تایپینگ مولکولی لپتوسپیراهای بومی ناحیه مرکزی منطقه جلگه ای استان گیلان به روش تجزیه Restriction Endonuclease Analysis (REA)

مهدی آسمار[1*]، حمید رضا هنرمند[2]، مریم فتح الهی[3]

۱*و۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات بیماری های گوارشی و کبد

mehdiassmar@yahoo.com

چکیده

لپتوسپیروز بیماری مشترک انسان – حیوان شایع در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری بوده و در استان گیلان آندمیک است. باکتریهای ترشح شده از حیوانات حامل، در آب و خاک مرطوب و در pH و دمای مناسب می توانند به مدت طولانی در کنار لپتوسپیراهای غیربیماریزای زنده دوام بیاورند. معمولاً در هر منطقه آندمیک، تعداد اندکی از سروارها شایع هستند و شناسایی آنها به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی کمک می کند. این مطالعه به منظور جداسازی لپتوسپیراها از آب شالیزارها، کانال ها و رودخانه های منطقه و به منظور شناسایی سروارهای شایع انجام شده است. نمونه برداری از آبهای سطحی شهرستان های منطقه در فاصله زمانی خرداد تا پایان شهریور سال ۱۳۸۵ صورت گرفت. هر نمونه بطور جداگانه در محیط مایع EMJH کشت داده شدند. کشت های مثبت و پر جمعیت با روش استاندارد استخراج گردید و برای آنها REA با استفاده از آنزیم EcoRI انجام شد. و پس از انجام الکتروفورز و رنگ آمیزی، تصویر باند ها آنالیز گردید. در مجموع تعداد ۳۰۱ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. تطبیق الگوی باندهای حاصل با الگوهای مربوط به سروارهای استاندارد، هویت گونه ای و زیر گونه ای ۲۷ ایزوله ها مشخص گردید که به ترتیب شامل گونه های ساپروفیت بی فلکسا و شامل سروگروپهای:آنداماناو پاتوک، بودند.گونه های بیماریزا شامل اینتروگانس،کیرشنری، بورگ پترسنی بودند که سروگروپهای: ایکتروهموراژی، پومونا، بالوم، هارجو، کانیکولا و گریپوتیفوزا را شامل می شدند. در این مطالعه حضورگونه های بیماریزا در شالیزارها بیشتر بود که می توان آن را به توقف آب و به رفت و آمد حیوانات به ویژه جوندگان نسبت داد و حضورگونه های غیر بیماریزا در رودخانه و کانال بیشتر بوده است.

کلمات کلیدی: گیلان، لپتوسپیرا، تایپینگ مولکولی، سروگروپ.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

لپتوسپیروز بیماری مشترک انسان – حیوان شایع در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که توسط گونه‌های بیماریزای لپتوسپیراها حاصل می شود. این باکتری ها طیف میزبانی وسیعی دارند. تعداد زیادی از پستانداران اهلی و وحشی میزبان طبیعی انواع بیماریزا هستد و اغلب آنها پس از ابتلا به بیماری به مدت طولانی و معمولاً تا پایان عمر حامل باقی می‌مانند و به صورت دوره ای باکتری را از طریق ادرار خود دفع می‌کنند. باکتری های دفع شده از حیوانات مخزن، اگر در آب و یا خاک مرطوب ریخته شوند در pH و دمای مناسب می توانند به مدت طولانی زنده بمانند و در همین دوره می توانند از طریق زخم های جلدی به سایر حیوانات خونگرم منجمله انسان سرایت نمایند و منجر به بیماری شوند (۱و۱۱). آبهای سطحی از قبیل: رودخانه، نهر، مرداب و دریاچه های آب شیرین، منابع لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند (۱۱). 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 بویژه گاو، همواره، شرایط مناسبی برای بروز این بیماری دارد. لپتوسپیروز در اغلب روستاهای ناحیه جلگه ای استان گیلان شیوع دارد و همه ساله موارد بسیار زیادی از بیماری از اواسط بهار تا اواخر تابستان به ویژه در شالیکاران بروز می کند. اغلب مبتلایان، سابقه کار در مزرعه برنج و یا تماس با آبهای سطحی راکد را ذکر می کنند (۱۳و۱۴). لپتوسپیراها در ۷ گونه بیماریزا که شامل ۲۳ سروگروپ متشکل از حدود ۲۵۰ سروار است دسته بندی شده اند و انواع ساپروفیت آن شامل ۳ گونه و ۱۴ سروگروپ هستند (۱و۱۱). معمولاً در هر منطقه آندمیک، تعداد اندکی از سروار های 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 محسوب می شود (۱۱). این مطالعه به منظور جداسازی لپتوسپیراها از آب شالیزارها در فصل شیوع بیماری و نیز از برخی منابع آبیاری شالیزارها (از جمله کانال و رودخانه) و شناسایی آنها با یک روش قابل اطمینان با هدف شناسایی سروارهای شایع منطقه انجام شده است.

مواد و روش کار

در این پژوهش جمعاً تعداد ۳۰۱ نمونه از آبهای سطحی (رودخانه، شالیزار وکانال آبیاری) ناحیه مرکزی منطقه جلگه ای استان گیلان شامل شهرستان های: لشت نشا، خشکبیجار، رشت، انزلی، فومن، صومعه سرا، شفت و سنگر در فاصله زمانی خرداد تا پایان شهریور سال ۱۳۸۵ جمع آوری و مقدار 1ml از هر نمونه پس از فیلتراسیون با استفاده از فیلترسرنگی ۲۲ نانومتر به یک لوله فالکون ۱۵ml حاوی محیط کشت مایع EMJH که به آن ۴۰۰µg/ml آنتی بیوتیک ۵- فلوروآروسیل جهت ممانعت از رشد سایر باکتریها افزوده گردیده بود، وارد نموده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ هفته در انکوباتور قرار داده می شد و هر ۲ هفته یک بار با میکروسکوپ زمینه تاریک مورد مشاهده قرار می گرفت. سپس با حذف موارد منفی موارد مثبت به ارلن ۲۵۰ml حاوی EMJH فاقد آنتی بیوتیک ۵- فلوروآروسیل انتقال داده شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور انتقال یافته تا به رشد پویا و به جمعیت مطلوب برسد. سپس با انجام

Archive of SID

www.SID.ir

تست رشد و عدم رشد در حضور ۸- آزاگوانین لپتوسپیراهای بیماریزا از انواع ساپروفیت ها تفکیک داده شود. وجود این ماده به مقدار ۲۲۵g/ml در محیط کشت رشد انواع بیماری زا را متوقف می کند (۷و۱۹). جهت استخراج DNA باید جمعیت میکروبی محیط کشت حداقل به $۱۰^{۸}$ml برسد. OD برابر ۰/۶ در طول موج ۵۵۰ نانومترحاکی از جمعیت مطلوب باکتریایی است (۸ و۱۹). برای استخراج DNA ، نمام حجم هر نمونه را در یک لوله فالکون ۱۵ml ریخته و با دور ۹۰۰۰rpm به مدت یک ساعت سانتریفوژ نمودیم و رسوب حاصله نیز با PBS دو بار شستشو شده، سپس رسوب را در بافر TE حل نموده و سپس استخراج DNA با روش فنل -کلروفرم انجام گرفت (۲۰). DNA استخراج شده در ۱۰۰µl از بافر TE حل شده و تا زمان انجام REA، در دمای ۲۰- نگهداری گردید. پس از سنجش کیفیت DNA با روش اسپکتروفتومتری، با در نظر گرفتن غلظت DNA، مقدار ۳µg از آن را برای انجام REA برداشته و پس از رقیق کردن آن با آب مقطر دیونیزه و رساندن حجم آن به ۱۸ µl، مقدار ۲µl بافر مخصوص REA و مقدار ۱ µl از آنزیم EcoRI را به آن افزوده و خوب مخلوط نمودیم و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت انکوبه گردیده و با افزودن مقدار ۵ µl از لودینگ بافر آبی رنگ به آن، عملیات الکتروفورز در آگارز ۳٪ با ولتاژ ۷۰ ولت به مدت ۱۸ ساعت انجام گرفت و در پایان پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، توسط ژل داک، از باندهای ایجاد شده عکسبرداری و مورد آنالیز قرار گرفت. در این مطالعه از سایز مارکر ۱۵-۱ kbp محصول شرکت فرمنتاز استفاده شد.

نتایج

از مجموع تعداد ۳۰۱ نمونه، ۱۹۰ نمونه از آب و خاک شالیزارها، ۴۴ نمونه رودخانه ها و ۶۷ نمونه از آب کانال جمع آوری گردید (جدول ۱).

جدول ۱: تعداد نمونه ها به تفکیک محل نمونه برداری و منابع

منابع / شهرستان	شالیزار	کانال	رودخانه	جمع
لشت نشا	۲۴ (۱۲)	۱۲	۴	۴۰
خشکبیجار	۱۹	۱۲	۹	۴۰
رشت	۲۴	۲	۴	۳۰
انزلی	۲۱	۱۲	۶	۳۹
فومن	۲۸ (۱۰)	۷	۵	۴۰
صومعه سرا	۲۵	۵	۴	۳۴
شفت	۲۹	۷	۲	۳۸
سنگر	۲۰	۱۰	۱۰	۴۰
جمع	۱۹۰	۶۷	۴۴	۳۰۱

* اعداد داخل پرانتز به تعداد مواردی اشاره دارند که به دلیل خشک بودن مزارع به جای آب از خاک نواحی مرطوب (گل) آنها نمونه برداری شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

دامنه دمای نمونه آب ها ۳۹-۲۶ (با میانگین ۲۷/۷ درجه سانتی گراد) و دامنه pH نمونه ها ۸–۶/۵ (با میانگین ۷/۴۳) بوده است. در بررسی اولیه مجموعاً تعداد ۱۶۸ مورد (۵۵/۸ درصد) مثبت و ۱۳۳ مورد (۴۴/۲ درصد) منفی شدند. در پاساژهای بعدی تعداد زیادی از موارد مثبت به رشد مطلوب نرسیدند و تنها ۳۳ نمونه (۱۱ درصد) به رشد پویا و پر جمعیت رسیدند که برای انجام REA مناسب بودند (جدول ۲). از تعداد مزبور ۱۷ نمونه ساپروفیت و ۱۰ نمونه بیماریزا بودند (جدول ۳).

جدول ۲: میزان آلودگی نمونه های مورد بررسی به لپتوسپیرا بر حسب شهرستان و منابع

منابع / فراوانی / شهرستان	رودخانه				کانال				شالیزار			
	تعداد نمونه	موارد منفی	موارد مثبت	درصد	تعداد نمونه	موارد منفی	موارد مثبت	درصد	تعداد نمونه	موارد منفی	موارد مثبت	درصد
انزلی	۶	۲	۴	۶۶/۶٪	۱۲	۵	۷	۵۸/۳٪	۲۱	۱۲	۹	۴۲/۸٪
رشت	۴	۱	۳	۷۵٪	۲	۰	۲	۱۰۰٪	۲۴	۸	۱۶	۶۶/۷٪
صومعه سرا	۴	۳	۱	۶/۷٪	۵	۴	۱	۲۰٪	۲۵	۱۵	۱۰	۴۰٪
فومن	۵	۲	۳	۶۰٪	۷	۵	۲	۲۸/۶٪	۲۸	۲۵	۳	۱۰/۷٪
شفت	۲	۱	۱	۵۰٪	۷	۵	۲	۲۷/۴٪	۲۹	۱۹	۱۰	۳/۴٪
سنگر	۱۰	۲	۸	۸۰٪	۱۰	۱	۹	۹۰٪	۲۰	۸	۱۲	۶۰٪
خشکبیجار	۹	۴	۵	۵۵/۵٪	۱۲	۴	۸	۶۶/۷٪	۱۹	۸	۱۱	۵۷/۹٪
لشت نشا	۴	۴	۰	۰	۱۲	۸	۴	۳۳/۳٪	۲۴	۱۹	۵	۲۰/۸٪
جمع	۴۴	۱۹	۲۵	۵۶/۸٪	۶۷	۳۲	۳۵	۵۲/۲٪	۱۹۰	۱۱۴	۷۶	۴۰٪

پس از انجام REA، الگوهای باندهای حاصله از انواع بیماریزا و ساپروفیت (شکل های ۱،۲،۳و۴) با الگوهای مربوط به سروارهای استاندارد بیماریزا و ساپروفیت (با رجوع به database اخذ شده از آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیروز انستیتو پاستور فرانسه، پاریس) تطبیق داده شد، هویت گونه ای و زیر گونه ای ۲۷ ایزوله مشخص گردید (جدول ۳) و ۶ ایزوله، الگوی نامشخص و غیر قابل تفسیر داشتند.

Archive of SID

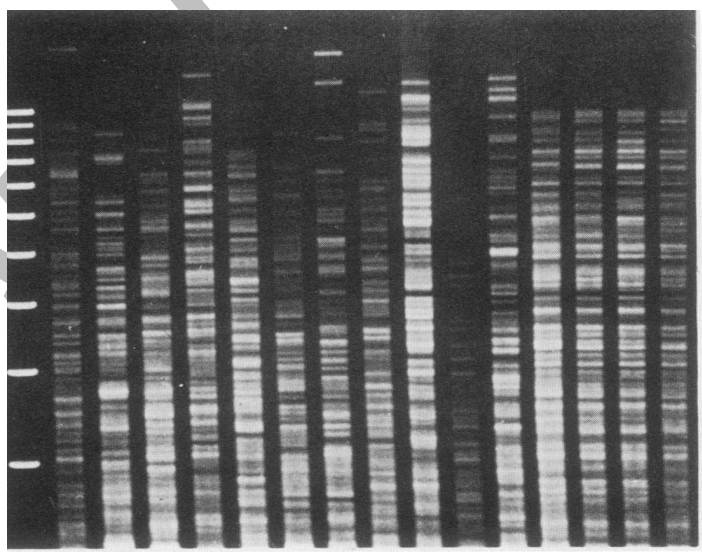
www.SID.ir

جدول ۳: تعیین فراوانی گروهها، گونه ها و زیرگونه های مختلف لپتوسپیراهای جداشده از منابع مختلف بر اساس الگوی باند REA در مقایسه با الگوی استاندارد

گروه	بیماریزا												غیر بیماریزا						جمع	
گونه	اینتروگانس						بورگ پترسنی				کیرشنری		بایفلک				ولباشیا			
زیرگونه	ایکتروموراژی		پومونا		کانیکولا		بالوم		هارجوبویس		گریپوتیفوزا		آنداماتا		پاتوک		کارانگا			
فراوانی / منبع	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
شالیزار	۳	۱۳	۲	۸/۶	۱	۴/۳	۱	۴/۳	۱	۴/۳	۲	۸/۶	۵	۲۱/۷	۷	۳۰/۴	۱	۴/۳	۲۳	۸۲/۱۴
کانال	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱	۲۵	۲	۵۰	۱	۲۵	۴	۱۴/۲۶
رودخانه	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱	۱۰۰	–	–	۱	۳/۶
جمع	۳	۱۰/۷	۲	۷/۱۴	۱	۳/۵	۱	۳/۵	۱	۳/۵	۲	۷/۱۴	۵	۱۷/۸	۷	۲۵	۱	۳/۵	۲۸	۱۰۰

در این بررسی بیشترین فراوانی (۱۳ درصد) در گروه لپتوسپیراهای پاتوژن متعلق به لپتوسپرا دیکترو هموراژیک می باشد که در شالیزار شیوع دارد. همچنین بیشترین فراوانی متعلق به سویه پاتوک از گروه لپتوسپیراهای غیر بیماریزا می باشد که در شالیزار به میزان ۳۰/۴ درصد و در کانالها به میزان ۵۰ درصد شیوع دارد (جدول ۳).

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



شکل ۱: الگوی باندی REA مربوط به تعداد ۱۵ ایزوله :

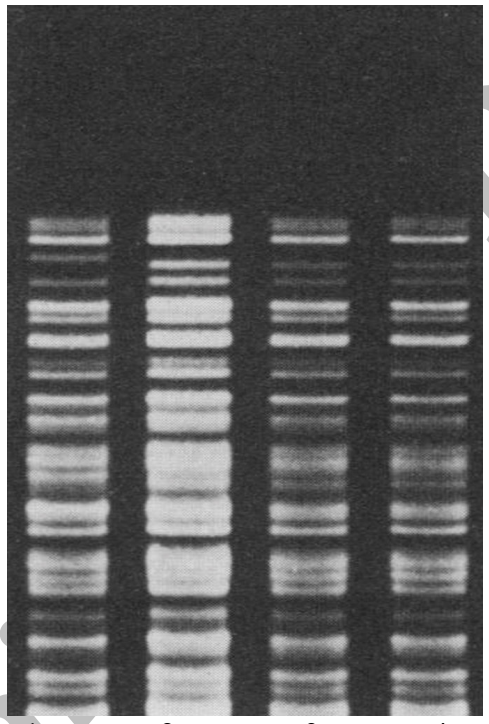
L: سایز مارکر 1-15 kbp. در این تصویر ۱۲-۳ kbp موجودند و لادرهای ۱و۲ کیلوبازی به دلیل طولانی بودن زمان الکتروفورز از ژل خارج شده اند.

ردیف ۱ : سروگروپ هارجوبوویس ردیف ۲ : سروگروپ بالوم ردیف ۳ : سروگروپ کانیکولا

Archive of SID

www.SID.ir

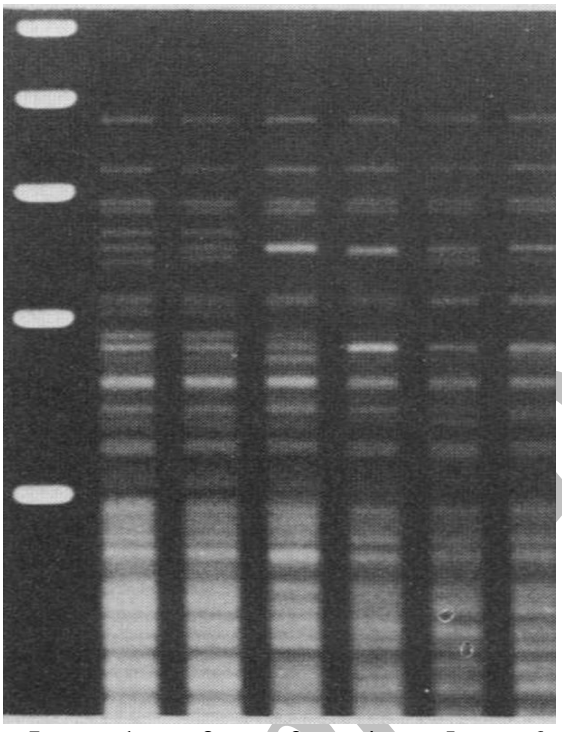
ردیف ۴ : سروگروپ گریپوتیفوزا ردیف ۵ : سروگروپ آندامانا ردیف ۶ : سروگروپ سمارانگا
ردیف ۷ : سروگروپ پومونا ردیف ۸ : سروگروپ پومونا ردیف ۹ : سروگروپ گریپوتیفوزا
ردیف ۱۰: الگوی نا مشخص ردیف ۱۱: سروگروپ ایکتروهموراژی
ردیف ۱۲-۱۵ : سروگروپ پاتوک



شکل ۲: تصاویر واضح تر و متمرکز شده تراز بخش میانی ژل از۴ الگوی باندی REA مربوط به تعداد ۴ ایزوله ردیف ۱۲-۱۵ که در شکل ۱ بوده اند. این الگوی باندی REA مربوط به بخش میانی الگوی باندی سروگروپ پاتوک است. در این تصویر سایز مارکرها به دلیل متمرکز کردن تصویر ژل در اینجا دیده نمی شوند

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳: تصاویر واضح تر و متمرکز شده تراز ۴ الگوی باندی REA مربوط به تعداد ۶ ایزوله

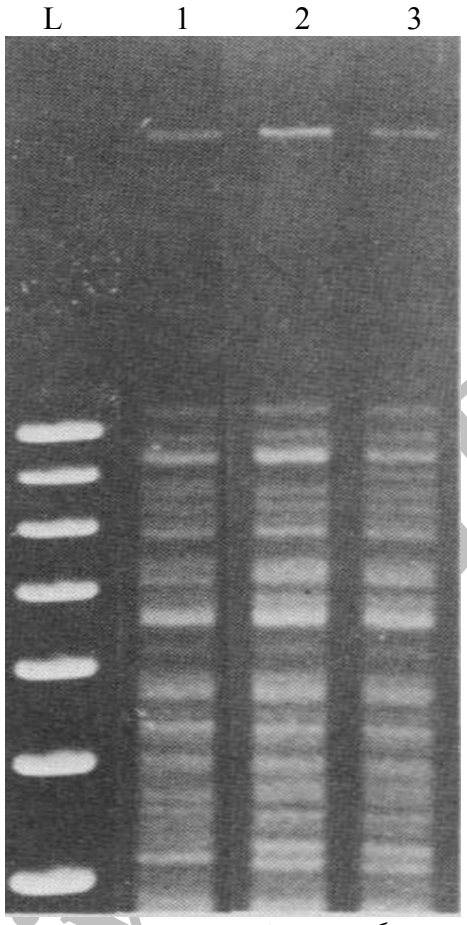
L: سایز مارکر 15-۱ kbp. در این تصویر 12 kbp در بالا و 7 kbp در پایین. بقیه لادر ها به دلیل متمرکز کردن تصویر ژل در اینجا دیده نمی شوند.

ردیف ۱، ۲و ۳: الگوی باندی REA مربوط به سروگروپ پاتوک

ردیف ۴، ۵ و۶: الگوی باندی REA مربوط به سروگروپ آندامانا

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴: تصاویر واضح تر و متمرکز شده تراز ۳ الگوی باندی REA مربوط به تعداد ۳ ایزوله. هر ۳ الگوی باندی REA مربوط به سرو گروپ ایکتروهموراژی

L: سایز مارکر kbp ۱۵-۱: در این تصویر kbp ۱۲در بالا و kbp ۷ در پایین. بقیه لادر ها به دلیل متمرکز کردن تصویر ژل در اینجا دیده نمی شوند.

بحث

متعدد بودن گونه ها و زیر گونه ها در جنس لپتوسپیرا، لزوم دسته بندی و متمایز نمودن آنها را بیشتر نموده است. سروتایپینگ با روش MAT هنوزدر آزمایشگاههای مرجع لپتوسپیروز رایج است ولی انجام این روش پر هزینه، وقت گیر و بسیار دشوار است زیرا برای دستیابی به نتیجه کاملاً درست باید سویه مورد نظر را با لااقل ۲۰۰ آنتی سرم ضد سرووارهای استاندارد مواجه نمود (۸ و۱۱). ضمناً خواندن نتایج نیز دشوار بوده و به تخصص و تجربه زیاد نیاز دارد (۱۱). بنابراین دستیابی به یک روش ساده تر و مطمئن لازم بوده است. در سال های اخیر تایپینگ مولکولی میکروارگانیزم ها متداول شده و روشهای متعدی، ابداع و آزموده شده‌اند. تعدادی از این روش ها برای تایپینگ لپتوسپیراها نیز به کار گرفته شدند و نتایج متفاوتی نشان دادند (۱).

Herrmann روش PFGE را برای تمایز درون گونه ای و تعیین هویت سرووارها مفید ارزیابی نمود (۹). Hookey روش ریبو تایپینگ با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

تکنیک RFLP_PCR را آزمود وآن را روش سودمندی برای دسته بندی و مطالعات اپیدمیولوژی ارزیابی نمود (۱۰). Perolat سه روش Ribotyping، AP_PCR و MRSP را برای تعیین هویت ایزوله‌های متعلق به سروارهارجو به کار برده و مقایسه نمودند و آنها را روش موثری برای مطالعه ساختارهای یک جمعیت داخل گونه ای ارزیابی نمودند (۱۲). Tony و همکاران و همچنین Savio و همکاران روش PCR-RFLP را برای تفکیک تعداد زیادی از سویه‌های استاندارد و ایزوله شده ها به کار بردند و آن را روش مفیدی برای شناسایی سریع زیر گونه های لپتوسپیرا اینتروگانس اعلام نمودند (۱۷و۱۸). Corney روش RAPD را روش مفیدی برای تجزیه و تحلیل تاکسونومیکی و یافتن ارتباط بین سروارها بیان نمود (۳). روشهای ذکر شده همگی نیاز مند به اجرای PCR بوده و هزینه بردار هستند ولی اجرای روش REA بسیار ساده تر است. این روش برای تایپینگ باکتری های مختلف بکار برده شده است. قدرت تمایز در این روش به وجود مکان های برش آنزیم های برش دهنده، موجود بر روی ملکول DNA و پلاسمید و نیز به تعداد پلاسمید های میکرو ارگانیزم وابسته است و به طور عمده برای باکتری هایی مناسب است که پلاسمید ندارند و یا کم دارند از جمله لپتوسپیراها، زیرا وجود پلاسمید الگوی باند ها را کمی مغشوش می کند. در واقع دقت روش REA در تفکیک گونه ها و زیر گونه‌ها به نوع و تعداد آنزیم‌های برش دهنده ای که بکار برده می شوند بستگی دارد. اگر از یک آنزیم استفاده شود تعداد باندهای حاصله کمتر بوده و تفسیر آنها آسان تر خواهد بود ولی الگوی باندها برای سرووارِیته‌های هم خانواده شباهت نزدیکتری داشته و تفکیک آنها را مشکل تر می‌کند. در صورت استفاده از چند آنزیم برش دهنده، قدرت تمایز افزایش می یابد ولی تعداد باندها زیادتر شده، تفسیر آنها مشکل تر می‌گردد و ضمناً تعدا زیادی باندهای کوچک بوجود می آیند که به صورت اسمیر نمایان می شوند (۱و۱۱). Ellis تعداد ۲۵۳ سویه متعلق به سروار هارجو از گونه اینتروگانس و ۱۹۰ ایزوله جدا شده از گاو را با روش REA مورد مطالعه قرار داد و توانست الگوی باندی متفاوت برای تیپ های هارجوبویس و هاجوراجیتنورا تشخیص دهد (۶). همان محقق در یک مطالعه دیگر همان روش را با استفاده از ۲۰ آنزیم برای ۱۶۲ سویه جدا شده از خوک و تعداد زیادی سویه استرالیایی متعلق به سروگروپ های گونه اینتروگانس بررسی نمود و باز هم تفاوت الگوی باندها در سطح زیر گونه را مشاهده نمود (۵). Wu روش REA را با استفاده از ۷ آنزیم برش دهنده برای سروارهای مختلف بکار برد و به این نتیجه رسید که تفاوت باندها در منطقه وزن مولکولی بالا چشمگیرتر است و این تفاوت در سویه های متعلق به یک سروار چندان مشهود نیست ولی در سطح سروار کاملاً نمایان است (۲۱). Tamai روش REA را با استفاده از ۱۵ آنزیم برش دهنده با موفقیت برای تفکیک سروارهای ایکترو هموری و کپنهاگنی به کار برد (۱۶). Robinson همین روش را با استفاده از ۲ آنزیم برش دهنده برای برای تفکیک سروارهای سروگروپ پومونا بکار برد (۲۲) و مطالعه مشابهی توسط Zhu برای ایزوله های سروگروپ پومونا جدا شده از کلیه خوک در منطقه ویکتوریا با موفقیت بکار برد (۲۳) و مطالعه ای توسط Djordjevic برای ایزوله‌های جدا

Archive of SID

www.SID.ir

شده از گاوهای مبتلا به آگالاکتیه و سقط جنین مکرر صورت گرفت (۴).

در این مطالعه روش REA با استفاده از یک آنزیم (آنزیم EcoRI ساخت شرکت فرمنتاز و خریدتری شده از شرکت ایرانی سینا ژن) برای تعیین هویت سویه های جدا شده از آبهای سطحی استفاده شد. با توجه به نتایج حاصله و فهرست گونه ها و زیر گونه های شناسایی شده، وجود انواع بیماری زا و غیر بیماریزا در آبهای سطحی منطقه مسجل شده است. با توجه به این نکته که مخزن گونه های غیر بیماری زا همان آبهای سطحی است، وجود آنها دور از انتظار نبوده و نیز حضور آنها در شالیزار ها نیز که بطور عمده با همان آبهای سطحی بویژه از: رودخانه ها، جویبارها، و کانال های آب رسانی آبیاری می شوند که غالباً مخزن لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند، قابل انتظار و طبیعی می باشد. نتایج این مطالعه نشان داده است که لپتوسپیراهای ساپروفیت به گونه بی فلکسا و گونه ولباشیا حضور زیادتری دارند و نسبت فراوانی این دو گونه به هم نزدیک است. در گونه بی فلکسا تنها زیر گونه های (سروگروپ) آندامانا و پاتوک و در گونه ولباشیا فقط سروگروپ سمارانگا شناسایی شدند. این سروگروپها علاوه بر آبهای سطحی در شالیزارها نیز یافت شدند.

یافته مهم دیگر این مطالعه، حضور انواع بیماریزا است که بطور عمده از شالیزار ها جدا شدند. در این مطالعه گونه های: اینتروگانس، بورگ پترسنی، کیرشنری شناسایی شدند. در گونه اینترگانس که مهم‌ترین و بزرگ ترین گونه بیماریزا در جنس لپتوسپیرا است و خود تعداد زیادی سرو گروپ و بیش از ۲۰۰ سروار دارد، سروگروپ های ایکتروهموراژی، پومونا و کانیکولا شناسایی شدند. در گونه بورگ پترسنی سرو گروپ بالوم و هاجو بوویس و در گونه کیرشنری سروگروپ گریپوتیفوزا شناسایی گردیدند. اصولا جوندگان و سایر حیوانات وحشی و نیز حیوانات اهلی و حتی انواع دست آموز، مخزن طبیعی گونه های بیماری زا هستند. لپتوسپیراهای بیماری زا بطور عمده در کلیه این حیوانات استقرار دارند. اغلب حیوانات پس از ابتلا تا آخر عمر حامل باقی می مانند و باکتری را بطور دوره ای از طریق ادرار خود ترشح می کنند. بیشتر گونه ها و زیر گونه های بیماری زا می توانند در شرایط مناسب (دمای بالای ۲۰ درجه سلسیوس و pH خنثی) به مدت طولانی در آب و خاک مرطوب زنده بمانند و در این مدت فرصت می یابند به بدن میزبان دیگر وارد شوند. وفور جوندگان و برخی از حیوانات وحشی به ویژه شغال که در مجاورت نزدیک سکونت گاههای انسان به ویژه در مناطق روستایی به سر می برند و به راحتی در شالیزار ها رفت و آمد می کنند 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، این ها توجیه کننده حضور گونه و زیر گونه های بیماریزا در شالیزار ها است. اغلب روستاییان بطور سنتی در منزل خود گاو نگه داری می کنند و از اسب برای برخی از فعالیت‌های کشاورزی و نیز برای حمل و نقل استفاده نموده و برای حفاظت خانه سگ نگه داری می کنند. بطور 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. اغلب گونه ها و زیر گونه های بیماری زا از شالیزار ها

Archive of SID

www.SID.ir

جدا شدند و تنها یک مورد کانیکولا از کانال جدا شد که احتمال آلوده شدن آن با ادرار حیوان حامل وجود دارد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی و علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان انجام گرفته است. لذا بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی جناب آقای دکتر بیدریغ تشکر می گردد.

منابع

۱. منصور قناعی، ف. و هنرمند، ح.ر.، ۱۳۸۴. لپتوسپیروز و شیوع آن در استان گیلان. انتشارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان. ص ۸۹-۹۹.

۲. هنرمند ح.ر.؛ منصور قناعی، ف.؛ اشراقی، س. و خرمی زاده، م.ر.، ۱۳۸۵. بررسی شیوع لپتوسپیروز در استان گیلان در سال ۱۳۸۳. مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان. ص ۸-۱۵.

3. Corney, B.G.; Colley, J. and Graham, G.C., 1997. Simplified analysis of pathogenic leptospiral servers by random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. J Med Microbiol.; 46 :927-32.
4. Djordjevic, S.; Hornitzky, M.; Ross, A.D. and Whittington, R.J., 1993. Restriction endonuclease analysis of Leptospira introgans serovar hardjo from cattle with agalacia and abortion. Aus Vet J.;70(3): 98-100.
5. Ellis, W.A.; Montgomery, J.M. and Thiermann, A.B., 1991. Restriction Endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belong to the Australia serogroup of Leptospira interrogans. J Clin Microbiol.; 29(5) : 957-61.
6. Ellis, W.A.; Thiermann, A.B., Montgomery, J. and et al., 1988. Restriction endonuclease analysis of Leptospira interogans serovar hardjo isolates from cattle.Res Vet Sci.; 44(3): 375-9.
7. Fains, 2003. Guidance for the Diagnosis, Surveillance and Control of Human Lepeospirosis. WHO offset publication Geneva. World Health Organization.; pp. 17-20.
8. Hartskeel, R.A.; Smits, H.L.; Korver, H.; Goris, M.G.A. and Terpstra, W.J., 2004. Instruction booklet of International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. KIT Royal Tropical Institute Publication: 38-42.
9. Herrmann, J.L.; Bellenger, E.; Perolat, P.; Baranton, G. and Girons, I.S., 1992. Pulsed-Field Gel electrophrosis of *Not* I digests of isolates of Leptospira interogans DNA: a new rapid method opf serovar identification. J Clin Microbiol.; 30 :1696-1702.
10. Hookey, J.V., 1993. Characterization of Leptospira by 16sDNA Restriction Length Polymorphism. J Gen Micribiol.; 139: 1681-9.
11. Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. Clin Micro Rev; 4: 296-326.
12. Perolat, P.; Merien, F.; Ellis, W.A. and Baranton, G., 1994. Charactrization of Leptospira from serovar Hardjo by Ribotyping, Arbitrarily Primed PCR, and Mapped Restriction Site Polymorphism. J Clin Microbiol.; Aug :1949-57.
13. Plank, R. and Deborah, D., 2000. Overiew of Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis of *Leptospira* spp in humansMicrobes and Infections.; 2: 1265-1267.
14. Resaei, A.R. and Delkhosh, J., 1998. Leptospirosis statistical report in Guilan, Iran, from 1996 to 1998. Abstract book of lepeospirosis conference, Rasht, Iran .pp. 30-35.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Savio M.L.; Rossi C.; Fusi, P.; Taqlibue, S. and Paccicarini, M.L., 1994. Detection and Identification of Leptospira interogans serovars by PCR coupled with Restriction endonuclease of amplified DNA. J Clin Microbiol.; 32(4):935-41.
16. Tamai, T.; Sada, E. and Kobayashi, Y., 1988. Restriction endonuclease analysis of Leptospira introgans serovar Icterohaemorrhagiae and Copenhageni. Microbiol Immunol.; 32(9):887-94.
17. Tahbaz, A.; Sarshad, A.; Vandyousefi, J.; Safavi, S. and Dabaghian, K., 1995. Preliminary study of leptospirosis in Guilan. Journal of Infectious and Tropical Diseases of Iran.; 113:109-110.
18. Tony, H.S.; Woo, Patel BKC, et al., 1997. Comparison of two PCR methods for rapid identification of Leptospira genospecies interrogans. FEMS Micribiology Letters ; : 169-177.
19. Turner, L.H., 1970. Leptospirosis III: Maintenance, Isolation and Demonstration of *lepeospires* . Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.; 64: 623-646.
20. Veloso, I.F.; Lopes, M.T.P.; Salas, C.E. and Moriera, E.C., 2000. A Comparison of three DNA extracive procedures with *lepeospires* for PCR analysis. Mem Inst Oswaldo ruz. Rio de Janeiro.; 95(3): 339-343.
21. Wu, W. and Dai, B., 1993. Restriction endonuclease analysis of Leptospira DNA from different serogroup and serovar. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.; 24(3):258-61.
22. Robinson, A.J.; Ramadass, P.; Lee, A. and Marshal, A.B., 1982. Differentiation of subtypes within Leptospira interogans serovars Hardjo, Balanica and Tarassovi, by bacterial restriction endonuclease DNA analysis. J Med Microbiol.; 15(3):331-8.
23. Zhu, S.; Chappel, R. and Amon, L., 1993. Restriction endonuclease analysis of Leptospira of Pomona serogroup of Leptospira interogans. Wei Sheng Wu Xue Bao.; 33(5):374-7.

Archive of SID

www.SID.ir