





Molecular diagnosis of dog pathogenic leptospirosis using the polymerase chain reaction method

Shabnam Anari¹ , Shahriyar Mehrabi² 

1. Department of Microbiology and Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. DVSc Graduate of Large Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: This is an overview of the prevalence of *Leptospira* in Khorramabad using PCR technique. Leptospirosis is a common bacterium that is common among humans and has a wide range of domestic and wild species (cows, sheep, goats, horses, pigs, goats, etc.). And humans are involved. The main reservoirs of the disease are rodents and semi-wild animals in the suburbs and villages, including dogs.

Materials and Methods: In order to carry out this study, which was carried out in the period of 2008-2009, 60 blood samples were taken from referred dogs. The samples were kept in the freezer until molecular tests were performed. To perform DNA extraction from the samples, the DNA extraction kit of Fargen company, Taiwan was used.

Results: *16S rRNA* and *LipL32* gene primers were used for molecular tracking of *Leptospira*. Out of a total of 60 blood samples studied, 6 samples (10%) were infected with *Leptospira* bacteria.

Conclusion: Considering that no study has been conducted on leptospirosis in dogs in Khorramabad region, so this study can be an important step towards determining the prevalence of leptospirosis in this region. Health recommendations to vaccinate dogs to prevent disease transmission to humans should be submitted to the regional veterinary department. The special situation of Lorestan province and the irregular entry and exit of livestock and their smuggling to neighboring countries and the lack of quarantine of livestock seem to be necessary to conduct a comprehensive study on the prevalence of *Leptospira* in Lorestan province and especially Khorramabad city. Consider all dimensions.

Keywords: leptospirosis, Khorramabad region, dog, polymerase chain reaction

Received: 04.04.2024

Accept: 25.05.2024

Final Edit: 09.06.2024

Online Publish: 28.06.2024

Corresponding Information: Shabnam Anari, Department of Microbiology and Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Email: shabnamanari76@gmail.com



Cite this article: Anari, Shabnam; Mehrabi, Shahriyar (2024). Molecular diagnosis of dog pathogenic leptospirosis using the polymerase chain reaction method. *Animal health and infectious diseases*. 2(1), 38-46.



تشخیص مولکولی لپتوسپیراهای بیماری زای سگ با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز

شبنم اناری^۱ ID، شهریار مهرابی^۲ ID

۱. گروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۲. دانشجو دکتری تخصصی بیماری های داخلی دام های بزرگ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

زمینه و هدف: این مطالعه به منظور بررسی میزان شیوع لپتوسپیروز در سگ های ولگرد خرم آباد با استفاده از تکنیک PCR انجام شده است. لپتوسپیروز بیماری باکتریایی زئونوز و مشترکی بین انسان و دام، با انتشار جهانی است و طیف گسترده ای از پستانداران اهلی و وحشی، از جمله گاو، گوسفند، بز، سگ، خوک، شتر و غیره و انسان درگیر می کند. مخازن اصلی بیماری چونندگان و حیوانات نیمه وحشی حومه شهرها و روستاها، از جمله سگ است.

مواد و روش ها: برای انجام این مطالعه که در بازه زمانی ۹۸-۹۹ انجام گرفت، تعداد ۶۰ نمونه خون از سگ های ارجاعی گرفته شد. نمونه ها تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در فریزر نگهداری شد. برای انجام استخراج DNA از نمونه ها، از کیت استخراج DNA شرکت فاورژن، تایوان استفاده شد. به منظور ردیابی مولکولی لپتوسپیروز از پرایمرها ژن های *16S rRNA* و *LipL32* استفاده شد.

یافته ها: از مجموع ۶۰ نمونه خون مطالعه شده تعداد ۶ نمونه (۱۰ درصد) آلوده به باکتری لپتوسپیروز بود.

نتیجه گیری: نتیجه گیری؛ با توجه به اینکه تاکنون هیچ مطالعه ای در زمینه لپتوسپیروز در سگ ها در منطقه خرم آباد انجام نشده است؛ این مطالعه می تواند گام مهمی در جهت تعیین میزان شیوع لپتوسپیروز در این منطقه باشد. توصیه های بهداشتی در جهت واکسیناسیون سگ ها برای پیشگیری از انتقال بیماری به انسان به اداره دام پزشکی منطقه ارائه شود. موقعیت ویژه استان لرستان و ورود و خروج نامنظم دام و قاچاق آن ها به کشورهای هم جوار و قرنطینه نکردن دام ها ضروری به نظر می رسد تا مطالعه جامعی در زمینه میزان شیوع لپتوسپیروز در استان لرستان و به خصوص شهرستان خرم آباد با در نظر گرفتن همه ابعاد انجام گیرد.

کلیدواژه ها: لپتوسپیروز، منطقه خرم آباد، سگ، واکنش زنجیره ای پلیمرز

دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵ ویرایش نهایی: ۱۴۰۳/۰۳/۲۰ انتشار آنلاین: ۱۴۰۳/۰۴/۰۸

اطلاعات نویسنده مسئول: شبنم حیدری، گروه میکروبیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد،

ایران. Email: shabnamanari76@gmail.com

استناد: اناری، شبنم؛ مهرابی، شهریار (۱۴۰۳). تشخیص مولکولی لپتوسپیراهای بیماری زای سگ با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز. بهداشت و بیماری های عفونی دام، ۲ (۱)، ۳۸-۴۶.



مقدمه

برای تشخیص لپتوسپیرواز روش‌های کشت و جداسازی عوامل، روش‌های سرولوژیک، الایزا، ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی (Immunofluorescent Antibody Test) و آگلوتیناسیون میکروسکوپی (Microscopic Agglutination Test) و نیز روش‌های مولکولی برپایه PCR استفاده می‌کنند. البته تشخیص سرولوژیکی لپتوسپیروز معمولاً با استفاده از MAT انجام می‌شود. گفتنی است که استفاده از روش‌های سرولوژیک منوط به گذشت حداقل ۱ تا ۲ هفته و ایجاد پاسخ همورال در بیمار است و در مورد کشت هم این زمان به چند هفته افزایش می‌یابد (Selvarajah et al., 2021). هدف اختصاصی این مطالعه ردیابی مولکولی لپتوسپیروهای موجود در سگ‌های ولگرد منطقه خرم‌آباد بود.

جمع‌آوری نمونه‌های خون

این مطالعه به صورت توصیفی در سال ۹۸-۹۹ انجام شد. در مرحله نمونه‌گیری، نمونه‌ها از سگ‌های ولگرد جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله در کنار یخ به آزمایشگاه باکتری‌شناسی منتقل شد. با توجه به مشترک بودن بیماری مراحل انجام آزمایش با رعایت شرایط استریل و در زیر هود لامینار فلو و با پوشیدن کلاه، دستکش، عینک و گان یک‌بارمصرف انجام شد.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های سرم با استفاده از کیت استخراج DNA (فاورژن، تایوان) طبق دستورکار سازنده کیت انجام شد. در مرحله اول ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه خون به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. حجم رسوب نمونه‌های خون که کمتر از ۲۰۰ میکرولیتر بود با PBS به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس ۲۰ میکرو لیتر پروتیناز K با حجم یک سی‌سی (Smobio, Taiwan) به نمونه اضافه شد. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده FABG به میکروتیوب اضافه و ورتکس شد. سپس نمونه در بن‌ماری با دمای 60°C به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. پس از یک سانتریفیوژ کوتاه، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق به نمونه اضافه شد. بعد از ورتکس کوتاه، کل حجم نمونه به لوله‌های فیلتردار منتقل شد. نمونه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع زیری جمع‌آوری شده و در لوله زیرستون تخلیه شد و سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر شست‌وشو اضافه شد. سپس نمونه به مدت ۳۰ ثانیه با ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایعی که از فیلتر عبور کرده بود، دور ریخته شد. در مرحله بعدی ۷۵۰ میکرولیتر بافر شست‌وشو، مرحله دوم

لپتوسپیروز یکی از بیماری‌های عفونی اسپروکتی و قابل‌انتقال بین حیوان و انسان بوده که به وسیله گونه‌های بیماری‌زای لپتوسپیرواز ایجاد می‌شود. لپتوسپیروز در تمام نقاط دنیا، به جز قطب شمال و جنوب گسترش دارد و در نواحی گرمسیری و مناطق با بارندگی زیاد و مناطقی که سطح آب‌های زیرزمینی بالا است، آندمیک است. این بیماری بیشتر در برنج‌کاران، کارگران مزارع نیشکر، کشاورزان، کارگران فاضلاب‌ها و معادن، دام‌پزشکان، دامداران، کارگران مزارع نیشکر، کشاورزان، کارگران کشتارگاه‌ها و ماهیگیران بروز می‌کند. همچنین افرادی که در حین تفریح (اسکی روی آب، قایق‌سواری و شنا) با آب آلوده به ادرار حیوانات مبتلا تماس دارند در معرض ابتلای به بیماری هستند (۱).

این بیماری در مناطق مختلف با عناوین ویل، بیماری نیشکرچینان، بیماری کارگران مزارع برنج، بیماری علف‌چینان، بیماری لوبیاچینان، بیماری ماهیگیران، یرقان عفونی، یرقان هموراژیک، تب هفت‌روزه، تب موش، تب کانیکولا، تب مرداب، تب مزرعه و تب درو می‌توان اشاره کرد. مخازن این بیماری شامل تعداد زیادی از حیوانات اهلی و وحشی‌اند؛ گاو، اسب، سگ، گربه، خوک، موش و سایر جوندگان به عنوان مخازن اصلی بیماری بوده و ممکن است بیمار شوند. حیوانات وحشی از قبیل گوزن، سنجاب، روباه، راسو، پستانداران دریایی (شیر آبی) و حتی خزندگان و دوزیستان (قورباغه) نیز ممکن است آلوده به بیماری باشند (۲).

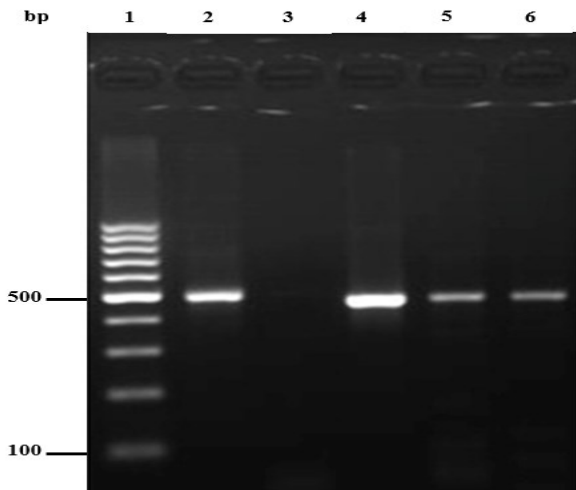
بیماری به اشکال مختلف ظاهر می‌شود، شروع بیماری با یک دوره تب‌دار حاد بوده که ممکن است بسیار شدید و گاهی مرگبار همراه با زردی و نارسایی کلیوی (بیماری ویل)، مننژیت، میوکاردیت، خون‌ریزی، سینه‌پهلو و کولپس قلبی عروقی باشد (۳).

در سال ۱۸۸۶ برای اولین بار آدولف ویل بیماری مشابهی را در چهار نفر مشاهده کرد و بیماری به نام بیماری ویل نام‌گذاری شد، در سال ۱۹۰۷ استیمسون عامل بیماری را به وسیله میکروسکوپ زمینه‌تاریک مشاهده کرد و در سال ۱۹۱۸ دانشمندی به نام اینادا و همکاران عامل بیماری را با استفاده از محیط‌های غذایی غنی‌کننده شناسایی و آن را لپتوسپیرو هموراژیک نام نهادند. شکل دیگر بیماری یعنی Pretibial Fort Bragg Fever بین سال‌های ۱۹۴۲-۱۹۴۴ در ارتش آمریکا شایع شد و عامل آن در سال ۱۹۴۶ به دست تولاک از بیماران جدا شد و در سال ۱۹۵۲ گوچنور و همکاران آن را اتومنالیس نام‌گذاری کردند (۴).

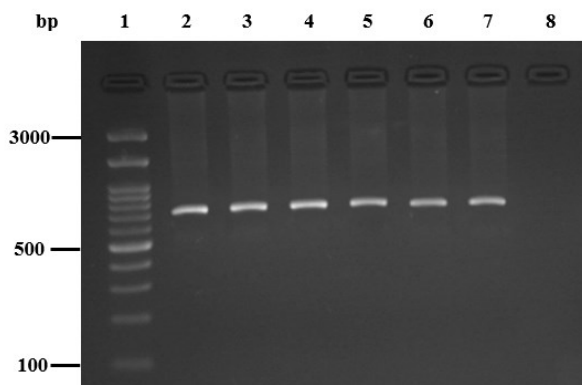
نتایج

نتایج آزمایش DNA ژنومی لپتوسپیروا در سرم سگ

در مجموع از ۶۰ نمونه خون بررسی شده با استفاده از روش PCR تعداد ۶ نمونه سرم جمع‌آوری شده از سگ‌های ولگرد (۱۰ درصد) از نظر وجود DNA لپتوسپیروا مثبت بودند (شکل ۱).



شکل ۱) آزمایش PCR نمونه سرم سگ بر اساس ژن 16SrRNA
ستون شماره ۱، نشانگر استاندارد (۱۰۰ bp): ستون‌های ۲، ۴، ۵ و ۶ نمونه‌های مثبت، ستون ۳ نمونه منفی



شکل ۲) آزمایش PCR نمونه سرم سگ بر اساس ژن LipL32 مورد مطالعه
ستون شماره ۱ نشانگر استاندارد (۱۰۰ bp): ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ نمونه‌های خون مثبت، ستون ۸ کنترل منفی، ردیف شماره ۲ کنترل مثبت

بحث

لپتوسپیروزیس یک بیماری زئونوز با انتشار جهانی است و براساس گزارش‌های به‌دست‌آمده از نقاط مختلف کشور در خصوص افزایش وقوع بیماری و با توجه به اهمیت جنبه‌های بهداشتی ناشی از لپتوسپیروزیس بررسی و مطالعه روش‌های سریع تشخیص این بیماری امری مهم تلقی

اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد برای اینکه بافرهای باقی‌مانده حذف شود، با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شد. در پایان ستون‌ها بر روی میکرو تیوب‌های بردار ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شدند و ۵۰ میکرولیتر بافر جداکننده اضافه شد و به مدت سه دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و در پایان میکرو تیوب‌ها با حداکثر سرعت به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند و DNA های جمع‌آوری شده داخل میکرو تیوب برای انجام آزمایش‌های مراحل بعد فریز شد.

مراحل انجام PCR

به منظور ردیابی ژنومی لپتوسپیروا در نمونه‌ها از روش Rahman و همکاران (۲۰۲۰) استفاده شد. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA استفاده شد، DNA استخراج شده تا زمان انجام PCR در فریز -۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بررسی حضور DNA ژنومی لپتوسپیروا در نمونه‌ها از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های 16SrRNA و LipL32 استفاده شد (جدول ۱). هدف از انتخاب این ژن‌ها با توجه به دقت و حساسیت زیاد آن‌ها در تشخیص باکتری لپتوسپیروا است.

پروتکل	نام پرایمر	سکانس ۵'-----۳'	محصول PCR (جفت باز)
16SrRNA	F	CATGCAAGTCAAGCGGAGTA	۵۴۱
	R	AGTTGAGCCCGCAGTTTTTC	
LipL32	F	GTCGACATGAAAAAAGTTTCGATTTTG	۷۵۶
	R	CTGCAGTTACTTAGTCGCGTCAGAAGC	

جدول ۱) مورداستفاده برای شناسایی ژن‌های 16SrRNA و LipL32

مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه‌ها
واشرشت‌سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
واشرشت‌سازی	۹۴	۴۵ ثانیه	۳۰
چسبیدن پرایمر	(۶۵ 16SrRNA و ۵۸ LipL32)	۳۰ ثانیه	
توسعه	۷۲	۳۰ ثانیه	
توسعه نهایی	۷۲	۶ دقیقه	۱

جدول ۲) برنامه و سیکل‌های دمایی جهت شناسایی ژن‌های 16SrRNA و LipL32

الکتروفورز و آنالیز محصولات PCR

برای شناسایی آمپلیکون‌ها یا فرآورده‌های تکثیر یافته حاصل از واکنش‌های PCR، از روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

می‌شود. در ضمن این بیماری در مناطق مختلف دنیا آندمیک است و اغلب به‌صورت فصلی و در مشاغل خاص بروز بیشتری پیدا می‌کند (۴).

این بیماری مشترک بین انسان و دام است و گونه‌های متعددی از جانوران اهلی و وحشی را آلوده می‌کند و خطری بالقوه برای بهداشت عمومی، توسعه اقتصادی، تجارب و صنعت است. این باکتری می‌تواند علائمی شبیه بیماری‌های رایج در منطقه نظیر تیلریوز ایجاد کند، بنابراین مطالعه بر روی باکتری لپتوسپیراهای اهمیت زیادی دارد (۵).

در بعضی مناطق ژاپن هم انسان‌ها و هم سگ‌ها با سرووارهای یکسانی از لپتوسپیراهای آلوده شده بودند (Koizumi et al., 2008)؛ بنابراین این احتمال می‌رود که سگ‌ها منبع آلودگی برای انسان باشند. برای تأیید این احتمال مطالعات آینده باید شامل تشخیص لپتوسپیراهای در انسان در منطقه لرستان باشد. در بررسی به‌عمل آمده از بیمارستان امام علی (ع) شهرستان زابل مشخص شد که برخی بیماران مراجعه‌کننده به این مرکز درمانی دارای علائم لپتوسپیروز بوده‌اند، اما هیچ‌گاه تشخیصی در این زمینه داده نشده است. بررسی مولکولی روی پر پیوس و واژن سگ‌های ولگرد، نشان داده که پخش ادراری لپتوسپیراهای می‌تواند خطری جدی برای انسان در مناطق شهری و روستایی باشد (۶).

طبق نتایج در تحقیق صفویه و همکارانش، PCR روشی سریع و دقیق برای شناسایی *L. interrogans* است، به‌طوری که وجود گونه‌های پاتوژن با این روش به‌سرعت قابل‌ردیابی است. استفاده از محیط کشت برای تشخیص لپتوسپیراهای به‌دلیل زمان طولانی تشخیص که به حدود ۸ هفته زمان نیاز دارد، روش مناسبی نیست (۷). برای تشخیص لپتوسپیراهای می‌توان از روش‌های کشت و سرولوژیک استفاده کرد، ولی روش‌های سرولوژیک منوط به گذشت حداقل یک تا دو هفته و ایجاد پاسخ همورال در بیمار است و در مورد کشت هم این زمان به چند هفته افزایش می‌یابد. همچنین تست MAT قادر به تمایز نمونه‌های حاصل از دام عفونی بالپتوسپیراهای و نمونه‌های حاصل از دام واکسینه‌شده علیه لپتوسپیراهای نیست (۸). به‌علاوه در مواردی مشخص شده که سگی که با استفاده از روش PCR نتیجه تست لپتوسپیروز آن‌ها مثبت بود با استفاده از روش سرولوژی نتیجه تست آن‌ها منفی تشخیص داده شده که این یافته تأیید می‌کند که سرولوژی در تشخیص سگ‌هایی که لپتوسپیراهای را از طریق ادرار پخش می‌کنند، روشی ضعیف‌تر از PCR است. تیتراژ آنتی‌بادی‌های ضد لپتوسپیراهای در سرم گاو‌ها در زمان سقط کاهش پیدا می‌کند (همالی و همکاران، ۱۳۹۱)؛ که این امر موجب می‌شود تست‌های سرولوژیک چندان قابل‌اطمینان نباشند.

PCR برای شناسایی تعداد وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، از جمله آن‌هایی که از لحاظ کلینیکی حائز اهمیت هستند استفاده می‌شود. در تست PCR

دیگر نیازی به جداسازی و کشت ارگانیسم نیست. در نتیجه این روش، روش مطلوبی برای شناسایی سریع و حساس ارگانیسم‌های درگیر در عفونت‌های حاد است (۹). در این تحقیق آن‌ها، نه‌تنها سعی شد با راه‌اندازی و طراحی PCR برای تشخیص لپتوسپیراهای پاتوژن امکان تشخیص زودرس لپتوسپیراهای فراهم آید. بلکه میزان فراوانی گونه‌های بیماری‌زا در منطقه استان لرستان نیز ارزیابی شود. در این مطالعه با تکنیک PCR مانند بسیاری از مطالعات انجام‌شده لپتوسپیراهای شناسایی شد، ولی نتیجه PCR در این پژوهش مانند تحقیقی است که سان هوکی انجام داده است و باند مدنظر مشاهده شد، اما درصد نمونه‌های مثبت در این دو تحقیق متفاوت بود. در مطالعه‌ای که براون در سال ۱۹۹۵ انجام داد، نتیجه گرفت PCR می‌تواند لپتوسپیراهای را در مراحل حاد عفونت لپتوسپیراهی نشان دهد و روش بازرشی برای تشخیص لپتوسپیروز در مراحل اولیه است (۱۰). علائم کلینیکی این بیماری به‌دلیل اینکه مختص این بیماری نیستند و می‌تواند به‌وسیله سایر پاتوژن‌ها ایجاد شود، نقش مهمی در تشخیص ندارند و بنابراین برنامه‌ها و استراتژی‌های کنترل بیماری باید براساس روش‌های تشخیص قابل‌اطمینان اجرا شود (۱۱). لپتوسپیروز تحت بالینی در سگ‌ها معمول است و تفاوت در علائم بیماری هنگام شکل بالینی بیماری گزارش شده است (۱۲). لپتوسپیروز در سگ شامل دامنه گسترده‌ای از علائم شامل بی‌حالی، افسردگی، بی‌اشتهایی، تب، اسهال و زردی می‌شود که در بسیاری دیگر از بیماری‌ها مثل ارلیشیوز، بازیوز، دیستمپر و بروسوز سگ‌سانان دیده می‌شود (۱۳). علائم فاز حاد بیماری در گاو به‌صورت ورم پستان ظاهر می‌شود. در فاز مزمن بیماری سقط، مرده‌زایی و مشکلات جنین ایجاد می‌شود (۱۴). همین‌طور تولد گوساله نابلغ و گوساله ضعیف از دیگر علائم است.

در مطالعه‌ای در تبریز بر روی گاو مشخص شد که دام‌پزشکان علائم کلینیکی لپتوسپیراهای را در مزارع گاو شیری این منطقه پی‌درپی مشاهده می‌کنند (همالی و همکاران، ۱۳۸۹). نارسایی کلیوی و زردی می‌توانند از جمله علائمی باشند که کلینیسین‌های دام کوچک را از وجود لپتوسپیروز آگاه می‌کنند (۱۵). در نتیجه نارسایی کلیه و نفریتیتیس بینایی علائم پاتولوژیکی نظیر ازوتمی، پروتئین ادراری و حضور تعداد زیادی گلبول سفید، گلبول قرمز و کست هیالین در مجاری کلیوی بروز می‌یابد (جمشیدی و همکاران، ۱۳۸۶). با توجه به اینکه تابلوی بالینی لپتوسپیروز با اغلب عفونت‌های باکتریایی یا ویروسی حاد تشابه داشته، تشخیص این بیماری با اتکا به علائم بالینی مشکل و در اغلب موارد غیرممکن است (۱۶).

لپتوسپیراهای به‌مرور پس از اولین روز عفونت از خون پاک‌شده و در دیواره داخل لوله‌های جمع‌کننده ادرار کلیه جایگزین می‌شود و به این ترتیب،

حدوداً از هفته دوم بیماری، لپتوسپیرو در ادرار وجود دارد (۱۷). با وجود این در تحقیق ما، تعداد ۸ نمونه از ۱۰۰ نمونه آلوده به لپتوسپیرو بودند که دلیل پایین بودن میزان آلودگی شاید به دلیل نمونه‌گیری باشد؛ چون فاصله در گرفتن نمونه خون باعث پاسخ به‌موقع سیستم ایمنی در برابر این باکتری می‌شود. با این حال ادرار و بافت کلیه نمونه‌های مطمئن‌تری برای تشخیص لپتوسپیرو بوده، ولی نمونه خون برای تشخیص لپتوسپیرو در مراحل ابتدای بیماری قابل اطمینان است.

در مطالعه شیربر و همکارانش در کانادا با استفاده از روش PCR برای تشخیص لپتوسپیرو از بافت کلیه برای نمونه‌برداری استفاده شد (۱۸). ادرار گاو منبع بسیار مهمی در شیوع لپتوسپیرو در گاوداری‌ها است (شفیعی و همکاران، ۱۳۹۳). همین‌طور سرم به‌طور معمول برای انجام تست‌های سرولوژی استفاده می‌شود و طی مراحل جداسازی سرم از خون تعداد باکتری‌های لپتوسپیرو کاهش پیدا می‌کند و استفاده از سرم برای انجام آزمایش PCR از حساسیت و ویژگی کمتری در مقایسه با خون و پلاسما دارد (۱۹)؛ بنابراین ما در تحقیق از خون کامل برای جداسازی سرم و انجام آزمایشات مولکولی استفاده کردیم و از سرم‌های جداشده از خون برای انجام تست‌های سرولوژی در آینده استفاده خواهد شد.

همین‌طور استفاده از لخته خون برای استخراج DNA جهت شناسایی لپتوسپیرو با استفاده از روش PCR تأیید شده است. لپتوسپیرو به گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز خون متصل می‌شود و هنگام لخته شدن، خون در آن وجود دارد (۲۰). همین‌طور در تحقیقی برای شناسایی لپتوسپیرو با استفاده از روش‌های مولکولی بر روی مایعات مهبلی بزها و میش‌ها، حضور عامل لپتوسپیرو را در دستگاه تولیدمثلی کرد. همین‌طور در دستگاه تناسلی گاوهای ماده غیرآبستن نیز وجود لپتوسپیرو تأیید شده است (۲۱). همین‌طور ایمونوگلوبولین‌های اختصاصی لپتوسپیرو در موکوس گردن رحم حاضر بود؛ بنابراین مایعات دستگاه تناسلی برای شناسایی لپتوسپیرو بسیار قابل اطمینان هستند.

در مطالعه‌ای که فرنلی و همکارانش انجام دادند از کلیه جنین‌های سقط‌شده برای نمونه‌برداری و استخراج DNA استفاده شد (۲۲). برای تشخیص لپتوسپیرو با استفاده از PCR می‌توان از طیف وسیعی از نمونه‌ها مانند نمونه‌های کلینیکی مانند سرم (۲۳)، زلالیه (۲۴)، جنین سقط‌شده (۲۵)، مایع نخاعی (۲۶)، ادرار (۲۷) و سایر نمونه‌های زیستی استفاده کرد. در مطالعه‌ای که در شمال ایران برای شناسایی لپتوسپیرو در ادرار ۳۰ گاو با استفاده از روش PCR انجام شد، مشخص گردید که ۲۶ نمونه از لحاظ وجود لپتوسپیرو مثبت است (شفیعی و همکاران ۱۳۹۳).

لپتوسپیرو در سگ‌سانان در سراسر دنیا اتفاق می‌افتد و گزارش‌های متعددی از بررسی سرولوژیکی لپتوسپیرو در سگ‌سانان وجود دارد، ولی اطلاعات موجود از سرو تایپ‌های عامل لپتوسپیرو در سگ‌سانان محدود است (Levett et al., 2001). در مطالعه‌ای در ژاپن سرووارهای کانیکولا، ایکتره‌مورازیه، اوسترالیس و کوپنهاگی از سگ‌ها جدا شده بودند (Yanagawa et al., 1992). عامل لپتوسپیرو *L. interrogans* است که بالای ۱۸۰ سرووار دارد و در ۱۹ گروه سرمی دسته‌بندی می‌شوند و هر سرووار با یک میزبان عادت یافته است، اما می‌تواند در هر موجود پستانداری بیماری کند. در گاو سرووار اصلی پومونا و هارجو (Hardjo and Pomona) هستند (همالی و همکاران، ۱۳۹۱).

در سراسر جهان، شیوع سرمی گونه‌های لپتوسپیرو در سگ متنوع است. به‌طور گسترده در ایران (۳۱ درصد)، ترکیه (۴۳/۹۶ درصد)، مصر (۱۱/۳ درصد)، ژاپن (۳/۹-۲۷ درصد)، آمریکا (۲۴/۹ درصد)، برزیل (۷/۱-۳۲/۲ درصد) گزارش شده است. شایع‌ترین سرووارهای لپتوسپیرو در سگ شامل کانیکولا، براتیسلا، پومونا، ایکتره‌مورازیه و گریپتوتیفوزا می‌شود. در کشورهای درحال توسعه، تصور می‌شود که تغییرات مکرر در شرایط آب‌وهوایی، به‌ویژه دمای بالا و بارندگی در مقاطع خاصی از سال می‌تواند نقش مؤثری در افزایش میزان موارد لپتوسپیرو داشته باشد (Alfattli et al., 2017).

نتایج مطالعات انجام‌شده در کشورهای ایالات‌متحده (۸/۲۰ درصد)، برزیل (۹/۳۰ درصد)، با این مطالعات شباهت داشت، اما مطالعات انجام‌شده در کشورهای شیلی و هند میزان آلودگی را به ترتیب (۲۵/۱۰ درصد) و (۴۱ درصد) گزارش دادند. دلایل اختلاف میزان شیوع و آلودگی لپتوسپیرو در این مطالعه با مطالعات نام‌برده می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع نمونه‌ها، حجم نمونه‌ها، منطقه جغرافیایی و حتی اقلیم منطقه‌ای که نمونه‌ها از آن جمع‌آوری شده‌اند ارتباط داشته باشد (Torkan and Momtaz, 2019).

مرداب‌ها و آب‌های راکد به‌عنوان منبع لپتوسپیروها شناخته می‌شوند و خطر انتقال لپتوسپیرو را افزایش می‌دهند (Mc Gowan et al., 1965). در مطالعه‌ای که هنرمنند و همکارانش در منطقه جلگه‌ای استان گیلان انجام دادند، عامل شیوع لپتوسپیرو در منطقه را وفور جوندگان و برخی از حیوانات وحشی، به‌ویژه شغال که در مجاورت سکونت‌گاه‌های انسان، به‌ویژه در مناطق روستایی به‌سر می‌برند و به‌راحتی در شالیزارها رفت‌وآمد می‌کنند و نیز وجود حیوانات اهلی از قبیل گاو، اسب، سگ و گربه که می‌توانند بالقوه بیمار یا حامل باشند و در مناطق روستایی بسیار فراوان هستند، توجه‌کننده حضور گونه و زیرگونه‌های بیماری‌زا در شالیزارهای است. اغلب روستاییان به‌طور سنتی در منزل خود گاو نگهداری می‌کنند و از اسب برای برخی از

بنابراین داشتن واکسن مؤثری برای این بیماری ضروری است. بیشتر واکسن‌های رایج با تولید آنتی‌بادی بر ضد لپتوسپیروزی ساکارید لپتوسپیروزی پاسخ حفاظتی ایجاد می‌کنند. این واکسن‌ها حاوی سرووارهای شایع در منطقه‌اند، ولی به علت متغیر بودن سرووارهای موجود در منطقه، ایمنی ایجاد شده ناقص است؛ بنابراین طراحی و ساخت واکسن نو ترکیب مؤثر و کارآمد علیه بیماری حائز اهمیت است (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۳).

نتیجه‌گیری

گرچه مقدار شناسایی شده در این مطالعه چندان زیاد نیست، اما به جهت اهمیت بیماری از نظر بهداشت عمومی و زنجیره بیماری و میزبان‌های وسیع و نحوه انتقال باکتری، باید همین مقدار کم نیز جدی گرفته شود و اقدامات لازم عملی گردد. منطقه خرم‌آباد دارای آب‌وهوای گرم در فصل بهار و تابستان و هوای سرد در فصل پاییز و زمستان است و بارش‌های پراکنده در فصول مختلف و وجود تعداد زیادی سگ ولگرد که خارج از کنترل هستند و واردات دام زنده از کشور عراق که لپتوسپیروز شیوع زیادی در بین دام‌های آن‌ها دارد، سبب شده تا شرایط رشد باکتری لپتوسپیروزی آسان شود و تعدادی زیادی از نمونه‌های مورد مطالعه به باکتری لپتوسپیروزی آلوده باشند.

تشکر و قدردانی

مجریان طرح بر خود واجب می‌دانند که از همکاری دانشگاه لرستان و عزیزیانی که در مراحل نمونه‌گیری ما را یاری کردند، تقدیر و تشکر به عمل آورند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی در خصوص این مقاله با یکدیگر ندارند.

منابع

- 1) James S., Sthian B., Teijlingen E. Outbreak of Leptospirosis in Kerala. *Nepal Journal Epidemiology*. 2018;8(4):745-747.
- 2) Tarantola A, Goarant C. Leptospirosis in Franch Historical Medical Literature: Welis Disease or Kelschs Disease? *Am Journal Med Hyg*, 2018;99(6):1366-1368.
- 3) Selvarajah S., Ran, S., Roberts, N.W. Leptospirosis in pregnancy: Asystematic review. *PLoS neglected Tropical Diseases*, 2021;15(9).
- 4) Fearnely, C., Wakeley, p., Beltran, J., Dalley, C., Williamson, S., Gaudie, C. and Woodward,

فعالیت‌های کشاورزی و نیز برای حمل‌ونقل استفاده می‌کنند و برای حفاظت خانه نیز سگ نگهداری می‌کنند (هنرمند و همکاران، ۱۳۸۸). شیوع زیاد در بین سگ‌ها شاید به دلیل ماندگاری زیاد لپتوسپیروزی در سگ‌ها به عنوان مخزن این بیماری در طبیعت باشد، به خصوص سگ‌های ولگرد که در خیابان‌ها سرگردان هستند و از زباله‌ها و آب‌های آلوده تغذیه می‌کنند و از جوندگان برای تغذیه استفاده می‌کنند. سگ‌های ولگرد می‌توانند مسافت‌های طولانی را طی کنند و حتی آلودگی در یک منطقه را به منطقه دیگری منتقل کنند (خاصی‌پور و همکاران، ۱۳۹۳). دلایل مطالب گفته شده دریر و همکارانش هم تأیید شده است (Dree et al., 2013). در منطقه لرستان شیوع لپتوسپیروز در میان سگ‌ها شاید به دلیل آلوده بودن آب‌های راكد و تغذیه سگ‌ها از این آب‌ها و جوندگان و زباله‌ها باشد و همین‌طور می‌تواند به دلیل انتقال افقی در بین سگ‌ها به دلیل ایجاد جراحت در نتیجه دعوی سگ‌ها باشد.

شرایط آب‌وهوایی یکی از فاکتورهای مهم در ارتباط با شیوع لپتوسپیروز است. شیوع لپتوسپیروز در دام‌هایی که بیشتر از دو ساعت در روز به چرا مشغول می‌شوند، به‌طور معنی‌داری بیشتر از شیوع لپتوسپیروزی در دام‌هایی بوده که کمتر از این میزان در چرا بودند. بنابراین چرا کردن دام در محیط می‌تواند عامل مهمی در انتقال لپتوسپیروزی باشد. طبق تحقیقات هاتاوی و همکارانش شیوع لپتوسپیروز در گاو در فصول مختلف متفاوت است، اما در فصل زمستان بیشتر است. همین‌طور مطالعه چتین کایا و همکارانش در شرق ترکیه این مورد که شیوع در زمستان بیشتر است را اثبات کرد. احتمالاً دلیل شیوع بیشتر در فصل زمستان به دلیل افزایش تماس با ادرار در دام‌های داخل اسطبل است (۲۳). شیوع لپتوسپیروز در مناطق خشک هم دیده شده و لزوماً شیوع لپتوسپیروز با بارش باران در ارتباط نیست و سایر عوامل نیز می‌توانند تأثیرگذار باشند (۲۳).

سگ به عنوان منبع لپتوسپیروزی در طبیعت نقش مهمی دارد و می‌تواند علاوه بر تهدید سایر سگ‌ها برای سایر حیوانات اهلی و انسان نیز خطر آفرین باشد (خاصی‌پور و همکاران، ۱۳۹۳). تشخیص لپتوسپیروز در مراحل اولیه عفونت در گاو، شانس درمان موفق و کاهش آسیب‌ها در عفونت انسانی را افزایش می‌دهد (۲۳). واکسن دوگانه لپتوسپیروزی از سال ۱۹۷۰ در ژاپن برای واکسیناسیون سگ‌ها استفاده می‌شود. در ایران نیز واکسن برای ایمنی سگ‌های خانگی وجود دارد و به صورت سامانمند جهت صدور شناسنامه و کنترل بیماری‌ها در سگ‌های خانگی استفاده می‌شود و این امر به دلیل زیاد لپتوسپیروزی در سگ‌های ولگرد باید برای سگ‌های ولگرد نیز انجام شود. مطالعات سروایدمیولوژیکی و باکتریولوژیکی افزایش شیوع لپتوسپیروزی را در کشور نشان می‌دهند،

- Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008;102: 117-122.
- 17) Wagenaar, J., Zuerner, L., Alt, D. and Bolin, C. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* in urine of cattle. *AJVR*, 2000;61: 316-320.
 - 18) WHO. Leptospirosis worldwide. *Wkly Epidemiol Rec*, 1999;74: 237-242.
 - 19) Xu, C., Loftis, A., Ahluwalia, K., Gao, D., verma, A., Wang, C. and Kaltenboeck, B. Diagnosis of Canine Leptospirosis by a Highly Sensitive FRET-PCR Targeting the *lig* Genes. *PLOS ONE*, 2014;9: 110-119.
 - 20) Yadeta, Waktole, G.M, Bashahun. Leptospirosis in animal and its public health implicaitons: Areview. *World Applied Sciences Journal*, 2016;34(6):845-853.
 - 21) Yanagawa, R. Animal leptospirosis. *Kagaku Ryoho no Ryoiki*, 1992;8: 673–678.
 - 22) Yang, C., Wu, M. and Pan, M. Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2001;16: 73-77.
 - 23) Yanagihara, Y., Sharon, Y., Villanueva, M., Nomura, N., Sekiya, S., Handabile, C., Masashi Shingai. *Leptospira* Is an Environmental Bacterium That Grows in Waterlogged Soil. *Environmental Microbiology*, 2022;10(2):1-9.
 - M. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Research in Veterinary Science*, 2008;85: 8-16.
 - 5) Negbede, E., Raji, M., Kwanashie, N., Okolocha, E., Maurice, N., Akange, E., and Odeh, L. Leptospirosis among zebu cattle in farms in Kaduna state, Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2012;12:367-369.
 - 6) NicolinoI, R. R., et al. Prevalence and spatial analysis of antileptospiral agglutinins in dairy cattle-Microregion of Sete Lagoas, Minas Gerais, 2009/2010. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2014, 66: 648-654.
 - 7) Rahman, M.S.A. et al. 2020. Detection and characterisation of *Leptospira* spp. in dogs diagnosed with kidney and/or liver disease.
 - 8) Renan Domingos FM., Vieira, L., Romero, EC., Gonçalves, AP. “Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions”. *BMC Microbiology*, 2012;12(50):1-16.
 - 9) Selvarajah S., Ran, S., Roberts, N.W. Leptospirosis in pregnancy: A systematic review. *PLoS neglected Tropical Diseases*, 2021;15(9).
 - 10) Shah, I. and Katira B. 2007. Clinical and laboratory profile of dengue, leptospirosis and malaria in children: a study from Mumbai. *Arch Dis Child*, 92:561-568.
 - 11) Shanahan, L. and Slovis, N. *Leptospira interrogans* associated with hydrallantois in 2 pluriparous Thoroughbred mares. *J Vet Intern Med*, 2011;25: 158-161.
 - 12) Shearer, K., Harte, M., Ojkic, D., Delay, J. and Campbell, D. Detection of *Leptospira* spp. in wildlife reservoir hosts in Ontario through comparison of immunohistochemical and polymerase chain reaction genotyping methods. *Can Vet J*, 2014;55: 240-248.
 - 13) Tarantola A, Goarant C. Leptospirosis in Franch Historical Medical Literature: Welis Disease or Kelschs Disease? *Am Journal Med Hyg*, 2018;99(6);1366-1368.
 - 14) Torkan S., Momtaz, H. Molecular detection of leptospir species serotypes in Iranina stry Doga. *International Journal of Medical Laboratory*, 2019;6(2):138-144.
 - 15) Vidigal, F., Vera-Tome, A., Nogales-Munoz, N., Garcia, M. and Munoz-Sanz, A. Leptospirosis in South-western Spain . *Revista Clínica Española*, 2014;214: 247-252.
 - 16) Vijayachari, P., Sugunan, A., sharma, S., Ray, S., Natarajaseenivasan, K. and Sehgal, K. Leptospirosis in the Andaman Islands, India.