

بررسی سرولوژی لپتوسپیروزیس در گوساله های نر در گاوداری های نیمه صنعتی اطراف تهران

• غلامرضا عبدالله پور

دانشیار آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (نویسنده مسئول)

• زهره افتخاری

رزیدنت بیماری های درونی دام های بزرگ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

• سعید ستاری تبریزی

کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

• فرهاد موسی خانی

عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

• نفیسه علی قاضی

دانشجوی دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۱۳۹۰

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۱۳۲۷۵۲۸

Email: greza@ut.ac.ir

چکیده

لپتوسپیروزیس یکی از بیماری های اسپیروکتی حاد می باشد که به لحاظ گسترش جهانی اهمیت ویژه ای دارد همچنین به عنوان یک بیماری زئونوز در سراسر جهان مطرح است. سرروارهای درگیر کننده ی جمعیت های گاوی در سراسر جهان معمولاً شامل ایکتروهموراژیه، هار جو، پومونا و گریپوتیفوزا می باشد. در مطالعه ی حاضر، ۲۰۰ نمونه سرمی از گوساله های نر ۸-۲ ماهه در دو ماه اردیبهشت و مهر ۱۳۸۸ جمع آوری گردید. نمونه های سرمی با کمک روش آزمایشگاهی MAT (تست آگلوتیناسیون میکروسکوپی) با ۶ سرو وار شامل های هار جو، پومونا، کانیکولا، گریپوتیفوزا، ایکتروهموراژیه و بالوم برای جستجوی پادتن مورد بررسی قرار گرفتند. تیتراهای MAT بالای ۱/۱۰۰ به عنوان نمونه های سرمی مثبت در نظر گرفته شدند. این مطالعه نشان می دهد که حدود ۲۹ درصد (۵۸ مورد) نمونه های سرمی مثبت بودند و بیشترین آلودگی مربوط به سرروار پومونا بود. همچنین بیشترین شیوع در ماه مهر و اردیبهشت به ترتیب مربوط به سرروار پومونا و گریپوتیفوزا بود. هدف از این مطالعه، بررسی و جستجوی پادتن های لپتوسپیروز در سرم گوساله های (بدون علایم کلینیکی) و مقایسه ی میزان شیوع سرروار های لپتوسپیروز در دو ماه مختلف در منطقه مورد مطالعه بود. این مطالعه نشان می دهد که در ماه های پر بارش سال، دامپزشکان و مدیران فارم ها (مزارع، گله داری ها، محل های پرورش موجودات زنده) باید توجه ویژه ای نسبت به امکان ناقل بودن و حامل بودن گاوهای نر تخمی داشته باشند تا از گسترش عامل به گاوداری های دیگر جلوگیری شود.

کلمات کلیدی: لپتوسپیروزیس، گوساله های نر، MAT، گاوداری های اطراف تهران

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 93 pp: 33-38

Serological survey of leptospirosis in calves in Tehran suburb

By: Gh. Abdollahpour, Associated Professor of Veterinary Faculty, Tehran University, (Corresponding Author; Tel: +9891212327528) Z. Eftekhari, PhD Student of Veterinary Faculty, Tehran, S. Sattari Tabrizi, Expert of Leptospira Research Lab, Veterinary Faculty, F. Mousakhani, Member of Scientific Board of Islamic Azad University, N. Alighazi, Student in Veterinary Medicine, Veterinary Faculty of Tehran.

Leptospirosis is one of the main causes of acute febrile illness and is presumed to be the most widespread zoonotic disease in the world. Cattle populations may be infected with serovars Hardjo, Pomona and Grippotyphosa. Infection with Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Hebdomadis, Autumnalis, Australis, Sejroe, Canicola and Bataviae serovars also occurs. In this study, 200 serum samples were collected from calves of 2-8 months-age from Tehran suburbs farms during October 2009 and May 2010. Sera were tested for antibodies against 6 serovars of *Leptospira interrogans* including: Hardjo, Pomona, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Ballum using standard microscopic agglutination test (MAT) and titers of $\geq 1/100$ were considered to be positive. The results of this study showed that 58 (29%) of the calves were MAT positive, mainly to serovar Pomona. In October the most prevalent *Leptospira* serovar was Pomona and in May the most prevalent *Leptospira* serovar was Grippotyphosa. The aim of this study was to evaluate the presence of leptospiral antibodies in calves which did not show any clinical symptoms of leptospirosis and comparing two months in our study zone. It is concluded that the managers and veterinarians must pay more attention to the herd's health because of biosecurity, specially in rainy months for preventing calves from becoming a source of continues infection in the herds.

Key words: DNA extraction, Fasciola, Molecular study.

مقدمه

لپتوسپیروزیس از بیماری‌های اسپیروکتی مهم است که جزء بیماری‌های مشترک در سراسر جهان مطرح می‌باشد (۹). Farf در سال ۱۹۹۵ سرووارهای این اسپیروکت را بیش از ۳۰ نوع گزارش کرده بود (۵). تاکنون بیش از ۱۸ گونه و ۲۰۰ سرووار از لپتوسپیروز شناسایی شده است اما به نظر می‌رسد که همه‌ی این سرووارها بیماری‌زا نیستند (۹). عفونت لپتوسپیروزی در گاو، اولین بار در سال ۱۹۹۴ در روسیه توسط Faine گزارش شد (۴). گاو در سراسر جهان معمولاً توسط سویه‌های هارجوی گاوی، پومونا و گریپوتیفوزا دچار بیماری می‌شوند اما عفونت با سویه‌های ایکتره‌هموراژیه، براتیسلاوا، اتومانیس، استرالیس، سرجو، کانیکولا و باتاویا نیز گزارش شده است (۴، ۵). اصلی‌ترین منبع لپتوسپیروز، ترشحات دامی به ویژه ادرار می‌باشد. لپتوسپیروز در لوله‌های کلیه میزبان خود ساکن می‌شود و چرخه انتقال آن شامل میزبان نگهدارنده‌عامل، میزبان حامل، محیط و انسان می‌باشد. انتقال عامل به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم است. انتقال عامل زمانی رخ می‌دهد که لپتوسپیروز از بافت‌ها، مایعات بدن، یا ادرار دام بیمار یا حاملین بدون علائم وارد بدن میزبان تازه شود، همچنین انتقال عفونت از طریق تماس جنسی و خوردن شیر آلوده نیز امکان پذیر است (۱۶). انتقال از طریق جفت نیز در سال‌های ۱۹۹۵، ۱۹۹۶ و ۱۹۸۴ توسط Ellis گزارش شده است (۳). انتقال مستقیم از دام به انسان در افرادی که به صورت حرفه‌ای با دام تماس دارند از قبیل دامپزشکان، قصاب‌ها، دامداران رخ می‌دهد. انتقال غیرمستقیم از طریق تماس انسان یا حیوان با محیط آلوده به عامل امکان پذیر است زیرا لپتوسپیروز می‌تواند به مدت طولانی

در محیط زنده بماند (۴).

تشخیص لپتوسپیروز بر پایه‌ی علائم کلینیکی و گرفتن تاریخچه و روش‌های آزمایشگاهی امکان پذیر است. روش استاندارد سرولوژیکی برای شناسایی پادتن‌های لپتوسپیروز طبق سازمان بهداشت جهانی (WHO)، آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) می‌باشد که روشی ارزان بوده با حساسیت قابل قبولی بوده و دسترسی به آنها نیز امکان پذیر است (۱). آزمایش MAT شامل مخلوط کردن سرم رقیق شده با پادگن حاوی اسپیروکت زنده‌ی سرووارهای مختلف مطرح در منطقه می‌باشد که حضور پادتن در نمونه‌ی سرمی به وسیله‌ی آگلوتیناسیون شناسایی می‌شود (۱۰). در این روش، نمونه‌های سرمی در رقت‌های مختلف تهیه شده و با آنتی‌ژن مخلوط شده و در زیر میکروسکوپی زمینه‌سیاه مورد بررسی قرار می‌گیرند. دام‌های آلوده تیتراهای مساوی یا بالاتر از ۱/۱۰۰ را شامل می‌شوند (۱۴). هدف این مطالعه بررسی میزان شیوع سرووارهای مختلف لپتوسپیروز در گوساله‌های نر تخمی در گاوداری‌های اطراف تهران می‌باشد و مقایسه‌ی میزان شیوع سرووارهای لپتوسپیروزی در دو ماه مختلف در منطقه مورد مطالعه بود.

مواد و روش کار

منطقه‌ی مورد مطالعه شامل ۱۰ گاوداری صنعتی، نیمه صنعتی و سنتی در اطراف تهران می‌باشد که گوساله‌های نر بعد از ۱۰ ماهگی به عنوان گاو نر تخمی به سایر گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی به فروش می‌رسند. ۲۰۰ نمونه‌ی سرمی از گوساله‌های دورگ و هلشتاین خالص در بازه‌ی سنی ۲-۸ ماه در دو ماه اردیبهشت و مهر ۱۳۸۸

و گریپوتیفوزا بود. طبق گزارش بولین در سال ۱۹۹۶، نتایج سرولوژی MAT مثبت نشان دهنده آلودگی دام‌ها در طی تماس مستقیم با میزبان نگهدارنده وحشی یا به دنبال واکسیناسیون می‌باشد. اما در این مطالعه دام‌های درگیر هیچ واکنشی بر علیه لپتوسپیروز دریافت نکرده بودند (۲). البته بر اساس گزارشات منتشره در سال ۲۰۰۵ توسط Green واکسیناسیون ضرورتاً از انتشار عامل توسط دام‌ها جلوگیری نمی‌کند و خود واکنش نیز می‌تواند به عنوان یک منبع عفونت برای گاوداری مطرح باشد (۶) و گوساله‌هایی که واکنش bivalent دریافت کرده باشند بر علیه سویه‌های دیگر مقاومتی نشان نمی‌دهند (۷). البته برخی گزارشات بیان کرده‌اند که واکسیناسیون از انتشار عامل متوسط سیستم‌آداری جلوگیری می‌کند (۱۵). براساس این مطالعات نمی‌توان دقیقاً بیان کرد که آیا در چنین مواردی برای جلوگیری از ورود عامل به دامداری‌های مد نظر می‌توان از واکنش به عنوان یک عامل حفاظتی استفاده کرد یا نه؟! بر اساس این مطالعه حتی در صورت عدم دریافت واکنش در گوساله‌های بدون علائم بالینی نیز انتظار انتشار عامل در گله وجود دارد. براساس نتایج و مطالعات بررسی شده توسط عبد اله پور و همکاران در سال ۱۳۸۸، سگ‌های موجود در گله که به عنوان سگ گله یا سگ نگهبان می‌باشند، می‌توانند یکی از عوامل گسترش عامل در سطح گله باشند (۸،۱).

براساس گزارشات Ward در سال ۲۰۰۲ و براساس نتایج بررسی مورد مطالعه ما در ماه‌های پرباران مثل ماه مهر در منطقه مورد مطالعه میزان شیوع بیماری بیشتر است به همین دلیل در ماه‌های مهر، آبان، اردیبهشت و خرداد بیشترین شیوع نمونه‌های سرولوژیکی مثبت می‌باشد (۱۷، ۱۸).

رایج‌ترین سویه‌ی لپتوسپیروز در میان گاوان در سراسر جهان سویه‌ی هارگو می‌باشد اما در مناطق اطراف تهران شیوع سویه‌های پومونا و گریپوتیفوزا بیشتر از بقیه سویه‌ها بود و این بیان‌گر آن است که با توجه به نوع سویه شایع در منطقه، واکنش مورد نظر باید استفاده گردد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ در گاوان کشتارگاه اطراف رشت توسط شفیقی و همکارانش انجام گرفت بیشترین سویه‌ی جدا شده از گاوان سویه‌ی پومونا بود که با مطالعات ما نیز همخوانی دارد. در این مطالعه از بین ۹۸ نمونه‌ی انتخابی به صورت تصادفی ۳۰،۸ درصد نمونه‌های مثبت مربوط به گاوان نر بود (۱۵).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ در ترکیه توسط Ozkan و Vildan انجام گرفت بیشترین سویه‌ی جدا شده از گاوان توسط تست آگلوتیناسیون میکروسکوپی، سویه‌ی گریپوتیفوسا و هارگو بود (۱۳). مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده‌ی آن است که انجام آزمایشات سرولوژیکی برای تأمین امنیت بیشتر و بیوسکیوریتی به ویژه در مناطق پرباران و مرطوب قبل از اقدام به فروش گاوان نر و گوساله‌ها به عنوان گاوان تخمی ضروری به نظر می‌رسد. از سوی دیگر به دلیل افزایش سویه‌ی پومونا در گاوداری‌ها و به دلیل آنکه سگ اصلی‌ترین میزبان نگهدارنده‌ی این سویه محسوب می‌شود، احتمالاً تست سگ‌های گله و واکسیناسیون سگ‌ها می‌تواند نقش مهمی در کنترل لپتوس پیروزیس گاوان داشته باشد.

جمع‌آوری گردید. گوساله‌های مورد مطالعه هیچ واکنشی بر علیه لپتوسپیروز دریافت نکرده بودند و در گاوداری‌های مورد مطالعه از سگ به عنوان محافظ استفاده می‌شد. نمونه‌های سرمی تا زمان انجام آزمایش سرولوژیکی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش آزمایشگاهی مورد مطالعه طبق توصیه OIE روش سرولوژیکی MAT بود (۱۱، ۱۲) که در بیمارستان آموزشی، پژوهشی دانشگاه تهران واقع در مردآباد کرج انجام گردید.

پادگن‌های زنده ۶ سویه مختلف *Leptospira interrogans* به مدت ۷-۱۰ روز در مایع EMJH قرار گرفته تا تکثیر یابند سپس در یک فلاسک مخصوص در رقت ۱/۱۰۰ تهیه شدند. سویه‌های مورد آزمایش شامل کانیکولا، گریپوتیفوزا، ایکتره‌هموراژیه، پومونا، بالیوم و هارگو بودند که رایج‌ترین سویه‌های منطقه مورد مطالعه می‌باشند. نمونه‌های سرمی تهیه شده در رقت‌های مختلف ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۱۶۰۰ رقیق گردیدند و برای هر تست یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی نیز در نظر گرفته شد.

۶ میکرولیتر پادگن با ۶ میکرولیتر سرم رقیق شده، مخلوط گردید و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای 1 ± 29 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۱۳)، نمونه‌های آگلوتینه شده در رقت ۱/۱۰۰ به بالا جزء نمونه‌های مثبت در نظر گرفته شدند.

نتایج

نتایج اپیدمیولوژیکی و سرولوژیکی سویه‌های مختلف اینتروگانس در جدول ۱ بیان شده است. از ۲۰۰ نمونه‌ی سرمی تهیه شده حدود ۲۹ درصد (۵۸ نمونه) از لحاظ سرولوژیکی مثبت بودند. از میان ۸۸ نمونه سرمی تهیه شده در اردیبهشت ماه ۲۲/۷۲ درصد نمونه‌ها مثبت (۲۰ نمونه سرمی) و درمهرماه از میان ۱۱۲ نمونه، نمونه‌ها سرمی مثبت ۳۳/۹۲ درصد (۳۸ مورد) بودند.

در اردیبهشت ماه بیشترین شیوع سویه‌های لپتوسپیروا به ترتیب مربوط به سرورار گریپوتیفوزا ۱۷/۴۰ درصد (۱۳ مورد)، پومونا ۵/۶۸ درصد (۴ مورد) و کانیکولا ۵/۶۸ درصد (۴ مورد) بود (جدول ۲). در مهر ماه بیشترین شیوع سویه‌های لپتوسپیروا به ترتیب، سویه پومونا در رقت ۱/۱۰۰ برابر با ۲۶/۷۸ درصد (۲۵ مورد) و سویه گریپوتیفوزا در رقت ۱/۲۰۰ برابر با ۱۶/۹۶ درصد (۱۰ مورد) بود (جدول ۳). در مجموع نمونه‌ها ۱۹ نمونه سرمی به بیش از یک سویه لپتوسپیروا واکنش مثبت نشان دادند. و بیشترین شیوع سرولوژیکی رقت ۱/۱۰۰ بود و بیشترین تیترا مشاهده شده در نمونه‌ها رقت ۱/۴۰۰ بود در مجموع، نمونه‌های سرولوژیکی مثبت در ماه مهر بیشتر از ماه اردیبهشت بود و شیوع سویه‌ی پومونا بیشتر از بقیه سویه‌ها بود.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، ۲۰۰ نمونه سرمی از گوساله‌های نر ۸-۲ ماهه در دو ماه اردیبهشت و مهر ۱۳۸۸ جمع‌آوری گردید و نتایج نشان می‌دهند که حدود ۲۹ درصد (۵۸ مورد) نمونه‌های سرمی مورد مطالعه مثبت بودند و بیشترین آلودگی مربوط به سرورار پومونا بود. همچنین بیشترین شیوع در ماه مهر و اردیبهشت به ترتیب مربوط به سرورار پومونا

جدول ۱- شیوع پادتن های *L.interogans* در ۲۰۰ نمونه سرمی از گوساله های نر تخمی در گاوداری های صنعتی اطراف تهران

زمان	تعداد گوساله	تعداد سرم مثبت	درصد کل
مهر ۱۳۸۸	۱۱۲	۳۸	۳۳/۹۲
اردیبهشت ۱۳۸۸	۸۸	۲۰	۲۲/۷۲
کل	۲۰۰	۵۸	۵۶/۶۴

جدول ۲- تعداد نمونه های سرمی مثبت در مقابل سروار های مختلف لپتوسپیروزیس در رقت های مختلف در ماه اردیبهشت

سروار	رقت ها			
	۱۰۰/۱	۲۰۰/۱	۴۰۰/۱	۸۰۰/۱
G	۱۳	۲	۰	۰
P	۴	۱	۰	۰
I	۰	۰	۰	۰
C	۴	۰	۰	۰
B	۰	۰	۰	۰
H	۰	۰	۱	۰
جمع کل	۲۱	۳	۱	۰

جدول ۳- تعداد نمونه های سرمی مثبت در مقابل سروار های مختلف لپتوسپیروزیس در رقت های مختلف در ماه مهر

سروار	رقت ها			
	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰	۱/۴۰۰	۱/۸۰۰
G	۹	۱۰	۰	۰
P	۲۵	۵	۰	۰
I	۰	۰	۰	۰
C	۲	۱	۰	۰
B	۰	۰	۰	۰
H	۱	۲	۰	۰
جمع کل	۳۷	۱۸	۰	۰

جدول ۴- توزیع فراوانی و درصد نمونه های مثبت در رقت های مختلف در ماه اردیبهشت

تعداد سروارها	تعداد موارد +	فراوانی سرمی
یک سروار	۱۵	۱۷
دو سروار	۵	۴
سه سروار	۰	۵/۶۸
چهار سروار	۰	۰
پنج سروار	۰	۰
جمع کل	۲۰	۰

جدول ۵- توزیع فراوانی و درصد نمونه های مثبت در رقت های مختلف در ماه مهر

تعداد سروارها	تعداد موارد +	فراوانی سرمی
یک سروار	۲	۲۱/۴۸
دو سروار	۴	۹/۸۲
سه سروار	۱	۲/۶۷
چهار سروار	۳	۰
پنج سروار	۰	۰
جمع کل	۱۰	۳۳/۹۷

