Archive of SID
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / پاییز ۱۳۸۸ / دوره ۱۱ / شماره ۳ (پی در پی ۳۱) / صفحات ۵۳ تا ۵۹

تحقیقی

شناسایی و سروتایپینگ لپتوسپراهای بومی ناحیه شرق منطقه جلگه‌ای استان گیلان

دکتر حمیدرضا هنرمند*[۱]، دکتر فریبرز منصور قناعی[۲]، دکتر آبتین حیدرزاده[۳]، دکتر مهدی آسمار[۴]

۱- استادیار گروه میکروب‌شناسی ، محقق مرکز تحقیقات گوارش و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی گیلان. ۲- استاد گروه داخلی ، محقق مرکز تحقیقات گوارش و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی گیلان. ۳- استادیار گروه پزشکی اجتماعی ، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان. ۴- استاد گروه انگل‌شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان.

چکیده

زمینه و هدف : *لپتوسپیروز یک بیماری مشترک انسان - حیوان شایع در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است و در استان گیلان آندمیک می‌باشد. معمولاً در هر منطقه آندمیک، تعداد اندکی از سروتایپ‌ها شایع هستند و شناسایی آنها به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی کمک می‌کند. این مطالعه به منظور جداسازی لپتوسپیراها از آب شالیزارها، کانال و رودخانه‌های ناحیه شرق منطقه جلگه‌ای استان گیلان و به منظور شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌های بومی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی مقطعی نمونه‌برداری از آب‌های سطحی شهرستان‌های استان گیلان در فاصله زمانی خرداد تا پایان شهریور سال ۱۳۸۵ انجام شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر از آب فیلتر شده هر نمونه در محیط کشت مایع EMJH حاوی ۵-فلوروراوسیل تلقیح شد 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 آنتی‌سرم‌های ضدسویه‌های استاندارد شناسایی شدند.*

یافته‌ها : *در مجموع ۳۲۰ نمونه بررسی شد. ۴۷ نمونه مثبت و ۲۷۳ نمونه منفی شدند. هویت گونه‌ای و زیرگونه‌ای ایزوله‌های مشخص شده به ترتیب شامل گونه ساپروفیت بی‌فلکسا شامل سروگروپ‌های آندامانا و سمارانگا و گونه‌های بیماری‌زا شامل اینتروگانس، کیرشنری و بورگ پترسنی بودند که سروگروپ‌های ایکتروهموراژی، پومونا، سجروئه، هارجو، کانیکولا و گریپو تیفوزا را شامل می‌شدند. در این مطالعه سروگروپ‌های غیربیماری‌زا در همه انواع آب‌های سطحی مطالعه شده؛ یافت شدند. ولی سروگروپ‌های بیماری‌زا تنها از شالیزارها جدا شدند.*

نتیجه‌گیری: *یافته‌های این مطالعه با شیوع بالای لپتوسپیروز در نواحی روستایی و در فصل شالیکاری در این منطقه مطابقت داشت. رفت‌وآمد زیاد جوندگان و حیوانات اهلی در شالیزارها و نیز بالا رفتن دما و اسیدیته آب شالیزارها می‌تواند؛ سبب حضور گونه‌ها و زیرگونه‌های بیماری‌زا در شالیزارها شود.*

کلید واژه‌ها: *لپتوسپرا ، شالیزار ، آب ، گیلان*

---

* نویسنده مسؤول : دکتر حمیدرضا هنرمند ، پست الکترونیکی : honarmand_36@yahoo.com

نشانی : رشت ، بیمارستان رازی ، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد ، تلفن : ۵۵۳۵۱۱۶ (۰۱۳۱) ، نمابر : ۵۵۳۴۹۵۱

وصول مقاله : ۸۷/۴/۱۶، اصلاح نهایی : ۸۷/۹/۱۲، پذیرش مقاله : ۸۷/۱۲/۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لپتوسپیروز یک بیماری مشترک انسان - حیوان شایع در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است که توسط گونه‌های بیماری‌زای لپتوسپیراها به‌وجود می‌آید (۱). این باکتری‌ها طیف میزبانی وسیعی دارند (۲). تعداد زیادی از پستانداران اهلی و وحشی و جوندگان 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 دوره‌ای باکتری را از ادرار خود ترشح می‌کنند (۲و۳). باکتری‌های دفع شده از حیوانات حامل، اگر در آب و یا خاک مرطوب ریخته شوند در PH و دمای مناسب می‌توانند؛ به مدت طولانی زنده بمانند و در همین دوره می‌توانند؛ از طریق زخم‌های جلدی به بدن میزبان دیگر (حیوان یا انسان) وارد شده و بیماری را به‌وجود آورند (۲و۳). آب‌های سطحی از قبیل رودخانه، نهر، مرداب و دریاچه‌های آب‌شیرین، 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 به‌ویژه گاو، شرایط مناسبی برای بروز این بیماری دارد (۴و۵). لپتوسپیروز در اغلب روستاهای ناحیه جلگه‌ای استان گیلان شیوع دارد و همه ساله موارد بسیار زیادی از بیماری از اواسط بهار تا اواخر تابستان به‌ویژه در شالیکاران بروز می‌کند. اغلب مبتلایان، سابقه کار در مزرعه برنج و یا تماس با آب‌های سطحی راکد را ذکر می‌کنند (۷-۴). لپتوسپیراها به ۷ گونه بیماری‌زا و ۳ گونه ساپروفیت (حدود ۴۰ سروگروپ شامل ۲۵۰ سروتایپ) دسته‌بندی شده‌اند (۳-۱). معمولاً در هر منطقه آندمیک، تعداد اندکی از سروتایپ‌های بیماری‌زا شایع هستند و شناسایی آنها به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی بیماری کمک می‌کند و شناسایی مخازن بیماری، گام بزرگی در کنترل کردن آن است (۳و۸). این مطالعه به منظور جداسازی لپتوسپیراها از آب شالیزارها، کانال و رودخانه‌های ناحیه شرق منطقه جلگه‌ای استان گیلان که موارد متعدد بروز سالیانه لپتوسپیروز انسانی را دارد و به منظور شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌های بومی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی مقطعی نمونه‌برداری از آب‌های سطحی (رودخانه، شالیزار، کانال آبیاری) ناحیه شرق منطقه

جدول ۱ : فهرست آنتی‌سرم‌های استفاده شده برای سروتایپینگ ایزوله‌ها

SPECIES	SEROGROUP	SEROVAR	STRAIN
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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ : تعداد موارد نمونه‌ها براساس مکان و منبع آنها

منابع / شهرستان	شالیزار: آب	شالیزار: خاک	کانال آبیاری	رودخانه	جمع
لاهیجان	۱۸	۱	۷	۵	۴۰
لنگرود	۲۰	۵	۱۰	۵	۴۰
رودبنه	۱۷	۹	۹	۵	۴۰
آستانه	۱۶	۸	۱۰	۶	۴۰
رودسر	۱۸	۶	۱۳	۳	۴۰
کیاشهر	۱۰	۱۰	۱۲	۸	۴۰
لشت نشا	۱۲	۱۲	۱۲	۴	۴۰
چابکسر	۱۱	۱۶	۵	۸	۴۰
جمع	۱۲۲	۷۶	۷۸	۴۴	۳۲۰

جدول ۳ : تعداد و درصد موارد ایزوله‌ها بر اساس منابع نمونه‌ها

منبع	تعداد نمونه	موارد مثبت از کل موارد مثبت تعداد (درصد)	موارد مثبت بیماری‌زا از کل موارد مثبت تعداد (درصد)	موارد مثبت ساپروفیت از کل موارد مثبت تعداد (درصد)
شالیزار	۱۹۸	۲۹ (۶۱/۷)	۲۱ (۴۴/۷)	۸ (۱۷)
کانال آبیاری	۷۸	۱۱ (۲۳/۴)	۰ (۰)	۱۱ (۲۳/۴)
رودخانه	۴۴	۷ (۱۴/۹)	۰ (۰)	۷ (۱۴/۹)

جلگه‌ای استان گیلان شامل شهرستان‌های چابکسر، رودسر، لنگرود، لاهیجان، رودبنه، آستانه، کیاشهر و لشت‌نشا در فاصله زمانی خرداد تا پایان شهریور سال ۱۳۸۵انجام شد. مقدار ۲میلی‌لیتر از آب هر نمونه، پس از فیلتراسیون با فیلتر سرنگی ۲۲ نانومتری، به لوله فالکون ۱۵ml حاوی ۱۲ml محیط کشت مایع EMJH که به آن آنتی‌بیوتیک ۵-فلوروآروسیل به نسبت ۲۰۰ µg/ml برای ممانعت از رشد سایر باکتری‌ها افزوده شده بود؛ وارد شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲هفته در انکوباتور قرار داده شد و هر ۲ هفته یک بار با میکروسکوپ زمینه تاریک مورد مشاهده قرار گرفت. سپس موارد منفی حذف شدند و موارد مثبت به یک لوله فالکون دیگر حاوی ۱۲ml محیط کشت EMJH مایع فاقد آنتی‌بیوتیک و غنی شده با سرم جنین گاو (با غلظت نهایی ۵درصد) انتقال داده شدند و در شیکر انکوباتور قرار داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند تا به رشد پویا و پرجمعیت برسند. سپس با انجام تست رشد و عدم رشد در حضور ۸-آزاگوانین، لپتوسپیراهای بیماری‌زا با انواع ساپروفیت تفکیک داده شدند. وجود این ماده به مقدار ۲۲۵g/ml در محیط کشت، رشد انواع بیماری‌زا را متوقف می‌کند (۱۱-۹). برای انجام سروتایپینگ از ۳۰ نوع آنتی‌سرم ضد ۳۰ سروتایپ استانداردکه هر یک نماینده شاخص یک سروگروپ هستند (جدول۱) استفاده شد. ایزوله‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا به‌طور جداگانه با آنتی‌سرم‌های مربوطه مواجهه داده شدند.سرو تایپینگ به روش میکروآگلوتیناسیون استاندارد انجام شد (۱۱و۱۲). مقدار ۵۰µl از کشت جوان و پر جمعیت هر ایزوله با مقدار مساوی از آنتی‌سرم‌ها در سه ردیف از یک پلیت الیزا مخلوط شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت انکوبه شدند و پس از ۵ دقیقه شیک کردن، نتایج با استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک خوانده شد. مقدار یک لوپ (4µl) از هر حفره به روی لام انتقال داده شد و به دقت زیر میکروسکوپ مشاهده گردید. آگلوتیناسیون بیش از ۵۰ درصد به عنوان موارد مثبت در نظر گرفته شدند (۱۱) و هویت گونه‌ای و زیرگونه‌ای آنتی‌سرم مربوطه به عنوان هویت آن ایزوله تلقی گردید.

یافته‌ها

در مجموع تعداد ۳۲۰ نمونه آب از شالیزارها، کانال‌ها و رودخانه‌های حوزه‌های ۸ شهرستان منطقه شرق ناحیه جلگه‌ای استان گیلان ظرف ۴ ماه جمع‌آوری گردید (جدول۲). تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده در ماه‌های خرداد، تیر، مرداد و شهریور به ترتیب ۵۰، ۱۳۰، ۹۰ و ۵۰ مورد بود. از مجموع تعداد ۳۲۰ نمونه ۱۹۸ نمونه از آب و خاک شالیزارها، ۴۴ نمونه از رودخانه و ۷۸ نمونه از کانال‌های آبیاری شالیزارها

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴ : فهرست گونه‌ها و زیرگونه‌های جدا شده با احتساب تعداد و درصد آنها از کل ایزوله‌ها

گونه	تعداد (درصد)	سرو گروپ	تعداد (درصد)	منبع (تعداد ایزوله‌ها)
بیماری‌زا	اینتروگانس ۹ (۱۹/۱)	ایکتروهموراژی	۶ (۱۲/۸)	شالیزار
		پومونا	۲ (۴/۲)	شالیزار
		کانیکولا	۱ (۲/۱)	شالیزار،
	بورگ پترسنی ۵ (۱۰/۵)	سجروئه	۲ (۴/۲)	شالیزار
		هارجو بوویس	۳ (۶/۴)	شالیزار
	کیرشنری ۷ (۱۷)	گریپوتیفوزا	۷ (۱۴/۹)	شالیزار
غیربیماری‌زا	بی فلکسا ۲۶ (۵۵/۳)	آنداماتا	۲۲ (۴۶/۸)	رودخانه (۶)، کانال (۸)، شالیزار (۸)
		سمارانگا	۴ (۸/۶)	رودخانه (۱) ، کانال (۳)

اخذ گردیدند. دامنه دمای نمونه آب‌ها ۲۹-۱۷ درجه سانتی گراد (با میانگین ۲۲/۷ درجه سانتی‌گراد) و دامنه PH نمونه‌ها ۸-۶/۷ (با میانگین ۷/۴) بود. در غربالگری اولیه در مجموع تعداد ۴۷ نمونه (۱۴/۷ درصد) مثبت و ۲۷۳ نمونه (۸۵/۳ درصد) منفی شدند. تعداد و درصد موارد مثبت نمونه‌های مربوط به شالیزار، کانال آبرسانی و رودخانه در جدول ۳ نشان داده شده است. ۶۱/۷ درصد از کل موارد مثبت از شالیزار، ۲۳/۴ درصد از کانال و ۱۴/۹ درصد از رودخانه‌ها جدا شدند. ۸۳درصد از ایزوله‌ها از آب و ۱۷ درصد آنها از خاک جدا شدند. بیشترین موارد مثبت به ترتیب از شهرهای رودبنه (۱۱مورد با ۲۳/۴ درصد)، لاهیجان (۹ مورد با ۱۹/۲ درصد)، لشت‌نشا و لنگرود (هرکدام ۶ مورد با ۱۲/۸ درصد)، آستانه و چابکسر (هرکدام ۵ مورد با ۱۰/۶درصد)، کیاشهر (۳ مورد با ۶/۴ درصد) و رودسر (۲ مورد با ۴/۲درصد) جدا شدند. ۴۴/۷ درصد از موارد جدا شده (۲۱مورد) بیماری‌زا و ۵۵/۳ درصد از آنها (۲۶ مورد) غیربیماری‌زا بودند. بیشترین موارد بیماری‌زا از لاهیجان و رودبنه و بیشترین موارد غیربیماری‌زا از رودبنه جدا شدند. در مجموع ۴ گونه جدا گردید که ۳ گونه از آنها بیماری‌زا و یک گونه نیز ساپروفیت بود.۲۶ مورد (۵۵/۴درصد) از ایزوله‌ها به گونه بی‌فلکسا، ۱۲ مورد (۲۵/۵درصد) به گونه اینتروگانس، ۸ مورد (۱۷ درصد) به گونه کیرشنری و یک مورد نیز به گونه بورگ پترسنی متعلق بود. تعداد و درصد سروتایپ‌های جدا شده در جدول ۴ نشان داده شده است.

بحث

در این مطالعه توزیع گونه‌ای و زیرگونه‌ای ایزوله‌ها به ترتیب شامل گونه ساپروفیت بی‌فلکسا (سروگروپ‌های آنداماتا و سمارانگا) و گونه‌های بیماری‌زا شامل اینتروگانس، کیرشنری و بورگ پترسنی (سروگروپ‌های ایکتروهموراژی، پومونا، سجروئه، هارجو، کانیکولا و گریپو تیفوزا) بودند.

متعدد بودن گونه‌ها و زیرگونه‌ها در جنس لپتوسپیرا، لزوم دسته‌بندی و تفکیک آنها را بیشتر نموده است. همواره لزوم دستیابی به یک روش ساده و مطمئن برای تایپینگ و متمایز نمودن زیرگونه‌های پر تعداد این باکتری حس می‌شد. استفاده از آنتی‌سرم‌های استاندارد و روش MAT رایج‌ترین روش سروتایپینگ است که هنوزدر آزمایشگاه‌های مرجع لپتوسپیروز انجام می‌شود (۳و۱۱) و برای اجرای آن تهیه یک کشت خالص و جوان و پرجمعیت ضروری است (۱۳و۱۴).

تاکنون چندین مطالعه از نوع جداسازی لپتوسپیراها از آب و خاک در مناطق مختلف جهان به ویژه در نواحی آندمیک بیماری صورت گرفته است (۱۹-۱۵). Diesch توانست لپتوسپیراها از آب منابعی که برای تفریحات و ورزش‌های آبی استفاده می‌شوند را جدا نماید (۲۰). اکنون لپتوسپیروز به عنوان یک بیماری شغلی پذیرفته شده است (۳-۱و۲۱) و در مشاغلی که با حیوانات و آب‌های سطحی سروکار دارند؛ بروز بیشتری دارد. Mumford شیوع لپتوسپیروز را در ورزش‌های آبی مطالعه نمود (۲۲) و Cacciapuuoti یک اپیدمی لپتوسپیروز با منشا آب را توصیف کرد (۲۳). Smith و Karaseva تاثیر دما و سایر عوامل را در بقای لپتوسپیراها در آب مطالعه نمودند (۲۴و۲۵).

در این مطالعه ما از روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی ساده (MAT) با استفاده از ۳۰نوع آنتی سرم ضد ۳۰ سروتایپ استاندارد که هر کدام از آنها نماینده شاخص یک سروگروپ هستند (۱۱)؛ برای تعیین هویت گونه‌ای و سروگروپی

www.SID.ir

Archive of SID

سویه‌های جدا شده از آب‌های سطحی استفاده نمودیم. نتایج حاصله نشان دادند که گونه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در آب‌های سطحی منطقه موجودند. با توجه به این نکته که آب‌های سطحی مخزن گونه‌های غیربیماری‌زا است؛ جداشدن آنها دور از انتظار نبود و نیز حضور آنها در شالیزارها نیز که به‌طور عمده با آب‌های سطحی منطقه به‌ویژه از رودخانه‌ها و کانال‌های آب‌رسانی آبیاری می‌شوند که غالباً مخزن لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند؛ قابل توجیه می‌باشد. در این مطالعه تنها یک گونه از لپتوسپیراهای ساپروفیت (بی‌فلکسا) حضور غالب نشان داد و از این گونه، تنها زیرگونه‌های آندامانا و سمارانگا شناسایی شدند. این سروگروپ‌ها علاوه بر آب‌های سطحی در شالیزارها نیز یافت شدند. یافته دیگر این مطالعه، وجود گونه‌های بیماری‌زا است که به‌طور عمده از شالیزارها جدا شدند و شامل گونه‌های اینتروگانس، بورگ پترسنی و کیرشنری بودند. در گونه اینترگانس، سروگروپ‌های ایکتروهموراژی، پومونا و کانیکولا در گونه بورگ پترسنی سروگروپ سجروئه و هارجو بوویس و در گونه کیرشنری سروگروپ گریپو تیفوزا شناسایی گردیدند. اصولاً جوندگان و سایر حیوانات وحشی و نیز حیوانات اهلی و حتی دست‌آموز می‌توانند؛ مخزن گونه‌های بیماری‌زا باشند (۳). وفور جوندگان و برخی از حیوانات وحشی به‌ویژه شغال که در مجاورت محل سکونت انسان به خصوص در نواحی روستایی منطقه جلگه‌ای استان گیلان به‌سر می‌برند و به راحتی در شالیزارها رفت و آمد می‌کنند و نیز وجود حیوانات اهلی از قبیل گاو، سگ، اسب و گربه که بالقوه می‌توانند بیمار و یا حامل باشند و در مناطق روستایی بسیار فراوان هستند؛ توجیه کننده حضور گونه و زیرگونه‌های بیماری‌زا در شالیزارها است. اغلب روستاییان به‌طور 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 (۴و۵). به‌طور معمول سگ مخزن سروگروپ کانیکولا، اسب مخزن سروگروپ پومونا، موش مخزن سروگروپ ایکترو هموراژی، گاو مخزن سروگروپ‌های گریپو تیفوزا و هارجو، و گراز مخزن سروگروپ پومونا و بالوم هستند (۳-۱). در این مطالعه گونه‌ها و زیرگونه‌های بیماری‌زا تنها 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 به‌طور عمده در کارگران مزارع برنج (۷-۴) تناسب دارد. مطالعه Ganoza روی نمونه‌های آب و خاک نواحی روستایی و شهری منطقه آمازونی کشور پرو که در آنجا لپتوسپیروز انسانی شایع است؛ نشان داد که ۷۵درصد از ایزوله‌های نواحی شهری به گونه اینتروگانس و ۷۸درصد از ایزوله‌های نواحی روتایی نیز بیماری‌زا بوده و به همان گونه و چندگونه بیماری‌زای دیگر متعلق هستند (۲۶). این مطالعه با روش مولکولی PCR و تعیین توالی ژن srDNA۱۶ انجام شده بود. Yang با روش مشابه مطالعه ما (فیلتراسیون، کشت و سروتایپینگ) تعداد زیادی نمونه آب و خاک یک استان جنوب غربی چین را برای جداسازی و شناسایی تیپوسپیراهای بومی آزمود و زیرگونه‌های ایکتروهموراژی، پیروژنز، کانیکولا، گریپوتیفوزا، سجروئه و اوسترالیس را که بیماری‌زا هستند و زیرگونه پاتوک از گونه بی‌فلکسا را غالب یافت (۲۷). Regalado Segui نیز با همان روش کشت، ایزوله کردن و سروتایپینگ، لپتوسپیراها را از تعدادی نمونه خون، آب و خاک جدا کرد و دریافت که تمام ایزوله‌های خون به گونه اینتروگانس و ایزوله‌های آب و خاک به‌طور عمده به گونه بی‌فلکسا متعلق بودند (۲۸). Aviat تعدادی کلیه متعلق به جوندگان به دام افتاده یک منطقه از کشور فرانسه و تعداد ۳۸ نمونه از آب‌های محیطی همان ناحیه را با روش مشابه (کشت و سروتایپینگ) با روش AP-PCR بررسی نمود و سرم همان جوندگان را با روش MAT آزمود و دریافت که ۴۴درصد از جوندگان سرم مثبت بودند و ۵ نمونه از آب (۱۳درصد) نیز با همان زیرگونه‌ها آلودگی داشته است (۲۹). در مطالعه ما نیز آلودگی آب راکد مزارع بیشتر به ادرار جوندگان احتمال داده می‌شد. برای اطمینان از این نکته انجام مطالعات جداسازی و شناسایی باکتری‌ها از حیوانات منطقه ضروری است. Transuphasiri تعداد ۱۰۰ نمونه از آب‌های محیطی یک منطقه شمال شرقی تایلند را بدون انجام کشت و شناسایی و با

www.SID.ir

Archive of SID

روش مولکولی duplex–PCR و هیبریدیزاسیون با استفاده از پروب و پرایمر Lip32DNA prob و تنها به منظور یافتن گونه‌ها و زیرگونه‌های بیماری‌زا آزمودند. در این مطالعه ۲۳ نمونه آب (۲۳درصد) آلودگی لپتوسپیرایی به‌طور عمده با زیرگونه‌های متعلق به گونه اینتروگانس داشتند (۳۰). این روش در مقایسه با روش مطالعه ما سرعت بالایی دارد؛ ولی با سیستم پروب-پرایمر فوق تنها زیرگونه‌های بیماری‌زا قابل شناسایی هستند و در ضمن سویه جدا نمی‌شود و امکان فراهم کردن بانک سویه‌های بومی وجود ندارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سروگروپ‌های غیربیماری‌زا در همه انواع آب‌های سطحی؛ ولی سروگروپ‌های بیماری‌زا به‌طور عمده در شالیزارها وجود دارند. چون رودخانه و کانال‌ها منشاء آبیاری مزارع هستند؛ حضور گونه‌ها و زیرگونه‌های بیماری‌زا را می‌توان به راکد ماندن آب در شالیزار و آلوده شدن آن با ادرار جوندگان و حیوانات اهلی منطقه در شالیزارها که رفت و آمد زیاد دارند و نیز به بالا رفتن دما و اسیدیته آب راکد شده در مزارع که بقا و دوام آنها را مساعدتر و طولانی‌تر می‌کند؛ نسبت داد. شیوع داشتن بیماری لپتوسپیروز در نواحی روستایی منطقه در فصل شالیکاری تاییدی بر یافته‌های این مطالعه است.

تشکر و قدردانی

منابع مالی این مطالعه توسط مرکز تحقیقاتی بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، در راستای اجرای طرح تحقیقاتی مصوب آن مرکز تحقیقاتی به شماره ش۱۳۰ مورخ ۱۳۸۶/۱۲/۲۲ تامین شد.

بدین‌وسیله از آقای محمود خوش‌سرور کارشناس آزمایشگاه میکروب‌شناسی مرکز تحقیقاتی بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی گیلان به خاطر کمک‌های بی‌دریغ سپاسگزاری می‌گردد.

References

1) Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):296-326.

2) Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of Leptospira spp. In humans. Microbes Infect. 2000 Aug;2(10):1265-1276.

3) Fains. Guidance for the Diagnosis, Surveillance and Control of Human Lepeospirosis. WHO offset publication Geneva. World Health Organization. 2003; pp:17-20.

4) Mansor Ghanaei F, Honarmand H. [Leptospirosis and prevalence of the disease in guilan province, iran]. 1st. Rasht: Guilan University of Medical Sciences Research office publishing center. 2005; pp: 89-99 [Persian]

5) Honarmand H, Mansour Ghanaei F, Eshraghi S, Khoramizadeh MR, Abollahpour GR. [Epidemiology of leptospirosis in Guilan province in 2003] J Gorgan Uni Med Sci. 2005;7(2):52-56. [Article in Persian]

6) Tahbaz A, Sarshad A, Vandyousefi J, Safavi S, Dabaghian K. [Perliminary study of leptospirosis in guilan] Journal of Infectious and Tropical diseases of Iran. 1995;113:109-110. [Article in Persian]

7) Resaei A, Delkhosh J. [Statistical report of leptospirosis incidence in Guilan since 1982 to 2000] Abstract book of leptospirosis seminar in Rasht. 2000; pp: 30-35. [Persian]

8) Johnson RC, Faine S. Leptospira. In: Keieg NR, Nolt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd. Baltimore USA: Williams &Wilkins. 1984; pp: 62-67.

9) Braun JL, McCulloch WF. Use of 8-azaguanine to differentiate leptospires isolated from Iowa surface waters. Appl Microbiol. 1968 Jan;16(1):174-175.

10) Johnson RC, Rogers PD. Ifferentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-Azaguanine. J Bacteriol. 1964 Dec; 88:1618-1623.

11) Hartskeel RA, Smits H, Korver H, Goris M, Terpstra WJ. Instruction booklet of International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. 1st. KIT Royal Tropical Institute Publication. 2004;pp: 38-42.

12) Dikken H, Kmety E. Serological typing methods of leptospires. In: Bergan T, Norris JR. Methods in Microbiology. vol II. London, UK. Academic Press. 1978; pp: 259-307.

13) Baseman JB, Henneberry RC, Cox CD. Isolation and growth of Leptospira on artificial media. J Bacteriol. 1966 Mar;91(3):1374-1375.

14) Johnson RC, Rogers P. Fluorouracil as a selective agent for growth of leptospirae. J Bacteriol. 1964 Feb;87:422-426.

15) Henry RA, Johnson RC. Distribution of the genus Leptospira in soil and water Appl Environ Microbiol. 1978 Mar;35(3):492-499.

16) Alexander AD, Evans LB, Baker MF, Baker HJ, Ellison D, Marriapan M. Pathogenic leptospiras isolated from Malaysian surface waters Appl Microbiol. 1975 Jan;29(1):30-33.

17) Alexander AD, Wetmore PW, Evans LB, Jeffries H, Gleiser CA. Classification of leptospiral isolates from Malaya, Thailand and North Borneo Am J Trop Med Hyg. 1955 May;4(3):492-506.

18) Baker MF, Baker HJ. Pathogenic Leptospira in Malaysian surface waters. I. A method of survey for Leptospira in natural waters and soilsAm J Trop Med Hyg. 1970 May;19(3):485-492.

www.SID.ir

Archive of SID

19) Okazaki W, Ringen LM. Some effects of various environmental conditions on the survival of Leptospira pomona. Am J Vet Res. 1957 Jan;18(66):219-223.

20) Diesch SL, McCulloch WF. Isolation of pathogenic leptospires from waters used for recreation Public Health Rep. 1966 Apr;81(4):299-304.

21) Waitkins SA. Leptospirosis as an occupational disease. Br J Ind Med. 1986 Nov;43(11):721-725.

22) Mumford CJ. Leptospirosis and water sports Br J Hosp Med. 1989 Jun;41(6):519.

23) Cacciapuoti B, Ciceroni L, Maffei C, Di Stanislao F, Strusi P, Calegari L, et al. A waterborne outbreak of leptospirosis. Am J Epidemiol. 1987 Sep;126(3):535-545.

24) Smith CEG, Turner LH. The effect of pH on thr survival of Leptospires in water. Bull WHO. 1961;24(1):35-43.

25) Karaseva EV, Chernukha YG, Piskunova LA. Results of studying the time of survival of pathogenic leptospira under natural conditions Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1973 Mar;17(3):339-345.

26) Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, Segura ER, et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic Leptospira. PLoS Med. 2006 Aug;3(8):e308.

27) Yang W, Pang J, Li C. [An investigation on the distribution of leptospirae interrogans in water and soil in southwest of Yunnan Province] Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 1994 Oct;15(5):289-291. [Article in Chinese]

28) Regalado Seguí JD, López Acosta C, Saltarén A, Atienzar E. [The identification of Leptospira strains of different origins] Rev Cubana Med Trop. 1992;44(1):33-36. [Article in Spanish]

29) Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, et al. Leptospira exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2009 Nov;32(6):463-476.

30) Tansuphasiri U, Thipsuk C, Phulsuksombati D, Chanyasanha C. Duplex PCR-hybridization based detection of pathogenic Leptospira in environmental water samples obtained from endemic areas in northeast region of Thailand Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006 Jul;37(4):729-741.

www.SID.ir