	panama	C2214	
Kirschneri	Cynopteri	cynopteri	3522C	
Interrogans	Djasmin	djasmin	Djasmin	
Weilli	Sarmin	sarmin	Sarmin	
Borgpetersenii	Mini	mini	Sari	
Borgpetersenii	Tarassovi	tarassovi	Perpelistin	
Borgpetersenii	Ballum	ballum	Mus 127	
Weilli	Celledoni	celledoni	Celledoni	
noguchii	Louisiana	louisiana	Louisiana	
Meyeri	Ranarum	ranarum	ICF	
Santarosi	Shermani	shermani	1342k	
Fainei	Hustbridge	hustbridge	BUT6	
Interrogans	Autumnalius	rachmati	Rachmat	
Interrogans	Bataviae	santarosa	LT-21 74	
Borgpetersenii	Javanica	poi	Poi	
Biflexa	Semaranga	semaranga	Veldrat sem 173	
Biflexa	Semaranga	patoc	Patoc I	
Biflexa	Andaman	andaman	Ch11	

حمیدرضا هنرمند و همکاران

در غربالگری اولیه در مجموع تعداد ۱۱۳ نمونه (۲۲/۶٪) مثبت و ۳۸۷ نمونه (۲۷۷٪) منفی شدند. تعداد و درصد موارد مثبت نمونههای مربوط به شالیزار، کانال آبرسانی و رودخانه در جدول ۳ نشان داده شده است.

۶۹/۹٪ از کل موارد مثبت از شالیزار، ۱۱/۵٪ از کانال، و ۶۹/۹٪ از رودخانهها جدا شدند. ۴۳/۴٪ از ایزولهها بیماریزا و ۵۶/۶٪ از آنها ساپروفیت بودند. ۹۵/۹٪ از

سویههای بیماریزا از شالیزارها و ۴/۱ ٪ از کانـالهـا جـدا شدند. ۵۰٪ از ساپروفیتها از شالیزارها، ۲۰/۳٪ از کانالها و ۲۹/۷٪ از رودخانهها جدا شدند. فراوانی موارد مثبت جدا شده از شهرستانها و فراوانی گونـههـا و زیـر گونـههـای بیماریزا و ساپروفیت جدا شده از آنها در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۳- تعداد و درصد ایزولهها برا ساس منابع نمونهها

ایزولههای ساپروفیت از کل موارد مثبت	ایزولههای بیماریزا از کل موارد مثبت	ایزولهها از کل موارد مثبت	تعداد نمونه	منبع
تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	•	
(/.۵٠) ٣٢	(/.9۵/9) ۴٧	(/.۶٩/٩) ٧٩	٣٠٢	شاليزار
(/۲٠/٣) ١٣	(/.•) •	(/.11/۵) 18	١٢٨	کانال آبیاری
(//۲٩/٧) ١٩	(/.4/1) ٢	(/.1	٧٠	رودخانه

جدول ٤- تعداد و درصد ایزولهها بر اساس مکان و منابع نمونهبرداری

منطقه		رودخانه		كانال		شاليزار	
نمونهبرداری	تعداد موارد جدا شده	تعداد نمونه	تعداد ايزولهها	تعداد نمونه	تعداد ايزولهها	تعداد نمونه	تعداد ايزولهها
انزلی	٩	۶	١	١٢	•	71	٨
رشت	11	۴	٢	٢	٢	74	γ
صومعه سرا	١٨	۴	٢	۵	٢	۲۵	14
فومن	۶	۵	١	γ	•	۲۸	۵
شفت	١٣	٢	٢	٧	٢	79	٩
سنگر	١٣	١.	٣	١.	٣	۲.	γ
خشکبیجار	۵	٩	٢	17	•	19	٣
خمام	۴	۴	•	17	•	74	۴
تالش	11	۵	۲	١٣	١	77	٨
رضوانشهر	γ	۶	٢	17	١	77	۴
پره سر	١.	۶	٢	17	١	77	γ
اسالم	۴	۴	١	١.	١	78	۲
آستارا	۲	۵	١	11	•	74	١
جمع	115	٧٠	71	۱۲۵	١٣	٣٠۶	٧٩

لپتوسپیراهای جدا شده به ۱۰ سروگروپ متعلق بودند که دو مورد ساپروفیت و ۸ مـورد بیمـاریزا بودنـد. از ۴۹ ایزوله بیماریزا تنها دو مورد از رودخانه جدا شدند که یک مورد بـه سـروگروپ پیروژنـز و یـک مـورد بـه سـروگروپ کانیکولا متعلق بودند و سایر موارد بیمـاریزا شـامل همـه گونهها و زیر گونهها اغلب از شالیزارها جدا شـدند. ۵۰٪ از

ایزولههای ساپروفیت از شالیزار، ۲۹/۷٪ از رودخانه و ایزولههای ساپروفیت جدا شدند. بیشترین سروگروپ ساپروفیت جدا شده آندامانا و بیشترین موارد بیماریزای جدا شده به سروگروپ ایکترو هموراژی متعلق بودند، که همگی از شالیزار جدا شدند. ایزولههای سروگروپ آندامانا از تمام منابع ولی بیشتر از شالیزارها جدا شدند (جدول ۵).

جدول ٥- فهرست گونهها و زیرگونههای جدا شده با احتساب تعداد و درصد آنها از کل ایزولهها

منبع	تعداد (درصد)	سرو گروپ			گونه
	از کل ایزوله ها				
			تعداد (درصد)		
شاليزار	(/.۱۵/۱) ۱۷	ایکتروهموراژی			
شاليزار	('/.۴/۴) ۵	پومونا			
شالیزار (۱)، رودخانه	(/.1/A) Y	كانيكولا	(/.19/1) ۲۹	اينتروگانس	
شاليزار (١)، رودخانه	(/.1/1) ٢	پيروژنز			
شاليزار	(/.٢/۶) ٣	سجروئه			بیماریزا
شاليزار	(/.٣/۵) ۴	هارجو بوويس	(/.١٠/۵) ٩	بور گ	
شاليزار	(/.1/1) ٢	بالوم		پترسنی	
شاليزار	(/.17/4) 14	گريپوتيفوزا	(/.14) 14	کیرشنری	
رودخانه (۱۰)	~/ *C* / ! \\ * C.!	LL 1 .1	d/ N C (C \ C \ C		الماء الماء
کانال (۶)، شالیزار (۳۲)	(/.47/5) 41	آندامانا	(%.68/8) 84	بی فلکسا	غیر بیماریزا
رودخانه (۹) کانال (۷)	(/.14/1) 18	سمارانگا			

اعداد داخل پرانتز در ستون منبع، تعداد ایزولهها را نشان میدهد.

ىحث

متعدد بودن گونهها و زیر گونهها در جنس لپتوسپیرا، لزوم دستهبندی و تفکیک آنها را بیشتر نموده است. دستیابی به یک روش ساده و مطمئن برای تایپینگ و متمایز نمودن زیر گونههای متنوع این باکتری یک ضرورت است. در سالهای اخیر تایپینگ ملکولی میکروارگانیزمها متداول شده و روشهای متعددی ابداع و آزموده شدهاند. تعدادی از این روشها برای تایپینگ لپتوسپیراها نیز به کار گرفته شدهاند و نتایج متفاوتی

نشان دادهاند [۱]. Herrmann و همکاران روش PFGE را برای تمایز درون گونهای و تعیین هویت سرووارها ارزیابی نمودند [۱۳]. Hookey روش ریبو تایپینگ را با استفاده از تکنیک RFLP_PCR آزمود [۱۴] Perolat و همکاران سه روش AP_PCR, Ribotyping و AP_PCR, Ribotyping را برای تعیین هویت ایزولههای متعلق به سرووار هارجو مقایسه کردند و آنها را روش مؤثری برای مطالعه ساختارهای یک جمعیت داخل گونهای ارزیابی نمودند [۱۵]. Tony و Savio و همکاران [۱۲] روش

جداسازی آنها باید محیط کشتهای بسیار غنی شده را مورد استفاده قرار داد [۱۱،۲۰].

Adler و Baseman محیط کشتهای سنتیک و غنی شـده را معرفـي نمودنـد [۲۱-۲۲]. Johnson و Rogres افزودن ۵- فلورواوراسیل به عنوان تنها آنتی بیوتیکی که با غلظت معین، بدون تأثیر بر رشد لپتوسپیراها، از رشد سایر باکتریها جلوگیری میکند، را توصیه نمودند [۲۳]. Hartskeerl و همكاران، محيط كشت EMJH اصلاح شده و غنیسازی آن با سرم خرگوش و یا سرم جنین گاو و نیز فیلتر کردن نمونههای آب را برای زدودن آلودگیهای میکروبی دیگر، توصیه نمودنید [۱۱]. با استفاده از توصیههای مزبور چندین مطالعه از نوع جداسازی لپتوسپیراها از آب و خاک در مناطق مختلف جهان به ویژه در نواحی آندمیک بیماری صورت گرفته است [۲۸-۲۴]. Diesch توانست لپتوسـپیراهـا را از آب منـابعی کـه بـرای تفریحات و ورزشهای آبی استفاده میشوند جدا نماید [۲۹]. اکنون لپتوسپیروز به عنوان یک بیماری شغلی پذیرفته شده است[۳۰، ۳-۱] و در مشاغلی که با حیوانات و آبهای سطحی سر و کار دارند، بروز بیشتری دارد. Mumford شیوع لیتوسپیروز را در ورزشهای آبی مطالعه نمود [٣١] و Cacciapuuoti یک اپیـدمی لپتوسـپیروز بـا منشاء آب را توصيف كرد [٣٢]. Smith و Karaseva تأثير دما و سایر عوامل مؤثر در بقای لیتوسییراها در آب را مطالعه نمودند [۳۳–۳۳].

در این مطالعه روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی ساده (MAT) با استفاده از ۳۰ نوع آنتی سرم ضد ۳۰ سرووار استاندارد که هر کدام از آنها نماینده شاخص یک سروگروپ هستند [۱۱] برای تعیین هویت گونهای و سروگروپی سویههای جدا شده از آبهای سطحی مورد

RFLP_PCR را برای تفکیک تعداد زیادی از سویههای استاندارد و ایزوله شدهها به کار بردند. Corney و همکاران روش RAPD را بـرای تجزیـه و تحلیـل تاکـسونومیکی و یـافتن ارتبـاط بـین سـرووارها مفیـد بیـان نمودنـد یـافتن ارتبـاط بـین سـرووارها مفیـد بیـان نمودنـد آلها]. Tamai و همکاران روش REA را بـا اسـتفاده از ۱۵ آنزیم برشدهنده بـا موفقیـت بـرای تفکیـک سـرووارهای ایکتروهموراژی و کپنهاگنی به کار بردند [۱۹].

علی رغم نتایج روشین روشهای ذکر شده، هنوز تاییینگ ملکولی لپتوسپیراها استاندارد و تثبیت نـشدهانـد [۱٬۳] و روشهای سرولوژیکی تایپینگ این باکتری پرتنوع متداول تر است [۳٬۱۱]. روشهای آگلوتیناسیون متقاطع، فاكتور أناليز و أگلوتيناسيون ميكروسكوپي ساده (MAT) Microscopic Agglutination Test برای تایینگ لپتوسـپیراهـا ابـداع و اسـتاندارد شـدهانـد [۱۲-۱۱، ۳]. روشهای اول و دوم پیچیده تر هستند و اجرا و تفسیر آنها به تجربه و تخصص بالا نياز دارد [۱،۱۱] ولي روش آخر که با استفاده از آنتی سرمهای استاندارد انجام می شود، ساده تر است و رایج ترین روش سروتایپینگ است که هنوز در آزمایـشگاههـای مرجع لپتوسـپیروز انجـام میشود [۳،۱۱]. اجرای این روش، پر هزینـه، وقـتگیـر و کمی دشوار است زیـرا بـرای دسـتیابی بـه نتیجـه کـاملاً درست، باید سویه مورد نظر را با تعداد زیادی از آنتی سرم ضد سرووارهای استاندارد مواجه کرد [۱۲–۱۱]. ضمناً خواندن نتایج نیز چندان آسان نیست و به تجربه کافی نیاز دارد [۱٬۳٬۱۱]. اولین و مهمترین مرحله برای اجرای سروتایپینگ، جداسازی و به دست آوردن یک کشت خالص و پرجمعیت است [۱۲-۱۲]. لپتوسیپراها باکتریهای سختگیر و کند رشد هستند و برای

استفاده قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که گونههای

بیماریزا و غیر بیماریزا در آبهای سطحی منطقه موجودند. با توجه به این نکته که آبهای سطحی مخزن گونههای غیر بیماریزا هـستند، جـدا شـدن آنهـا دور از انتظار نبوده و نیز حضور آنها در شالیزارها که به طور عمده با آبهای سطحی منطقه به ویژه از رودخانهها و كانالهاى آبرساني آبياري ميشوند و غالباً مخزن لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند، قابل توجیه میابشد. اغلب جوندگان و سایر حیوانات وحشی و نیز حیوانات اهلی و حتى دست آموز، مى توانند مخزن اين زير گونههاى بیماریزا باشند [۳]. وفور جونـدگان و برخـی از حیوانـات وحشى به ویژه شغال که در مجاورت مناطق مسکونی به خصوص در نواحی روستایی منطقه جلگهای استان گیلان زندگی میکنند و به راحتی در شالیزارها رفت و آمد مینمایند و نیز وجود حیوانات اهلی از قبیل گاو، سگ، اسب و گربه که می توانند بالقوه بیمار و یا حامل باشند و در مناطق روستایی بسیار فراوان هستند [۵-۴] توجیه کننده حضور گونه و زیرگونههای بیماریزا در شالیزارها است. اغلب روستاییان به طور سنتی در منزل خود گاو نگهداری میکنند و از اسب برای برخی از فعالیتهای

سروگروپ پومونا، موش مخزن سروگروپ ایکتروهمـوراژی، گاو مخزن سروگروپهای گریپـو تیفـوزا و هـارجو، و گـراز مخـزن سـروگروپ پومونـا و بـالوم اسـت [۳-۱]. در ایـن مطالعه، بیشتر گونهها و زیرگونههای بیماریزا از شالیزارها که احتمال آلوده شدن آن بـا ادرار حیـوان حامـل، بیـشتر است و زیرگونههای ساپروفیت، از تمام منابع آبـی مطالعـه شده جدا شدند. وجود گونهها و زیرگونههای بیمـاریزا در شالیزارها، با شیوع غالب این بیماری در مناطق روستایی و به طور عمده در کارگران مزارع برنج [۷-۴] تناسب دارد.

نتيجهگيري

با توجه به حضور غالب و بیشتر گونههای بیماریزا در شالیزارها و نسبت دادن آن به رفت و آمد حیوانات به ویژه جوندگان و توقف طولانی مدت آب در شالیزارها به نظر میرسد که با بالا بردن آگاهی شالیکاران در مورد راه انتقال بیماری و استفاده از وسایل حفاظت فردی مانند دستکش و چکمه در هنگام کار در مزرعه، بتوان بروز بیماری را کاهش داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری بیشائبه آقای محمود خوش سرور، کارشناس آزمایشگاه میکروبشناسی مرکز تحقیقاتی بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان قدردانی و تشکر میشود.

References

[2] Plank R, Deborah D. Overiew of epidemiology, microbiology, and pathogenesis of Leptospira

کشاورزی و نیز برای حمل و نقل استفاده نموده و برای

حفاظت خانه سگ نگهداری می کنند [۵-۴]. به طور

معمول سگ مخزن سروگروپ کانیکولا، اسب مخزن

[1] Levett PN. leptospirosis. *Clin Micro Rev* 2001; 14(2): 296-326.

- spp in humans. *Microbes Infect* 2000; 2(10): 1265-76.
- [3] Fain S. Guidance for the Diagnosis, Surveillance and Control of Human Lepeospirosis. WHO offset publication Geneva. World Health Organization 2003; 17-20.
- [4] Mansour Ghanaei F, Honarmand H.

 Leptospirosis and its prevalence in Guilan
 province. Guilan Univ Med Sci Publishing
 division. 2005; pp: 89-99. [Farsi]
- [5] Hoinarmand H, Mansour Ghanaei F, Eshraghi S, Khoramizadeh MR. Study on prevalence of leptospirosis in Guilan in 2004. *J Gorgan Univ Med Sci* 2005; 2: 52-55. [Farsi]
- [6] Tahbaze M. Study on leptospirosis in Guilan.
 Iranian J Infect Tropical Dis 1997; 59: 26-32.
 [Farsi]
- [7] Resaei A, Delkhosh J. Statistical report of leptospirosis in Guilan. Abstract book of leptospirosis seminar, Rasht, Guilan Iran. 2000; pp: 30-35. [Farsi]
- [8] Johnson RC, Faine S. Leptospira; in Keieg NR, Nolt JG. B ergey's manual of systematic bacteriology. USA, Williams & Wilkins, Baltimore. 1992; pp: 62-7.

- [9] Braun JL, McCulloch WF. Use of 8-azaguanine to differentiate Leptospires isolated from Iowa surface waters. *Appl Microbiol* 1968; 16(1): 174-5.
- [10] Johnson RC, Rogres P. Differentiation of pathogenic and saprophytic Leptospires with 8-Azaguanin. *J Bacteriol* 1964; 88: 1618-23.
- [11] Hartskeerl RA, Smits H, Korver H, Goris M, GA, Terpstra WJ. Instruction booklet of International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Netherland, KIT Royal Tropical Institute Publication. 2004; 38-42.
- [12] Dikken H, Kmety E. Serological typing methods of leptospires; in Bergan T, Norris JR. Methods in Microbiology,vol II. London, Academic Press. 1978; pp. 259-307.
- [13] Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Girons IS. Pulsed-Field Gel electrophrosis of *Not* I digests of isolates of Leptospira interogans DNA: a new rapid method of serovar identification. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1696-702.
- [14] Hookey JV. Characterization of Leptospiraceae by 16s rDNA restriction length polymorphism. *J Gen Micribiol* 1993; 139(8): 1681-9.

- [15] Perolat P, Merien F, Ellis WA, Baranton G. Charactrization of Leptospira from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994; 32(8): 1949-57.
- [16] Tony HS, Patel BK. Comparison of two PCR methods for rapid identification of Leptospira genospecies interrogans. FEMS Micribiology Letters 1997; 169-77.
- [17] Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S, Pacciarini ML. Detection and identification of Leptospira interrogans serovars by PCR coupled with restriction endonuclease of amplified DNA. *J Clin Microbiol* 1994; 32(4): 935-41.
- [18] Corney BG, Colley J, Graham GC. Simplified analysis of pathogenic leptospiral serovar by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Med Microbiol* 1997; 46(11): 927-32.
- [19] Tamai T, Sada E, Kobayashi Y. Restriction endonuclease analysis of Leptospira intrrogans serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhage_ ni. *Microbiol Immunol* 1988; 32(9): 887-94
- [20] Turner LH. Leptospirosis 3. Maintenance, isolation and demonstration of lepeospires.

- Trans. *R Soc Trop Med Hyg* 1970; 64(4): 623-46.
- [21] Adler B, Faine S, Christopher WL, Chappel RJ. Development of an improved selective medium for isolation of Leptospires from clinical material. *Vet Microbiol* 1986; 12(4): 377-81
- [22] Baseman JB, Henneberry RC, Cox CD. Isolation and growth of Leptospira on artificial media. *J Bacteriol* 1966; 91(3): 1374-5.
- [23] Johnson RC, Rogres P. 5-flurouracil as selective agent for growth of Leptospirae. *J Bacteriol* 1964; 87: 422-6
- [24] Henry RA, Johnson RC. Distribution of genus Leptospira in soil and water. Appl Envir Microbiol 1978; 35(3): 492-9.
- [25] Alexander AD, Evans LB, Baker MF, Baker HJ, Ellison D, Marripan M. Pathogenic Leptospiras isolated from Malaysian surface waters. *Appl Microbiol* 1975; 29(1): 30-3.
- [26] Alexander AD, Wetmore PW, Evans LB, Jeffries H, Gleiser CA. Classification of leptospiral isolates from Malaya, Thailand, and North Bomero. Am J Trop Med Hyg 1955; 4(3): 492-506
- [27] Baker MF, Baker HJ. Pathogenic *Leptospira* in Malaysian surface waters, a method of survey

- for Leptospira in natural waters and soils. *Am J Trop Med Hyg* 1970; 19(3): 485-92
- [28] Okazaki W, Ringen LM. Some effects of various environmental condition on the survival of Leptospira Pomona. Am J Vet Res 1957; 18(66): 219-23.
- [29] Diesch SL, McCulloch WF. Isolation of pathogenic *Leptospires* from waters used for recreation. *Pub Health Res* 1966; 81: 299-304.
- [30] Waitkins SA. Leptospirosis as an occupational disease. *Br J Ind Med* 1986; 43(11): 721-5.
- [31] Mumford CJ. Leptospirosis and water sports. Br J Hosp Med 1989; 41(6): 519.

- [32] Cacciapuuoti B. A waterborn outbreak of leptospirosis. Am J Epidemiol 1987; 126: 535-45.
- [33] Smith CE, Turner LH. The effect of pH on thr survival of Leptospires in water. *Bull WHO* 1961; 24: 35-43.
- [34] Karaseva EV, Cherunkha YG, Piskunova LA.

 Results of studing the time of survival of pathogenic Leptospires under natural conditions. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1973; 17(3): 339-45.

Isolation and Serotyping of Endemic Leptospires of West and Central Regions of the Flat Areas of Guilan Province

H.R. Honarmand¹, F. Mansour Ghanaei², A. Heidarzadeh³, M. Asmar⁴

Received: 26/05/08 Sent for Revision: 11/03/09 Received Revised Manuscript: 19/05/09 Accepted: 08/06/09 Background and Objectives: Leptospirosis is a zoonosis which is more widespread in the tropical and semi tropical regions, and is endemic in the flat area of Guilan province, north of Iran. Surface waters are sources of saprophytic and carier animals are reservoirs of pathogenic agent. In each endemic region only a limited number of pathogenic serovars are common, and characterization of them is a very important step in detecting the main reservoirs of the disease. This study is performed to isolate endemic leptospires from rice farms, irrigation canals, and rivers of west and central parts of the area, which accounted for a significant annual incidence of the disease.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 500 specimens were taken from 13 cities of the area, between May to September of 2007. One ml of each water sample was inoculated in EMJH liquid medium with 200μg/ml 5-flurouracil after filtration by 22 μm syringe filter. All speciments were incubated in 30°c for 3 months and were checked by darkfield microscope every 2 weeks. All positive samples were characterized by using 30 types antisera.

Results: One hundred thirteen of 500 specimens were positive. Saprophytic serogroups were Andamana and Semaranga, belonging to biflexa species. Pathogenic serogroups were icterohaemorrhagiae, pomona, canicola and pyrogenes (interrogans Specie), hardjobovis and sejroea (Borgpeterseni specie), grippotyphosa (Kircshneri). Pathogenic species were common in the rice paddies and saprophytic species were common in the rice farms, rivers and irrigation canals, respectively.

Conclussion: It seems that higher frequency of pathogenic serogroups in rice farms is due to high traffic of animals and rodents, and the long time stay of water in the farms. Isolation of saprophytic serogroups in all types of surface waters was expected. Increasing farmers' knowledge about the ways of the disease transfer, and avoiding of unprotected contact with surface waters might help with decreasing the incidence of the disease in the area.

Key words: Leptospires, Serotyping, Serogroup

Funding: This research was funded by Gastrointestinal and Liver Research Center, Guilan University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Guilan University of Medical Sciences approved the study.

¹⁻ Assistant Prof., Dept.of Microbiology, Gastrointestinal and Liver Research Center, University of Medical Sciences, Guilan, Iran

⁽Corresponding Author) Tel: (0131)5535116, Fax: (0131) 5534951, E-mail: honarmand 36@yahoo.com

²⁻ Prof., Dept. of Internal Medicine, Gastrointestinal and Liver Research Center, University of Medical Sciences, Guilan, Iran

³⁻ Assistant Prof., Dept. of Epidemiology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Guilan, Iran

⁴⁻ Prof., Dept. of Microbiology, Azad University, Lahijan, Iran