

## بررسی شیوع بیماری لپتوسپیروز در استان مازندران با استفاده از روشهای میکروآگلوتیناسیون و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

حبیب الله فرجی<sup>۱</sup>، مهدی آسمار<sup>۲\*</sup>، غلامحسین ابراهیمی پور<sup>۱</sup>، سید ابوالفضل هاشمی چلاوی<sup>۳</sup>، بهزاد اسفندیاری<sup>۳</sup>، سید پیمان ضیاء پور<sup>۳</sup>، گالیا امیربزرگی<sup>۳</sup>، بتول امینی<sup>۳</sup>، غلامرضا عبدالله پور<sup>۴</sup> و سعید ستاری تبریزی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

<sup>۲</sup> تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه انگل شناسی

<sup>۳</sup> آمل، انستیتو پاستور ایران، پژوهشکده شمال کشور

<sup>۴</sup> تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۱۷

تاریخ دریافت: ۸۶/۸/۱۶

### چکیده

بروز لپتوسپیروز در مناطق معتدل در بین کارگران برنج و حیوانات مزرعه بالاست به همین دلیل وضعیت این بیماری و بررسی سروتیپهای شایع انسانی منطقه، برای ساخت واکسن مناسب ضرورت پیدا می کند. از آذر ماه ۱۳۸۵ تا تیر ماه ۱۳۸۶، تعداد ۱۲۷ نمونه خون متعلق به افراد مشکوک به لپتوسپیروز از مناطق مختلف مازندران همراه با سابقه بیماران به پژوهشکده شمال کشور واقع در آمل ارسال و با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) مورد آزمایش قرار گرفت. سپس برای شناسایی سروتیپهای بیماریزای محل، نمونه‌های جمع آوری شده به آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ارسال و با روش میکروآگلوتیناسیون (MAT) مورد آزمایش قرار گرفت. شیوع بیماری در منطقه مازندران با استفاده از روش IFA و MAT، ۵۸/۲۶ درصد شناخته شد. کارگران زمین برنج به عنوان پرخطرترین گروه شغلی برای ابتلا به این بیماری شناخته شدند که از بین موارد مثبت، ۶۶/۲۲ درصد در این گروه دیده شد و ارتباط معنی داری با سایر مشاغل نشان داد ( $P=0/007$ ). شیوع بیماری در بین مردان، ۵۷ درصد و در زنان، ۶۵ درصد مثبت شناخته شدند. جنس از نظر ابتلا به بیماری تفاوت معنی داری نشان نداد ( $P>0/05$ ). محل سکونت (روستا-شهر) و تماس افراد مشکوک به لپتوسپیروز با حیوانات نیز ارتباط معنی داری با بیماری نشان ندادند. بیشترین موارد مثبت در گروه سنی ۵۰-۴۰ سال (۲۵/۶۷ درصد) دیده شد. از میان ۱۵ سروتیپ استفاده شده در روش MAT، ۷ سروتیپ شامل، بالوم (۱۶/۸۷ درصد)، سجر (۱۴/۲۹)، تاراسووی (۱۳/۶۴ درصد)، استرالیس (۱۱/۶۹ درصد)، پیروژنز (۷/۷۹ درصد)، ایکتر/هموراژی (۶/۵ درصد) و ژاوانیکا (۶/۵ درصد) به عنوان سروتیپهای شایع منطقه شناخته شدند. در این تحقیق حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی آزمایش IFA با تیتراژ مثبت ۱:۸۰ نسبت به آزمایش MAT با تیتراژ مثبت ۱:۱۰۰ به عنوان استاندارد اصلی به ترتیب، ۳۸/۸ درصد، ۸۸/۳۳ درصد، ۷۸/۷۸ درصد و ۵۶/۳۸ درصد شناخته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که عفونت لپتوسپیروز به طور وسیع در استان مازندران وجود دارد و مسئولین مربوطه باید اقدامات پیشگیری و کنترل این بیماری چند چهره را با جدیت بیشتری دنبال کنند، تا از توسعه و گسترش این بیماری در منطقه جلوگیری شود. آنالیز آماری نتایج بیان کرد که لپتوسپیروز به عنوان یک بیماری شغلی در منطقه مازندران شناخته می شود.

واژه های کلیدی: لپتوسپیروز، استان مازندران، میکروآگلوتیناسیون، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، کارگران برنج

\* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۶۶۹۵۳۳۱۱، پست الکترونیک: mehdiassmar@yahoo.com

## مقدمه

لپتوسپیروسیس (*Leptospira*) نوعی اسپروکت (*Spirochete*) از خانواده لپتوسپیروسه (*Leptospirsea*) می باشد (۸) که گونه پاتوژن آن باعث بیماری لپتوسپیروز (*Leptospirosis*) می شود (۷). بیش از ۲۰۰ سرووار بیماریزا در ۲۳ سروگروپ شناخته شده است (۱۲). لپتوسپیروز یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان است که در سطح جهان گسترده می باشد (۲ و ۳) و انسان میزبان تصادفی این بیماری است (۲ و ۳). علائم بیماری انسانی این باکتری فوق العاده وسیع بوده که از عفونت بسیار خفیف و حاد تا عفونت قسمتهای مختلف بدن با مرگ و میر شدید را شامل می شود (۷). منبع عفونت در انسان معمولاً تماس مستقیم یا غیر مستقیم با ادرار حیوانات عفونی است (۷). راه ورود معمولاً از طریق سایش پوست یا بریدگی یا از طریق غشای ملتحمه یا دهان می باشد (۷ و ۱۲). عفونت ممکن است از طریق پوست سالم بعد از شنای زیاد در آب نیز ایجاد شود، اما احتمالاً این انتقال از طریق سایش پوست در آب ایجاد می شود. انتقال از طریق جنسی نیز دیده شده است (۷).

لپتوسپیروز به عنوان یک بیماری فصلی شناخته شده و شیوع بالای این بیماری در فصلهای گرم مناطق معتدل و فصلهای بارانی مناطق گرمسیر دیده می شود. در مناطق معتدل کاهش دما و در مناطق گرمسیر خشکی فاکتور محدودکننده در حیات لپتوسپیروسیس می باشد (۷).

لپتوسپیروز از مهمترین بیماری شغلی است، کارگران مزارع برنج به عنوان بیشترین موارد بروز عفونت شناخته شده اند (۱۱ و ۱۴)، ضمن اینکه تماس نزدیک با حیوانات عفونی اهلی و وحشی زمینه را برای ابتلا به این بیماری فراهم می کند (۷). یک آگاهی از سرووارهای شایع و میزبانهای نگهدارنده شان ضروری است تا اپیدمیولوژی بیماری در هر منطقه بهتر درک شود (۷). تصویر واضح و بالینی زردی عفونی (*Infectious jaundice*) تا سال ۱۸۸۶ ارائه نشد، در آن سال آدولف ویل چهار بیمار را با علائم تب، لرز، درد

عضلانی، بزرگ شدن کبد و طحال، خونریزی و گهگاهی عود مجدد تب فروکش کرده گزارش کرد که به آن بیماری ویل نام نهادند (۹). تحقیقات مختلف در ایران نیز نشان داده است که بیماری لپتوسپیروز در بین حیوانات مختلف وجود دارد، برای اولین بار رفیعی و همکارانش در سالهای ۱۳۳۶، ۱۳۳۸ و ۱۳۴۰ لپتوسپیروسیس گریپوتیفوزا (*Grippotyphosa*) را از گاو و گوسفند جداسازی نمودند (۱). به دنبال آن محققان دیگری همچون مقامی، جعفری، جلیل وندیوسفی روی گونه های مختلف حیوانی کار کردند و سروتیپهای مختلف لپتوسپیروسیس را گزارش نمودند

استان مازندران جزء مناطق معتدل جغرافیایی بوده و آب و هوای منطقه زمینه را برای بقای لپتوسپیروسیس فراهم می کند، شغل اکثر افراد این منطقه کشت برنج است که عامل مهمی در بروز این بیماری می باشد. روستاهای زیادی در این منطقه بوده و ارتباط نزدیکی بین انسان و حیوانات مزرعه وجود دارد، لذا با بررسی سرولوژیکی لپتوسپیروز در افراد مشکوک به این بیماری، وضعیت این بیماری و سروتیپهای شایع انسانی منطقه را می توان بررسی کرد. تا در کنترل و ریشه کنی این بیماری در منطقه مازندران و بهبود شرایط بهداشتی منطقه بتوان کمک کوچکی نمود.

## مواد و روشها

بیماران مشکوک به بیماری لپتوسپیروز همراه با پرسشنامه ای شامل مشخصات فردی بیمار، شغل، سابقه تماس با حیوانات، نوع آب آشامیدنی، علائم بالینی و جواب آزمایشهای پاراکلینیکالی توسط پزشکان متخصص بیماریهای عفونی به آزمایشگاه رفرانس واقع در انستیتوپاستور ایران، مرکز آمل، ارجاع می شدند، در آن مرکز بعد از خونگیری از بیمار به میزان ۳-۵ ml سرم جداسازی گردید و به روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA) مورد آزمایش قرار گرفت. سپس نمونه های جمع

۱۵ سروتپب شایع و بیماریزا استفاده شد. استفاده از هر سروتپب به صورت جداگانه، این امکان را می داد که سروگروپ عامل بیماری را تشخیص داده شود. سروتپبهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۴ نشان داده شده است.

**روش تجزیه و تحلیل داده ها:** ارتباط متغیرهای کیفی و بیماری لپتوسپیروز در این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون کای دو (chi-square) مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

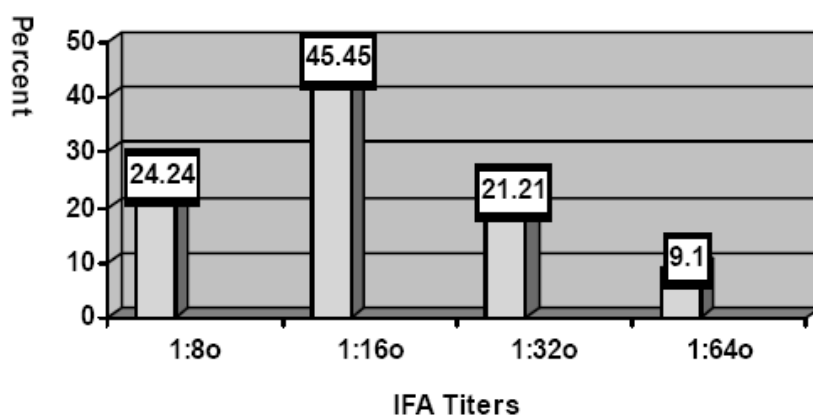
در این مطالعه، علائم بیماران مشکوک به لپتوسپیروز در روز اول بستری مورد بررسی قرار گرفت. علائم بیماران مثبت از نظر سرولوژیکی نشان داد که تب در ۸۹/۱۹ درصد، درد عضلانی در ۸۲/۳۵ درصد، احتقان ملتحمه و یرقان در ۴۲/۶ درصد بیماران دیده می شود. سایر علائم شامل اختلالات کلیوی، ریوی، خونریزی، اختلالات پرده مننژ، راش و غیره نیز به نسبت کمتر دیده شد. این بررسی نشان داد که کارگران زمین برنج به عنوان پرخطرترین گروه شغلی برای ابتلا به این بیماری شناخته می شوند، از بین موارد مثبت، ۶۶/۲۲ درصد در این گروه دیده شده است و ارتباط معنی داری با سایر مشاغل نشان داد ( $P=0/007$ ). از مجموع برنجکاران، ۷۰ درصد آنها مثبت شدند، همچنین از میان برنجکاران مرد، ۷۰/۹۶ درصد و از میان برنجکاران زن، ۶۲/۵ درصد آنها مثبت شناخته شدند (جدول ۱). ارتباط معنی داری بین جنسیت و بیماری لپتوسپیروز در استان مازندران دیده نشد ( $P=0/506$ )، ۵۷ درصد از بین مردان و ۶۷ درصد از بین زنان، با استفاده از روش IFA و MAT مثبت شدند. از بین موارد مثبت، ۸۲/۴۳ درصد در مردان و ۱۷/۵۷ درصد در زنان دیده شد که نشان دهنده شمار بالای مردان در این مطالعه می باشد (جدول ۱، ۲ و ۳).

آوری شده با استفاده از زنجیره سرد به آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال و با روش میکروآگلوتیناسیون (MAT) مورد آزمایش قرار گرفت.

در طی نمونه گیری به مدت ۸ ماه (۱ آذر ۱۳۸۵ لغایت ۳۱ تیر ۱۳۸۶) تعداد ۱۲۷ نمونه جمع آوری شد.

**روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم:** بعد از رقیق کردن سرم آن با آنتی ژن فیکس شده بر روی لام (سرووار پاتوک = *Serovar patoc*) همراه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. در مرحله بعد آنتی کر کونژوکه پلی والان متصل به فلورسانس اضافه شده و دوباره در انکوباتور قرار گرفت. بعد از هر مرحله انکوباسیون شستشوی لام با آب نمک ۹ در هزار با pH ۷/۲ ضروری می باشد و در نهایت لام گلیسرینه شده با میکروسکوپ فلورسانس برای وجود باکتری فنری شکل به رنگ سبز روشن مایل به زرد درخشان بررسی گردید. با آزمایشهای متعددی که از نمونه های کنترل مثبت با استفاده از کونژوکه موجود انجام شد، مشخص گردید که عیار نمونه های مثبت کمتر از ۱:۸۰ نمی باشد، بنابراین عیار Cut-off آزمایش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم، ۱:۸۰ در نظر گرفته شد.

**روش میکروآگلوتیناسیون:** ۱۰ میکرولیتر از رقت ۱:۵۰ سرم را با همان حجم از کشت خالص و زنده ۵ تا ۷ روزه سروتپبهای زنده لپتوسپیروز، در محیط مایع GRA-Sina با تراکم استاندارد  $10^8 \times 2$  باکتری در هر میلی لیتر، بر روی لام همراه نموده و به آرامی مخلوط گردید، سپس لام را در داخل بوات مرطوب با پایه های شیشه ای قرار داده و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد و در نهایت با میکروسکوپ زمینه تاریک میزان آگلوتیناسیون لپتوسپیروزها در تیتراژ ۱:۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. در موارد مثبت به علت آگلوتیناسیون، حداقل بیش از ۵۰ درصد باکتری بی حرکت می شوند. در این مطالعه از



نمودار ۱- فراوانی نسبی عیارهای مثبت IFA

جدول ۱- نتیجه آنالیز آماری رابطه شغل و بیماری لپتوسپیروز با استفاده از روش میکروآگلوتیناسیون و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

جمع		زن				مرد				جنس	
		تعداد	مثبت	منفی	درصد مثبت	تعداد	مثبت	منفی	درصد مثبت	شغل	فراوانی
تعداد	مثبت	مثبت	منفی	درصد مثبت	تعداد	مثبت	منفی	درصد مثبت	شغلیکار		
۷۰	۴۹	۶۲/۵	۳	۶/۷۶	۸	۵	۱۸	۷۰/۹۶			
(۶۶/۲۲)		(۶/۷۶)		(۵۹/۴۶)				(۵۹/۴۶)	مشاغل دیگر		
۴۲/۸۶	۱۵	۶۳/۶۳	۴	۹/۴۴	۱۱	۷	۱۶	۳۳/۳۳			
(۲۰/۲۷)		(۹/۴۴)		(۱۰/۸۱)				(۱۰/۸۱)	موارد ذکر نشده		
۴۵/۴۵	۱۰	۱۰۰	۰	۱/۳۵	۱	۱	۱۲	۴۲/۸۵			
(۱۳/۵۱)		(۱/۳۵)		(۱۲/۱۶)				(۱۲/۱۶)	جمع کل		
۵۸/۲۶	۷۴	۶۵	۷	۱۷/۵۷	۲۰	۱۳	۴۴	۵۷			
(۱۰۰)		(۱۷/۵۷)		(۸۲/۴۳)				(۸۲/۴۳)			

$\alpha = 0.05$

$df=1$

$\chi^2 = 7.223 > 3.84$

$P\text{-value} = 0.007$

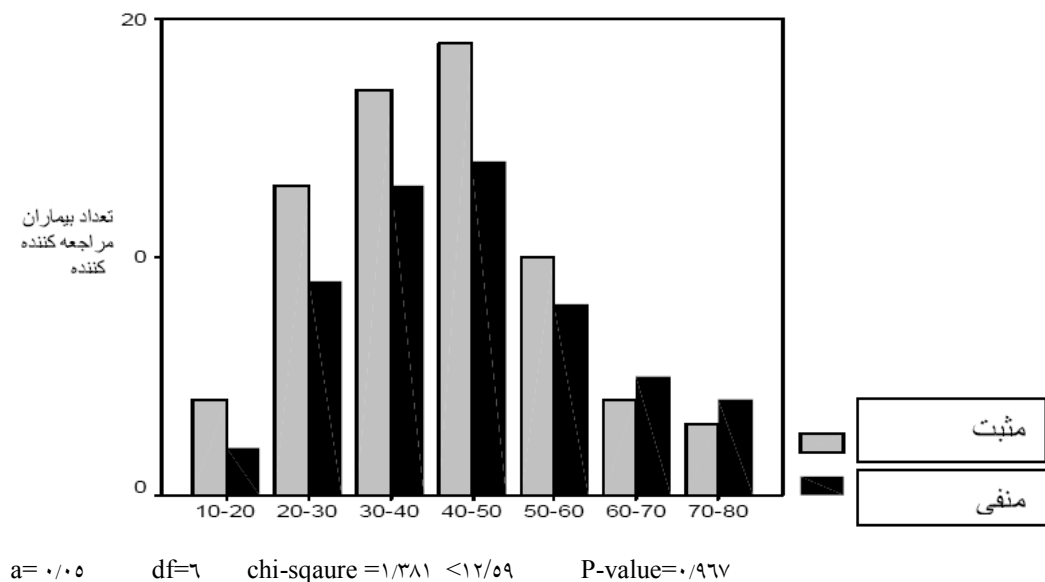
افراد مشکوک به لپتوسپیروز با حیوانات، ارتباط معنی داری با بیماری ندارد ( $P=0.751$ ).

نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد که شیوع بیماری لپتوسپیروز در استان مازندران، با استفاده از روش IFA و MAT، ۵۸/۲۶ درصد می باشد که نشان دهنده درصد بالای آلودگی در منطقه است (جدول ۱، ۲ و ۳). در این تحقیق، از مجموع ۷۴ نمونه دارای آنتی بادی بر علیه لپتوسپیروز، ۳۵/۱۳ درصد به وسیله IFA و MAT، ۹/۴۶

همان طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، بیشترین موارد مثبت لپتوسپیروز در گروه سنی ۴۰-۵۰ سال (۲۵/۶۷ درصد) دیده شد. ۴۸/۶۶ درصد موارد مثبت در گروه سنی ۳۰-۵۰ دیده شد. ارتباط معنی داری بین گروه سنی و بیماری لپتوسپیروز دیده نشد ( $P=0.967$ ). همان طوری که در جدول ۲ نشان داده شده است، هیچ ارتباط معنی داری بین محل سکونت (روستا-شهر) و بیماری لپتوسپیروز دیده نشده است ( $P=0.862$ ). نتایج نشان داده است که تماس

سرولوژیکی میکروآگلوتیناسیون (MAT) شناسایی شد به ترتیب شامل، بالوم (۱۶/۸۷ درصد)، سجره (۱۴/۲۹ درصد)، تاراسووی (۱۳/۶۴ درصد)، استرالیس (۱۱/۶۹ درصد)، پیروژنز (۷/۷۹ درصد)، ایکترهمورازی (۶/۵ درصد) و ژاوانیکا (۶/۵ درصد) می باشد که از بین سروتیپهای منطقه، مردان دارای آنتی بادی بر علیه ۸۱/۸۱ درصد سروتیپها و زنان نسبت به ۱۸/۱۹ درصد آنها می- باشند (جدول ۴). شایع ترین سروتیپ در بین شالیکاران، بالوم (۱۸/۹ درصد)، تاراسووی (۱۴/۱ درصد)، استرالیس (۱۲/۲۶ درصد) و سجره (۹/۴ درصد) شناخته شد.

درصد به وسیله IFA و ۵۵/۴ درصد به وسیله MAT مثبت شدند. حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی IFA نسبت به MAT، به ترتیب ۳۸/۸ درصد، ۸۸/۳۳ درصد، ۷۸/۷۸ درصد و ۵۶/۳۸ درصد شناخته شد (جدول ۳). با بالا رفتن تیتراژ IFA از ۱:۸۰ به ۱:۱۶۰، اختصاصیت (توانایی آزمایش برای شناسایی موارد منفی) و ارزش اخباری مثبت (احتمال صحت موارد مثبت آزمایش) به ترتیب به ۹۱/۶۶ درصد و ۸۰ درصد رسید (نمودار ۱). اگرچه تشخیص قطعی سروتیپهای لپتوسپیروا توسط آزمایشگاههای میکروبیولوژی صورت می-گیرد، ۷ سروتیپ شایع منطقه که با استفاده از روش



نمودار ۲- ارتباط گروه سنی و بیماری لپتوسپیروز با استفاده از نتایج روش IFA و MAT

در زمینهای زراعی آزاد می باشند. همچنین حیوانات وحشی فراوانی مانند شغال و جوندگان در نزدیک روستا زندگی می کنند. اکثر این حیوانات ممکن است عفونت لپتوسپیروا را حمل کنند. زمینهای زراعی در این منطقه اکثراً بوسیله کانالهای کوچک منشاء گرفته از رودخانه ها و نهرها آبیاری می شوند و در بیشتر مواقع باید مرطوب باشند. تخمین زده شده است که بقای لپتوسپیروا در مناطق مرطوب، به ویژه زمینهای شالیزار بسیار بالاست. با توجه به اینکه زنان هم دوش مردان در زمینهای زراعی به تلاش

## بحث

در بعضی از مناطق ایران، شرایط محیطی، آب و هوایی، اجتماعی و اقتصادی زمینه را برای افزایش بروز لپتوسپیروز فراهم می کند. در استان مازندران و مناطق روستایی، شغل اصلی اکثر مردم شالیکاری می باشد. شغل دوم منطقه نیز دامداری است، نگهداری از گاو و گوسفند برای تولید گوشت و شیر، استفاده از اسب برای حمل کالا و وجود سگ برای امنیت، در مازندران به تعداد زیاد وجود دارد. همه حیوانات خانگی در فاصله مابین دو فصل شالیکاری

معنی دار نبودن اثر تماس حیوانات احتیاج به تحقیقات بیشتر و نمونه‌گیری مستقیم از حیوانات یا از ادرار آنها و مقایسه آن با نتایج این مطالعه می‌باشد. فراوانی آلودگی لپتوسپیروزی در منطقه تحت بررسی نشان می‌دهد که میزبانهای مهم و نگهدارنده لپتوسپیروزی در منطقه وجود دارد. نمونه‌گیری مستقیم از حیوانات باعث شناسایی قطعی این میزبانها می‌شود.

و کوشش می‌پردازند، همچنین، اگرچه شالیکاری به عنوان شغل سنتی منطقه می‌باشد، ارتباط افراد جوانتر نیز با این شغل برقرار است. بنابراین عدم ارتباط جنس و گروه سنی با بیماری لپتوسپیروزی قابل توجهی می‌باشد. با درک اینکه در استان مازندران، ارتباط افراد شهری با کار کشاورزی و برنجکاری قطع نشده است، معنی دار نبودن محل سکونت بر روی شیوع بیماری نیز قابل توجهی می‌باشد. در مورد

جدول ۲- نتیجه آنالیز آماری رابطه محل سکونت (روستا یا شهر) و بیماری لپتوسپیروزی با استفاده از نتایج حاصل از روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم

(IFA) و میکروآگلوتیناسیون (MAT)

جنس	مرد			زن			جمع			
	تعداد	مثبت	منفی	تعداد	مثبت	منفی	تعداد	مثبت	منفی	
روستا	۶۲	۳۸	۲۴	۶	۴	۲	۶۶/۶۶ (۵۱/۳۵)	۴۲	۲۶	۶۱/۷۶ (۵۶/۷۵)
شهر	۲۳	۱۳	۱۰	۱۲	۸	۴	۶۶/۶۶ (۱۰/۸۲)	۲۳	۱۴	۶۰ (۲۸/۳۹)
موارد ذکر نشده	۲۲	۱۰	۱۲	۲	۱	۱	۵۰ (۱/۳۵)	۲۲	۱۳	۴۵/۸۳ (۱۴/۸۶)
جمع کل	۱۰۷	۶۱	۴۴	۲۰	۱۳	۷	۵۷ (۸۲/۴۳)	۱۲۷	۷۴	۵۸/۲۶ (۱۰۰)

$$a=0.05 \quad df=1 \quad \text{chi-square}=0.03 < 3/84 \quad P\text{-value}=0.862$$

جدول ۳- نتایج به دست آمده از روش میکروآگلوتیناسیون (MAT) و ایمنوفلورسانس غیرمستقیم (IFA)

جنس	مرد			زن			جمع			
	تعداد	مثبت	منفی	تعداد	مثبت	منفی	تعداد	مثبت	منفی	
MAT	۱۰۷	۵۴	۵۳	۲۰	۱۳	۷	۵۷ (۸۰/۴۳)	۱۲۷	۶۷	۵۲/۷۵ (۱۰۰)
IFA	۱۰۷	۲۸	۷۹	۲۰	۵	۱۵	۲۵ (۱۵/۱۵)	۱۲۷	۳۳	۲۵/۹۸ (۱۰۰)
جمع کل	۱۰۷	۶۱	۴۴	۲۰	۱۳	۷	۵۷ (۸۲/۴۳)	۱۲۷	۷۴	۵۸/۲۶ (۱۰۰)

جدول ۴- توزیع فراوانی نسبی سروتیپ ها در استان مازندران، در تیتراژ ۱:۱۰۰ میکروآگلوتیناسیون (MAT)

جمع		زنان		مردان		جنس فراوانی
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
						سروتیپ
۱۶/۸۷	۲۶	۳/۲۴	۵	۱۳/۶۳	۲۱	Ballum
۱۴/۲۹	۲۲	۲/۶	۴	۱۱/۶۹	۱۸	Sejroe
۱۳/۶۴	۲۱	۱/۹۵	۳	۱۱/۶۹	۱۸	Tarassovi
۱۱/۶۹	۱۸	۱/۳	۲	۱۰/۳۹	۱۶	Australis
۷/۷۹	۱۲	۰/۶۵	۱	۷/۱۴	۱۱	Pyrogenes
۶/۵	۱۰	۲/۶	۴	۳/۹	۶	Icterohaemorrhagiae
۶/۵	۱۰	۰/۶۵	۱	۵/۸۴	۹	Javanica
۵/۱۹	۸	۰	۰	۵/۱۹	۸	Cynopteri
۳/۹	۶	۱/۹۵	۳	۱/۹۵	۳	Pomona
۳/۹	۶	۰/۶۵	۱	۳/۲۴	۵	Hardjo
۳/۲۵	۵	۱/۳	۲	۱/۹۵	۳	Autumnalis
۲/۶	۴	۰/۶۵	۱	۱/۹۵	۳	Hebdomadis
۱/۹۵	۳	۰/۶۵	۱	۱/۳	۲	Grippotyphosa Moskva V
۱/۳	۲	۰	۰	۱/۳	۲	Bataviae
۰/۶۵	۱	۰	۰	۰/۶۵	۱	Canicola
۱۰۰	۱۵۴	۱۸/۱۹	۲۸	۸۱/۸۱	۱۲۶	جمع کل

۳ منطقه شالیزاری و یک منطقه با تراکم بالای حیوانات مزرعه انجام شد، درصد مثبت در گروه سنی جوانان کمتر از گروه سنی افراد پیرتر بود، ولی این اختلاف قابل توجه نبود. نتایج نشان داد که مناطق برنجکاری در ترکیه اندمیک برای عفونت لپتوسپیرومی باشد (۱۳). در تحقیق دیگری در سال ۱۹۸۸ در فیلیپین، بیش از ۱۵۵ سرم انسانی از ۳ روستای دارای شغل شالیکاری جمع آوری شد، در این بررسی، ۴۳/۶ درصد نمونه‌ها با استفاده از روش MAT مثبت شدند، آنتی‌بادی بر علیه لپتوسپیرومی در مردان بیشتر از زنان شناسایی شد، همچنین این آنتی‌بادی در افراد با سن بالا کمتر شایع بود. در این تحقیق گزارش شد که شیوع لپتوسپیروز در کارگران زمین برنج بالا بوده و احتمالاً لپتوسپیروز عامل بیماریهای ناشناخته و همراه با تب شدید یا ملایم در فیلیپین می‌باشد (۱۰). در تحقیقی در سال ۱۹۹۰ در شیلی که بر روی ۲۶۵ مورد از کارگران در

در یک بررسی، با توجه به وجود بیماری در سگهای دو خانواده، در یک مورد هیچگونه ابتلاء آن خانواده به بیماری لپتوسپیروز مشاهده نشد، در حالی که تعداد ۹ نفر از اعضای خانواده دیگر به این بیماری مبتلا شدند. بنابراین به نظر می‌رسد، میزان برخورد با عفونت یک فاکتور عمده در بروز بیماری در انسان نباشد و فاکتورهای دیگری اعم از نوع سروتیپ و سویه آلوده‌کننده، عوامل محیطی و جغرافیایی و شرایط و ویژگیهای میزبان در آلودگی و ابتلاء به بیماری دخالت دارند (۵). نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد که شیوع بیماری لپتوسپیروز در استان مازندران، با استفاده از روش IFA و MAT، ۵۸/۲۶ درصد می‌باشد که نشان دهنده درصد بالای آلودگی در منطقه است (جدول ۱، ۲ و ۳). نتایج ما تاحدی مشابه نتایج بعضی از محققان دیگر بوده و در یک تحقیق سرمی در سال ۱۹۶۰ در ترکیه که بر روی نمونه‌های انسانی و حیوانی در

حیوانات مزرعه و جوندگان به ویژه موش به عنوان حاملان *لپتوسپیرو*، شیوع این بیماری را افزایش داده است.

تماس با آب نیز از عوامل خطرناک برای ابتلاء به بیماری *لپتوسپیروز* می‌باشد، در سال ۱۹۳۱ در لیبون پرتقال، تعداد ۱۲۶ نفر با نوشیدن آب از یک منبع به بیماری *لپتوسپیروز* مبتلا شدند، در همان سال ۳۱ نفر در یونان با نوشیدن آب در کافه به این بیماری دچار شدند. در سال ۱۹۴۹ در اوکیناوا ژاپن، تعداد ۱۶ نفر با شنا در گودالی به بیماری *لپتوسپیروز* مبتلا شدند، در سال ۱۹۵۲ در روسیه، تعدادی از افراد با شنا در رودخانه به این بیماری دچار شدند. نمونه‌های دیگر گزارش شده شامل، درگیری ۱۱۴ نفر در ژاپن با شنا در رودخانه در سال ۱۹۵۳، بیماری ۱۰ نفر در بوینس آیرس آرژانتین به دنبال شنا در کانال در سال ۱۹۷۶، عفونت ۶ نفر در مورون کوبا با شنا در کانال در سال ۱۹۸۶ و ابتلاء ۲۳ مورد در سائوپائولو برزیل به دنبال شنا در استخر در سال ۱۹۸۷ می‌باشد (۷). در این مطالعه ۸ نفر سابقه شنا در رودخانه یا استخر را داشتند که با استفاده از روش IFA و MAT، ۵ نفر واکنش سرولوژیکی مثبت نسبت به *لپتوسپیرو* نشان دادند، همچنین ۷ نفر دیگر از آبهای جاری برای نوشیدن استفاده کردند که ۶ نفر از نظر سرولوژیکی مثبت شدند. به نظر می‌رسد آبهای استان مازندران شرایط را برای بیماری *لپتوسپیروز* فراهم می‌کند. دفع ادرار حیوانات و جوندگان آلوده به *لپتوسپیرو* در محیط و آلودگی بسترهای آبی منطقه باعث انتشار هر چه بیشتر عفونت در منطقه می‌شود. آزمایش IFA توانایی بالایی در تشخیص بیماری *لپتوسپیروز* در فاز حاد دارد (۴، ۶ و ۱۲). در بررسی حاضر، با پیگیری از ۷ بیماری که به وسیله آزمایش IFA مثبت شد و با روش MAT منفی بود، مشخص شد که از ۶ نفر از این بیماران در هفته اول بعد از بروز علائم، نمونه‌گیری صورت گرفته است.

در تحقیق سال ۲۰۰۰ در هاتیای تایلند، بعد از بررسی سری از افراد تب‌دار و بدون علائم واضح، مشخص شد

معرض خطر *لپتوسپیروز* انجام گرفت، ۲۲ درصد نمونه‌های سری با روش MAT مثبت شدند. در این مطالعه، بیشترین موارد مثبت در کارگران زمین برنج دیده شد (۱۵). بعد از سیل عظیمی که در سال ۲۰۰۰ در هاتیای تایلند روی داد، ۵۲۷ بیمار دارای تب شدید و حاد مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی سری، با استفاده از روش IFA با کونژوکه پلی‌والان و MAT، ۳۲/۵ درصد بیماران مثبت شدند (۱۲).

سروتیپهای شایع منطقه در مطالعه ما در استان مازندران *بالوم*، *سجرو*، *تاراسووی* و *استرالیس* شناخته شد. میزبان مخزن *سروگروپ بالوم*، موشهای خانگی و راتها و میزبان مخزن *سروگروپ سجرو* و *استرالیس* حیوانات مزرعه می‌باشند. *سروگروپ تاراسووی* در حیوانات مزرعه نیز دیده می‌شود (۷). به نظر می‌رسد جوندگان، به ویژه موشها، منبع اصلی بیماری در منطقه مازندران باشند که با دفع ادرار در محیط، زمینه را برای آلودگی منطقه فراهم می‌کنند. وجود حیوانات مزرعه در مناطق مازندران و دفع ادرار آنها در محیط نیز باعث انتقال غیرمستقیم این بیماری به انسان می‌شود. در یک بررسی سرولوژیکی در سالهای ۱۳۷۶-۱۳۷۸، شیوع آنتی‌بادیهای *لپتوسپیرو ایتروگانس* در گله‌های گاو مشکوک استان مازندران بررسی شد که آنتی‌بادی ضد سه *سروگروپ ایکتروهمورازی*، *گریپوتیفوزا* و *کانیکولا* گزارش شد (۱). بررسیهای انجام شده در این مطالعه نشان داد که این سروتیپها در موارد انسانی کمتر شایع می‌باشد. وجود آب و هوای معتدل و مناطق شالیزاری زیاد در منطقه، زمینه را برای بقای *لپتوسپیرو* فراهم می‌کند. عدم رعایت شرایط بهداشتی، شایع نبودن کشاورزی مدرن، استفاده نکردن از حشره‌کشها، علف‌کشها و مواد شیمیایی مناسب، عدم مصرف شالیکاران از آنتی‌بیوتیکها و نبودن واکسن مناسب برای پیشگیری باعث شیوع بالای این بیماری در بین شالیکاران منطقه شده است. با توجه به اینکه روستاهای زیادی در مازندران وجود دارد، وجود



وقت گیر و پیچیده بوده و آزمایشگاههای کمی تجهیزات و تخصص ویژه برای انجام این آزمایش را دارا می باشند (۷و۴)، بنابراین آزمایشهای سرولوژیکی سریع و ساده تر همچون (IFA)، که توانایی بالایی در تشخیص لپتوسپیروز در فاز حاد دارد، مورد نیاز می باشد.

### نتیجه گیری

با توجه به بررسی حاضر می توان نتیجه گرفت که عفونت لپتوسپیروز به طور وسیع در استان مازندران وجود دارد و مسئولین مربوطه کشور باید اقدامات پیشگیری و کنترل این بیماری چند چهره را با جدیت بیشتری دنبال کنند، تا از توسعه و گسترش بیشتر این بیماری در منطقه جلوگیری شود. تولید واکسن پلی والان از سروتیپهای شایع منطقه و استفاده در مشاغل پرخطر به خصوص شالیکاران و کنترل و جلوگیری از آلودگی آنها با ادرار جوندگان و فضولات دامها ضروری می باشد.

که از مجموع بیماران دارای آنتی بادی بر علیه لپتوسپیروز، ۶۷/۸ درصد به وسیله IFA و MAT، ۲۴ درصد به وسیله IFA و ۸/۲ درصد به وسیله MAT مثبت شدند. حساسیت IFA و MAT به ترتیب ۹۱/۸ درصد و ۷۶ درصد شناخته شد (۱۲). در تحقیق دیگری در همین منطقه در سال ۲۰۰۴، حساسیت و اختصاصیت IFA به ترتیب ۹۱/۹ درصد، ۱۰۰ درصد و حساسیت و اختصاصیت MAT، ۷۶/۶ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش گردید (۴).

در یک بررسی در بانکوک تایلند در سال ۲۰۰۵، حساسیت و اختصاصیت تیترا IFA ۱:۲۰۰ در مقایسه با تیترا MAT ۱:۱۰۰ به عنوان استاندارد اصلی، به ترتیب ۹۴/۷ درصد و ۹۵/۳ درصد گزارش شد (۴). به نظر می رسد علت پایین بودن حساسیت IFA در این تحقیق (۳۸/۸ درصد)، مراجعه اکثر بیماران بعد از بروز علائم و طولانی شدن بیماری باشد، در صورتی که این روش در فاز حاد بیماری بسیار مفید است. آزمایش میکروآگلوتیناسیون

### منابع

- ۱- واحدی نوری، ن، وندیوسفی، ج و خرسند، ن. (۱۳۸۱) مطالعه شیوع پادتنهای لپتوسپیروز/ ایتروگانس در گله های گاو مشکوک استان مازندران، پژوهش و سازندگی، شماره ۵۴.
- Leptospirosis. J. Tropical. Medicine. Public. Health. 35:863-870.
- 7-Levett, P. N. (2001): Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews. 14:296-326.
- 8-Milton, H. S. and Garcia, J. ( 2002): The Spirochetes: Molecular and Cellular Biology Book Reviews. H S press, International Microbiology. 5: 43-4.
- 9-Molner, J.G. and Kasper, J. A. (1940): Epidemiology and Laboratory Diagnosis of Infectious Jaundice (Weil's disease). Sixty-ninth Annual Meeting in Detroit, Mich. 31:945-950.
- 10-Padre, L.P., Watt, G., Tuazon, M.L., Gray, M.R. and Laughlin, L.W. (1988): A serologic survey of rice-field leptospirosis in Central Luzon, Philippines. J. Tropical. Medicine. Public. Health. 19:197-9.
- 11-Phraisuwan, P., Whitney, E.A.S., Tharmaphornpilas, P., Guharat, S., Thongkamsamut, S. and Aresagig, S.,
- 2-Ahmad, S.N., Shah, S. and Ahmad, F.M. (2005): Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. J. Postgraduate Medicine. 51:195-200.
- 3-Angela, P. B., Eide, D. C., Emilson, D. S., Marcos, V. S. and Rui, V. A. (1998): Macroscopic Agglutination Test for Rapid Diagnosis of Human Leptospirosis. J. Clinical Microbiology. 36:3138-3142.
- 4-Chimsumang, S., Chettanadee, S., Jitrathai, S. and Wongchotigul, V. (2005): Indirect immunoperoxidase test for the diagnosis of leptospirosis. Southeast. Asian. J. Tropical. Medicine. Public. Health. 36: 296-301.
- 5-Haunz, E. A. and Cardy, J. D. Canicola Fever: Report of Nine Case in One Family. Arch. Inter. Med. No 89. 978-993.
- 6-Kemapunmanus, M., Sretrirutchai, S., Khuntikij, P., Pradutkanchana. And Pradutkanchana, J. (2004): A Prospective Evaluation of four Immunodiagnostic Assays for Human

- Liangphongphanthu, J., Junthima, S. K., Sokampang, A. and Ashford, D. A. (1999): Leptospirosis: Skin Wounds and Control Strategies, Thailand. *Emerg Infect Disease*. <http://www.cdc.gov/ncidid/EID/vol8no12/02-0180.htm>.
- 12-Sukone, P., Jintana, P., Walailak, K. and Pisuth, S.(2000): An Outbreak of Leptospirosis after Severe Flood in Hat Yai in 2000. *J. Infect.Dis. Antimicrob.Agents*. 19:9-13.
- 13-Walter, E. B., Alexander, A. D., Fahri, H. and Evans, L. B.(1960): Rice-Field Leptospirosis in Turkey. A Serologic Survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg*.9: 229-239.
- 14-Yuzuru, K. (2001): Clinical Observation and Treatment of Leptospirosis. *J. Infect Chemother*. 7:59-68.
- 15-Zamora, J., Riedemann, S., Montecinos, M.I. and Cabezas, X.(1990): Serological survey of human leptospirosis in a high risk population in Chile. *Rev. Med. Chil*. 118:247-52.

## The Survey of Seroprevalence of Leptospirosis in Mazandaran Province of Iran Using Microscopic Agglutination Test and Indirect Immunofluorescence Assay

Faragi H.<sup>1</sup>, Assmar M.<sup>2</sup>, Ebrahimipour Gh. H.<sup>1</sup>, Hashemi Chelavi S. A.<sup>3</sup>, Esfandiari B.<sup>3</sup>, Ziapour S. P.<sup>3</sup>, Amirbozorgi G.<sup>3</sup>, Amini B.<sup>3</sup>, Abdollahpour R.<sup>4</sup>, and Sattari Tabrizi S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biological Sciences Shahid Beheshti University,

<sup>2</sup>Dept. Parasitology, Pasteur Institute, Tehran, I.R. of IRAN

<sup>3</sup>Amol Branch, Pasteur Institute, Tehran, I.R. of IRAN

<sup>4</sup>Leptospira Research Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, I.R. of IRAN

### Abstract

Leptospirosis is a worldwide zoonotic disease with a much greater incidence in tropical and temperate regions. It has now been identified as one of the emerging infectious diseases. Since, the incidence of Leptospirosis is significantly high in temperate regions among rice field workers and livestock animals at Mazandaran province, it is necessary to evaluate condition of Leptospirosis that will help to recognize the most prevalent for vaccine development. In this survey, 127 serum samples of suspected human were collected from different parts of Mazandaran during eight months (during november 2006 to july 2007) and were tested by indirect immunofluorescence assay (IFA) in Amol Branch, Institute Pasteur of Iran. To recognize common pathogenic serotypes, collected samples were tested using Microscopic agglutination test (MAT) in *Leptospira* Research Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. Prevalence rate of Leptospirosis in Mazandaran province was 58.26% using IFA and MAT. In this survey, 74 samples were positive which 82.43% of them were belonged to male and 17.52% to female. Rice field workers showed the most frequent occurrence of infection, so among positive cases 66.22% were to the rice field workers and showed significant difference with other occupations ( $P=0.007$ ). Among 107 samples that were collected from males and 20 from females, 57% and 65% samples were positive, respectively. There was no significant difference between gender and Leptospirosis ( $P>0.05$ ). Living place (urban or rural) and contact with animals did show no significant difference with Leptospirosis. The most positive cases were found in age range of 40-50 years (25.67%). The most prevalent serotypes which were recognized in Mazandaran province using MAT, included, *Ballum* (16.77%), *Sejroe* (14.29%), *Tarassovi* (13.64%), *Australis* (11.69%), *Pyrogenes* (7.79%), *Javanica* (6.5%), *Icterohaemorrhagiae* (6.5%). Using a MAT titer of  $\geq 1:100$  as the gold standard, The sensitivity of IFA for the detection of Leptospirosis was 38.8%, the specificity was 88.33%, the positive predictive value was 78.78%, and the negative predictive value was 56.38%. It seems that Leptospirosis is widespread in Mazandaran province and the authorities should pursue prevention and control measures of this multifaceted disease with more enthusiasm to prevent spread of the disease. Demographic analysis of the results indicates that leptospirosis is typically an occupational disease in the region.

**Keywords:** Leptospirosis, Mazandaran province, Indirect immunofluorescence, Microscopic agglutination, Rice field workers