

بررسی شیوع سرمی آلودگی به سرووارهای مختلف لپتوسپیرو در میان شالیکاران ویسیان استان لرستان

سجاد باباخانی^۱، شهرام ملکی^{۲*}، مهدیه بهاروند^۳، غلامرضا عبدالله پور^۴

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر، اشکذر، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران.

۴- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

یافته / دوره هجدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۵ / مسلسل ۶۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۵/۲/۵ پذیرش مقاله: ۹۵/۳/۲۹

*** مقدمه:** لپتوسپیرو متعلق به راسته اسپروکت‌ها است که موجب بیماری لپتوسپیروز می‌شود. لپتوسپیروز یک بیماری عفونی مشترک میان انسان و دام با علائم بالینی بسیار متغیر است. هدف مطالعه تعیین شیوع سرمی سرووارهای مختلف لپتوسپیرو در میان شالیکاران ویسیان در استان لرستان بوده است.

*** مواد و روش‌ها:** ۲۰۰ شالیکار ویسیان (مرد و زن) به صورت تصادفی در بهار ۱۳۹۳ نمونه‌گیری (نمونه خون) شدند. نمونه‌های خون به آزمایشگاه منتقل و سرم آن‌ها جدا شد، سرم‌ها تا زمان انجام تست میکروآگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های سرمی به روش MAT مورد بررسی قرار گرفتند. تیتراژی سرم‌ها با رقت سازی ۱:۲۰۰، ۱:۴۰۰ و ۱:۸۰۰ تعیین گردید.

*** یافته‌ها:** از مجموع ۲۰۰ نمونه سرمی مورد آزمایش، ۶۰ نمونه (۳۰٪) عیار مثبت سرمی ۱:۱۰۰ ($\geq 1:100$) را نشان دادند. از میان ۶۰ نمونه سرمی مثبت، ۳۸ نمونه (۶۳/۳۳٪) با سرووار گریپوتیفوزا و ۲۲ نمونه (۳۶/۶۷٪) با سرووار کانیکولا واکنش مثبت نشان دادند. میزان عفونت در مردان ۶۵٪ و در زنان ۳۵٪ بود. از نظر آماری میان جنسیت و نتایج حاصل از آزمایش MAT ارتباط معنی داری ($p=0/02$) وجود دارد. بیشترین و کمترین موارد مثبت به ترتیب در گروه سنی بالای ۵۰ سال و ۲۱-۳۰ سال قرار داشتند.

*** بحث و نتیجه‌گیری:** لپتوسپیروز در میان شالیکاران یک بیماری شایع است و در منطقه ویسیان با توجه به شالیکاری به روش سنتی به عنوان یک بیماری عفونی مهم مطرح می‌گردد؛ لذا برای کنترل و پیشگیری از این بیماری باید اقدامات بهداشتی و ایمنی گسترش یابد. همچنین با بکارگیری روش‌های مکانیزه کشاورزی تا حدود زیادی از شیوع لپتوسپیروز در این منطقه جلوگیری می‌شود.

*** واژه‌های کلیدی:** لپتوسپیروز، MAT، لپتوسپیرو، ویسیان، لرستان.

* آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی.

پست الکترونیک: dr_shahram.maleki@yahoo.com

مقدمه

لپتوسپیرو در شاخه اسپروکت‌ها قرار دارد (۱،۲) و شامل گونه‌های بیماریزا، حد واسط و غیر بیماریزا است که گونه‌های غیر بیماریزا در محیط زیست یافت می‌شوند و گونه‌های بیماریزا ایجاد کننده عفونت در حیوانات هستند (۲). لپتوسپیروها مارپیچی شکل، نازک، کند رشد، گرم منفی، هوازی و با انتهای قلاب مانند هستند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد بهینه دارند (۲،۳).

لپتوسپیروز یک بیماری مشترک بین انسان و دام و شبیه آنفلوآنزا است که به وسیله جنس لپتوسپیرو ایجاد می‌شود. لپتوسپیروز در مناطق گرمسیری به دلیل مهیا بودن شرایط برای انتقال، بیشتر دیده می‌شود (۴). این بیماری به دلیل شناسایی در سال‌های اخیر به عنوان یک بیماری خطرناک و تهدیدی برای بهداشت جهانی معرفی شده است، به طوری که با بیش از ۵۰۰۰۰۰ گزارش در سال تا میزان زیادی موجب مرگ و میر بوده است (۴،۵).

کلونیزاسیون گونه‌های بیماریزای لپتوسپیرو در لوله‌های پروگزیمال کلیه حیوانات میزبان، موجب ایجاد منبع عفونت می‌شود و تماس با ادرار حیوانات عفونی باعث انتقال بیماری به انسان می‌شود (۴،۵). با اینکه لپتوسپیرو از بیشتر پستانداران جدا شده اما میزبان‌های اصلی این باکتری گاو، خوک، سگ و موش هستند (۶). لپتوسپیروز در محیط از طریق تماس با خاک و آب آلوده به انسان منتقل می‌شود (۷). احتمال انتقال لپتوسپیروز به انسان در فصل‌های گرم و بارانی به خصوص پس از جاری شدن سیل زیاد است (۶،۸).

بیماری لپتوسپیروز دارای دو مرحله است؛ در هفته اول، پس از ظهور علائم در بدن بیمار آنتی‌بادی ساخته می‌شود که در ادرار قابل مشاهده است. پس از چند روز بیمار دچار تب و لرز، سردرد، درد عضلانی، استفراغ و اسهال می‌شود که معمولاً با بهبودی همراه است. بیماری

در حالت‌های شدید، کلیه و ریه را نیز درگیر می‌کند و موجب مرگ می‌شود (۷).

اخیراً مشخص شده است که لپتوسپیرو می‌تواند تا مدت زیادی در بافت‌های مختلف بدن باقی بماند و این موضوع نشان می‌دهد که انسان نیز می‌تواند به عنوان میزبان عمل کند (۸). بیماری لپتوسپیروز شامل دو شکل آنیکتریک و ایکتریک است. لپتوسپیروز آنیکتریک شکل خفیف و تحت بالینی با علائمی مانند سردرد، تب و لرز، درد عضلانی است. لپتوسپیروز ایکتریک شکل شدید بیماری است که علامت آن زردی شدید است و در نهایت منجر به مرگ می‌شود (۹).

زمین‌های کشاورزی مانند کشتزارهای برنج مکان‌های مناسبی برای تولید و مثل جوندگانی مانند موش است و در نتیجه موش آلوده به لپتوسپیروز می‌تواند بیماری را به کارگران مزارع برنج انتقال دهد (۱۰).

بر اساس تجزیه و تحلیل DNA جنس لپتوسپیرو دارای نه گونه بیماریزا به نام‌های *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchi*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. alexanderi*, *L. alstonii* and *L. alstonii kmetyi* است، البته هنوز بیماریزایی دو گونه *L. alstonii* and *L. kmetyi* به طور قطعی مشخص نیست (۱۱،۱۲). برخی از گونه‌های حد واسط لپتوسپیرو عبارتند از: *L. broomii*, *L. licherasiae*, and *L. wolffii*. گونه‌های غیر بیماریزای لپتوسپیرو بر اساس تقسیم‌بندی فیلوژنیک 16srRNA شامل *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. terpstrae*, *L. vanthiellii*, *L. wolbachii*, and *L. yanagawae* هستند (۱۲).

هر گونه بیماریزای لپتوسپیرو دارای تعدادی سرگروپ هستند و هر سرگروپ به نوبه خود مشخص کننده یک سرووار است. لپتوسپیرو استرالیس، لپتوسپیرو اتومنالیس، لپتوسپیرو کانیکولا، لپتوسپیرو گریپوتیفوزا، لپتوسپیرو ایکتریهموراژیه، لپتوسپیرو هارجو، لپتوسپیرو

پومونا، لپتوسپیرو جاوانیکا، لپتوسپیرو پامانا و لپتوسپیرو پیروجنز تعدادی از سرووارهای لپتوسپیرو هستند (۹،۱۳). برای تشخیص لپتوسپیرو از روش‌هایی مانند کشت، IFA، ELISA، MAT و PCR استفاده می‌شود (۱۳،۱۴). آزمون استاندارد طلایی برای تشخیص لپتوسپیرو Microscopic Agglutination Test (MAT) است که کاربرد گسترده‌ای دارد. MAT یک روش بسیار مفید برای اثبات وجود آنتی‌بادی در سرم افراد در دوران حاد بیماری و دوران نقاهت است (۱۵). هدف ما در این مطالعه بررسی شیوع سرمی آلودگی به سرووارهای لپتوسپیرو در بین شالیکاران ویسیان واقع در شهرستان خرم‌آباد در استان لرستان (غرب ایران) به روش MAT بوده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه در بهار سال ۱۳۹۳ (اردیبهشت) با مراجعه به درمانگاه ویسیان از ۲۰۰ نفر از شالیکاران به صورت تصادفی از افراد سالم و کسانی که در حال حاضر و یا قبلاً علائمی نزدیک به بیماری لپتوسپیروز داشتند (علائمی شبیه به آنفلوآنزا) نمونه خون به حجم ۵cc گرفته شد. پس از نمونه‌گیری خون با استفاده از سرنگ و لوازم استریل، نمونه‌های خون به آزمایشگاه انتقال داده شدند و تا صبح روز بعد در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند. صبح روز بعد نمونه‌ها با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم آن‌ها جدا گردید و به میکروتیوب‌هایی که از قبل کدگذاری شده بودند انتقال یافت. میکروتیوب‌های حاوی سرم برای نگهداری طولانی مدت تا زمان آزمایش در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سرم‌ها (با حفظ شرایط انجماد) برای انجام آزمایش MAT به آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز واقع در بیمارستان آموزشی-پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران واقع در مردآباد کرج منتقل شدند.

برای انجام آزمایش تمام نمونه‌های سرم جمع‌آوری شده با آزمایش MAT مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور چند ساعت قبل از شروع آزمایش، میکروتیوب‌های حاوی نمونه‌های سرم خون از فریزر خارج و در دمای آزمایشگاه قرار می‌گرفتند تا به تدریج ذوب شده و به دمای محیط برسند.

با توجه به نتایج مطالعات سرولوژیک که در گذشته در ایران انجام شده و به‌منظور صرفه جویی در مصرف محیط کشت و نیز تسریع در انجام آزمایش، در بررسی حاضر از شش سروتیپ مختلف لپتوسپیروهای شایع در ایران به نام‌های پومونا، هارجو، گریپوتیفوزا، ایکتروهموراژیه، کانیکولا و استرالیس استفاده شد.

بر اساس پیشنهاد سازمان بهداشت جهانی (WHO) از کشت‌های خالص و عاری از آلودگی ثانویه ۷ تا ۱۰ روزه لپتوسپیرو به مقدار لازم از محیط کشت مایع -GRA-SINA برداشته و به ظروف میکروتیوب منتقل شد. با توجه به خطر انتقال بیماری به انسان و نیز به‌منظور جلوگیری از آلودگی محیط کشت، تمامی مراحل فوق در شرایط کاملاً بهداشتی و در زیر هود میکروبیولوژی که جزء تجهیزات آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز بود، انجام شد. در ضمن تراکم باکتری در نمونه‌ای که از محیط مایع برداشت می‌شد به کمک میکروسکوپ زمینه تاریک مورد ارزیابی قرار می‌گرفت و چنانچه تراکم آن بیش از حد استاندارد (2×10^8 Cells/ml) بود، به آن مقداری محلول رقیق کننده استریل (PBS) با $pH = 7.2$ اضافه می‌شد تا به حد استاندارد برسد.

برای انجام آزمایش ابتدا ۹۸۰ میکرولیتر از محلول PBS به ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه سرمی اضافه شد و رقت ۱:۵۰ از هر نمونه به دست آمد. سپس در هر یک از هشت مربع ایجاد شده بر روی لامی که از قبل آماده شده، به‌طور جداگانه، ۱۰ میکرولیتر آنتی‌ژن و ۱۰ میکرولیتر سرم مورد آزمایش را قرار داده و با هم مخلوط می‌کنیم و

برای تجزیه و تحلیل نتایج از روش SPSS استفاده شد. برای تعیین ارتباط بین نمونه‌های مثبت و جنسیت، داده‌ها به وسیله آزمون مربع کای تجزیه و تحلیل شدند (ضریب اطمینان ۰/۹۵). تفاوت معنادار آماری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) جهت ردیابی آنتی بادی علیه شش سرووار مختلف لپتوسپیرو حاکی از آن بود که از مجموع ۲۰۰ نمونه خون مورد آزمایش، ۶۰ نمونه (۳۰٪) عیار مثبت سرمی برابر یا بیشتر از ۱:۱۰۰ را نشان دادند. بر اساس نتایج حاصله از مجموع ۶۰ نمونه مثبت سرمی، تعداد ۳۶ نمونه (۶۰٪) عیار ۱:۱۰۰، تعداد ۱۴ نمونه (۲۳/۳۳٪) عیار ۱:۲۰۰، تعداد ۷ نمونه (۱۱/۶۷٪) عیار ۱:۴۰۰ و تعداد ۳ نمونه (۵٪) عیار ۱:۸۰۰ را نشان دادند. عیار ۱:۱۰۰ و ۱:۸۰۰ به ترتیب بیشترین و کمترین عیارهای مشاهده شده بودند (جدول ۱).

بررسی تنوع سرووارهای نمونه‌های سرمی مورد مطالعه نشان داد که از میان شش سرووار مورد آزمایش در روش MAT تنها دو سرووار با نمونه‌های سرمی مورد مطالعه واکنش مثبت نشان دادند که بالاترین شیوع را سرووار گریپوتیفوزا با ۳۸ مورد (۶۳/۳۳٪) و کمترین شیوع را سرووار کانیکولا با ۲۲ مورد (۳۶/۶۷٪) نشان دادند (جدول ۲). به‌طور کلی از ۶۰ نمونه مثبت لپتوسپیرو، ۲۴ نمونه در رقت‌های بالای ۱:۱۰۰ مثبت شدند. در میان ۲۴ نمونه مثبت، فراوانی سرووار گریپوتیفوزا در رقت‌های ۱:۲۰۰، ۱:۴۰۰ و ۱:۸۰۰ به ترتیب ۱۰ مورد (۴۱/۶۷٪)، ۵ مورد (۲۰/۸۳٪) و ۲ مورد (۸/۳۳٪) و فراوانی سرووار کانیکولا نیز به ترتیب ۴ مورد (۱۶/۶۷٪)، ۲ مورد (۳۳/۳۳٪) و ۱ مورد (۴/۱۷٪) بود (شکل ۱).

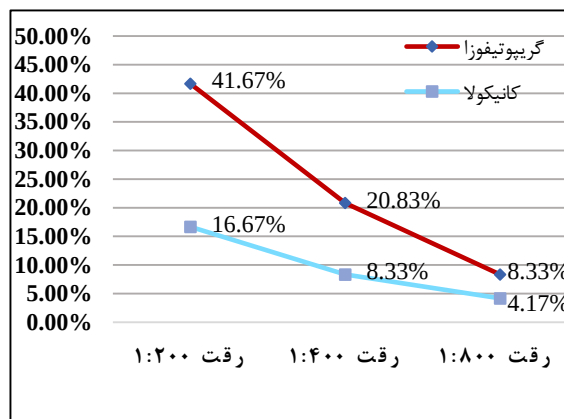
رقت نهایی آن به ۱:۱۰۰ می‌رسد (حداقل رقت استفاده شده در آزمایش ۱:۱۰۰ بود). پس از مخلوط کردن هر هشت نمونه سرمی با آنتی ژن به‌طور جداگانه بر روی لام، به‌منظور جلوگیری از خشک شدن مخلوط آنتی ژن-آنتی بادی، فوراً لام در داخل بوآت که در کف آن کاغذ جاذب الرطوبه قرار گرفته و از قبل با آب مقطر خیسانده شده، بر روی پایه‌های شیشه‌ای قرار داده شده و درب بوآت بسته می‌شد و در گرمخانه (انکوباتور) ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار می‌گرفت.

در هر روز از آزمایش جهت کنترل صحت آزمایش سه نوع کنترل، کنترل منفی (حاوی ۱۰ میکرولیتر آنتی ژن و ۱۰ میکرولیتر سرم کاملاً منفی)، کنترل مثبت (حاوی ۱۰ میکرولیتر آنتی ژن و ۱۰ میکرولیتر سرم مثبت) و کنترل آنتی ژن که به‌منظور کنترل آگلوتیناسیون خود به خودی در آن به‌جای سرم از PBS استفاده شده است، تهیه می‌شد. پس از سپری شدن زمان لازم، بوآت‌ها را از گرمخانه خارج کرده و پس از برداشتن لام، سطح زیرین آن را توسط پارچه‌ای تمیز، خشک نموده و به‌منظور ارزیابی و درجه بندی میزان آگلوتیناسیون در هر نمونه، لام با استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک با بزرگنمایی ۱۰۰× مورد بررسی قرار می‌گرفت. برای تعیین میزان آگلوتیناسیون از دستورالعمل WHO استفاده گردید، بنابراین نمونه‌هایی که پایین‌تر از ۵۰٪ آگلوتیناسیون را نشان دادند، منفی و بالاتر از ۵۰٪ مثبت در نظر گرفته شدند (۱۳).

در پایان به‌منظور تعیین تیترا نهایی سرم‌هایی که در مرحله اول با رقت ۱:۱۰۰ مثبت شدند، با استفاده از 2-fold dilution (دو برابر سازی) رقت‌های ۱:۲۰۰، ۱:۴۰۰، ۱:۸۰۰ و ۱:۱۶۰۰ سرم‌ها تهیه گردید و به روش قبل مورد آزمایش قرار گرفتند. بالاترین رقتی که نشان‌دهنده حداقل ۵۰٪ آگلوتیناسیون با یک یا چند سرووار بود به‌عنوان تیترا نهایی آنتی بادی در نمونه سرمی مثبت در نظر گرفته شد.

واکنش متقاطع) که در این حالت سروواری که بالاترین عیار را نشان داد به عنوان سروواری اصلی در نظر گرفته شد. در خصوص نتایج حاصل از توزیع سنی افراد سرم مثبت، بیشترین موارد مثبت در گروه سنی بالای ۵۰ سال و کمترین موارد مثبت در گروه سنی ۲۱-۳۰ سال قرار داشتند. فراوانی موارد مثبت در گروه‌های سنی مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است.

از ۶۰ نمونه سرمی مثبت، ۳۹ مورد (۶۵٪) مربوط به جنس مذکر و ۲۱ مورد (۳۵٪) مربوط به جنس مؤنث بود. نتایج این تحقیق نشان داد که میان جنسیت و نتایج حاصل از آزمایش MAT از نظر آماری ارتباط معنی داری ($p=0/02$) وجود دارد (جدول ۴).



شکل ۱ نمودار فراوانی سروواریهای گریپوتیفوزا و کانیکولا در میان ۲۴ نمونه سرمی مثبت در رقت‌های بالاتر از ۱:۱۰۰ لازم به توضیح است که از ۶۰ نمونه مثبت، ۲۹ نمونه (۴۸/۳۳٪) با بیش از یک سروواری (سروتیپ) واکنش مثبت نشان دادند (به دلیل ابتلای همزمان بیمار به دو سروواری و یا

جدول ۱. فراوانی آلودگی سرمی به سروواریهای لپتوسپیرو در رقت‌های ۱:۱۰۰ و بالاتر از ۱:۱۰۰

رقت‌های ۱:۱۰۰ و بالاتر از ۱:۱۰۰		
تیترا	تعداد مثبت	%
۱:۱۰۰	۳۶	۶۰/۱۰۰
۱:۲۰۰	۱۴	۲۳/۳۳
۱:۴۰۰	۷	۱۱/۶۷
۱:۸۰۰	۳	۵/۰۰
کل	۶۰	۱۰۰

جدول ۲. فراوانی مطلق و نسبی سروواریهای مختلف لپتوسپیرو در ۶۰ نمونه سرمی مثبت با رقت ۱:۱۰۰

رقت ۱:۱۰۰ MAT		
سرووار	موارد مثبت	%
گریپوتیفوزا	۳۸	۶۳/۳۳
کانیکولا	۲۲	۳۶/۶۷
پومونا	۰	۰
هارجو	۰	۰
ایکتروهموراژیه	۰	۰
استرالیس	۰	۰
مجموع	۶۰	۱۰۰

جدول ۳. تعداد و فراوانی نسبی نتایج مثبت و منفی سرمی در آزمایش MAT در گروه‌های مختلف سنی

گروه سنی	تعداد مثبت (%)	موارد مثبت از کل نمونه‌ها %	تعداد منفی (%)	موارد منفی از کل نمونه‌ها %	کل مثبت و منفی (%)
۲۱-۳۰	۷ (۱۱/۶۷)	۳/۵۰	۳۸ (۲۷/۱۴)	۱۹/۰۰	۴۵ (۲۲/۵۰)
۳۱-۴۰	۱۴ (۲۳/۳۳)	۷/۰۰	۳۹ (۲۷/۸۶)	۱۹/۵۰	۵۳ (۲۶/۵۰)
۴۱-۵۰	۱۸ (۳۰/۰۰)	۹/۰۰	۳۷ (۲۶/۴۳)	۱۸/۵۰	۵۵ (۲۷/۵۰)
> ۵۰	۲۱ (۳۵/۰۰)	۱۰/۵۰	۲۶ (۱۸/۵۷)	۱۳/۰۰	۴۷ (۲۳/۵۰)
کل	۶۰	۳۰/۰۰	۱۴۰	۷۰/۰۰	۲۰۰ (۱۰۰)

جدول ۴. فراوانی مطلق و نسبی نتایج مثبت و منفی سرمی در آزمایش MAT و بررسی ارتباط آن با جنسیت افراد مورد مطالعه

جنسیت	رقت ۱:۱۰۰ MAT		سطح معناداری
	فراوانی موارد مثبت (%)	فراوانی موارد منفی (%)	
مرد	۳۹ (۱۹/۵۰)	۶۱ (۳۰/۵۰)	۱۰۰ (۵۰/۰۰)
زن	۲۱ (۱۰/۵۰)	۷۹ (۳۹/۵۰)	۱۰۰ (۵۰/۰۰)
مجموع	۶۰ (۳۰/۰۰)	۶۰ (۷۰/۰۰)	۲۰۰ (۱۰۰/۰۰)

بحث و نتیجه‌گیری

لپتوسپیروز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در مناطق گرمسیری است که شیوع آن با بارش‌های فراوان باران و جاری شدن سیل مرتبط است. این بیماری توسط جنس *لپتوسپیرو* ایجاد می‌شود و این باکتری می‌تواند به مدت طولانی در آب و خاک با رطوبت بالا زنده بماند (۱۶). لپتوسپیروز در ایران به‌خصوص در شمال کشور یک بیماری شایع است و علائم آن بسیار متغیر هستند به‌طوری که به‌عنوان یک بیماری چند چهره معرفی شده است. تشخیص بالینی این بیماری بدون تست‌های آزمایشگاهی برای پزشکان مشکل است؛ بنابراین استفاده از آزمایش در تشخیص این بیماری بسیار مهم است. در میان آزمایش‌ها، روش MAT از مقبولیت جهانی برخوردار است و یک آزمایش مرجع جهت تشخیص لپتوسپیروز می‌باشد.

در مطالعه حاضر که به روش MAT انجام گرفت، از ۲۰۰ نفر شالیکاران ویسیان، ۶۰ نفر (۳۰٪) دارای آنتی‌بادی علیه دو سرووار *لپتوسپیرو* بودند. از نمونه‌های سرمی مثبت این ۶۰ نفر، ۲۴ نفر آلودگی در تیتراهای ۱:۲۰۰، ۱:۴۰۰ و ۱:۸۰۰ را نشان دادند. در لپتوسپیروز انسانی آلودگی در تیتراهای بالا مانند ۱:۸۰۰ خیلی کم مشاهده می‌شود و نشانه بالا بودن شدت آلودگی است. P value برای سن افراد مورد مطالعه در این تحقیق معنی‌دار بود و نشان داد آلودگی به *لپتوسپیرو* با سن بیماران در ارتباط است.

در مطالعات انجام گرفته در ایران و جهان، شیوع *لپتوسپیرو* بررسی شده است. شیوع *لپتوسپیرو* توسط ابراهیمی

و همکاران (۲۰۰۳) در مناطق غرب و مرکزی ایران، به روش MAT بررسی شده که از ۴۰۰ نمونه مورد آزمایش ۱۹۴ نمونه سرمی مثبت (۴۸/۵٪) گزارش شده است. در مطالعه فوق‌الذکر میزان شیوع سرووارها برای *لپتوسپیرو* هارجو ۱۰۵ مورد (۵۴/۱۲٪)، *لپتوسپیرو پومونا* ۴۰ مورد (۲۰/۶۲٪)، *لپتوسپیرو ایکتره‌مورا* ۲۸ مورد (۱۴/۴۳٪)، *لپتوسپیرو کانیکولا* ۱۹ مورد (۹/۸٪) و *لپتوسپیرو گریپوتیفوزا* ۲ مورد (۱/۰۳٪) بوده است که بیشترین و کمترین شیوع به ترتیب مربوط به سرووار هارجو و *گریپوتیفوزا* بوده است. ضمناً میزان آلودگی در زنان بیشتر از مردان گزارش شده است (۱۷). شیوع بالای *لپتوسپیروز* در زنان عشاير احتمالاً به دلیل انجام کارهای سخت مانند کشاورزی و دامپروری توسط آنان است. میزان شیوع سرووارهای *لپتوسپیرو* در این مطالعه با نتایج ما متفاوت است البته نتایج در این مطالعه و نتایج به دست آمده در بررسی ما نشان‌دهنده شیوع بالای سرووارهای *لپتوسپیرو* است. در مطالعات انجام شده در ایران میزان شیوع سرووار هارجو در بیشتر موارد بالا گزارش شده است اما در مطالعه ما این میزان ۰ است و بیشترین فراوانی مربوط به سرووار *گریپوتیفوزا* است. به هر حال با توجه به نبود بررسی پیشین سرووارهای *لپتوسپیرو* در منطقه ویسیان، نتیجه مطالعه ما حاکی از عدم وجود سرووار هارجو در منطقه ویسیان است.

در مطالعه‌ای که توسط هنرمند و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی ۲۸۲ نفر بیمار مراجعه کننده به بیمارستان‌های دانشگاهی گیلان انجام گرفته، شیوع ۲۴/۶٪ تیترا سرمی مثبت علیه حداقل یک سروتیپ *لپتوسپیرو* گزارش شده است (۱۸). نتایج بدست آمده در

این مطالعه بسیار نزدیک به نتایج بررسی ما می‌باشد. مطالعه‌ای دیگر توزیع گونه‌های لپتوسپیرو در آب‌های سطحی استان گیلان به روش MAT توسط عیسی‌زاده و همکاران (۲۰۰۹) بررسی شده است. از مجموع ۲۲۲ نمونه آب شیرین جمع‌آوری شده، بالاترین شیوع لپتوسپیرو در مزارع برنج با فراوانی ۳۵٪ و کمترین شیوع با ۳۰٪ مربوط به رودخانه‌ها بود (۱۹). با توجه به این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که بررسی میزان شیوع سروواریهای لپتوسپیرو در شالیکاران بسیار ضروری است. شیوع لپتوسپیرو (۳۰٪) در مطالعه ما نیز نشان‌دهنده میزان آلودگی بالا در شالیکاری‌ها است. در بررسی دیگر، میزان شیوع گونه‌های لپتوسپیرو در مزارع برنج شهرستان تنکابن توسط رستم پور (۲۰۱۳) تعیین شد. طبق این گزارش ۱۱۵ نمونه آب، خاک و مدفوع حیوانات از مزارع برنج شهرستان تنکابن جمع‌آوری شد. از ۱۱۵ نمونه، ۳۸ مورد (۳۳/۰۴٪) برای گونه‌های پاتوژن لپتوسپیرو مثبت گزارش شده است که شیوع بالای لپتوسپیرو در مزارع برنج را نشان می‌دهد (۲۰). نتایج این بررسی در تنکابن نزدیک به نتایج مطالعه ما است. مطالعه رستم پور و همکاران در تنکابن نیز دلیلی بر اهمیت بررسی شیوع لپتوسپیرو در مزارع برنج و شالیکاران است.

میزان شیوع لپتوسپیرو در بین کارگران کارخانه‌های برنج در شهر کوچک سالام در شمال هند بررسی شد. از ۳۲۹ نمونه سرمی، ۲۲۵ مورد (۶۸/۳٪) برای لپتوسپیرو مثبت گزارش شده است. این مطالعه نشان داد که بالاترین شیوع لپتوسپیرو در میان کارگران مربوط به سرووار لپتوسپیرو/تومنالیس (۳۴/۹٪) است (۲۱). در این مطالعه شیوع بالای سروواریهای لپتوسپیرو در میان افرادی که کار آن‌ها با برنج در ارتباط است به‌خوبی مشخص شده است؛ البته ممکن است شیوع بالای

لپتوسپیرو در این مطالعه مربوط به رعایت نشدن نکات بهداشتی در کارخانه برنج باشد.

آنگنانی و همکاران (۲۰۰۳) در هند میزان شیوع لپتوسپیرو را در گروه‌های پرخطر بررسی کرده‌اند که از ۲۵ نمونه کشاورزان روستایی، ۸ مورد (۳۲٪) برای لپتوسپیرو مثبت گزارش شدند (۲۲). بروکمن و همکاران در آلمان (۲۰۱۰) نشان دادند که افراد در ورزش‌های آبی (خصوصاً شنا) مستعد ابتلا به لپتوسپیرو هستند و مشخص کردند که بیشترین راه انتقال لپتوسپیرو به این ورزشکاران از طریق زخم است (۲۳).

مطالعه انجام گرفته در کشور فرانسه (۲۰۱۳) نشان می‌دهد که اپیدمی لپتوسپیرو تحت شرایط آب و هوایی مختلف، تغییر می‌کند. همچنین در این بررسی یک شکل شدید هپاتونفریت در شمال فرانسه گزارش شده است که علت آن خوردن آب آلوده به لپتوسپیرو بوده است (۲۴).

می‌توان گفت میزان آلودگی شالیکاران در منطقه ویسیان بالا است و وجود سروواریهای بیماری‌زا/لپتوسپیرو در این منطقه سلامت افراد را تهدید می‌کند. در پایان باید به این نکته اشاره کرد که تمامی مطالعات انجام شده نشان می‌دهند میزان آلودگی به بیماری لپتوسپیرو روز به روز در حال افزایش است لذا انجام تست‌های آزمایشگاهی برای تشخیص صحیح و کنترل میزان شیوع لپتوسپیرو در انسان و حتی دام‌های منطقه ضروری است. ذکر این نکته نیز ضروری است که با اینکه لپتوسپیرو سلامت عمومی را تهدید می‌کند و در کشور ما شیوع پیدا کرده است اما هنوز به‌طور جدی به این بیماری توجه کافی نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که در طول دوران تحصیل همواره در کنار اینجانب بوده‌اند و بنده را در انجام این تحقیق کمک و یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

1. Leon A, Pronost S, Fortier G, Andre-Fontaine G, Leclercq R. Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri*. J Clin Microbiol. 2010;48(2):581–585.
2. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol. 2012;7(10):736–747.
3. Rathinam SR. Ocular manifestations of leptospirosis. J Postgrad Med. 2005;51(3):189-194.
4. Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E, Vinetz JM. Asymptomatic renal colonization of humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(2):612.
5. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS ONE. 2008;3(2):1607.
6. Victoriano AFB, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. BMC Infect Dis. 2009;9:1-9.
7. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpai boon R, et al. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. PLoS Negl Trop Dis. 2007;1(1):56.
8. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Burth P, Silva AR, Younes-Ibrahim M, Castro-Faria-Neto HC, Castro-Faria MV. *Leptospira* and inflammation. Mediat Inflamm. 2012;1-11.
9. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001;14(2):296–326.
10. Ghane M, Rostampour Yasouri S. Isolation and identification of pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. From the rice fields of Tonekabon township using culture and PCR technique. Ann Biolog Res. 2013;4(11):123-128.
11. Nalam K, Ahmed A, Manjulata Devi S, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, et al. Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. PLoS ONE. 2010;5(8):12637.
12. Voronina OL, Kunda MS, Aksenova EI, Ryzhova NN, Semenov AN, Petrov EM, et al. The characteristics of ubiquitous and unique *Leptospira* strains from the collection of Russian Centre for leptospirosis. BioMed Research International. 2014;1-15.
13. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO library cataloguing-in-publication data, Malta. 2003;109.
14. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea

- in Queensland, Australia, 1998–2004. *Epidemiol Infect.* 2006;134:1217–1225.
15. Balamurugan V, Gangadhar NL, Mohandoss N. Characterization of *Leptospira* isolates from animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. *SpringerPlus.* 2013;2:1–9.
16. Roqueplo C, Cabre O, Davoust B, Kodjo A. Epidemiological study of animal leptospirosis in New Caledonia. *Vet Med Int.* 2013;1–6.
17. Ebrahimi A, Alijani L, Abdollahpour GR. Serological survey of human leptospirosis in tribal area of West Central Iran. *Iran J Med Sci.* 2003;28(2):93-95.
18. Honarmand H, Hartskreel RA, Eshraghi S, Khoramizadeh M, Ghanaei FM. Study on the prevalence of leptospirosis in Guilan province, Iran. 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society. 2005;177.
19. Issazadeh Kh, Amirmozaffari N, Mehrabian S, Oryan H. Assessment of distribution *Leptospira* spp. In surface waters of Guilan province. *World J Zool.* 2009;4(2):79-84.
20. Rostampour Yasouri S, Goleyjani Moghadam R, Ghane M. Identification of pathogenic and saprophytic *leptospira* spp from the rice fields of Tonekabon township using PCR technique. *Adv Stud Biol.* 2013;5(10):437-445.
21. Natarajaseenivasan K, Boopalan M, Selvanayagi K, Suresh SR, Ratnam S. Leptospirosis among rice mill workers of Salem, South India. *Jpn J infect Dis.* 2002;55:170-173.
22. Angnani R, Pathak AA, Mishra M. Prevalence of leptospirosis in various risk groups. *Indian J Med Microbiol.* 2003;21(4):271-273.
23. Brockmann S, Piechotowski I, Bock-Hensley O, Winter C, Oehme R, Zimmermann S, et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. *BMC Infect Dis.* 2010;10:1-5.
24. Assez N, Mauriaucourt P, Cuny J, Goldstein P, Wiel E. Fever and jaundice and if it was a leptospirosis. About a case of *L. Interrogans icterohaemorrhagiae* in Northern France. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2013;32(6):439-443.