"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2022.1960070.1370**

Serological investigation of the prevalence of leptospirosis in sheep of Khuzestan province using MAT method

Moradikia, M.H.[1], Abdollahpour, G.[2*], Akbarein, H.[3], Ghalyanchilangeroudi, A[4].

1- Postgraduate Student of Large Animal Internal Medicine, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
2- Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
4- Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
*Corresponding author's email: greza@ut.ac.ir
(Received: 2022/6/1 Accepted: 2022/9/16)

Abstract

Leptospirosis is a common zoonosis caused by *Leptospira interrogans*. Leptospira are more durable in temperate and humid climates and if transmitted to a vertebrate host, can lead to clinical to subclinical disease with a wide range of symptoms including fever, jaundice, hematuria, abortion and sometimes death. Sheep are important hosts of Leptospira that have received less attention due to the higher prevalence of subclinical form of the disease in this species. The aim of this study was to determine the serological prevalence of leptospirosis in sheep of Khuzestan province using standard microscopic agglutination test (MAT). Two hundred and sixty one blood samples were taken from sheep in 10 cities of Khuzestan province during the autumn and winter of 2022. All samples were tested by MAT method using five serotypes of *Leptospira Grippotyphosa* , *Pomona*, *Icterohemorrhagiae*, *Canicula* and *Hardjo*. The results of MAT showed that 12 samples (4.5%) had anti-leptospiral antibodies, of which 4 samples had a positive reaction with *Grippotyphosa*, 4 samples with *Icterohemorrhagiae*, 3 samples with *Hardjo* and 1 sample with *Pomona.* Titration of positive samples showed that 10 samples had a titer of 1:100 and 2 samples had a titer of 1:400. The results of this study indicate a decrease in the serological prevalence of leptospirosis in sheep of Khuzestan province compared to previous studies. It seems that the trend of climate change, the unprecedented decrease in rainfall expectations over the past years and the increase in compliance with health protocols, have played an effective role in reducing the prevalence of the disease.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Khuzestan, Leptospirosis, MAT, Serology, Sheep.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2022.1960070.1370

بررسی سرولوژیک شیوع لپتوسپیروزیس در گوسفندان استان خوزستان با استفاده از روش میکروآگلوتیناسیون

محمدحسین مرادی‌کیا[۱]، غلامرضا عبداله‌پور[۲]*، حسام‌الدین اکبرین[۳]، آرش قلیانچی‌لنگرودی[٤]

۱- دستیار تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- استاد گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- استادیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
٤- استاد گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: greza@ut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۱٤۰۱/۳/۱۱ پذیرش نهایی: ۱٤۰۱/٦/۱۵)

چکیده

لپتوسپیروز از بیماری‌های شایع مشترک بین انسان و دام است که عامل آن باکتری *لپتوسپیرا اینتروگانس* است. لپتوسپیراها در شرایط آب و هوایی معتدل و مرطوب دوام بیشتری داشته و در صورت انتقال به میزبان مهره‌دار می‌توانند منجر به بروز بیماری بالینی تا تحت‌بالینی با طیف وسیعی از علائم از جمله تب، زردی، خون‌شاشی، سقط و گاهی مرگ شوند. گوسفندان از میزبانان مهم لپتوسپیرا هستند که با توجه به شیوع بیشتر فرم تحت‌بالینی بیماری در این گونه، کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه، تعیین میزان شیوع سرولوژی لپتوسپیروز در گوسفندان استان خوزستان با استفاده از تست استاندارد آگلوتیناسیون میکروسکوپی (Microscopic Agglutination Test; MAT) است. بدین منظور، ۲٦۱ نمونه خون از گوسفندان ۱۰ شهرستان استان خوزستان در طی پاییز و زمستان سال ۱٤۰۰ اخذ گردید. تمامی نمونه‌ها با روش MAT و با استفاده از پنج سروتیپ *لپتوسپیرا گریپوتیفوزا*، *پومونا*، *ایکتروهموراژیه*، *کنیکولا* و *هارجو* مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج آزمایشMAT نشان داد ۱۲ رأس (٤/۵ درصد) واجد آنتی‌بادی ضدلپتوسپیرایی بودند که از این میان، ٤ نمونه با سروتیپ *گریپوتیفوزا*، ٤ نمونه با سروتیپ *ایکتروهموراژیه*، ۳ نمونه با سروتیپ *هارجو* و ۱ نمونه نیز با سروتیپ *پومونا* دارای واکنش مثبت MAT بودند. تیتراسیون نمونه‌های مثبت نشان داد که ۱۰ نمونه تیتر ۱:۱۰۰ و ۲ نمونه واجد تیتر ۱:٤۰۰ بودند. نتایج این مطالعه حاکی از کاهش میزان شیوع سرولوژیک لپتوسپیروز در گوسفندان استان خوزستان در مقایسه با مطالعات قبلی است. به‌نظر می‌رسد روند تغییرات آب و هوایی، کاهش بی‌سابقه بارش‌ها در طی سالیان گذشته و افزایش رعایت پروتکل‌های بهداشتی، نقش موثری در کاهش شیوع بیماری داشته است.

کلیدواژه‌ها: لپتوسپیروزیس، خوزستان، میکروآگلوتیناسیون ، گوسفند، سرولوژی.

مقدمه

لپتوسپیروز یکی از بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام با گسترش جهانی است که طیف وسیعی از پستانداران اهلی و وحشی و نیز انسان را مبتلا می‌سازد. این بیماری در تمام نقاط جهان، به‌جز مناطق قطبی وجود دارد (WHO, 2003). لپتوسپیروز در آب و هوای گرم و مرطوب شیوع بیشتری دارد زیرا باکتری در این محیط مدت زمان طولانی‌تری زنده می‌ماند. اغلب کشورهای مناطق حاره‌ای و گرمسیر، از مناطق در حال توسعه هستند و در آنها فرصت مواجهه انسان با حیوانات مبتلا (احشام، حیوانات خانگی و حیوانات وحشی) و نیز حیوانات مخزن مانند جوندگان به مراتب بیشتر است (Victoriano *et al*., 2009). براساس آخرین بررسی‌ها، میزان متوسط گزارش سالانه بیماری در سطح جهانی در جمعیت انسانی، ۱/۰۳ میلیون نفر و موارد فوتی را ۵۸۹۰۰ مورد تخمین زده‌اند (Costa *et al*., 2015).

لپتوسپیروز، علاوه بر اهمیت بهداشتی، از جنبه اقتصادی در صنعت دامپروری نیز بسیار حائز اهمیت است. این بیماری سبب سقط جنین، مرده‌زایی، ناباروری، کاهش تولید شیر و گوشت و مرگ‌ومیر دام‌ها در صنعت دامپروری می‌شود (Ellis *et al*., 1994). البته هزینه‌های سنگین ناشی از پیشگیری، کنترل و درمان بیماری جنبه دیگری از خسارت وارده به این صنعت است. علاوه بر آن، خسارات و تلفات وارده به حیات وحش که اغلب از دید ما پنهان باقی می‌ماند نیز بر اهمیت بهداشتی و اقتصادی این بیماری می‌افزاید.

باکتری *لپتوسپیرا اسپیروکتی* از خانواده Leptospiraceae است که گرم منفی، متحرک، هوازی اجباری و دمای مناسب رشد آن ۳۰-۲۸ درجه سلسیوس (۸۶-۸۲/٤ درجه فارنهایت) است. تماس با مایعات بیولوژیکی آلوده به این باکتری در انتقال بیماری نقش دارد، اما از این میان ادرار دام‌های مبتلا به‌عنوان مهم‌ترین منبع انتقال و انتشار بیماری شناخته شده است، چرا که جرم قادر است برای مدت طولانی در توبول‌های کلیوی باقی مانده و برای ماه‌ها یا حتی سال‌ها از طریق ادرار به‌طور متناوب دفع گردد (Constable *et al*., 2017). مطالعات انجام شده در ایران حاکی از آن است که پراکندگی وسیع سروتیپ‌های مختلف باکتری لپتوسپیرا در نقاط مختلف کشور وجود دارد. این بیماری در انسان بسته به نوع سروتیپ باکتری، سن افراد و میزان کفایت سیستم ایمنی بیمار می‌تواند دامنه متغیری از علائم مانند یک بیماری سبک یا بیماری شبه آنفلوانزا تا یک عفونت شدید همراه با اختلالات کبدی و کلیوی و نارسایی ریوی و حتی مرگ ایجاد کند (Abdollahpour, 2016).

در مقایسه با گاو، اطلاعات منتشر شده درخصوص لپتوسپیروز در گوسفند کمتر است. در کشور ما ایران، بررسی‌های سرولوژیک انجام شده در گوسفندان استان های آذربایجان، خوزستان، تهران و برخی استان‌های دیگر نشان می‌دهد که این بیماری از سالیان دور در جمعیت دامی کشور حضور دارد. در یک بررسی انجام شده روی ۱۳۰ رأس از میش‌های شهرستان خوی در آذربایجان شرقی، نشان داد که ۲٤/۵ درصد آنها دارای تیتر سرمی مثبت علیه سروتیپ‌های مختلف لپتوسپیرا بودند که بیشترین آن مربوط به سروتیپ *پومونا* و *گریپوتیفوزا* بود (Hassanpour *et al*., 2011). در سال ۱۳۸٦ نیز مطالعه انجام‌شده روی گوسفندان و بزهای

شهرستان اهواز نشان داد که ۱۵ درصد گوسفندان و ۱۰/۵ درصد بزها دارای تیتر مثبت سرمی بودند که بیشترین آن مربوط به سروتیپ‌های پومونا و گریپوتیفوزا بود (Haji Hajikolaei *et al.*, 2007a-b). هرچند گزارش‌های زیادی از شیوع سرولوژیک لپتوسپیروز در گوسفندان در اغلب کشورها وجود دارد، اما به‌نظر می‌رسد گوسفندان تا حدودی نسبت به بیماری مقاوم‌تر می‌باشند و یا اینکه فرم تحت‌بالینی بیماری در این گونه بیشتر است. با این‌وجود گزارش‌هایی هم از شکل بالینی بیماری با نشانه‌های زردی، هموگلوبینوری و مرگ نوزادان دیده می‌شود که بیشتر ناشی از سویه‌های پومونا، گریپوتیفوزا، ایکتروهموراژیه و سجره است. گزارش‌هایی مبنی بر معرفی گوسفند به‌عنوان میزبان نگه‌دارنده هارجو وجود دارند (Abdollahpour, 1995) که در این صورت عامل بیماری به‌راحتی می‌تواند به گوساله‌ها و گاوهایی که در مجاورت گوسفندان نگه‌داری می‌شوند، منتقل شود. بروز بیماری در هنگام بلایای طبیعی مانند طوفان، سیل و زلزله به‌طرز قابل‌توجهی افزایش می‌یابد و تهدید جدی برای سلامتی حیوانات و انسان ایجاد می‌کند (Goarant, 2016). بعد از وقوع سیلاب، باکتری *لپتوسپیرا* ممکن است در برکه‌های آب یا خاک مرطوب مدت زمان طولانی بقا داشته و منبعی برای آلودگی حیوانات و حتی انسان باشد (Wynwood *et al.*, 2014). حیوانات مبتلا به فرم تحت‌بالینی با سروارهای عادت‌یافته به میزبان، به عنوان حاملین باکتری برای طولانی مدت عمل کرده و تداوم دفع باکتری عمدتاً از طریق ادرار، اصلی‌ترین خطر آلودگی آب و خاک و ابتلای انسان و دام‌ها به شمار می‌آید (Vijayachari *et al.*, 2008). به‌دنبال تغییرات آب و هوایی صورت گرفته در طی ۵ سال گذشته و وقوع بارندگی‌های شدید و سیلاب، مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع سرولوژیک و ارزیابی شرایط فعلی بیماری در گوسفندان استان خوزستان طراحی شد.

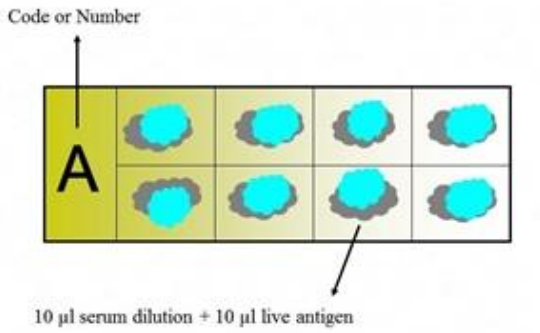
مواد و روش‌ها

- **تعیین حجم نمونه:** مطالعه حاضر یک مطالعه مقطعی از نوع مشاهده‌ای توصیفی است. حجم نمونه بر اساس پیش‌بینی شیوع ۱۵ درصد، سطح اطمینان ۹۵ درصد و حداکثر خطای ۵ درصد و برطبق فرمول $n=\frac{z^2p(1-p)}{d^2}$ محاسبه شد (N برابر است با حجم نمونه، P برابر است با مقدار شیوع آلودگی بر اساس مطالعات قبلی، Z برابر است با ۱/۹۶ و D برابر است با میزان خطای مطلق) و طبق محاسبه انجام‌شده، تعداد ۱۹۶ رأس گوسفند به‌عنوان حداقل تعداد نمونه به‌دست آمد. با توجه به احتمال از بین رفتن تعدادی از نمونه‌ها در مراحل اخذ نمونه، حمل‌ونقل به آزمایشگاه و انجام آزمایشات لازم، برای اطمینان بیشتر با احتساب ضریب ریزش (Attrition Coefficient) ۲۷/۵ درصد، در مجموع تعداد ۲۶۱ رأس گوسفند از مناطق مختلف استان به شرح زیر تحت بررسی بالینی و نمونه‌برداری قرار گرفتند.

نمونه‌های مورد نیاز از گوسفندان ۱۰ شهرستان استان خوزستان شامل دزفول، شوش، اندیمشک، اهواز، ایذه، شوشتر، گتوند، مسجدسلیمان، باغ‌ملک و آبادان در فصول پاییز و زمستان سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری شد. بدین منظور و پس از هماهنگی با صاحب گوسفندداری، ضمن بررسی محیط و جایگاه نگه‌داری گوسفندان و

ثبت اطلاعات کامل دامداری، از ۵ تا ۱۵ درصد گوسفندان هر گله (بسته به جمعیت آنها) نمونه خون کامل بدون ماده ضد انعقاد اخذ گردید. ابتدا معاینه کامل هر گوسفند انجام و اطلاعات بالینی آن در فرم مخصوص ثبت گردید و سپس میزان ۵ میلی‌لیتر خون از طریق ورید وداج توسط سرنگ اخذ شد. سرم هر نمونه خون که شامل ۲۲۹ حیوان ماده و ۳۲ حیوان نر بودند، پس از سانتریفیوژ جداسازی و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری کدگذاری شده منتقل گردید. نمونه‌های سرمی تا زمان ارسال آنها به آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز واقع در بیمارستان شماره یک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و تا قبل از شروع آزمایشات، در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

- **آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (Microscopic Agglutination Test; MAT)**: آزمایش MAT طبق روش پیشنهادی WHO در آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز و مستقیم بر روی لام‌های میکروسکوپی انجام شد. برای انجام این آزمایش از ۵ آنتی‌ژن زنده لپتوسپیرایی شامل سروتیپ‌های *گریپوتیفوزا*، *پوموناً*، *ایکتروهموراژیه*، *کنیکولا* و *هارجو* با تراکم استاندارد ۲×۱۰^{۸} باکتری در هر میلی‌لیتر استفاده شد. یک روز قبل از شروع آزمایش، میکروتیوب‌های حاوی نمونه‌های سرمی از فریزر خارج و در دمای محیط به تدریج ذوب شده تا امکان تهیه رقت‌های مورد نیاز از آنها فراهم گردد. ابتدا لام‌های میکروسکوپی با استفاده از قلم الماسه به یک مستطیل بزرگ در کناره برای شماره‌گذاری و ۸ مربع مساوی جهت مخلوط‌سازی نمونه‌ها تقسیم‌بندی شدند (تصویر ۱).



شکل ۱- نحوه آماده‌سازی لام میکروسکوپی در آزمایش MAT

برای تهیه رقت ۱:۵۰ مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه سرم مورد نظر با ۹۸۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی فسفات (PBS) در یک ظرف اپندروف اضافه و محلول یکنواختی از آنها تهیه گردید. پس از استاندارد نمودن آنتی‌ژن زنده، مقدار ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن آماده شده در مرکز هر یک از هشت مربع ریخته و ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرمی با رقت ۱:۵۰ به آن افزوده و با سرسمپلر به خوبی مخلوط گردید. این عمل برای هر نمونه و با هرپنج سروتیپ انجام شد. در نهایت این لام که حاوی مخلوط آنتی‌ژن و نمونه سرمی بود به داخل پتری‌دیش انتقال یافته و به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس و با رطوبت مناسب قرار داده شد. در نهایت

لام مذکور با کمک میکروسکوپ زمینه‌تاریک با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر مشاهده و از نظر میزان آگلوتیناسیون تحت بررسی و ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور کنترل و اطمینان از صحت روش کار، ابتدا لام حاوی نمونه‌های کنترل منفی و مثبت ارزیابی شده و در صورتی که به ترتیب عدم آگلوتیناسیون و آگلوتیناسیون ٤+ مشاهده می‌شد، سایر نمونه‌ها نیز با میکروسکوپ بررسی شدند. میزان آگلوتیناسیون هر نمونه بدین‌صورت درجه‌بندی شد: چنانچه ۲۵ درصد اجرام لپتوسپیرایی در هر میدان میکروسکوپی آگلوتینه می‌شدند ۱+ (منفی)، اگر ۵۰ درصد آگلوتینه می‌شدند ۲+ (مشکوک)، اگر ۷۵ درصد آگلوتینه می‌شدند ۳+ (مثبت) و اگر نزدیک به ۱۰۰ درصد آگلوتیناسیون مشاهده می‌شد ٤+ (مثبت) گزارش می‌شد (Abdollahpour, 2016). طبق استاندارد WHO نمونه‌هایی ۳+ و ٤+، مثبت تلقی شده و جهت تعیین تیتراسیون نهایی تحت آزمایش مجدد قرار گرفتند.

- **تعیین تیتر نهایی نمونه‌های مثبت:** به منظور تعیین تیتر نهایی سرم‌هایی که در مرحله اول مثبت می‌شدند، پس از تهیه رقت‌های ۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰، ۱:٤۰۰ و ۱:۸۰۰ عملیات عیارسنجی انجام گرفت. بالاترین رقتی که در آن میزان آگلوتیناسیون ۳+ و ٤+ مشاهده می‌شد به عنوان عیار نهایی پادتن در نمونه سرمی موردنظر تعیین می‌گردید.

یافته‌ها

براساس نتایج به‌دست آمده در آزمایش MAT، از مجموع ۲٦۱ نمونه سرمی اخذ شده از ٤۰ دامداری تحت بررسی در این مطالعه، ۱۲ نمونه (٤/۵ درصد) دارای واکنش مثبت باتیتر سرمی ۱:۱۰۰ و بالاتر بودند که در این بین، ۲ نمونه تیتر سرمی ۱:٤۰۰ داشتند (جداول ۱ و ۲).

سروارهای گریپوتیفوزا و ایکتروهموراژیه هر کدام با ٤ نمونه مثبت (۳۳/۵ درصد) بیشترین شیوع را به خود اختصاص دادند، سروار هارجو با ۳ مورد مثبت (۲۵ درصد) در مرتبه بعدی قرار گرفت و سروار پومونا با فقط ۱ مورد مثبت (۸/٤ درصد) کمترین شیوع را در آزمایش MAT نشان داد. براساس تفکیک شهرستان، شهرستان شوش با ٤ مورد مثبت، بیشترین و باغ‌ملک با یک مورد مثبت کمترین میزان شیوع را نشان دادند (جدول ۲)، اما بر اساس شیوع موارد مثبت بر تعداد نمونه‌های اخذشده از هر شهرستان، دزفول با فراوانی نسبی ۱۲/۵ درصد (۳ مورد مثبت از مجموع ۲٤ نمونه اخذشده) بالاترین شیوع را داشت و باغ‌ملک با فراوانی ۱/۹ درصد (۱ مورد مثبت از مجموع ۵۱ نمونه اخذشده) کمترین شیوع را در بین شهرستان‌های مختلف به خود اختصاص داد (جدول ۱).

جدول ۱- تفکیک شهرها، تعداد نمونه‌های اخذشده و نتایج کلی MAT

شهر	تعداد دامداری تحت بررسی	تعداد نمونه‌های سرم	نتایج MAT		فراوانی موارد مثبت به کل نمونه‌ها
			+	−	
اندیمشک	٦	٣٧	−	٣٧	−
دزفول	٣	٢٤	٣	٢١	١٢/٥ درصد
شوشتر	٢	١٣	−	١٣	−
گتوند	٥	١٢	−	١٢	−
شوش	٤	٣٩	٤	٣٥	١٠/٢ درصد
مسجدسلیمان	٦	٤٠	٢	٣٨	٥ درصد
ایذه	٣	١٩	٢	١٧	١٠/٥ درصد
باغملک	٦	٥١	١	٥٠	١/٩ درصد
آبادان	٢	١٥	−	١٥	−
اهواز	٣	١١	−	١١	−
مجموع	٤٠	٢٦١	١٢	٢٤٩	

جدول ۲- فراوانی موارد مثبت سروواروارهای مختلف آزمایش MAT

شهر	تعداد نمونه مثبت هر آنتی‌ژن					فراوانی نسبی
	گریپوتیفوزا	پومونا	ایکتروهموراژیه	کنیکولا	هارجو	
دزفول	١*	−	١	−	١	٢٥ درصد
شوش	٢	١*	−	−	١	٣٣/٥ درصد
مسجدسلیمان	١	−	١	−	−	١٦/٦ درصد
ایذه	−	−	٢	−	−	١٦/٦ درصد
باغ‌ملک	−	−	−	−	١	٨/٣ درصد
مجموع	(٣٣/٥ درصد) ٤	(٨/٤ درصد) ١	(٣٣/٥ درصد) ٤	−	(٢٥ درصد) ٣	(١٠٠ درصد) ١٢

*نمونه‌های سرمی با تیتر ١:٤٠٠

از مجموع ٢٦١ نمونه سرمی، ١١ نمونه (٤/١ درصد) در تست MAT دارای واکنش سرمی ٢+ بوده که طبق استاندارد WHO به عنوان نمونه‌های مشکوک تلقی شدند (جدول ٣).

جدول ۳- فراوانی موارد مشکوک (+۲) سروارهای مختلف آزمایش MAT

شهر	فراوانی مطلق و نسبی موارد مشکوک هر آنتی‌ژن					
	گریپوتیفوزا	پومونا	ایکتروهموراژیه	کنیکولا	هارجو	فراوانی نسبی
دزفول	۲	–	۱	–	۱	۳۶/۳ درصد
شوش	۱	–	–	–	–	۹/۱ درصد
مسجدسلیمان	۱	–	۱	–	۱	۲۷/۲ درصد
باغ‌ملک	–	–	۱	–	–	۹/۱ درصد
آبادان	–	–	–	–	۱	۹/۱ درصد
اهواز	–	–	–	۱	–	۹/۱ درصد
مجموع	۴ (۳۶/۳ درصد)	–	۳ (۲۷/۲ درصد)	۱ (۹/۱ درصد)	۳ (۲۷/۲ درصد)	۱۱ (۱۰۰ درصد)

در این مطالعه هیچ گوسفندی به‌طور همزمان با ۲ سروار واکنش نداد و همه نمونه‌ها با یک سروار واکنش مثبت داشتند. در بین نمونه‌های مثبت، ۱۰ نمونه مربوط به گوسفندان ماده (۸۳/۴ درصد) و ۲ نمونه به جنس نر (۱۶/۷ درصد) تعلق داشتند. میانگین سنی حیوانات تحت مطالعه نیز مورد بررسی قرار گرفت و در گروه نمونه‌های MAT مثبت، میانگین سنی نرها ۴ و ماده‌ها ۴/۱ سال بود (جدول ۴).

جدول ۴- میانگین سنی و فراوانی نسبی موارد مثبت در آزمایش MAT بر حسب جنسیت به تفکیک شهرستان

جنسیت	شهرستان	سن (سال)	میانگین	فراوانی نسبی
نر	دزفول	۴	۴	۱۶/۶ درصد
	مسجدسلیمان	۴		
ماده	دزفول	۶	۴/۱	۸۳/۴ درصد
		۸		
	شوش	۲		
		۵		
		۲		
		۵		
	ایذه	۲		
		۳		
	مسجدسلیمان	۳		
	باغ‌ملک	۵		

بحث و نتیجه‌گیری

استان خوزستان به‌دلیل شرایط خاص جغرافیایی و قرار داشتن در حوزه آبریز چندین رودخانه دائمی و بزرگ مانند کارون، جراحی، کرخه و دز و نیز میزان بالای بارش که گاهی منجر به طغیان رودخانه‌ها می‌شود، دارای شرایطی ویژه برای شیوع و انتشار برخی از باکتری‌های آب دوست و بیماری‌های مرتبط با آنها است. بر اساس سوابق موجود، مقامی و همکاران در سال ۱۳۵۵ از بین ۱۱٤٦ عدد موش نمونه‌برداری شده از سراسر ایران، برای اولین نوبت موفق به جداسازی *لپتوسپیرا گریپوتیفوزا* از ادرار موش در منطقه شوشتر در استان خوزستان شدند (Maghami *et al*., 1977). این گزارش به‌نوبه خود بیانگر سابقه حضور این باکتری و مخزن اصلی آن یعنی موش در استان خوزستان می‌باشد. البته از آن زمان تاکنون مطالعات متعددی روی لپتوسپیروز در گونه‌های مختلف دامی مانند گاو، گوسفند، اسب، گاومیش و نیز انسان در طی زمان‌های مختلف در استان انجام شده است (Haji Hajikolaei *et al*., 2005a,b; 2007a,b; Rezaei *et al*., 2016) که همگی بیانگر حضور و شیوع لپتوسپیروز در سطح استان هستند. با توجه به این سوابق و به منظور بررسی وضعیت فعلی بیماری در گوسفندان در سطح استان، مطالعه حاضر طراحی و اجرا گردید.

لپتوسپیروز در گوسفند در بیشتر کشورهای دنیا شایع می‌باشد، به‌ویژه در سیستم‌های مدیریتی بسته جایی که گوسفندان و گاوها ممکن است در کنار یکدیگر پرورش یابند و انتقال عفونت به روش مستقیم از طریق ادرار یا منابع آب مشترک رخ می‌دهد (Ellis *et al*., 1983; Ellis *et al*., 1994). به عقیده اُتاکا و همکاران در سال ۲۰۱۳، MAT یک روش آزمایشگاهی قابل قبول برای نظارت بر بیماری لپتوسپیروز در گله است اما ابزار قابل قبولی برای تشخیص حاملین نیست زیرا ۵۰ درصد گاوهای تحت‌مطالعه، دفع ادراری ارگانیسم بر پایه تست PCR را داشتند، درحالی که تست MAT آنها منفی بود (Otaka *et al*., 2013). در مطالعه حاضر نیز از گوسفندان چراگاهی در ۱۰ شهرستان استان خوزستان با فرض بر این‌که در شرایط محیطی مناسب برای ابتلای به بیماری قرار دارند، نمونه‌گیری شد که نتایج نشان داد ٤/٥ درصد آنها دارای تیتر سرمی مثبت علیه لپتوسپیراهای بیماری‌زا بودند و ٤/١ درصد آنها نیز دارای تیتر سرمی مشکوک داشتند. این نتایج علی‌رغم این‌که میزان شیوع سرولوژیک بیماری را نسبت به مطالعات قبلی کمتر نشان می‌دهد، اما در عین حال نشان می‌دهد که عامل این بیماری همچنان به عنوان یک خطر بالقوه در کمین حیات حیوانات اهلی و وحشی استان و نیز انسان قرار دارد و در صورت فراهم شدن شرایط محیطی مانند افزایش ناگهانی بارش‌ها و حوادث غیرمترقبه مانند سیلاب و زلزله، می‌تواند خسارات سنگین اقتصادی و بهداشتی به بار آورد.

لپتوسپیروز در نشخوارکنندگان ممکن است به شکل یک عفونت حاد و یا در اغلب مواقع تحت‌بالینی نمایان شود. عفونت حاد با تب، بی‌اشتهایی، هموگلوبینوری، سقط‌های اپیدمیک، سندروم کاهش شیر و مرگ دیده می‌شود (Ellis *et al*., 1994; Martins *et al*., 2012). فرم حاد بیماری در بره و بزغاله و مکررا با سروارهای تصادفی از جمله Pomona، Ballum، Icterohemorrhagiae یا Grippotyphosa رخ می‌دهد

Leon-Vizcaino *et al*., 1987; Vermunt *et al*., 1994). درمقابل، عفونت تحت بالینی عمدتاً با نشانه‌های اختلالات تولیدمثلی از جمله ناباروری، افزایش دفعات سرویس به ازای هر تلقیح، افزایش فواصل گوساله‌زایی، سقط و رخداد مرده‌زایی و تولد بره‌ها و بزغاله‌های ضعیف مشخص می‌شود (Ellis *et al*., 1994).

خلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۹ و براساس جمع‌آوری و متاآنالیز اطلاعات منتشر شده پیشین در زمینه لپتوسپیروز در بازه زمانی ۱۹ ساله، شیوع سرولوژی آن را در گوسفندان کشور ایران ۱۷/۳۸ درصد گزارش کردند (Khalili *et al*., 2020). در مطالعه متاآنالیز دیگری نیز با بازه زمانی ۲۰ ساله، شیوع سرولوژی بیماری در گوسفند ۱۷/٤ درصد گزارش شد و سروار گریپوتیفوزا (۲٦ درصد) با اختلاف کمی نسبت به سروار پومونا (۲۵/۱ درصد) شایع‌ترین سروار بود. همچنین از نظر آماری مشخص شد که شیوع لپتوسپیروز با گذشت زمان کاهش می‌یابد (Hassani and Nayeri Fasaei, 2020).

سروارهای مختلفی از باکتری لپتوسپیرا شناخته شده‌اند، اما عفونت معمولاً توسط سرووارى ایجاد می‌شود که بومی همان منطقه باشد (Alanso-Andicoberry *et al*., 2001). مطالعات انجام گرفته در نقاط مختلف ایران حاکی از آن است که سروار غالب در مناطق مختلف متفاوت است. در مطالعاتی که در شیراز (Vand e yousefi *et al*., 2000)، شهرکرد (Ebrahimi *et al*., 2003)، اطراف کرج (Goli, 2012) و همچنین در نمونه‌های سرمی ارجاع‌شده به موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی که شامل نمونه‌های بیش از ۱۳۸٤۰ رأس گاو بود (Khaki *et al*., 2005)، سرووار کنیکولا بیشترین شیوع سرمی را به خود اختصاص داد، در حالی‌که میزبان اختصاصی این سروتیپ سگ است. در سال ۱۳۷۱ در اطراف تهران سرووار هارجو بیشترین و سرووار ایکتروهموراژیه کمترین شیوع را داشتند (Moharrami *et al*., 1992) و در بررسی این بیماری در ارومیه، سرووار گریپوتیفوزا بیشترین شیوع را داشت (Jafari *et al*., 1996). در بررسی سرولوژیک گوسفندان در ارومیه از مجموع ۱٦٦ نمونه اخذ شده، ۱۹/۳ درصد از گوسفندان واکنش مثبت داشتند و سروارهای گریپوتیفوزا با میزان ٦٦/۷ درصد، پومونا ۲٦/۲ درصد و کانیکولا ۷/۱ درصد شایع‌ترین سروارها در آن مطالعه بودند (Ramin *et al*., 2013).

بر طبق مطالعات مختلف انجام شده در کشور، بیشترین سروارهایی که در دام‌های ایران شیوع دارند شامل هارجو، پومونا، گریپوتیفوزا، کنیکولا و ایکتروهموراژیه هستند. در همین ارتباط، تعدادی مطالعه سرولوژیکی در اهواز روی گاو، اسب و الاغ (Haji Hajikolaei *et al*., 2005a; 2005b) و دو مطالعه نیز روی گوسفند و بز انجام گرفته است. در مطالعه حاجی حاجی‌کلایی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در گوسفندان شهرستان اهواز، از ۱۸۱ نمونه گوسفندان ماده، ۲۷ مورد (۱٤/۹ درصد) واجد آنتی‌بادی ضدلپتوسپیرایی بودند و پاسخ مثبت MAT با سروارهای پومونا (٤۳/۸ درصد)، کنیکولا (۲۱/۹ درصد)، ایکتروهموراژیه (۱۲/۵ درصد)، گریپوتیفوزا (۹/٤ درصد)، بالوم و هارجو (٦/۳ درصد) در آن مطالعه به ثبت رسید (Haji Hajikolaei *et al*., 2007b). در همان سال، مطالعه دیگری نیز جهت بررسی شیوع سرمی لپتوسپیرا روی ۱۷۲ بز ماده صورت پذیرفت که ۱۸ مورد (۱۰/٤٦ درصد) پاسخ MAT مثبت

داشتند و شیوع سروارهای گریپوتیفوزا (۳۹/۹ درصد)، کنیکولا (۲۶/۰۸ درصد)، پومونا (۲۱/۷۲ درصد) ایکتروهموراژیه (۸/٦٤ درصد) و هارجو (٤/۳٤ درصد) گزارش شدند (Haji Hajikolaei *et al*., 2007a).

در مطالعه دیگری شیوع سرمی عفونت لپتوسپیرایی در بزها و گوسفندان شهرستان اهواز به‌ترتیب ۱۰/۹۵ و ۸/۵۳ درصد گزارش شده که سروار پومونا (۱۵ مورد) با اختلاف، بیشترین مورد را به خود اختصاص داد و پس از آن سروارهای ایکتروهموراژیه (٤ مورد)، هارجو (۱ مورد)، کنیکولا (۱ مورد) و گریپوتیفوزا (۱ مورد) قرار داشتند (Rezaei *et al*., 2016). در تحقیق حاضر نیز سروارهای گریپوتیفوزا و ایکتروهموراژیه هر کدام با ٤ نمونه شایع‌ترین سروارهای این مطالعه بودند، سه نمونه با سروتیپ هارجو و یک نمونه نیز با سروتیپ پومونا دارای واکنش مثبت MAT بودند. در ضمن دو نمونه با سروارهای گریپوتیفوزا (دزفول) و پومونا (شوش) دارای تیتر ۱:٤۰۰ بودند که بر اساس استاندارد سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد این دو رأس گوسفند، در فاز فعال بیماری (current infection) قرار داشتند. مقایسه نتایج این بررسی با نتایج مطالعات همکاران در طی سالیان گذشته در شهرهای مختلف استان خوزستان، حاکی از کاهش شیوع سرولوژی بیماری و تغییر سروارهای شایع در استان است.

در مطالعه‌ای برای بررسی شیوع بیماری در جمعیت گوسفندان شهرستان تبریز و بررسی فاکتورهای خطر مرتبط با بیماری، تعداد ۲٦۰ نمونه سرمی به روش MAT تحت بررسی قرار گرفت و ۲۸/٤٦ درصد با یک یا بیش از یک سروتیپ واکنش مثبت نشان دادند که از این تعداد ٥٦/۲٥ درصد مربوط به کنیکولا بود. همچنین هیچ نمونه مثبتی در گوسفندان زیر ۲ سال دیده نشد و با افزایش سن (٦-۳ سال) درصد شیوع بیشتر شد (Imandar *et al*., 2012). در تحقیق حاضر نیز میانگین سنی گوسفندان نر ٤ و گوسفندان ماده ٤/٤ سال بود که با مطالعه ایماندار و همکاران همخوانی داشته و نشان دهنده آن است که سن یک فاکتور خطر مهم تلقی می‌شود (Constable *et al*., 2017).

در بررسی شیوع سرمی لپتوسپیروز در بازه‌های زمانی مختلف درکشور ایتالیا، شیوع از ۱۲/۱۳ درصد در طی سال‌های ۲۰۰۱-۱۹۹٥ (Cerri *et al*., 2003) به ۳/۱۳ درصد در بازه زمانی ۲۰۱٦-۲۰۰۲ کاهش یافته بود (Bertelloni *et al*., 2019). در مطالعه سرولوژیک دیگری با استفاده از تست MAT در گوسفندان منطقه گجرات جنوبی در کشور هندوستان، از مجموع ۳٥۷ نمونه سرمی، ۱۰٦ نمونه واجد آنتی‌بادی ضدلپتوسپیرا (۲۹/٦۹ درصد) بودند و سروار پومونا با ۳۳/٦۱ درصد شایع‌ترین بود (Balakrishnan *et al*., 2011). چند سال بعد در همان منطقه و در مطالعه سرولوژی دیگری نیز در گوسفندان بیمار دارای علامت بالینی مرتبط با لپتوسپیروز، شیوع ٤/۳٥ درصد و در میان حیوانات به ظاهر سالم شیوع ۲۲/۲۲ درصد گزارش شد. در آن مطالعه سروار پومونا شایع‌ترین سروار قابل مشاهده بود (Vihol Priti *et al*., 2016). در کشور مالزی پس از سیل سال ۲۰۱٤ شیوع ٥/۰۳ درصد در گوسفندان Kelantan به ثبت رسید و سروار هارجو شایع‌ترین سروار جداشده بود (Rahman *et al*., 2020). این نتایج با نتایج مطالعات پیشین که حاکی از شیوع بالاتر بیماری در گاو نسبت به گوسفند و بز هستند، همخوانی دارد (Bahaman and Ibrahim, 1988; Samsi *et al*., 2013).

در بسیاری از منابع علمی گوسفند به‌عنوان گونه حیوانی نسبتاً مقاوم نسبت به لپتوسپیروز شناخته می‌شود (Ellis, 1994) و در مطالعه صورت‌گرفته در کشور سنگال نیز کمترین میزان شیوع در بین گونه‌های مختلف حیوانی با ۷ درصد به گوسفند اختصاص داشت (Roqueplo *et al.*, 2019). برای توجیه این اختلاف فرضیه‌های مختلفی ارائه شده است. مثلا حجم کمتر اطلاعات منتشرشده در زمینه لپتوسپیروز گوسفندی در مقایسه با گاو، نحوه ادرارکردن گوسفند و عدم پرتاب ریزقطرات ادرار به محیط اطراف، حجم کمتر ادرار گوسفند و متعاقباً آلودگی کمتر محیط اطراف در اثر جریان ادرار روی زمین و عدم نوشیدن ادرار توسط سایر گوسفندان در حین ادرارکردن اشاره شده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد، میزان شیوع سرولوژیک لپتوسپیروز در گوسفندان استان خوزستان در مقایسه با مطالعات قبلی طی ۱۵ سال گذشته روند نزولی داشته است. البته به‌نظر می‌رسد با توجه به روند تغییرات آب و هوایی و کاهش بی‌سابقه بارش‌ها در طی سال گذشته از یک طرف و افزایش آگاهی دامداران از اهمیت رعایت پروتکل‌های بهداشتی در طی دوره پاندمی کرونا، نقش موثری در کاهش شیوع بیماری‌های عفونی از جمله بیماری لپتوسپیروز داشته است. با این وجود به‌نظر می‌رسد به‌دلیل حضور میزبان‌های نگه‌دارنده اهلی و وحشی و شرایط آب و هوایی متغیر و ناپایدار منطقه، خطر طغیان مجدد بیماری در استان همچنان به قوت خود باقی است. لذا ضرورت دارد نهادهای مسئول بهداشت و درمان و سازمان دامپزشکی کشور اقدامات نظارتی و پیشگیری را همواره به‌طورجدی دنبال نمایند.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از رساله تخصصی مصوب دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (طرح شماره ۱۵/۶/۷۵۰۸۰۱۵) می‌باشد و نویسندگان تشکر ویژه خود را از همکاری جناب آقای مهندس جواد صادقی‌علویجه کارشناس آزمایشگاه اعلام می‌دارند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ موردی از تضاد منافع ندارند.

منابع

- Abdollahpour, G.R. (1995). Bovine leptospirosis, with a special reference to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. Ph.D. thesis; The University of Sidney, pp: 26-51.
- Abdollahpour, G.R. (2016). Leptospirosis, a disease transmitted from animals to humans. University of Tehran Press, (No. 3720). [In Persian] pp: 6-30.
- Alonso-Andicoberry, C., Garcia-Pena, F.J., Pereira-Bueno, J., Costas E. and Ortega-Mora, L.M. (2001). Herd-level risk factors associated with Leptospira spp. Seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. Preventive Veterinary Medicine, 52(2): 109-117.

- Avizeh, R., Ghorbanpoor, M., Hatami, S. and Abdollahpor, G. (2009). Seroepidemiology of canine leptospirosis in Ahvaz, Iran. Iran Journal Veterinary Research, 2(2): 75-79.
- Bahaman, A.R. and Ibrahim, A. (1988). A review of leptospirosis in Malaysia. Veterinary Research Commun, 12(2-3): 179-189.
- Balakrishnan, G., Govindarajan, R., Meenambigai, T.V. and Murali Manohar, B. (2011). Seroprevalence of Leptospirosis among sheep in Tamilnadu. Journal of Veterinary and Animal Sciences, 7(6): 285-289.
- Bertelloni, F., Cilia, G., Turchi, B., Pinzauti, P., Cerri, D. and Fratini, F. (2019). Epidemiology of Leptospirosis in North-Central Italy: Fifteen years of serological data (2002-2016). Comparative immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 65(8): 14-22.
- Cerri, D., Ebani, V.V., Fratini, F., Pinzauti, P. and Andreani, E. (2003). Epidemiology of Leptospirosis: Observation of serological data obtained by a Diagnostic laboratory for Leptospirosis from 1995 to 2001. The New Microbiologica, 26(4): 383-389.
- Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H. and Grünberg, W. (2017). Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats. 11th ed., Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, pp: 1115-1129.
- Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., *et al*. (2015). Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. PLoS Neglected Tropical Diseases, 9(9): 1-19.
- Ebrahimi, A., Alijani, L. and Abdollahpour, G.R. (2003). Serological survey of human leptospirosis in tribal area of west central Iran. Iranian Journal of Medical Science, 28(2): 93-95.
- Ellis, G.R., Partington, D.L., Hindmarsh, M. and Barton, M.D. (1994). Seroprevalence to Leptospira interrogans serovar hardjo in merino stud rams in South Australia. Australian Veterinary Journal, 71(7): 203-206.
- Ellis, W.A., Bryson, D.G., Neill, S.D., McParland, P.J. and Malone, F.E. (1983). Possible involvement of leptospires in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. Veterinary Record, 112(13): 291-293.
- Goarant, C. (2016). Leptospirosis: Risk factors and management challenges in developing countries. Research and Reports in Tropical Medicine, 7: 49-62.
- Goli, G. (2012). Seroepidemiological study of leptospirosis in livestock farms around Karaj. Thesis for D.V.M. degree, No. 2862. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. [In Persian]
- HajiHajikolaei, M.R., Ghorbanpour, M. and Abdollapour, G.R. (2005a). Serological study of leptospirosis in cattle in Ahvaz. Journal Veterinary Research (University of Tehran), 60(1): 7-14.
- HajiHajikolaei, M.R., Ghorbanpour, M., Gharibi, D. and Abdollapour, G.R. (2007b). Serologic study on leptospiral infection in sheep of Ahvaz, southwestern Iran. Journal Veterinary Research (University of Tehran), 8(4): 333-336.
- HajiHajikolaei, M.R., Ghorbanpour, M., Haidari, M. and Abdollapour, G.R. (2005b). Comparison of leptospiral infection in the horse and donkey. Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy, 49(2): 175-178.
- HajiHajikolaei, M.R., Ghorbanpour, M., Keshavarzi- Yangabadi, M. and Abdollapour, G.R. (2007a). Seroprevalence of leptospiral infection in goats of Ahvaz. Iran Journal Veterinary Research, 62(4): 93-96.
- Hassani, M. and Nayeri Fasaei, B. (2020). Ameta-analysis of the prevalence of Leptospirosis and its serovars in livestock population of Iran. Journal of Veterinary Research, 75(3): 262-270.
- Imandar, M., Hassanpour, A., Abdollahpour, G. and Haghpanah, H. (2012). Evaluation of risk factors of prevalence of leptospirosis in sheep flocks. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 5(4): 1397-1403.

- Hassanpour, A., Imandar, M., Abdollahpour, G. and Mahsayekhi, M. (2011). Seroprevalence of Leptospiral Infection in Ewes in Khoy – Iran. Advances in Environmental Biology, 5(8): 2033-2038.
- Jafari, M., Maham, A. and Azarvandi, A. (1996). Evaluation of leptospirosis in cows in Urmia. Abstracts of the Third Congress of Human-Animal Communicable Diseases, 6-4 May-Mashhad. [In Persian]
- Khaki, P., Bidehendi, M.S. and Vande yousefi, J. (2005). Prevalence of Leptospirosis in Iran. 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society. November 14-16. Chiang Mai, Thailand, pp: 179.
- Khalili, M., Sakhaee, E., Bagheri Amiri, F., Asadabadi Safat, A., Afshar, D. and Esmaeili, S. (2020). Serological evidence of Leptospirosis inIran; A systemic review and meta-analysis. Microbial Pathology, 138(1): 103833.
- Leon-Vizcaino, L., De Mendoza, M.H. and Garrido, F. (1987). Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 10(2): 149-153.
- Maghami, G.H., Hooshmand-rad, P. and Farhang-azad, A. (1997). Leptospirosis in small mammals of Iran: II: isolation of Leptospira grippotyphosa from Mus msuculus. Journal of Wildlife Diseases, 13(3): 286-289.
- Martins, G., Brandão, F.Z., Hamond, C., Medeiros, M. and Lilenbaum, W. (2012). Diagnosis and control of an outbreak ofleptospirosis in goats with reproductive failure. Veterinary Journal, (193): 600-601.
- Moharrami, M., Taghipour Bazargani, T., Hooshmandrad, P. and Bokaei, S. (1992). Seroepidemiological study of leptospirosis in dairy farms around Tehran. Abstracts of the First National Congress of Zoonoses, 3-5 November, Amol, Iran. [In Persian]
- Otaka, D.Y., Martins, G., Hamond, C., Penna, B. Medeiros, M.A. and Lilenbaum, W. (2012). Serology and PCR for bovine leptospirosis: Herd and individual approaches. Veterinary Record, 10(2): 113-119.
- Rahman, M.S.A, Bejo, S.K., Zakaria, Z., Hassan, L. and Roslan, M.A. (2020). Seroprevalence and distrubtion of Leptospiral serovars in livestock (cattle, goats and sheep) in flood-prone Kelantan, Malaysia. Journal of Veterinary Research, 65(1): 53-58.
- Ramin A.Gh., Abdollahpour, G., Azizzadeh, F., Ghahremani, P., Masoudi, A. and Ramin, S. (2013). Seroepidemiological detection of antibodies against leptospira using microscopical agglutination test in Urmia cow and sheep. Iranian Veterinary Journal, 9(3): 54-61. [In Persian]
- Rezaei, S., Haji Hajikolaei, M.R., Ghadrdan Mashhadi, A.R., Ghorbanpour, M. and Adbollahpour. (2016). Comparision of Leptospira interrogans infection in the goats and sheep. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 10(2): 113-119.
- Roqueplo, C., Kodjo, A., Demoncheaux, J., Scandola, P., Bassene, H., Diatta, G., *et al*. (2019). Leptospirosis, one neglected disease in rural Senegal. Veterinary Medicine Science, 5(1): 536-544.
- Samsi, N.S., Zainol, A., Darus, A., Zainun, Z., Wang, C.S., Zainal, Z., *et al*. (2013). Serodiagnosis of Leptospirosis in Domestic Animals and Humans. Malaysia Journal of Veterinary Research, 4(2): 21-26.
- Talebkhan Garoussi, M., Vand-e-ussefi, J., Familghadakchi, H. and Nowrouzian, I. (2003). The seroepidemiolgical survey of canine leptospirosis in shephered of dairy cattle herds in Mashhad suburb of Iran. Journal of Veterinary Research, 58(2): 177-179.
- Vand-e-ussefi, J., Moradi Bidhendi, S., Arabi, A., Ameli, A. and Charkhar, S. (2000). Serological examination of leptocirosis in humans and animals. Abstracts of the Third Congress of Human-Animal Communicable Diseases, 6-4 May-Mashhad. [In Persian]
- Vermunt, J.J., West, D.M., Cooke, M.M., Alley, M.R. and Collins-Emerson, J. (1994). Observations on three outbreaks of Leptospirainterrogans serovar pomona infection in lambs. New Zealand Veterinary Journal, 42(4): 133-136.

- Victoriano, A., Smythe, L.D. and Barzaga, N. (2009). Leptospirosis in the Asia Pacific region. BMC Infectious Diseases, 9: 147-156.
- Vihol Priti, D., Jignesh, M.P., Jatin, H.P., Mahesh, C.P., Irsadikhank, H.K. and Jeetendra, K.R. (2016). Serological and clinicopathological studies on Leptospirosis among sheep. Journal of Animal Research, 6(4): 571-577.
- Vijayachari, P., Sugunan, A.P. and Shriram, A.N. (2008). Leptospirosis: An emerging global public health problem. Journal of Biosciences, 33(4): 557-569.
- World Health Organization. (2003). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control, pp: 107.
- Wynwood, S.J., Graham, G.C., Weier, S.L., Collet, T.A., McKay, D.B. and Craig, S.B. (2014). Leptospirosis from water sources. Pathology Global Health, 108(7): 1-5.
- Zeynali, A., Rod, M.A., Vandyousefi, J., Tabatabayi, A.H. and Bokai, S. (2003). Evaluation of serological findings of leptospiral infection by microscopic agglutination test (MAT) in dogs Tehran and Suburbs. Journal of Veterinary Research, 58(2): 133-137.