DOI: 10.22092/vj.2019.125057.1553
شماره ۱۲۶ بهار ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

پایش مولکولی کلنی موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH موسسه رازی از نظر آلودگی به باکتری لپتوسپیرا اینتروگنس

• **روزبه فلاحی (نویسنده مسئول)**
دانشیار پژوهش بخش تحقیق، تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **محمدعلی منصوری**
کارشناسی ارشد بخش تحقیق، تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **حسین مدیر روستا**
کارشناس ارشد بخش تحقیقات، بیماریهای زنبور عسل، کرم ابریشم و حیات وحش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۰۲-۱۱-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۲۸-۱۲-۱۳۹۷
Email: r.fallahi@rvsri.ac.ir

چکیده

باکتری لپتوسپیرا اینتروگنس*(Leptospira interrogans)*، عامل بیماری لپتوسپیروز است که یکی از بیماری‌های مهم مشترک میان انسان و حیوانات می‌باشد. یکی از مهم‌ترین توصیه‌های انجمن بین‌المللی در رابطه با حیوانات آزمایشگاهی، استفاده از حیوانات با فلور میکروبی مشخص می‌باشد. بر این اساس، توصیه فدراسیون انجمن‌های علوم حیوانات آزمایشگاهی اروپا *(FELASA)*، پایش‌های تشخیصی جهت بررسی وضعیت آلودگی حیوانات به عوامل میکروبی مختلف الزامی می‌باشد. در این تحقیق میزان شیوع این باکتری در کلنی موش‌های آزمایشگاهی نژاد *NIH* مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی در سال ۱۳۹۶ مورد بررسی قرار گرفت. ۷۴ سر موش پرورشی بالغ (در محدوده وزنی ۳۵-۳۰ گرمی و سن ۸-۶ هفته) بصورت تصادفی از هر دو جنس نر و ماده از کلنی پرورشی و ۶ سر موش وحشی نیز بوسیله تله‌های زنده گیری از بیرون از ساختمان‌های پرورشی صید و بعد از کشتن به روش انسانی و کالبدگشایی، نمونه‌برداری از بافت کلیه آنها صورت گرفت و پس از آماده‌سازی، روش *PCR* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی باکتری لپتوسپیرا اینتروگنس انجام گردید. جهت طراحی و تهیه نمونه کنترل مثبت، با استفاده از ترانسفورمیشن پلاسمید *pGEM - T easy vector* حاوی قطعه ژن بیماری‌زای *LipL32* در *E.coli* جهت تکثیر ژن و سپس استخراج آن صورت گرفت. از نمونه‌های بررسی شده، هیچگونه مورد مثبتی مشاهده نگردید. بر طبق دستورالعمل *FELASA* می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که با اطمینان ۹۹/۹٪، آلودگی به لپتوسپیرا اینتروگنس در کلنی موش‌های نژاد *NIH* موسسه رازی منتفی می‌باشد.

کلمات کلیدی: پایش، لپتوسپیرا اینتروگنس، موسسه رازی، موش، *NIH*

Veterinary Researches & Biological Products No 126 pp: 9-15

Molecular monitoring of Razi Institute NIH strain laboratory mice colony for infection with *Leptospira interrogans* bacteria

By: Fallahi, R., (Corresponding Author) Member of Scientific Board, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mansouri, M.A., MSc, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Modirrousta, H., MSc,Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2019-01-22 **Accepted: 2019-03-19**

Email: r.fallahi@rvsri.ac.ir

Leptospira interrogans is the cause of leptospirosis, a common disease among humans and animals. One of the most important recommendations of international associations concerned with laboratory animals, is the use of defined animals. Based on the recommendation of the FELASA, the diagnostic monitoring is required to evaluate the contamination of animals to different microbial agents. In this study, the prevalence of this bacteria was investigated in a colony of NIH strain laboratory mice of laboratory animal breeding unit at the Razi Institute in 1396.74 adult mice (in the range of 30-35g and age 6-8 weeks) were randomly selected from both sexes in breeding colony and 6 wild mice were selected by means of live traps from the outside of facility. After ethical euthanasia and autopsy, samples were taken from their kidney tissues and after preparation, the PCR method was performed using *Leptospira interrogans* specific primers. Designing and preparing the positive control was carried out using plasmid (pGEM -T easy vector) transformation containing the pathogenic of *Leptospira interrogans* gene (LipL32) in *E.coli* for gene amplification and extraction. No positive cases were observed from the examined samples. According to FELASA instructions, it can be concluded that with 99.9% confidence, the *Leptospira interrogans* infection in breeding salons of Razi Institute NIH mice was discarded.

Key words: Monitoring, *Leptospira interrogans*, Razi Institute, Mouse, NIH

مقدمه

یکی از مهم‌ترین توصیه‌های سازمان‌ها و انجمن‌های بین‌المللی در رابطه با حیوانات آزمایشگاهی، استفاده از حیوانات تعریف‌شده (gnotobiotic) است، چراکه نتایج‌کار بایستی قابل تکرار و قابل اطمینان و قابل‌تعمیم باشد (۶، ۱۱). براساس توصیه فدراسیون انجمن‌های علوم حیوانات آزمایشگاهی اروپا (FELASA) پایش‌های تشخیصی (Diagnostic monitoring) حیوانات، جهت صدور گواهی سلامت آن‌ها که مورد درخواست سیستم‌های کیفیت و کنترل کیفی مؤسسات تولیدی و تحقیقاتی می‌باشد، الزامی است. از آنجاکه بسیاری از آلودگی‌های باکتریایی، مایکوپلاسمایی و ویروسی باعث ایجاد واکنش‌های متقاطع می‌شوند و در تست‌های کنترلی مداخله می‌کنند، انجام پایش‌های بهداشتی خصوصاً برای عوامل عفونی مهم از نظر FELASA، از جمله باکتری لپتوسپیرا اینتروگنس (*Leptospira interrogans*) باید بصورت دوره‌ای انجام گیرد (۶). با پایش‌های تشخیصی، نوع آلودگی تعیین و شدت و میزان آن مشخص و در صورت مواجهه با عوامل بیماری‌زای خاص، اقدامات کنترلی بصورت جدی بایستی انجام گیرد. جهت انجام پایش‌های تشخیصی از روش‌های توصیه شده مانند الایزا، PCR و غیره استفاده می‌گردد (۶). از باکتری‌های مهم که توسط FELASA توصیه شده است، لپتوسپیرا اینتروگنس می‌باشد. این باکتری به شکل اسپیروکت فنر مانند و به ضخامت ۰/۱ میکرومتر و به طول ۲۰-۶ میکرومتر می‌باشد که در موش ایجاد زخم و عفونت‌های کلیوی نموده و در موارد پیشرفته باعث مرگ و میر می‌گردد (۹، ۱۴، ۱۶، ۱۹). در این تحقیق به بررسی آلودگی به باکتری لپتوسپیرا اینتروگنس در کلنی موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH پرداخته شد. موش‌های آزمایشگاهی نژاد NIH، بیشترین مصرف را در کارهای تحقیقاتی به خود اختصاص داده است (۸، ۱۱). در این تحقیق از روش PCR برای بررسی آلودگی استفاده شد که بعنوان Golden test از سوی FELASA معرفی گردیده است (۶). از آنجائی‌که تاکنون هیچگونه تحقیقی بر روی این باکتری در موش‌های آزمایشگاهی

نژاد NIH گزارش نشده است، لذا از روش ها و نتایج حاصل از این تحقیق می توان جهت انجام آزمایشات تشخیصی بصورت مستمر و دائمی در هر مرکز پرورش موش‌های آزمایشگاهی استفاده نمود.

مواد و روش کار

انتخاب نمونه

با توجه به دستورالعمل FELASA، (جدول ۱) با احتساب ۱۰٪ شیوع آلودگی در سطح کلنی حیوانات و با اطمینان ۹۹/۹٪، از کلنی پرورشی، به تعداد ۶۶ نمونه احتیاج است که در این تحقیق تعداد ۷۴ سر موش پرورشی بالغ (در محدوده وزنی ۳۵-۳۰ گرمی و سن ۸-۶ هفته) بصورت تصادفی از هر دو جنس نر و ماده از کلنی پرورشی انتخاب گردیدند. به علاوه ۶ سر موش وحشی در محدوده وزنی و سنی مشابه نیز به طریق تله‌های زنده‌گیری صید گردید (۶).

بعنوان مثال اگر میزان شیوع احتمالی یک عفونت ۳۰٪ و درصد اطمینان، ۹۵٪ در نظر گرفته شود، جهت پایش و تشخیص حداقل یک نمونه مثبت، به ۱۰ سر حیوان نیاز می باشد. نحوه محاسبه تعداد نمونه بر اساس ضریب اطمینان در ذیل آمده است:

$$\text{تعداد نمونه} = \frac{\text{لگاریتم } ۰/۰۵}{\text{لگاریتم } N}$$

N = درصد حیوانات غیرآلوده

۰/۰۵ = ضریب اطمینان ۹۵٪

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها

با رعایت کامل اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی، پس از مرگ آسان موش‌ها (با مخلوط کتامین (Ketamine) به میزان ۲۲۵mg/kg و زایلازین (Xylazine) به میزان ۳۰mg/kg و تزریق داخل صفاقی) کالبدگشایی و نمونه‌برداری از بافت کلیه آن‌ها صورت گرفت (۸، ۱۱). نمونه‌ها بطور مستقیم در داخل میکروتیوپ قرار داده شد و تا زمان آزمایش در تانک ازت مایع نگهداری شدند. روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گردید. جهت رعایت کامل موارد استریلیتی، تمام کارهای نمونه‌برداری و انجام روش PCR، در زیر دستگاه لامینار فلو انجام گردید.

طراحی و تهیه نمونه جهت کنترل مثبت

طراحی توالی مناسب و محافظت شده از باکتری لپتوسپیرا اینتروگنس جهت شناسایی تمامی گونه‌های موجود در بانک ژن صورت گرفت. جهت طراحی پرایمر، از کلون توالی ژن بیماری‌زای LipL32 موجود در بانک ژن NCBI و نرم افزار Kalign، استفاده گردید. جهت تهیه کنترل مثبت از قطعه bp ۲۷۴ (Primer F: 5'-*GAATCAAGATCCCWAATCCTC*-3' و Primer R: 5'-*TTACTTAGTCGCGTCAGAAGC*-3') به داخل پلاسمید pGEM - T easy vector و تکثیر آن با ترانسفورمیشن در باکتری *E.coli* استفاده شده است (۱۲). از سویه باکتری لیوفیلیزه *E.coli* ۲۱۶۳ GM که در محیط LBB ، کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۸ ساعت قرار داده شد، استفاده گردید و طبق پروتکل، Competent cell از آن تهیه گردید (۲). سنتز ژن و کلون آن در پلاسمید توسط شرکت سیناکلون انجام شد. استخراج پلاسمید توسط کیت Accuprep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction خریداری شده از شرکت سینا کلون طبق دستورالعمل ذیل صورت گرفت (۲۰).

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه های تهیه شده بر طبق پروتکل کیت Dyna Bio (تکاپوزیست) صورت گرفت.

انجام PCR

انجام PCR در دستگاه Thermocycler gradiant Eppendorf انجام گرفت. واکنش با یک حجم نهایی ۲۵ µl انجام گردید و محلول‌های به کار رفته

جدول ۱- محاسبه تعداد حیوان بر طبق دستورالعمل FELASA

میزان شیوع احتمالی (٪)	تعداد نمونه های مورد نیاز با در نظر گرفتن درصد اطمینان مختلف		
	٪۹۵	٪۹۹	٪۹۹/۹
۱۰	۲۹	۴۴	۶۶
۲۰	۱۴	۲۱	۳۱
۳۰	۱۰	۱۳	۲۰
۴۰	۶	۱۰	۱۴
۵۰	۵	۷	۱۰

و غلظت آن‌ها مطابق جدول ۲ بود. بعد از انجام PCR، تخلیص محصول انجام گرفت. جهت تعیین توالی، به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.
پس از بهینه‌سازی شرایط مطلوب برای PCR، بهترین شرایط به شرح ذیل بدست آمد: Initial Denaturation با دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل بعدی بصورت: Denaturation با دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، Annealing با دمای ۵۲ درجه به مدت ۱ دقیقه، Extending با دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و Final Extending با دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه (۱۸).

الکتروفورز

جهت تعیین باند محصول PCR، الکتروفورز انجام شد. از DNA marker، ۱۰۰ bp استفاده گردید. ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری، به خوبی مخلوط و به داخل چاهک‌های ژل آگارز ۱٪ حاوی رنگ syber safe ریخته شد. حجم ژل ۱۰۰ میلی‌لیتر و میزان رنگ ۲ میکرولیتر بود. نهایتاً الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ ولت بمدت ۴۰ دقیقه انجام گرفت. پس از پایان زمان الکتروفورز، ژل بر روی دستگاه UV-Transilluminator قرار داده شد و مورد بررسی و عکس‌برداری قرار گرفت (۱۸).

نتایج

از تعداد ۸۰ نمونه اخذ شده که از بافت کلیه موش‌های پرورشی نژاد NIH (۷۴ نمونه) و موش های وحشی (۶ نمونه) و برای پایش باکتری لپتوسپیرا اینتروگنس تهیه شد بودند، روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بر روی نمونه‌های بدست آمده که غلظتی بین ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانو مولار داشتند انجام گرفت و در تمامی نمونه‌ها، هیچگونه مورد مثبتی مشاهده نگردید. محصول PCR باندی به طول ۲۷۴ bp تولید می‌کند (شکل ۱ و ۲).

بحث

در مراکز اصلی پرورش حیوانات آزمایشگاهی ایران با وجود پیشرفت‌هایی که در طراحی و روش‌های پرورش حاصل شده است ولی هنوز شیوع بعضی از عفونت‌ها به ویژه عفونت‌های باکتریایی دیده می‌شود. گرچه علائم بالینی در آلودگی به عوامل عفونت‌زا دیده نشده است ولی می‌تواند در نتایج تحقیقات و تست‌هایی که جهت تهیه واکسن بر روی این حیوانات انجام می شود تأثیر منفی بگذارد (۶، ۸).
بر اساس توصیه انجمن علوم حیوانات آزمایشگاهی اروپا، پایش بهداشتی حیوانات آزمایشگاهی، جهت صدور گواهی سلامت آن‌ها الزامی است. بر طبق نظر این فدراسیون، عوامل محیطی، فاکتورهای ژنتیکی و عوامل عفونت‌زا به‌طور مستقیم در سلامت حیوانات آزمایشگاهی و در نهایت در کارهای تحقیقاتی صورت گرفته بر روی آن حیوانات تأثیر می‌گذارند (۶، ۸، ۱۱). بعضی از عوامل عفونت‌زای باکتریایی (نظیر عامل rat bite fever، سالمونلوز، تولارمی و کمپیلوباکتریوز)، ویروسی (نظیر عامل LCM)، مایکوپلاسمایی (مانند *Mycoplasma pulmonis*) و انگلی (مانند *Toxoplasma gondii* و *Hymenolepis nana*) در حیوانات آزمایشگاهی باعث ایجاد عفونت در انسان می شوند و زئونوز(Zoonosis) هستند. بنابر این حیوانات مورد استفاده باید عاری از آن عوامل عفونی باشند. اما عاری بودن از تمام میکروارگانیسم‌ها ضرورتی ندارد (۶، ۸، ۹). با دلایل ذکر شده مهم است که برنامه‌های پایش بهداشتی بعنوان یک سیستم کنترل کیفی مهم به اجرا درآیند (۶). هزینه اقدامات پیشگیرانه و نیز اجرای برنامه‌های پایش بهداشتی ممکن است زیاد به‌نظر برسند، ولی نسبت به هزینه کلی که در مورد تحقیقات گوناگون استفاده می‌شود،

جدول ۲- غلظت و حجم بکار رفته محلول های مورد استفاده در PCR

غلظت مواد به کار رفته	حجم به کار رفته
PCR buffer ۱ X	۱۲/۵ میکرولیتر
(mM ۱۰) dNTP mix	۰/۵ میکرولیتر (غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار)
(µM ۱۰) F- Primer	۱ میکرولیتر (غلظت نهایی ۰/۴ میکرو مولار)
(۱۰µM) R- Primer	۱ میکرولیتر (غلظت نهایی ۰/۴ میکرو مولار)
(Taq (IU	۰/۱۲۵ میکرولیتر
(۲۵mM) MgCl۲	۲ میکرولیتر (غلظت نهایی ۲ میلی مولار)
Template DNA	۱ میکرولیتر (غلظت نهایی ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانو گرم)
آب مقطر دو بار تقطیر	۶/۸۷۵ میکرولیتر
مقدار کل	۲۵ میکرولیتر

بسیار ناچیز می‌باشد. توصیه‌ها بایستی براساس ملاحظات پژوهشی، عواملی که شیوع آنها بصورت ناحیه‌ایی است و نیز اهداف ملی که در هر کشور در این خصوص مطرح می‌باشد تنظیم گردند (۶، ۸، ۱۱). از آنجا که موش آزمایشگاهی نژاد NIH بیشترین استفاده را در تحقیقات بیولوژیکی دارد، لزوم انجام پایش بهداشتی در این خصوص جهت استاندارد کردن روش‌های تشخیصی و استفاده از آن‌ها در آزمایشات آتی که بصورت مستمر و دوره‌ای برای تمام نژادهای موش آزمایشگاهی صورت خواهد گرفت ضروری می‌باشد. انتقال عوامل عفونت‌زا و نیز حضور عوامل آلرژن‌زا در سیستم‌های با قفس‌های روباز (Open cages) که در سیستم‌های پرورشی متعارفی وجود دارند، نسبت به قفس‌های

شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای لپتوسپیرا اینتروگنس مربوط به نمونه های موش های پرورشی (مارکر L: bp۱۰۰، کنترل منفی: C-، کنترل مثبت: C+، ۱۲-۱: نمونه ها)

شکل۲- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای لپتوسپیرا اینتروگنس مربوط به نمونه های موش های پرورشی و وحشی (مارکر L: ۱۰۰bp، کنترل منفی: C-، کنترل مثبت: C+، ۷۴-۶۹: نمونه های موش های پرورشی، ۸۰-۷۵: نمونه های موش های وحشی)

با تهویه مجزا (Individually Ventilated Cages) بسیار بیشتر بوده و ضرورت انجام برنامه‌های پایش بهداشتی در مورد آن‌ها اهمیت بیشتری دارد. در سیستم‌های با قفس‌های روباز، انتقال مواد عفونت‌زا از طریق بستر، آب، غذا، قفس‌ها و حیوانات آلوده بطور مستقیم صورت می‌گیرد (۶، ۸، ۱۱). بررسی وجود آنتی‌بادی‌های عوامل عفونی بیماری‌زا در سرم خون حیوانات آزمایشگاهی بالغ نشان‌دهنده عفونت قبلی در آن‌ها می‌باشد (۶، ۱۳). امروزه در مراکز بزرگ تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، انجام آزمایش تشخیص عوامل عفونت‌زای مهم، هر شش هفته انجام می‌شود (۶، ۸). در ایران تاکنون گزارشی از تحقیق بر روی باکتری لپتوسپیرا اینتروگنس در مراکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دیده نشده است. در صورت مشاهده موارد مثبت از این باکتری، بایستی بر طبق دستورالعمل‌های FELASA اقدام‌های کنترل، مبارزه و احتمالاً حذف کلنی‌های آلوده صورت گیرد (۶). با توجه به مشاهدات و بررسی‌های انجام شده در این تحقیق مشخص گردید که اقدامات پیشگیرانه تا حد زیادی باعث کاهش شیوع عفونت به باکتری لپتوسپیرا اینتروگنس شده است. در زمینه پایش بهداشتی عوامل عفونی باکتریایی در سایر کشورها گزارشات زیادی وجود دارد. در سال ۱۹۹۶، Boot و همکارانش عفونت‌های باکتریایی و ویروس‌های متقابل را در موش‌های یك آزمایشگاه پرورش حیوانات مورد بررسی قرار دادند (۳). در سال ۲۰۱۱، Dammann و همکارانش میکروارگانیسم‌های عفونی شامل ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌های یوکاریوتی (Eukaryotic parasites) در موش‌هایی که از مغازه‌های فروش حیوانات اهلی در آلمان تهیه شده‌اند را مورد بررسی قرار دادند. این مطالعه نشان داد که در صورت تماس مستقیم با موش‌های فروشگاه‌های حیوانات خانگی اگر اقدامات احتیاطی انجام نگرفته باشد امکان ابتلا به بیماری وجود دارد (۵). Nally و همکاران (۲۰۰۵) گزارشی از عفونت کشنده لپتوسپیرا اینتروگنس در موش‌های آزمایشگاهی نژاد C3H ارائه نمودند (۱۴). Pereira و همکاران (۱۹۹۸) در مورد ویژگی‌های زخم‌های ایجاد شده در کلیه و ریه‌های موش‌های آزمایشگاهی نژاد C3H ارائه نمودند (۱۶). Koizumi و Watanabe (۲۰۰۳) در خصوص ردیابی *Leptospira spp.* در سرم موش‌های آزمایشگاهی تحقیقی انجام و به موارد مثبت آن اشاره نمودند (۱۳). Richer و همکاران (۲۰۱۵) مدل موشی برای عفونت لپتوسپیرا اینتروگنس معرفی نمودند (۱۷).

Adler و Faine (۱۹۷۶) از ترکیبات سیکلوفسفامیدها برای درمان موش‌های مبتلا به لپتوسپیرا اینتروگنس استفاده نموده و به نتایج مطلوبی دست یافتند (۱). PCR از روش‌های توصیه شده برای تشخیص عفونت لپتوسپیرا اینتروگنس از سوی FELASA می‌باشد (۵). همچنین Cheemaa و همکاران (۲۰۰۷)، با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن lipL32 نسبت به تشخیص لپتوسپیروز اقدام نموده و موفق به تشخیص بیماری گردیدند (۴). Heinemann و همکاران (۱۹۹۹)، Khodaverdi Dariyan و همکاران (۲۰۱۳)، Oliveira و همکاران (۲۰۰۳)، از روش PCR جهت تشخیص لپتوسپیروز استفاده نموده و به نتایج مطلوبی دست یافتند (۱۰، ۱۲، ۱۵).

در این تحقیق مشخص گردید تمام نمونه‌های تهیه شده از موش‌های پرورشی نژاد NIH و وحشی از نظر آلودگی به لپتوسپیرا اینتروگنس منفی بوده‌اند. بر طبق دستورالعمل FELASA می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که با اطمینان ۹۹/۹٪، آلودگی به لپتوسپیرا اینتروگنس در سالن‌های پرورشی، در کلنی موش‌های نژاد NIH منتفی می‌باشد که برای حفظ این وضعیت و همچنین جلوگیری از آلودگی به سایر اجرام مشخص شده در دستورالعمل‌ها، باید مراقبت‌ها و پایش‌های بهداشتی را با دقت و حساسیت زیاد اعمال نمود (۷).

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی با عنوان پایش بهداشتی موش‌های آزمایشگاهی تولیدی موسسه رازی به عوامل باکتریایی، مایکوپلاسمایی، ویروسی و انگلی با کد مصوب ۰۱-۱۸-۱۸-۹۴۵۴ می‌باشد و بدینوسیله از کلیه همکاران بخش‌های تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی و تحقیقات بیماری‌های زنبور عسل، کرم ابریشم و حیات وحش موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Adler, B. and Faine, S. (1976) Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona, *Infection and Immunity*, 14:703–708.

2- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G. and Smith, J.A. (2003) Current Protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, Inc.

3- Boot, R., Oosterhuis, A. and Thuis, H.C. (2002) PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*, *Laboratory Animals*, 36 (2): 200-208.

4- Cheemaa, P.S., Srivastava, S.K., Amutha, R., Singh, S,, Singh, H. and Sandey, M. (2007) Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes, I*ndian Journal of Experimental Biology*, 45(6): 568-573.

5- Dammann, P., Hilken, G., Hueber, B., Kohl, W., Bappert, M.T. and Mahler, M. (2011) Infectious microorganisms in mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Germany. *Laboratory Animals*, 45 (4): 271-275.

6. FELASA Working group on health monitoring of rodent and rabbit colonies (2014) Recommendations on health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals*, 36: 20-42.

7- Fallahi, R. and Mansouri, M.A. (2017) Health monitoring of Razi Institute laboratory mice (NIH strain) to *Clostridium piliforme* in 1395. *Veterinary Resrarches and Biological Products*, 117: 78-84.

8- Fallahi, R. and Mansouri, M.A. (2015) Biology, Breeding, Diseases and Principles of Working to Laboratory Animals, First Edition, Razi Vaccine and Serum Research Institute Publication. pp: 68-109.

9- Hansen, A.K. (2000) Handbook of laboratory animal bacteriology, CRC Press, Medical / Nursing.

10- Heinemann, M.B., Garcia. J.F., Nunes, C.M., Morais, Z.M., Gregori, F., Cortez, A., Vasconcellos, S.A., Visintin, J.A. and Richtzenhain, L.J. (1999) Detection of leptospires in bovine semen by polymerase chain reaction, *Veterinary Journal*, 77 (1): 32-34.

11- Hubrecht, R. and Kirkwood, J. (2010) The UFAW hand book on the care and management of laboratory and other research animals. 8th Edition, Wiley-Blackwell, The laboratory mouse. pp: 304-309.

12- Khodaverdi Dariyan, E, Khaki, P., Moradi Bidhendi, S. and Smaelizad, M. (2011) Designing a positive control for molecular diagnosis of pathogen Leptospires by PCR based on lipl32 gene, *Journal of Microbiology Knowledge*, Vol. 3, No. 9, 43-47.

13- Koizumi, N. and Watanabe, H. (2003) Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira spp.* that reacted with convalescent mice sera, *Journal of Medical Microbiology*, 52:585–589.

14- Nally, J. E., Fishbein, M. C., Blanco, D. R. and Lovett, M. A. (2005) Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, *Infection and Immunity*, 73, 7014–7017.

15- Oliveira, M.A., Caballero, O.L., Vago, A.R., Harskeerl, R.A., Romanha, A.J., Pena, S.D., Simpson, A.J. and Koury, M.C. (2003) Low-stringency single specific primer PCR for identification of Leptospira, *Journal of Medical Microbiology*, 52 (Pt 2):127-135.

16- Pereira, M.M., Andrade, J., Marchevsky, R.S. and Ribeiro dos Santos, R. (1998) Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae: defect of CD4+ and CD8+ T-cells are prognosticators of the disease progression, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 50:191–198.

17- Richer. L., Potula, H.H., Melo, R., Vieira, A. and Gomes-Solecki, M. (2015) Mouse model for sublethal *Leptospira interrogans* infection, *Infection and Immunity*, 83: 4693–4700.

18- Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratorymanual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

19- Santos, C. S., Macedo, L.O., Bandeira, M., Chagas-Junior, A.D., McBride, A.J.A., McBride, W.C., Reis, M.G. and Athanazio, A.J.A. (2010) Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes, *Journal of Medical Microbiology*, 59,1101–1106.

20- Seidman, C.E., Stuhl, K., Sheen, J. and Jessen, T. (1997) Introduction of plasmid DNA into Cells, Plasma DNA into cells, *Current protocols in Molecular Biology*, Vol. 37, No. 1, 1.8.1-1.8.10.