ارزیابی سرمی گونه‌های لپتوسپیرا به روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی در بزهای ارومیه

غلامرضا عبدالله‌پور[۱]، علی‌قلی رامین[۲] و یوسف خلیلی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۱۷

[۱] دانشیار گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۲] استاد گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
[۳] دانش آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
*مسئول مکاتبه: Email:Ali_ramin75@yahoo.com

چکیده

فراوانی واکنش سرمی مثبت به انواع گونه‌های لپتوسپیرا در تعداد ۱۳۰ راس بز در سال۱۳۹۰ در ارومیه مطالعه شد. پس از اخذ خون از بزها و جدا نمودن سرم آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی به لپتوسپیرا ایکترهموراژیه، پومونا، هارجو، کانیکولا، گریپوتیفوزا، و بالوم انجام گردید. از مجموع ۱۳۰ سرم تعداد ۲۵ رأس (۱۹/۲٪) شامل ۱۷ رأس بز نر (۱۳/۱٪) و ۸ رأس بز ماده (٦/۱٪ واکنش سرمی مثبت به انواع آنتی‌ژن‌های زنده لپتوسپیرا نشان دادند. از مجموع نمونه ها با واکنش سرمی مثبت، تعداد ۲۱ نمونه (۵۰٪) به پومونا، ۱۷ نمونه (٤۰/۵٪) به گریپوتیفوزا، ۲ نمونه (٤/۷۵٪) به هارجو، ۱ نمونه (۲/۳۸٪) به ایکترهموراژیه و یک نمونه (۲/۳۸٪) به کانیکولا مثبت بودند. فراوانی نمونه‌های با واکنش سرمی مثبت با رقت ۱:۱۰۰ برای پومونا ۱۳ مورد (۳۰/۹٪)، گریپوتیفوزا ١٤ مورد (۳۳/۳) و رقت ۱:۲۰۰ برای پومونا ۸ مورد (۱۹/۱٪)، گریپوتیفوزا ۳ مورد (۷/۱۷٪)، هارجو۲ مورد (٤/۷۵٪)، ایکترهموراژیه ۱ مورد (۲/۳۸٪) و کانیکولا ۱ مورد (۲/۳۸٪) بود. تعداد ۱۱ نمونه (٤٤٪) به یک آنتی‌ژن و ۱۳ نمونه (۵۲٪) به دو و یک نمونه (٤٪) به پنج آنتی‌ژن واکنش نشان دادند، فراوانی و درصد سنی با واکنش سرمی مثبت برای سنین ۱، ۲، ۳، ٤ و بالای ٤ سال برای مجموع نمونه‌ها به ترتیب ٤ (١٦٪)، ۸ (۳۲٪)، ۷ (۲۸٪)، ۳ (۱۲٪) و ۳ (۱۲٪)، جنس نر ۲ (۸٪)، ۷ (۲۸٪)، ۵ (۲۰٪)، ۲ (۸٪) و ۱ (٤٪) و ماده‌ها ۲ (۸٪)، ۱ (٤٪)، ۲ (۸٪)، ۱ (٤٪) و ۲ (۸٪) نمونه بود. مقایسه سنی فراوانی آنتی‌ژن‌های لپتوسپیرا در جنس نر و ماده معنی دار بوده ($X=3.76, df=4, P<0.01$) سنین ۲ و ۳ سال بیشترین ابتلا و آلودگی را در ماده‌ها نشان دادند. مقایسه فراوانی جنسی بزها با واکنش سرمی مثبت به لپتوسپیرا تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. مقایسه فراوانی آنتی‌ژن‌های مثبت لپتوسپیرا در بزها بطور معنی‌داری متفاوت بوده، پومونا و گریپوتیفوزا بیشتر از همه بودند. می‌توان گفت که آنتی ژن‌های لپتوسپیرا در بزهای ارومیه حضور داشته که پومونا و گریپوتیفوزا مهمترین آنها هستند. وجود بیش از یک آنتی ژن با غالبیت پومونا در بزها محتمل است. غالب آنتی‌ژن‌ها با رقت ۱/۱۰۰ بوده، جنس در ابتلا به لپتوسپیراها موثر نبوده ولی سن دو تا سه سال در ابتلا مهم تلقی می شود. لپتوسپیروز با عامل لپتوسپیرا بیماری مشترک انسان و دام بوده که ارتقاء بهداشت همگانی با تدابیر پیشگیری در بزها ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: لپتوسپیرا، سرولوژی، بز، آگلوتیناسیون میکروسکوپی، پومونا، گریپوتیفوزا

مقدمه

مطالعات اپیدمیولوژیک، لپتوسپیروز را بیماری مشترک مناطق گرمسیری جهان معرفی نموده که گاو، گوسفند، بز، اسب، شتر، نشخوارکنندگان وحشی، جوندگان و انسان را مبتلا می‌کند (الیس ۱۹۸٦). بیماری علاوه بر تهدید بهداشت عمومی، خسارات اقتصادی قابل توجهی را در صنعت دامپروری مانند کاهش تولید شیر، سقط جنین، تولد گوساله های ضعیف، کاهش وزن و عدم باروری و تلفات ایجاد نموده که نیازمند صرف هزینه های پیشگیری، کنترل و درمان است (الیس ۱۹۸٦). بیماری متعاقب عفونت اسپیروکت‌های بیماریزای لپتوسپیرا ایجاد شده که با تب، زردی، شیر صورتی رنگ و هموگلوبینوری شناخته می‌شود (لوت ۲۰۰۹، مک‌براید و همکاران ۲۰۰۵). جوندگان، خوک، گاو، گوسفند و سگ می‌توانند مخازن و ناقلین خفته بیماری در طبیعت تلقی شوند (نالی و همکاران ۲۰۰۵). جوندگان اصلی‌ترین مخزن بیماری بوده و باکتری را از ادرار دفع می‌نمایند. انسان از طریق آب آشامیدنی یا محیط های مرطوب آلوده به ادرار حیوانات مخزن آلوده می-شوند (ورلد هلث ارگانیزیشن).

بیماری با اسامی سندرم ویل، تب پاییزی، تب باتلاق، تب کانیکولا، تب شالیزار، بیماری اشتوتگارت و بیماری آب قرمز گوساله‌ها (فاین و همکاران ۱۹۹۹) در جهان شناخته شده که در حاشیه دریای خزر بنام تب شالیزار در انسان معروف است (هنرمند و همکاران ۱۳۸٤). تشخیص و تأیید بیماری با توجه به علائم بالینی و آزمایشات سرمی مانند جستجوی پادتن‌ها به روش الیزا و آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی امکان پذیر است (فلانی و همکاران ۲۰۰۱). مطالعات سرولوژیکی فراوانی در مناطق مختلف جهان و ایران بر روی گاوها (راجیو و همکاران ۲۰۱۰) به روش الایزا (نصیری ۱۳۸۲) صورت گرفته که حضور لپتوسپیرا را تأیید می-نماید.

نظر به مشترک بودن بیماری بین انسان و دام، تدابیر و توجه خاصی نسبت به اپیدمیولوژی و کنترل آن معطوف شده است. مطالعات گسترده در زمینه لپتوسپیروز بر سه پایه انسان، دام و محیط متکی است. روشهای تشخیص، حذف و کنترل لپتوسپیروز با اتکا بر نمونه خون، ادرار و بافتهای دامی بوده تا بنحوی انسان را از گردونه بیماری خارج نمایند که در این خصوص نشخوارکنندگان از موقعیت خاصی برخوردار می‌باشند. بر اساس منابع موجود میزان ابتلاء سرمی گاو، گاومیش و گوسفندهای ایران و ارومیه با روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی بیش از ۲۰٪ بوده که آنتی‌ژنهای ایکترهموراژیه، کانیکولا و پومونا غالب ترین گونه‌ها ذکر شده است (وندیوسفی و همکاران ۱۳۷۹) ولی در رابطه با بز مخصوصاً در ارومیه اطلاع خاصی موجود نبوده لذا ارزیابی سرواپیدمیولوژیکی شیوع لپتوسپیرا درجمعیت بزهای ارومیه به روش MAT ضروری و اجتناب ناپذیر است. اهداف این مطالعه عبارتند از: ۱- تعیین فراوانی سرمی ابتلا به لپتوسپیرا در بزهای ارومیه، ۲ - تعیین نقش جنس و سن در ابتلا به لپتوسپیراها، ۳- تعیین آنتی ژن‌های مهم لپتوسپیرا در آلودگی‌های بزی.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

از تعداد ۱۳۰ رأس بز ارجاع شده به کشتارگاه ارومیه و بصورت تصادفی در تابستان سال ۱۳۹۰ مقدار ۵ میلی-لیتر خون از ورید وداج تهیه شد. نمونه‌های خون در لوله آزمایش جمع‌آوری شده، پس از شماره‌گذاری، مشخصات بزها از نظر سن با تکیه بر وضعیت دندان‌ها و جنس ثبت شدند (جدول ۱). نمونه‌ها به یخچال ٤C° منتقل شده در دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سرم‌ها جدا شدند. سرم‌ها به میکروتیوب-های ۱/۵ میلی لیتری منتقل و پس از شماره‌گذاری در

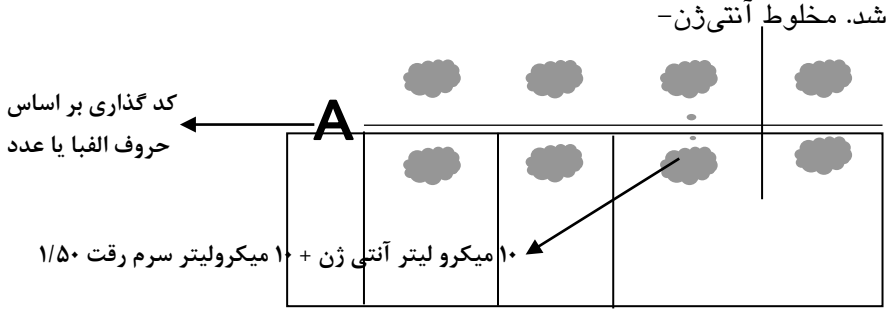
°۲۰C- فریزر شدند. نمونه‌ها به آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال و با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی ارزیابی شدند. در این مطالعه از ٦ آنتی‌ژن شایع و بیماریزا در ایران شامل پومونا، گریپوتیفوزا، هارجو، کانیکولا، ایکترهموراژیه و بالوم به صورت جداگانه استفاده شده که توانایی تعیین آنتی‌ژن‌های مثبت را ممکن می‌سازد.

آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی

سرم‌ها از فریزر خارج و در دمای محیط رفع انجماد شدند. سطح لام‌های میکروسکوپی به دو ردیف چهارتایی (به منظور آزمایش هشت نمونه سرمی) و یک مستطیل جهت شماره‌گذاری تقسیم شد. رقت ۱:۵۰ از نمونه‌های سرمی در محلول بافر نمکی فسفات (PBS) تهیه شد. آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی به صورت زیر انجام گرفت. مقدار ۱۰ میکرولیتر از آنتی-ژن آماده یک لپتوسپیرا مشخص در هریک از مربع های لام با ۱۰ میکرولیتر از هشت نمونه سرم مختلف با رقت۱:۵۰ مخلوط و رقت ۱:۱۰۰ حاصل شد. این عمل برای پنج آنتی ژن دیگر نیز انجام شد. مخلوط آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به داخل پتری‌دیش حاوی کاغذ مرطوب منتقل و به مدت۹۰ دقیقه در انکوباتور °۳۰C قرار گرفته و در زیر میکروسکوپ زمینه سیاه با بزرگ نمائی ۱۰۰× بررسی گردید. در صورتیکه کنترل منفی و کنترل آنتی-ژن، فاقد اگلوتیناسیون بوده ولی در کنترل مثبت آگلوتیناسیون ٤+ رخ می‌داد، نمونه‌ها نیز خوانده می‌شد. و در صورتی‌که ۲۵٪ اجرام لپتوسپیرایی در هر میدان میکروسکوپی آگلوتینه می‌شدند ۱+ (منفی) و اگر ۵۰٪ آگلوتینه می شدند ۲+ (مشکوک) و در صورتی‌که ۷۵٪ و یا ۱۰۰٪ آگلوتینه می‌شدند ۳+ و ٤+ (مثبت) گزارش می‌شد (عبداله پور ۱۳۷۸).

تعیین عیار نهایی نمونه‌های مثبت

به منظور تعیین عیار نهایی سرم‌هایی که در مرحله اول مثبت می‌شدند، پس از تهیه رقت‌های۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰، ۱:٤۰۰ و ۱:۸۰۰ عملیات عیار سنجی انجام می‌گرفت. بالاترین رقتی که در آن میزان آگلوتیناسیون +۳ یا +٤ مشاهده می‌شد به عنوان عیار نهایی پادتن در نمونه سرمی مثبت تعیین می‌گردید.



شکل ۱- نحوه آماده سازی یک لام برای استفاده در آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی

جدول ۱- مشخصات بزهای ارومیه بر اساس جنس و سن

سن (سال)	نر	ماده	مجموع
۱	۹	۵	۱٤
۲	۲۳	۱۲	۳۵
۳	۲۱	۱٤	۳۵
٤	۱۲	۱۳	۲۵
٤<	٦	۱۵	۲۱
مجموع	۷۱	۵۹	۱۳۰

آنالیز آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS13 و آزمون مربع کای (Chi-Square) استفاده گردید.

نتایج

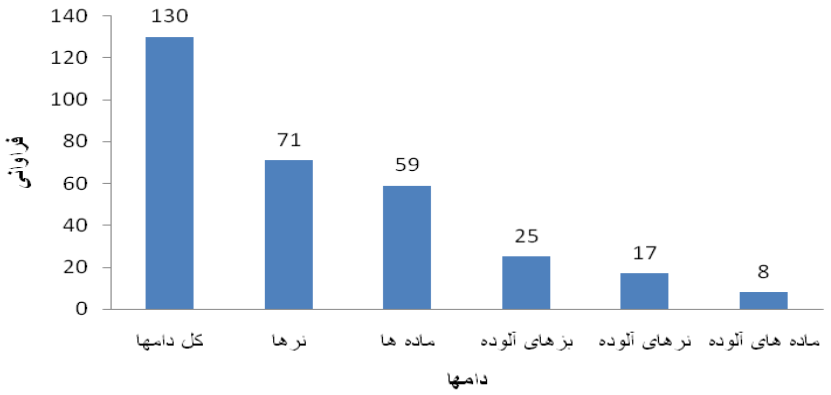
از مجموع ۱۳۰ راس بزهای ارومیه (۷۱ رأس نر و ۵۹ رأس ماده)، تعداد ۲۵ رأس (۱۹/۲٪) شامل ۱۷ رأس نر (۱۳/۱٪) و ۸ رأس ماده (۶/۱٪) واکنش سرمی مثبت به یکی از آنتی ژن های زنده لپتوسپیرا را نشان دادند (نمودار ۲).

جدول ۲ فراوانی نسبی و درصد هریک از آنتی ژن‌های مثبت را در بزها نشان می‌دهد. از مجموع نمونه‌ها با واکنش سرمی مثبت، تعداد ۲۱ نمونه (۵۰٪) به پومونا، ۱۷ نمونه (۴۰/۵٪) به گریپوتیفوزا، ۲ نمونه (۴/۷۵٪) به هارجو، ۱ نمونه (۲/۳۸٪) به ایکترهموراژیه و ۱ نمونه (۲/۳۸٪) به کانیکولا مثبت بودند. سایر آنتی‌ژن‌های لپتوسپیرا یافت نشدند.

فراوانی و درصد نمونه‌های مثبت رقت ۱:۱۰۰ برای پومونا ۱۳ مورد (۳۰/۹٪)، گریپوتیفوزا ۱۴ (۳۸/۱٪) مورد و رقت ۱:۲۰۰ برای پومونا ۸ مورد (۱۹/۱٪)، گریپوتیفوزا ۳ مورد (۷/۱۷٪)، هارجو۲ مورد (۴/۸٪)، ایکترهموراژیه ۱ مورد (۲/۳۸٪) و کانیکولا ۱ مورد (۲/۳۸٪) بود (جدول ۳). تعداد ۱۱ نمونه (۴۴٪) یک آنتی ژن و ۱۳ نمونه (۵۲٪) به دو و یک نمونه (۴٪) به پنج آنتی ژن واکنش مثبت نشان دادند (شکل ۳).

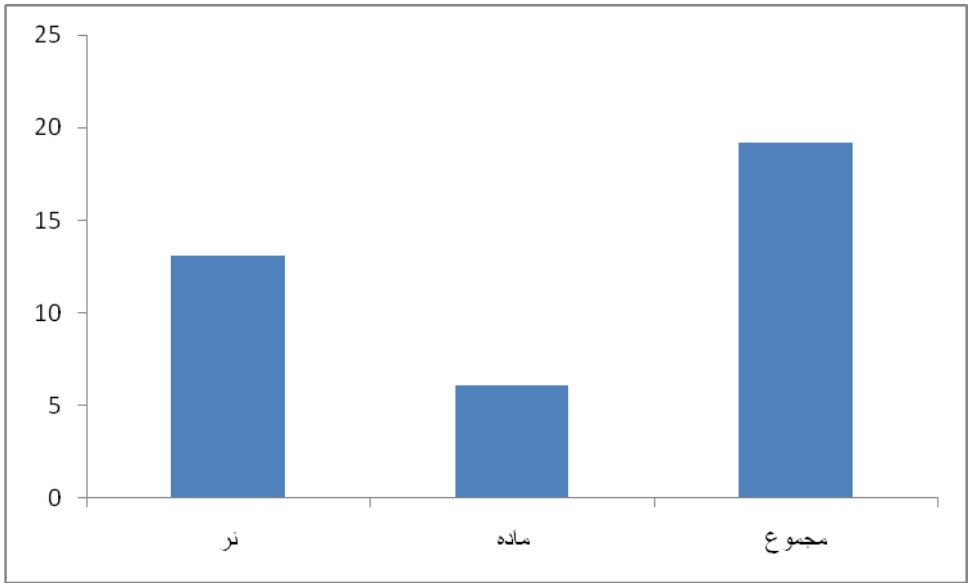
فراوانی سنی بزها به واکنش سرمی مثبت به لپتوسپیرا برای سنین ۱، ۲، ۳، ۴ و بالای ۴ سال برای مجموع نمونه‌ها به ترتیب ۴ (۲۰٪)، ۸ (۴۰٪)، ۷ (۳۵٪)، ۳ (۱۵٪) و ۳ (۱۵٪)، جنس نر ۲ (۱۰٪)، ۷ (۳۵٪)، ۵ (۲۵٪)، ۲ (۱۰٪) و ۱ (۵٪) و ماده‌ها ۲ (۱۰٪)، ۱ (۵٪)، ۲ (۱۰٪)، ۱ (۵٪) و ۲ (۱۰٪) نمونه بود. (جدول ۵). مقایسه سنی فراوانی آنتی‌ژن‌ها در جنس نر و ماده اختلاف معنی-داری را در سنین مختلف نشان داده ($X=3.76, df=4, P<0.01$) سنین ۲ و ۳ سال بیشترین ابتلا و آلودگی را در جنس ماده نشان دادند.

در این مطالعه ۲۳/۹٪ بزهای نر و ۱۳/۶٪ ماده‌ها واکنش سرمی مثبت به لپتوسپیرا را نشان داده که از نظر آزمون مربع کای اختلاف در بین جنس نر و ماده مشاهده نشد. مقایسه آماری فراوانی آنتی‌ژن‌های پومونا (۲۱ مورد)، گریپوتیفوزا (۱۷ مورد)، هارجو (۲ مورد)، کانیکولا و ایکترهموراژیه (یک مورد) اختلاف معنی‌داری را نشان داده، پومونا و گریپوتیفوزا بطور معنی‌داری بیشتر از سایرین بودند.

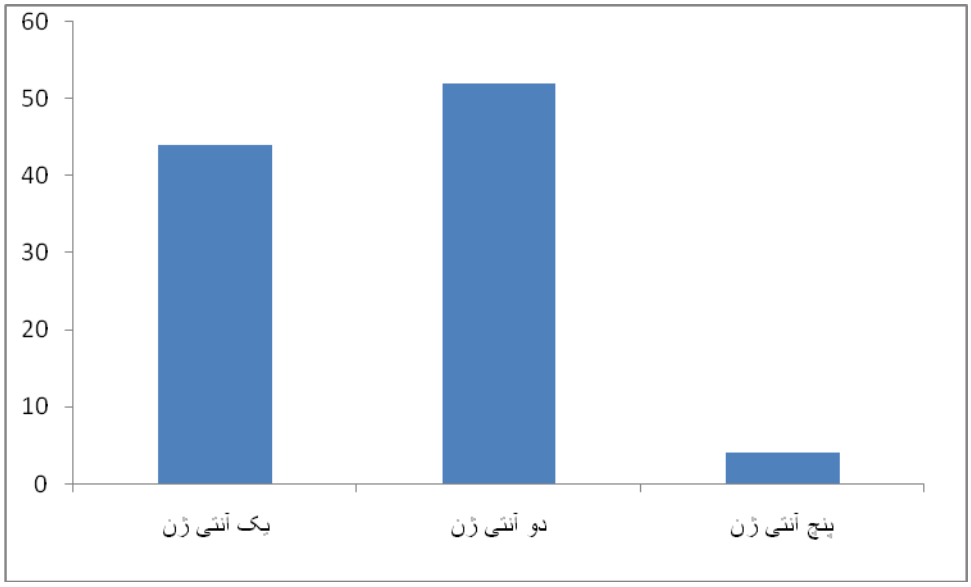


شکل۲- فراوانی بزهای آلوده به لپتوسپیرا در هر دو جنس نر و ماده

*در ستون اول اعداد واقعی دام‌های آلوده در برابر کل دام‌های مورد بررسی ارایه شده است.



شکل ۳- درصد لپتوسپیروز مثبت در بزهای نر، ماده و مجموع



شکل ۴-درصد بزهای مثبت به یک، دو و پنج آنتی‌ژن لپتوسپیروز

جدول ۲- فراوانی و درصد آنتی ژن‌های مثبت به لپتوسپیرا در بزهای نر، ماده و مجموع بزها در ارومیه

سرووار	جنس نر		جنس ماده		مجموع دام‌ها		
	فراوانی	٪ از نرها	فراوانی	٪ از ماده‌ها	فراوانی	٪ از کل بزها	٪ از مثبت‌ها
پومونا	۱۳	۱۸/۳	۸	۱۳/٦	۲۱	۱٦/۲	۵۰
گریپوتیفوزا	۱٤	۱۹/۷	۳	۵/۱	۱۷	۱۳/۱	٤۰/۵
هارجو	۱	۱/٤۱	۱	۱/۷	۲	۱/۵٤	٤/۷۵
ایکترهموراژیه	۱	۱/٤۱	---	----	۱	۰/۷۷	۲/۳۸
کانیکولا	۱	۱/٤۱	---	----	۱	۰/۷۷	۲/۳۸

*= سرووار بالوم یافت نشد.

جدول ۳- فراوانی و درصد رقت سرمی بزها به آنتی‌ژن‌های لپتوسپیرا در ارومیه

سروار	رقت ۱۰۰		رقت ۲۰۰	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
پومونا	۱۳	۳۰/۹	۸	۱۹/۱
گریپوتیفوزا	۱٤	۳۸/۱	۳	۷/۱۷
هارجو	-----	-----	۲	٤/۸
ایکترهموراژیه	-----	-----	۱	٪۲/۳۸
کانیکولا	-----	-----	۱	٪۲/۳۸

*= سرووار بالوم یافت نشد.

جدول ۴- فراوانی و درصد تعدد آنتی‌ژن‌های لپتوسپیرا در بزهای ارومیه

تعداد آنتی‌ژن‌های مثبت	فراوانی	درصد از کل بزها	درصد از موارد مثبت
یک نوع آنتی‌ژن	۱۱	۸/۴۶	۴۴
دو نوع آنتی‌ژن	۱۳	۱۰	۵۲
پنج نوع آنتی‌ژن	۱	۰/۷۷	۴
جمع	۲۵	۱۹/۲	۱۰۰

جدول ۵- فراوانی و درصد سنی سرم‌های مثبت به لپتوسپیرا در بزهای ارومیه

سن (سال)	بزهای نر		بزهای ماده		مجموع بزها	
	فراوانی	درصد موارد مثبت	فراوانی	درصد موارد مثبت	فراوانی	درصد موارد مثبت
۱	۲	۸	۲	۸	٤	۱٦
۲	۷	۲۸	۱	٤	۸	۳۲
۳	٥	۲۰	۲	۸	۷	۲۸
٤	۲	۸	۱	٤	۳	۱۲
<٤	۱	٤	۲	۸	۳	۱۲
جمع	۱۷	٦۸	۸	۳۲	۲٥	۱۰۰

بحث

مشاهده عامل لپتوسپیرا در سرم خون بزها به همراه تائید بیماری در گاو، گاومیش و گوسفندهای ارومیه (رامین و همکاران ۱۳۹۲) نشانگر حساسیت نشخوارکنندگان به این عامل بیماریزا بوده که با مشخص شدن میزان و نوع آلودگی در گونه‌های دامی راهنمای مطلوبی در راستای تشخیص، کنترل و درمان بیماری خواهد بود. اگرچه گونه همه لپتوسپیراها مربوط به اینتروگانس بوده (رادوستیت و همکاران ۲۰۰۷) و اغلب مختص مناطق با میزان بارندگی زیاد و باتلاقی است می تواند از مشخصات اپیدمیولوژیکی بیماری در منطقه جغرافیائی ارومیه باشد. بیماری در انسان، تکسمی‌ها، گوشتخواران و نشخوارکنندگان نواحی مختلف ایران تائید شده که بیانگر میزان بالای شیوع سرمی است و آنتی ژن های غالب ایکترهموراژیه،

کانیکولا، گریپوتیفوزا و بالوم می‌باشند (وند یوسفی و همکاران ۱۳۷۳).

حدود ۱۹/۲٪ بزهای این مطالعه واکنش سرمی مثبت داشته که از ابتلاء ۳۱٪ گاوان در آذربایجان شرقی کمتر (شعاعی، ۱۳۷۳) و ۱۷٪ در دامپروری‌های اطراف تهران بیشتر است (محرمی ۱۳٦۹). نتایج ابتلاء سرمی با روش غیرآگلوتیناسیون میکروسکوپی در سال ۱۳۷۹ ارومیه در گاو، گوسفند و بز به ترتیب ٦۲/٥٪، ٤۲/٦٪ و ۲۷/٥٪ بوده که از نتایج آگلوتیناسیون میکروسکوپی این مطالعه زیاد است (زینالی و همکاران، ۱۳۷۹). علت این تفاوت ممکن است در ارتباط با سیر نزولی ابتلاء سرمی در ۱۲ سال گذشته در نشخوارکنندگان ارومیه باشد و یا اینکه روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی دقیق تر از روش‌های قبل بود که این تفکر محتمل‌تر است زیرا بررسی‌های سرمی در تهران (گلی ۱۳۸۰)، شیراز (مشایخی ۱۳۷۹)، شهرکرد (نصر اصفهانی ۱۳۸۲) و اهواز (حاجی حاجیکلایی و همکاران ۱۳۸٤) حکایت از ابتلاء حداکثری تا ۲٤٪ در نشخوارکنندگان به روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی می‌کند. با توجه به نتایج واکنش سرمی سایر نقاط ایران ابتلاء سرمی در گاوهای ارومیه برخلاف گوسفند و بز نسبتاً بالا است.

لپتوسپیراهای غالب در بزهای ارومیه پومونا و گریپوتیفوزا بوده که هماهنگ با یافته‌های محققان بوده که برای اولین بار در ایران گریپوتیفوزا، پومونا و ایکتروهموراژیه را ذکر نموده اند. در مطالعات ثبت شده در نواحی مختلف ایران سروارهای غالب گریپوتیفوزا (شعاعی، ۱۳۷۳)، پومونا (حسن پور و همکاران ۱۳۸٦)، ایکتروهموراژیه (عبداله پور و راد ۱۳٦۸، وند یوسفی و همکاران ۱۳۷۹) و کانیکولا (نصر اصفهانی ۱۳۸۲) بودند. از آنجائی که جوندگان به عنوان میزبان نگه-دارنده و مخزن گریپوتیفوزا شناخته شده‌اند، لذا نقش جوندگان در انتقال عامل به نشخوارکنندگان حیاتی بوده و بایستی مبنای برنامه‌های کنترلی لپتوسپیرا منظور گردد (واحدی نوری و همکاران ۱۳۸۱). مشاهده ایکتروهموراژیه با گریپوتیفوزا در شیراز (مشایخی ۱۳۷۹) و مشهد (طالب خان گروسی و همکاران ۱۳۸۲) نشانگر اهمیت جوندگان به همراه عوامل دیگری خواهد بود. ابتلاء همزمان دو و بیش از دو لپتوسپیرا در اکثر گزارشات مانند این مطالعه مشهود است (حاجی حاجیکلایی و همکاران ۱۳۸٤). مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با سایر مطالعات ایران نشان می‌دهد که درصد ابتلاء سرمی هر یک از سرواروها و سروار غالب در مناطق مختلف کشور و در طی سال های متفاوت متغیر بوده است. گرچه فراوانی سرواروهای پومونا وگریپوتیفوزا در مطالعه حاضر بیشتر بوده اما از نظر آماری بین این دو سروار اختلاف معنی دار نبود.

اگرچه در این مطالعه ۲۳/۹٪ بزهای نر و ۱۳/٦٪ ماده‌ها واکنش سرمی مثبت به لپتوسپیرا را نشان دادند اما تفاوت معنی‌دار نبوده و هر دو جنس به لپتوسپیرا حساس هستند. نتایج مشابه در گاو و گوسفند نیز ذکر شده است (رامین و همکاران ۱۳۹۲). در صورتی‌که اختلاف سنی در ابتلاء سرمی در بین بزها وجود داشته و بطوری‌که سنین ۲ و ۳ سال بیشترین ابتلا را در ماده‌ها نشان دادند. این یافته منطبق بر گزارشات موجود در نشخوارکنندگان بزرگ مانند تلیسه‌ها است (طالب خان گروسی و همکاران ۱۳۸۲). در مقایسه فراوانی سرواروها، پومونا در ارومیه غالب بر دیگر لپتوسپیراها بوده که با گزارشات رادوستیتس و همکاران (۲۰۰۷) و (لوت ۲۰۰۱) مطابقت داشته اما با نتایج آلئنسو و همکاران (۲۰۰۱) و گیتیان و همکاران (۲۰۰۱) که سروار غیر از پومونا را مطرح کرده‌اند مغایرت دارد. در شرایط ایران سروار غالب ایکترهموراژیه بوده (واحدی نوری و همکاران ۱۳۸۱، طالب خان گروسی و همکاران ۱۳۸۲) که با سروار غالب در ارومیه کاملاً متفاوت است. مطالعات قبلی نشان می دهد که در گذشته سروار غالب در ارومیه

گریپوتیفوزا بوده که در طی ۱۵ سال گذشته به پومونا تغییر یافته است (زینالی و همکاران ۱۳۷۹).

در بین واکنش سرمی به لپتوسپیرا، ٤٤٪ بزها به یک، ٥٢٪ به دو و ٤/١١٪ به پنج سرووار مثبت بودند. این نتایج برای سایر نشخوارکنندگان به ترتیب ٧٠/٩٪، ٢٠٪ و ٩/١٪ (حسن پور و همکاران، ١٣٨٦)، ٦٦/٧٪، ٣٠/٨٪ و ٢/٥٪ (گلی،١٣٨٠)، ٥٠٪، ٤٢/٣٪ و ٥/٨٪ (زینالی و همکاران، ١٣٧٩)، ٧٩/٢٪، ١٤/٤٪ و ٦/٣٪ (مشایخی، ١٣٧٩) گزارش شده است. سایر گزارشات با بیش از یک سرووار بوفور بوده که می‌توان گفت آلودگی همزمان به سرووارهای لپتوسپیروز جامعیت دارد (نصر اصفهانی ١٣٨٢، حاجی حاجیکلایی و همکاران ١٣٨٤). تنها مطالعه با ٥ سرووار گزارش شده علاوه بر این مطالعه متعلق به اهواز است (حاجی حاجیکلایی و همکاران ١٣٨٤). در این مطالعه بیشترین فراوانی مربوط به سرووارهای لپتوسپیرا با رقت ١:١٠٠ و سپس ١:٢٠٠ بوده که در مقایسه با نتایج مطالعات دیگران در گوسفند (رقت ١:٤٠٠، قهرمانی ١٣٨٩) و گاو (رقت ١:٤٠٠، حسن پور و همکاران ١٣٨٣، رقت١:٨٠٠ تا ١:١٦٠٠، سخائی و همکاران ١٣٨٦) نشان می‌دهد که نسبت به سایر مناطق کشور حدت آلودگی در ارومیه نسبتاً ضعیف است.

در حال حاضر با ارزش‌ترین و قابل اعتمادترین روش تشخیص سرمی لپتوسپیرا در دام‌ها روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی است (برکوویچ و همکاران ١٩٩٩، بیسوال و همکاران ٢٠٠٠ و پر و همکاران ٢٠٠٥). این روش در صورتی‌که سرووارهای لپتوسپیرای زنده در آزمایشگاه‌ها موجود باشند، روشی مطلوب بوده و می‌تواند کارآیی خوبی داشته باشد هم‌چنانکه در این مطالعه استفاده گردید. در غیر اینصورت جایگزین‌های مناسب الیزا (کازینس و مکاران ١٩٩١)، واکنش زنجیره پلی‌مریزاسیون (ستینکایا و همکاران ٢٠٠٠، ویتاله و همکاران ٢٠٠٥) و فلورسنت آنتی‌بادی (راجیو و همکاران ٢٠١٠) می‌باشند. در یک آلودگی تجربی با لپتوسپیراها تشخیص سرمی گوساله-ها توسط الیزا ٢٥ روز پس از آلودگی میسر بوده ولی در روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی ١٥ روز بوده که از امتیازات این روش نسبت به روش‌های دیگر است (برکویچ و همکاران ١٩٩٩). عده‌ای از محققان برای تشخیص و غربالگری بیماری از آزمایش همزمان آگلوتیناسیئن میکروسکوپی و زنجیره پلی مریزاسیون نام می‌برند (لیلنبام و همکاران ٢٠٠٨ و ٢٠٠٩ و شیوارا و همکاران ٢٠٠٩).

در خاتمه می‌توان گفت که واکنش سرمی مثبت به لپتوسپبرا در بزهای ارومیه تائید می‌شود. لپتوسپیراهای غالب ایکترهمراژیه و پومونا بوده که عیار سرمی غالب ١:١٠٠ است. ابتلاء به چند آنتی‌ژن لپتوسپبرا امکان‌پذیر است. جنس در ابتلا به لپتوسپیرا موثر نبوده، ولی ابتلا دو تا سه سال چشمگیر است. در نهایت لپتوسپیروز در بز مانند گاو، گاومیش و گوسفندبه عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده و نیازمند اتخاذ اقدامات پیشگیرانه در راستای ارتقاء بهداشت همگانی است.

منابع مورد استفاده

حاجی حاجیکلایی مر، قربانپور نجف آبادی م و عبدالله پور غ، ١٣٨٤. بررسی سرولوژیکی لپتوسپیروز در گاوهای اهواز .مجله دانشکده دامپزشکی دا نشگاه تهران، شماره ١، دوره ٦٠ ، صفحات ١٤-٧.

حسنپور ع، فرتاش وند م، عبداله پور غ، مقدم غ، نادعلیان محمدقلی و ستاری سعید، ١٣٨٦. تعیین میزان شیوع سرولوژیک آلودگی به لپتوسپیرا در گاوهای شیری اطراف تبریز. پژوهش و سازندگی، شماره ٧٤، صفحات ٧٧-٦٧.

رامین عق، عبداله پور غ، عزیززاده ف، قهرمانی پ، مسعودی ا، رامین س، ١٣٩٢. جستجوی پادتن های ضد لپتوسپیرا درسرم خون گاوها و گوسفندهای ارومیه. مجله دامپزشکی ایران. در حال انتشار.

زینالی ع، وندیوسفی ج، اهورایی پ، آذروندی ع، بهکام و جعفری م، ۱۳۷۹. مطالعه اشکال بالینی، سرولوژیکی و پاتولوژیکی لپتوسپیروز در گاو،گوسفند و بز در کانونهای آلوده شهرستان ارومیه. انتشارات شرکت جهاد تحقیقات و آموزش. دوره ۷، صفحات ۲۱-۱٤.

سخائی ا، عبدالله پور غ، بلورچی م، حسنی طباطبایی ع، ستاری تبریزی س، ۱۳۸٦. تشخیص سرولوژیک و باکتریولوژیک لپتوسپیروز در گاوداری های شیری اطراف تهران. مجله تحقیقات دامپزشکی دانشگاه شیراز، شماره ۲۱، صفحات ۳۳۱-۳۲۵.

شعاعی، س(۱۳۷۳) بررسی سرواپیدمیولوژی آلود گی لپتوسپیرایی گاوان استان آذربایجان شرقی. پایان نامه جهت دریافت دکترای عمومی دامپزشکی، دا نشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، شماره پایان نامه ۲۰.

طالب خان گروسی م، وندیوسفی ج، فامیل قدکچی هو نوروزیان، ا، ۱۳۸۲. بررسی سرواپیدمیولوژی آلودگی لپتوسپیرایی در کارکنان و گله های گاو شیری دا مپروریهای اطراف مشهد. مجله دانشکده دامپزشکی تهران، دوره ۵۸ ، شماره ۱ صفحات ۸۹-۹٤.

عبدالله پورغ و راد م ع، ۱۳٦۸. سمینار بیماریهای قابل انتقال بین انسان و دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران صفحات ۲۳-۲۸ .

قهرمانی پ ، ۱۳۸۹. جستجوی سرولوژیک لپتوسپیراها به روش MAT در گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه ارومیه. پایان نامه جهت دریافت دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه .شماره پایان نامه ۱۱۳٤.

گلی غ،۱۳۸۰. بررسی سرواپیدمیولوژی لپتوسپیروز در دا مپروریهای شهرستان کرج. پایان نامه جهت دریافت دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران .شماره پایان نامه ۲۸٦۲.

محرمی م، ۱۳٦۹ .بررسی سرواپیدمیولوژی لپتوسپیروز در دامپروریهای اطراف تهران. پایان نامه جهت دریافت دکترای عمومی دامپزشکی، دا نشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره پایان نامه ۱۹۲۸.

مشایخی ط، ۱۳۷۹. بررسی سرواپیدمیولوژیکی لپتوسپیروز در گاوداریهای اطراف شیراز .پایان نامه جهت دریافت دکترای عمومی دامپزشکی، دا نشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شماره پایان نامه ۷۵۹.

نصراصفهانی ز ، ۱۳۸۲. بررسی تیتر آنتی بادی ضد لپتوسپیرا در گاوهای شهر کرد. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۸ ، شماره ۲، صفحات ۱۳۷-۱۳۳.

نصیری ر، ۱۳۸۲ ارزیابی سرولوژیک میزان آلودگی به لپتوسپیرا در گاوان منطقه ارومیه به روش الیزا. پایان نامه جهت دریافت دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه ارومیه، شماره پایان نامه: ۷٦۳.

واحدی نوری ن، وندیوسفی ج و خرسند ن، ۱۳۸۱. مطالعه شیوع پادتن های*Leptospira interrogans* در گله های گاو مشکوک استان مازندران. پژوهش و سازندگی، دوره ۱۵ ، شماره ۱، صفحات ۱۵-۱۳.

وندیوسفی ج، اهورایی پ، مرادیبیدهندی س، عاملی م و اکبرزاده ج، (۱۳۷۹. بررسی لپتوسپیروز گاو و گوسفند و شناسایی کانونهای آلوده به بیماری درمناطق مشکوک ایران .انتشارات شرکت جهاد تحقیقات و آموزش.

هنرمند ح ر، اشراقی س، خرمی‌زاده م ر، منصور قناعی ف، فلاح م ص، رضوانی م و عبداله‌پور غ، ۱۳۸٤. بررسی انتشار موارد مثبت لپتوسپیروزدر استان گیلان به روش الایزا. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره ۱٤، شماره ٥٤، صفحات ٦٥-٥۹.

Alonso-Andicoberry C, García-Peña F J, Pereira-Bueno J, Costas E and Ortega-Mora LM, 2001. Herd-level risk factors associated with Leptospira spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. Prev Vet Med 52:109–117.

Bercovich Z, Taaijke R and Bakhout AB, 1990. Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring leptospira hardjo infectious in cattle. Vet Microbiol 21: 255-262.

Biswal BC, Ratnam KC, Sureshbabu and Natarajaseenivasan K, 2000. Evidence of Antibodies to Leptospira among Farm cattle and Farm workers in Orissa State. Indian Vet J 77**:** 622-623.

Çetinkaya B, Ertaş HB, Öngör H and Muz A, 2000. Detection of Leptospira species by Polymerase Chain Reaction (PCR) in urine of cattle. Turkish J Vet Anim Sci 24:123-130.

Cousins DV, Robertson GM, Parkinson J and Richards RB, 1991. Use of the enzyme linked immuno-aborbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to Leptospira interrogans Serovar hardjo in pregnant ewes. Zentralbl Bakteriology 275:335-342.

Ellis WA, 1984. Bovine leptospirosis in the tropics: Prevalence, pathogenesis and control. Pre Vet Med 2: 411-423.

Faine S, Adler B, Bolin C and Perolat P, 1999. *Leptospira and* Leptospirosis, Second Edition, Med Sci Writing PP: 249-273 (Armadale Vic, Australia).

Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Pinto Ferreira AG, Riley LW, Reis MG, Haake DA and Ko AI, 2001. Evaluation of Recombinant Leptospira Antigen-Based ELISA for the serodiagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 39: 3303–3310.

Guitian FJ, Garcia-Pena FJ, Oliveira J and Sanjuan ML, 2001. Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. Vet Microbiol 80:275-284.

Levett PN, 2001. Leptospirosis. J Clin Microbiol Rev 14: 296–326.

Levett PN and Haake DA, 2009. Leptospira species (Leptospirosis), In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandel G L, Bennett J E, Raphael D, 7th Edn PP: 2789-2795 (Philadelphia Elsevier Churchill Livingston).

Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ and Vasconcellos SA, 2009. Identification of Leptospira spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. Res Vet Sci 87: 16-19.

McBride AJ, Athanazio DA, Reis M G and Ko AI, 2005. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 18: 376–386.

Nally E, Chow JE, Fishbein C\M, Blanco RD and Lovett AM, 2005. Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infections. Inf Immun 73: 3251–3260.

Perret PC, Abarca VK, Dabanch J, Solari GV, García CP, Carrasco LS, Olivares CR and Avalos P, 2005. Risk factors and frequency of positive antibodies for leptospirosis in a sub urban population near Santiago. Revista Medica de Chile 133: 426-431.

Radostits OM, Gay CC and Hinchcliff KW, 2007. Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats. 10th Edn PP: 1094-1110 (Philadelphia, Saunders).

Rajeev S, Berghaus RD, Overton MW, Pence ME and Baldwin CA, 2010. Comparison of fluorescent antibody and microscopic agglutination testing for Leptospira in pregnant and non-pregnant cows. J Vet Diag Inv 22: 51-54.

Shivara V, Sanjukta RD, Sripad K, Chandranaik BM, Renukaprasad C, 2009. Leptospriosis in sheep and its diagnosis. Vet World 2: 263-264.

Vitale M, Vitale F, Di Marco V, Currò V, Vesco G and Caracappa S, 2005. Polymerase chain reaction method for leptospirosis, analysis on samples from an autochthon swine population in Sicily, Italy. Revista Cubana de Medicina Tropical 57: 25-27.

World Health Organization, 1999. Leptospirosis worldwide. Weekly Epidemiol Rec 74: 237–242.

Serological evaluation of leptospira serotypes using microscopic agglutination test in Urmia goats

Gh Abdollahpour[1], A Ramin[2] and Y Khalili[3]

Received: August 06, 2013 Accepted: October 09, 2013
[1]Associate Professor, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[2]Professor, Faculty of Veterinary, University of Urmia, Urmia, Iran
[3]Veterinary Graduated, Faculty of Veterinary, University of Urmia, Urmia, Iran
[*]Corresponding author: Email: Ali_ramin75@yahoo.com

Abstract

The serological frequency to leptospira serovars was studied in 130 goats in Urmia, Iran, 2012. Blood was collected from goats and sera were separated to evaluate serological reaction to leptospira serovars by Microscopic Agglutination Test (MAT) using live antigens representing *Leptospira interrogans* serogroups: grippotyphosa, icterrohaemoragia, canicula, hardjo, ballum and pomona. From 130 serum tested to leptospira 25 samples (19.2%) including 17 males (13.1%) and 8 females (6.1%) had positive reaction to one of the *Leptospira interrogans* serovars. The most leptospira serovars were pomona (50%), grippotyphosa (40.5%), hardjo (4.75%), icterohaemorrhagiae (2.38%) and canicula (2.38%). The most serological titer for 1:100 was found in 13 (30.9%) cases for pomona, 14 (33.3%) grippotyphosa, and titer 1:200 for Pomona was 8 (19.1%), grippotyphosa 3 (7.17%), hardjo 2 (4.75%), and icterohaemorrhagiae and canicula 1 (2.38%) case. Goats with positive reaction showed against one, two and 5 leptospira serovars were 11 (44%), 13 (52%), and 1 (4%) animals, respectively. Age frequency and percentages in seropositive to overall goats with 1, 2, 3, 4 and 4< years old were 4 (16%), 8 (32%), 7 (28%), 3 (12%) and 3 (12%), for males were 2 (8%), 7 (28%), 5 (20%), 2 (8%), 1 (4%), and females were 2 (8%), 1 (4%), 2 (8%), 1(4%), 2 (8%), respectively. The age comparison of the serovars' distribution in males and females showed significant differences (X=3.76, df=4, P<0.01) in two and three years old for both genders emphasis on female goats. In this study 23.9% of males and 13.6% of females revealed seropositive to leptospira in which there was not significant different between males and females. The comparison of the serovars' distribution for pomona, grippotyphosa, hardjo, canicula and icterhemorrhagia showed significant differences which pomona and grippotyphosa were the predominant among leptospira serovars. It is concluded that the leptospira serovars are detectable in Urmia goats in that the most ones are pomona and grippotyphosa. The presence of one, two or multi serovars is possible and the most ones is pomona. The most general titer was 1:100 and there was no gender difference but the age distribution was from 2 to 3 years old. Therefore, leptospirosis as a zoonotic disease must be considered as an emerging disease and attempt should be paid to reduce the risk of public health.

Keywords: Leptospira, Serological reaction, Goats, MAT, Pomona, Grippotyphosa