مقاله پژوهشی
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

حمیدرضا هنرمند[۱]، فریبرز منصور قناعی[۲]، آبتین حیدرزاده[۳]، مهدی آسمار[٤]

دریافت مقاله: ۸۷/۳/٦ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۷/۱۲/۲۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۲/۲۹ پذیرش 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 میلی‌لیتر از آب فیلتر شده هر نمونه، در محیط کشت مایع EMJH حاوی ۵- فلورواورسیل تلقیح شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد 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 آنتی‌سرم 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 فراوان‌تر بودند.

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: ۵۵۳۵۱۱٦-۰۱۳۱، دورنگار: ۵۵۳٤۹۵۱-۰۱۳۱، پست الکترونیکی: honarmand_36@yahoo.com
۲- استاد گروه آموزشی داخلی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارشی و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
۳- استادیار گروه آموزشی اپیدمیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
٤- استاد گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد، واحد لاهیجان

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 حیوانات حامل اگر در آب و یا خاک مرطوب ریخته شوند، در pH و دمای مناسب به مدت طولانی زنده مانده و در همین دوره می‌توانند از طریق زخم‌های جلدی به بدن میزبان دیگر (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 تا اواخر تابستان به ویژه در شالیکاران بروز می‌کند ولی اطلاعات قطعی در مورد میزان شیوع آن در شالیکاران و کارگران فصلی شالیزارها که بیشترین کار در شالیزارهای منطقه را انجام می‌دهند در دست نیست. اغلب مبتلایان، سابقه کار در مزرعه برنج و یا تماس با آب‌های سطحی راکد را ذکر می‌کنند [۷-۴]. لپتوسپیراها به ۷ گونه بیماری‌زا دارای ۲۳ گروه سرولوژیکی و ۳ گونه ساپروفیت شامل ۱۰ سروگروپ دسته‌بندی شده‌اند و در مجموع ۲۵۰ سروار را شامل می‌گردند [۳-۱]. معمولاً در هر منطقه آندمیک، 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 به منظور 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 می‌توانند در شناسایی مخزن و یا مخازن این بیماری مؤثر بوده و به تهیه بانک میکروبی از سویه‌های بومی بیانجامد و خود می‌تواند تهیه آنتی‌ژن مشترک از آن‌ها و راه‌اندازی تست‌های تشخیصی اختصاصی‌تر و تهیه واکسن را در آینده امکان‌پذیر 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-فلورواوراسیل به نسبت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای

ممانعت از رشد سایر باکتری‌ها افزوده شده بود، وارد شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد 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 حاوی ۱۲ میلی‌لیتر محیط کشت مایع EMJH فاقد آنتی‌بیوتیک و غنی شده با سرم جنین گاو (با غلظت نهایی ۵٪) انتقال یافته و در شیکر انکوباتور و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند تا به رشد پویا و پرجمعیت برسند. سپس با انجام آزمون رشد و عدم رشد در حضور ۸-آزاگوانین، لپتوسپیراهای بیماری‌زا با انواع ساپروفیت تفکیک داده شدند. وجود این ماده به مقدار ۲۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط کشت، رشد انواع بیماری‌زا را متوقف می‌نمود [۱۰-۹]. برای تعیین سرو تایپ‌ها از ۳۰ آنتی‌سرم اهدا شده از آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیروز وابسته به مؤسسه ملی تحقیقات بیماری‌های گرمسیری کشور هلند (KIT)، ضد ۳۰ سروار مختلف که که هر یک نماینده شاخص یک سروگروپ هستند، استفاده شد. ایزوله‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا به طور جداگانه با آنتی‌سرم‌های مربوطه مواجهه شدند. سروتایپینگ به روش میکرو آگلوتیناسیون استاندارد انجام شد [۱۲-۱۱]. مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت جوان و پر جمعیت هر ایزوله با مقدار مساوی از آنتی‌سرم‌ها در سه ردیف از یک پلیت الیزا مخلوط و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت انکوبه شده و پس از ۵ دقیقه مخلوط کردن دورانی، نتایج با استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک خوانده می‌شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر حفره به روی لام منتقل شده و به دقت زیر میکروسکوپ مشاهده گردید. آگلوتیناسیون بیش از ۵۰٪ به عنوان مورد مثبت [۱۱] و هویت آن آنتی‌سرم به عنوان هویت گونه‌ای و زیر گونه‌ای ایزوله مربوطه تلقی می‌شد. در این روش، محلول آنتی‌ژنی اولیه که فاقد آنتی‌سرم است به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

نتایج

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).

جدول ۱- تعداد نمونه‌ها بر اساس مکان و منبع جمع‌آوری

منطقه	شهرستان	شالیزار	کانال	رودخانه	جمع
مرکز گیلان	خمام	۲۴	۱۲	۴	۴۰
	خشک‌بیجار	۱۹	۱۲	۹	۴۰
	رشت	۲۴	۲	۴	۳۰
	انزلی	۲۱	۱۲	۶	۳۹
	فومن	۲۸	۷	۵	۴۰
	صومعه سرا	۲۵	۵	۴	۳۴
	شفت	۲۹	۷	۲	۳۸
	سنگر	۲۰	۱۰	۱۰	۴۰
غرب گیلان	رضوانشهر	۲۲	۱۲	۶	۴۰
	پره سر	۲۳	۱۱	۶	۴۰
	تالش	۲۲	۱۳	۵	۴۰
	اسالم	۲۲	۱۴	۴	۴۰
	آستارا	۲۳	۱۱	۵	۳۹
جمع		۳۰۲	۱۲۸	۷۰	۵۰۰

تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده در ماه‌های اردیبهشت، خرداد، تیر، مرداد و شهریور به ترتیب ۹۰، ۱۰۲، ۹۷، ۱۱۰ و ۱۰۱ 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 سانتی‌گراد (میانگین ۱۸/۱) و دامنه pH نمونه‌ها ۸/۱ – ۶/۸ (میانگین ۷/۳) بوده است.

تمام نمونه‌ها با استفاده از ۳۰ آنتی‌سرم ضد ۳۰ سروار استاندارد که هر یک نماینده شاخص یک سروگروپ بودند، غربالگری شدند (جدول ۲).

جدول ۲- فهرست آنتی‌سرم‌های استفاده شده برای سروتایپینگ ایزوله‌ها

نمونه‌ها	سروگروپ	سروار	سویه
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
Ẅeilli	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

در غربالگری اولیه در مجموع تعداد ۱۱۳ نمونه (۲۲/۶٪) مثبت و ۳۸۷ نمونه (۷۷/۴٪) 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 ۱۸/۶٪ 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 کانال‌ها جدا 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 گونه‌ها و زیر گونه‌های بیماری‌زا و ساپروفیت جدا شده از آن‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۳- تعداد و درصد ایزوله‌ها برا ساس منابع نمونه‌ها

منبع	تعداد نمونه	ایزوله‌ها از کل موارد مثبت	ایزوله‌های بیماری‌زا از کل موارد مثبت	ایزوله‌های ساپروفیت از کل موارد مثبت
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
شالیزار	۳۰۲	۷۹ (۶۹/۹٪)	۴۷ (۹۵/۹٪)	۳۲ (۵۰٪)
کانال آبیاری	۱۲۸	۱۳ (۱۱/۵٪)	۰ (۰٪)	۱۳ (۲۰/۳٪)
رودخانه	۷۰	۲۱ (۱۸/۶٪)	۲ (۴/۱٪)	۱۹ (۲۹/۷٪)

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

منطقه نمونه‌برداری	تعداد موارد جدا شده	رودخانه		کانال		شالیزار	
		تعداد نمونه	تعداد ایزوله‌ها	تعداد نمونه	تعداد ایزوله‌ها	تعداد نمونه	تعداد ایزوله‌ها
انزلی	۹	۶	۱	۱۲	۰	۲۱	۸
رشت	۱۱	۴	۲	۲	۲	۲۴	۷
صومعه سرا	۱۸	۴	۲	۵	۲	۲۵	۱۴
فومن	۶	۵	۱	۷	۰	۲۸	۵
شفت	۱۳	۲	۲	۷	۲	۲۹	۹
سنگر	۱۳	۱۰	۳	۱۰	۳	۲۰	۷
خشک‌بیجار	۵	۹	۲	۱۲	۰	۱۹	۳
خمام	۴	۴	۰	۱۲	۰	۲۴	۴
تالش	۱۱	۵	۲	۱۳	۱	۲۲	۸
رضوانشهر	۷	۶	۲	۱۲	۱	۲۲	۴
پره سر	۱۰	۶	۲	۱۲	۱	۲۲	۷
اسالم	۴	۴	۱	۱۰	۱	۲۶	۲
آستارا	۲	۵	۱	۱۱	۰	۲۴	۱
جمع	۱۱۳	۷۰	۲۱	۱۲۵	۱۳	۳۰۶	۷۹

لپتوسپیراهای جدا شده به ۱۰ سروگروپ متعلق بودند که دو مورد ساپروفیت و ۸ مورد بیماری‌زا بودند. از ۴۹ ایزوله بیماری‌زا تنها دو مورد از رودخانه جدا شدند که یک مورد به سروگروپ پیروژنز و یک مورد به سروگروپ کانیکولا متعلق بودند و سایر موارد بیماری‌زا شامل همه گونه‌ها و زیر گونه‌ها اغلب از شالیزارها جدا شدند. ۵۰٪ از ایزوله‌های ساپروفیت از شالیزار، ۲۹/۷٪ از رودخانه و ۱۸/۷٪ از کانال 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 ۵- فهرست گونه‌ها و زیرگونه‌های جدا شده با احتساب تعداد و درصد آن‌ها از کل ایزوله‌ها

گونه		تعداد (درصد)	سرو گروپ	تعداد (درصد) از کل ایزوله ها	منبع
بیماری‌زا	اینتروگانس	۲۹ (۱۹/۱٪)	ایکتروهموراژی	۱۷ (۱۵/۱٪)	شالیزار
			پومونا	۵ (۴/۴٪)	شالیزار
			کانیکولا	۲ (۱/۸٪)	شالیزار (۱)، رودخانه
			پیروژنز	۲ (۱/۸٪)	شالیزار (۱)، رودخانه
			سجروئه	۳ (۲/۶٪)	شالیزار
	بورگ پترسنی	۹ (۱۰/۵٪)	هارجو بوویس	۴ (۳/۵٪)	شالیزار
			بالوم	۲ (۱/۸٪)	شالیزار
غیر بیماری‌زا	کیرشنری	۱۴ (۱۷٪)	گریپوتیفوزا	۱۴ (۱۲/۴٪)	شالیزار
	بی فلکسا	۶۴ (۵۶/۶٪)	آندامانا	۴۸ (۴۲/۵٪)	رودخانه (۱۰) کانال (۶)، شالیزار (۳۲)
			سمارانگا	۱۶ (۱۴/۱٪)	رودخانه (۹) کانال (۷)

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

بحث

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 MRSP را برای تعیین هویت ایزوله‌های متعلق به سروار هارجو مقایسه کردند و آن‌ها را روش مؤثری برای مطالعه ساختارهای یک جمعیت داخل گونه‌ای ارزیابی نمودند [۱۵]. Tony و همکاران [۱۶] و هم‌چنین Savio و همکاران [۱۷] روش

RFLP_PCR را برای تفکیک تعداد زیادی از سویه‌های استاندارد و ایزوله شده‌ها به کار بردند. Corney و همکاران روش RAPD را برای تجزیه و تحلیل تاکسونومیکی و یافتن ارتباط بین سروارها مفید بیان نمودند [۱۸]. Tamai و همکاران روش REA را با استفاده از ۱۵ آنزیم برش‌دهنده با موفقیت برای تفکیک سروارهای ایکتروهموراژی و کپنهاگنی به کار بردند [۱۹].

علی‌رغم نتایج روشن روش‌های ذکر شده، هنوز تایپینگ ملکولی لپتوسپیراها استاندارد و تثبیت نشده‌اند [۱،۳] و روش‌های سرولوژیکی تایپینگ این باکتری پرتنوع متداول‌تر است [۳،۱۱]. روش‌های آگلوتیناسیون متقاطع، فاکتور آنالیز و آگلوتیناسیون میکروسکوپی ساده (MAT) Microscopic Agglutination Test برای تایپینگ لپتوسپیراها ابداع و استاندارد شده‌اند [۱۲-۱۱، ۳]. روش‌های اول و دوم پیچیده‌تر هستند و اجرا و تفسیر آن‌ها به تجربه و تخصص بالا نیاز دارد [۱،۱۱] ولی روش آخر که با استفاده از آنتی‌سرم‌های استاندارد انجام می‌شود، ساده‌تر است و رایج‌ترین روش سروتایپینگ است که هنوز در آزمایشگاه‌های مرجع لپتوسپیروز انجام می‌شود [۳،۱۱]. اجرای این روش، پر هزینه، وقت‌گیر و کمی دشوار است زیرا برای دستیابی به نتیجه کاملاً درست، باید سویه مورد نظر را با تعداد زیادی از آنتی‌سرم ضد سروارهای 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 [۱۲-۱۱]. لپتوسپیراها باکتری‌های سخت‌گیر و کند رشد هستند و برای جداسازی آن‌ها باید محیط کشت‌های بسیار غنی شده را مورد استفاده قرار داد [۱۱،۲۰].

Adler و Baseman محیط کشت‌های سنتتیک و غنی شده را معرفی نمودند [۲۲-۲۱]. Johnson و Rogres افزودن ۵- فلوراوراسیل به عنوان تنها آنتی‌بیوتیکی که با غلظت معین، بدون تأثیر بر رشد لپتوسپیراها، از رشد سایر باکتری‌ها جلوگیری می‌کند، را توصیه نمودند [۲۳]. Hartskeerl و همکاران، محیط کشت 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 نمودند [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 لپتوسپیراها را از آب منابعی که برای 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 لپتوسپیروز را در ورزش‌های آبی مطالعه نمود [۳۱] و Cacciapuuoti یک اپیدمی لپتوسپیروز با منشاء آب را توصیف کرد [۳۲]. Smith و Karaseva تأثیر دما و سایر عوامل مؤثر در بقای لپتوسپیراها در آب را مطالعه نمودند [۳۴-۳۳].

در این مطالعه روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی ساده (MAT) با استفاده از ۳۰ نوع آنتی‌سرم ضد ۳۰ سروار 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

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 هستند، جدا شدن آن‌ها دور از انتظار نبوده و نیز حضور آن‌ها در شالیزارها که به طور عمده با آب‌های سطحی منطقه به ویژه از رودخانه‌ها و کانال‌های آبرسانی آبیاری می‌شوند و غالباً مخزن لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند، قابل توجیه می‌باشد. اغلب جوندگان و سایر حیوانات وحشی و نیز حیوانات اهلی و حتی دست‌آموز، می‌توانند مخزن این زیرگونه‌های بیماری‌زا باشند [۳]. وفور جوندگان و برخی از حیوانات وحشی 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 می‌توانند 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 کشاورزی و نیز برای حمل و نقل استفاده نموده و برای حفاظت خانه سگ نگه‌داری می‌کنند [۵-۴]. به طور معمول سگ مخزن سروگروپ کانیکولا، اسب مخزن سروگروپ پومونا، موش مخزن سروگروپ ایکتروهموراژی، گاو مخزن سروگروپ‌های گریپو تیفوزا و هارجو، و گراز مخزن سروگروپ پومونا و بالوم است [۳-۱]. در این مطالعه، بیشتر گونه‌ها و زیرگونه‌های بیماری‌زا از شالیزارها که احتمال آلوده شدن آن با ادرار حیوان حامل، بیشتر است و زیرگونه‌های ساپروفیت، از تمام منابع آبی مطالعه شده جدا شدند. وجود گونه‌ها و زیرگونه‌های بیماری‌زا در شالیزارها، با شیوع غالب این بیماری در مناطق روستایی و به طور عمده در کارگران مزارع برنج [۷-۴] تناسب دارد.

نتیجه‌گیری

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

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

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

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. Honarmand[1], F. Mansour Ghanaei[2], A. Heidarzadeh[3], M. Asmar[4]

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 30ºc 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 decreaseing 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