بررسی شیوع سرمی آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در اسب‌های تعدادی از اسب‌داری‌های تهران با استفاده از روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی

محمدرحیم حاجی‌حاجیکلایی[۱*]، علیرضا نفیسی مظفر[۲]، صمد لطف‌الله‌زاده[۳]، مسعود قربانپور[۴]، غلامرضا عبدالله‌پور[۳]

۱- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴- استاد گروه پاتوبیولوی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: mhajih@scu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۴/۸/۱۸ پذیرش نهایی: ۹۴/۱۱/۱۰)

چکیده

به‌منظور بررسی سرولوژیکی آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* از تعداد ۱۵۲ رأس اسب متعلق به ۷ واحد اسب‌داری واقع در اطراف تهران، نمونه‌گیری به‌عمل آمد. برای مشخص شدن پادتن ضد *لپتوسپیرا اینتروگانس* از روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی با استفاده از ۵ سروتیپ زنده *لپتوسپیرا اینتروگانس* (گریپوتیفوزا، پومونا، ایکترهموراژیه، کانیکولا و هارجو) استفاده شد. از ۱۵۲ رأس اسب تحت مطالعه، ۲۳ رأس (۱۵/۱۳ درصد) به یک یا چند سروتیپ آلوده بودند. اسب‌های آلوده تیتر سرمی ۱:۱۰۰ الی ۱:۲۰۰ داشتند. بیشترین آلودگی مربوط به ایکترهموراژیه (٤٤/٤٤ درصد) بود و بعد از آن به ترتیب گریپوتیفوزا (۲۹/٦۲ درصد)، کانیکولا (۲۲/۲۲ درصد)، پومونا (۳/۷ درصد) و هارجو (صفر درصد) قرار داشتند. بررسی‌های آماری با استفاده از روش مربع‌کای نشان داد که بین آلودگی و فاکتورهایی مانند جنس و سن هیچ ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. اسب‌های آلوده دارای تیتر سرمی ۱:۱۰۰ (۱۹ رأس) و ۱:۲۰۰ (۸ رأس) بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که *لپتوسپیرا اینتروگانس* سروتیپ ایکترهموراژیه به عنوان سروتیپ غالب در بین اسب‌های تهران می‌باشد.

کلید واژه‌ها: *لپتوسپیرا اینتروگانس*، اسب، آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی، شیوع سرمی، تهران.

مقدمه

لپتوسپیروز بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام است که توسط سروتیپ‌های مختلف *لپتوسپیرا اینتروگانس* ایجاد می‌شود. این بیماری انتشار جهانی دارد و بیشتر در مناطق آب‌وهوایی گرم و مرطوب به‌خصوص در فصول بارانی اتفاق می‌افتد.

نشانه‌های بالینی بیماری در اسب سقط، چشم‌درد راجعه (Equine recurrent uveitis; ERU)، تب به‌همراه بی‌اشتهایی، بی‌حالی، زردی، اختلال در عملکرد

کبد و نارسایی شدید کلیوی می‌باشد. در کره اسب‌ها لپتوسپیروز حاد عموماً با همولیز و التهاب عروق همراه با خونریزی‌های پتشی در مخاطات، هموگلوبینوری، آنمی، زردی، افسردگی و بی‌حالی همراه می‌باشد. در مرحله حاد بیماری، لکوسیتوز و نوتروفیلی و افزایش بیلی‌روبین مشاهده می‌شود (Sellon and Long 2007; Bolin 2010; Radostits *et al*., 2007). سروتیپ‌های متعددی ممکن است عامل سقط باشند. به‌طوری‌که سروتیپ‌های پومونا، گریپوتیفوزا، کنویکی و براتیسلاوا از جنین‌های سقط شده در اسب‌های ایالت کنتاکی در کشور آمریکا گزارش شده است (Radostitis *et al*., 2007). معمولاً سقط ۱ الی ۳ هفته پس از علائم خفیف و غیراختصاصی در مادیان مشاهده می‌شود. مادیان سقط کرده دارای تیتر بسیار بالای پادتن علیه *لپتوسپیرا اینتروگانس* در زمان سقط می‌باشند (Bolin, 2010). از مهم‌ترین نشانه‌های بالینی اسب‌های مبتلا به این بیماری چشم‌درد راجعه است که دارای اسامی دیگر مانند چشم‌درد دوره‌ای (Periodic ophtalmia)، شب‌کوری (Moon blindness)، التهاب راجعه عنبیه و جسم مژگانی (Recurrent iridocyclitis) می‌باشد. در اسب به نظر می‌رسد پادتن‌های تولیدی علیه *لپتوسپیرا اینتروگانس* با آنتی‌ژن‌های بافت چشم (پروتئین 52-k-Da) واکنش متقاطع داشته و باعث بروز چشم دردهای دوره‌ای می‌شوند. در اسب‌هایی که درگیر بیماری به صورت سیستمیک هستند، پس از ماه‌ها حتی تا سال‌ها بعد از آن رخ می‌دهد. حمله دوباره به چشم معمولاً باعث کوری در هر دو چشم می‌گردد. علائم بالینی در اسب شامل ترس از نور، ریزش اشک به صورت غیرطبیعی و اسپاسم پلک می‌باشد. پرخونی ملتحمه چشم، ادم قرنیه، بسته‌شدن مردمک چشم و تورم عنبیه وجود دارد. در صورت ادامه یافتن بیماری، خونریزی و چرک در اتاقک قدامی چشم، تجمع فیبرین در اتاقک قدامی چشم، میوزیس و چسبندگی عنبیه به قرنیه یا عدسی و پرخون شدن و رگ‌زایی قرنیه مشاهده می‌گردد. در صورت رنگ‌آمیزی چشم با فلورسئین، قرنیه قابلیت نگه‌داشتن رنگ را نخواهد داشت (Radostitis *et al*., 2007). اسب‌هایی که دارای پادتن ضد *لپتوسپیرا اینتروگانس* بودند، ٤/٤ برابر بیشتر در معرض ابتلا به چشم درد دوره‌ای قرار داشتند (Sellon and Longs 2007).

لپتوسپیرا اینتروگانس به عنوان عامل خون‌ریزی ریه در اسب نیز مطرح است. بررسی‌ها نشان داده‌است که خطر ابتلا به خون‌ریزی ریه در اسب‌های واجد پادتن ضد *لپتوسپیرا اینتروگانس*، ٤/٢٦ برابر بیشتر است (Hamond *et al*., 2011).

سویه‌های *لپتوسپیرا اینتروگانس* تمایل زیادی برای چسبیدن به سلول‌های اپتیلیال کلیه دارند. سویه‌های لپتوسپیرا اینتروگانس نسبت به عوامل کمپلمان و کشته‌شدن توسط نوتروفیل‌ها در میزبان غیرایمن مقاومت دارند، ولی در حضور آنتی‌بادی اختصاصی به سرعت از بین می‌روند. به‌دلیل این‌که *لپتوسپیرا اینتروگانس* پس از ورود، از طریق جریان خون به سرعت در بدن منتشر می‌شود و در محل ورود تجمع نمی‌یابد، پاسخ التهابی در موضع به‌وجود نمی‌آید. در ابتدای ورود، بدن با سیستم هومورال سعی به مقابله با بیماری می‌کند و به همین دلیل در دام‌هایی که سیستم ایمنی هومورال آن‌ها تکامل نیافته‌است، نسبت به عفونت حساسیت بیشتری دارند (Fain *et al*., 1999).

از روش‌های مختلفی برای تشخیص لپتوسپیروز استفاده می‌شود. از روش رنگ‌آمیزی باکتری بیشتر به منظور نشان دادن باکتری در نمونه ادرار، خون و بافت‌های دام‌های تلف شده استفاده می‌شود. از این بافت‌ها به‌خصوص به کبد و کلیه می‌توان اشاره کرد (Walker, 2004). کشت باکتری روشی پرهزینه و مشکل بوده و مدت زمان طولانی احتیاج دارد. علاوه بر این، به فرد ماهری جهت انجام آزمایش نیاز دارد. حساسیت این آزمایش پایین و ویژگی آن بالا است. نمونه‌گیری بایستی از خون، مایع مغزی-نخاعی، ادرار و بافت‌های بدن مثل کلیه، البته قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک، انجام شود (WHO, 2003). رشد *لپتوسپیرا اینتروگانس* به‌خصوص آن‌هایی که از دام‌های بیمار جدا شده‌اند، بسیار آهسته می‌باشد، به‌طوری که حدود ۳ تا ۱۳ هفته بسته به شرایط محیط کشت به طول می‌انجامد (Faine *et al.*, 1999).

تست آگلوتیناسیون میکروسکوپی (Microscopic agglutination test; MAT)

رایج‌ترین روش سرولوژیکی مورد استفاده جهت تشخیص *لپتوسپیرا اینتروگانس* می‌باشد. در حیواناتی که از بیماری جان سالم به‌در می‌برند، فرم حاد لپتوسپیروز می‌تواند با افزایش تیتر پادتن در سرم تشخیص داده شود. معمولاً ۲ نمونه سرمی جهت ردیابی افزایش تیتر مورد نیاز است. در موارد سقط و مرده‌زایی آلودگی معمولاً ۱ تا ٤ هفته قبل از سقط رخ می‌دهد که در آن زمان تیتر آزمایش MAT ممکن است کاهش یابد. در ابتدای بیماری افزایش IgM و سپس IgG افزایش می‌یابد که IgG بقای بیشتری دارد. آزمایش MAT هم IgM و هم IgG را ردیابی می‌کند. تیتر MAT بیشتر از صد، مثبت می‌باشد. حساسیت این تست برای تشخیص IgM از IgG بیشتر است. این تست جهت اندازه‌گیری ایمنی علیه واکسیناسیون مناسب نمی‌باشد، به این علت که بیشتر پاسخ IgG وجود دارد. تیتر MAT در موارد میزبان‌های اتفاقی و تصادفی مثل پومونا، بسیار بالا حتی تا ۳۰۰۰ و بیشتر از آن است (Radostitis *et al.*, 2007). از روش‌های دیگری مانند ELISA، تست پادتن درخشان (Florescent antibody test; FAT)، آگلوتیناسیون بر روی لام (Slide agglutination test; SAT)، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction; PCR) نیز برای تشخیص آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* استفاده می‌شود (Radostitis *et al.*, 2007).

لپتوسپیرا اینتروگانس دارای بیش از ۲۰۰ سروتیپ می‌باشد که در ۲۳ سروگروپ دسته‌بندی شده‌اند. این سروتیپ‌ها نسبت به همدیگر ایمنی متقاطع ایجاد نمی‌کنند. پاسخ ایمنی بدن در برابر یک سروتیپ مختص همان سروتیپ می‌باشد (Radostitis *et al.*, 2007). با توجه به تنوع سروتیپ‌ها و اینکه در هر منطقه سروتیپ‌های خاصی حضور دارند که باعث ایجاد بیماری در دام‌های همان منطقه می‌شوند، لذا جهت شناسایی این سروتیپ‌ها باید مطالعات اولیه‌ای صورت گیرد تا بر مبنای آن اقدامات مقتضی جهت کنترل و پیشگیری مانند طراحی واکسن حاوی سروتیپ‌های شایع به‌عمل آید. هدف از انجام این مطالعه بررسی آلودگی اسب‌های تعدادی از اسب‌داری‌های اطراف تهران به *لپتوسپیرا اینتروگانس* و تعیین سویه‌های غالب آن بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه خون از تعداد ۱۵۲ رأس اسب متعلق به ۷ واحد اسب‌داری واقع در اطراف تهران اخذ شد که اطلاعات این اسب‌داری‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- تعداد اسب‌داری‌های تحت مطالعه، تعداد اسب‌های موجود در آن‌ها و تعداد اسب‌های تحت مطالعه در هر اسب‌داری

شماره اسب‌داری	تعداد اسب‌های نمونه‌گیری شده	تعداد کل اسب‌ها	درصد نمونه‌گیری
۱	۳۷	٤٥	۸۲/۲۲
۲	۲۰	۳٥	٥۷/۱٤
۳	۲۳	٤۰۰	٥/۷٥
٤	۱۰	۱۰	۱۰۰
٥	۳٥	۳۸	۹۲/۱
٦	۲۳	۳۰	۷٦/٦٦
۷	٤	۱٥	۲٦/٦٦

هنگام خون‌گیری، اسب‌های تحت مطالعه درون باکس‌های انفرادی مخصوص معاینات اسب قرار گرفته و توسط لواشه بر روی گوش مقید می‌گشتند. پس از ضدعفونی کردن موضع خون‌گیری (ورید وداج) توسط الکل، خون‌گیری به‌وسیله لوله‌های ونوجکت انجام می‌شد. پس از اخذ نمونه خون، لوله مورد نظر کدگذاری شده و کد آن در فرم مخصوص ثبت مشخصات درج می‌شد. آن‌گاه نمونه‌ها داخل فلاسک حاوی یخ قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گشته پس از گذشت ۱ الی ۲ ساعت توسط سواب، اتصالات لخته از جدار لوله‌ها جدا و لوله‌ها با ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس سرم آن توسط سمپلر به آرامی از قسمت رویی برداشت شده و به میکروتیوبی که قبلاً کدگذاری و کد آن ثبت شده بود، منتقل می‌شد. به‌منظور نگه‌داری کوتاه مدت، میکروتیوب‌ها به یخچال ٤ درجه سلسیوس و به‌منظور نگه‌داری بلند مدت، به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل و چند ساعت قبل از انجام آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپیک (MAT) که در آزمایشگاه تحقیقات لپتوسپیروز در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام گرفت، میکروتیوب‌ها در دمای محیط قرار داده می‌شدند، تا نمونه‌های سرمی از حالت جامد به حالت مایع تبدیل شوند.

آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپیک (MAT)

اولین قدم به‌منظور انجام آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپیک، آماده‌سازی آنتی‌ژن‌ها می‌باشد. برای این منظور از کشت خالص و زنده ٥ تا ۷ روزه باکتری که در محیط EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) به‌طور منظم هر هفته کشت فرعی داده می‌شد، استفاده شد. از ٥ سروتیپ رایج در ایران شامل گریپوتیفوزا، پومونا، ایکترهموراژیه، کانیکولا و هارجو با تراکم استاندارد ۲×۱۰^{۸} در هر میلی‌لیتر استفاده شد. تراکم باکتری با استفاده از لام مخصوص شمارش *لپتوسپیرا اینتروگانس* محاسبه گردیده و رقت آنالیز با

اضافه کردن محلول PBS (Phosphate-buffered saline) در حد مورد نظر تنظیم شد.

قبل از شروع آزمایش بایستی هر نمونه سرم به رقت ۱:۵۰ می‌رسید که برای این منظور ابتدا با استفاده از سمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول PBS در یک میکروتیوب ریخته و همچنین از نمونه سرمی اولیه به میزان ۲۰ میکرولیتر برداشته و به میکروتیوب جدید اضافه و با هم مخلوط شدند.

به منظور آزمایش MAT ابتدا توسط یک سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن با ۱۰ میکرولیتر از هر یک از سرم-های رقیق شده بر روی لام ریخته شده سپس با هم‌دیگر مخلوط شدند. رقت نهایی در این مرحله برای هر سرم ۱:۱۰۰ به‌دست آمد. به منظور جلوگیری از خشک شدن مخلوط آنتی‌ژن–سرم، هر لام سریعاً پس از پایان مراحل کار در بواتی که داخل آن کاغذ مرطوب با آب مقطر وجود داشت، بر روی ۲ پایه شیشه‌ای قرار گرفته و درب بوات بسته شد. بوات دوپتری به‌مدت ۹۰ دقیقه در گرم‌خانه‌ای که دمای آن ۳۰ درجه سلسیوس بود، قرار داده شد. پس از گذشت زمان لازم، بوات از گرم‌خانه خارج گشته و لام درون آن خارج شده و سطح زیرین آن توسط پارچه‌ای تمیز خشک شده و لام زیر میکروسکوپ زمینه تاریک قرار گرفت. هر نمونه آنتی-ژن– سرم با استفاده از کندانسور زمینه تاریک و با بزرگ‌نمایی ×۱۰۰ بررسی شد. به‌منظور کنترل آزمایش، در ابتدای آزمون کنترل مثبت و منفی تهیه شد. کنترل منفی سرم حاوی ۱۰ میکرولیتر آنتی‌ژن و ۱۰ میکرولیتر سرم کاملاً منفی، کنترل مثبت حاوی ۱۰ میکرولیتر آنتی-ژن و ۱۰ میکرولیتر سرم کاملاً مثبت و کنترل آنتی‌ژن حاوی ۱۰ میکرولیتر آنتی‌ژن و ۱۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات بود که جهت کنترل آگلوتیناسیون خودبه‌خودی به کار می‌رفت. قبل از تفسیر نتایج، نمونه‌ها کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

در تفسیر آزمایش از +۱ تا +٤ امتیازدهی گردید که به شرح زیر می‌باشد: در صورتی که ۲۵ درصد اجرام باکتریایی آگلوتینه و ۷۵ درصد دیگر به صورت آزاد و متحرک بودند درجه آگلوتیناسیون +۱ در نظر گرفته شد. در صورتی که ۵۰ درصد اجرام باکتریایی آگلوتینه و ۵۰ درصد دیگر به صورت آزاد و متحرک بودند، درجه آگلوتیناسیون +۲ در نظر گرفته شد. در صورتی که ۷۵ درصد اجرام باکتریایی آگلوتینه و ۲۵ درصد دیگر به صورت آزاد و متحرک بودند، درجه آگلوتیناسیون +۳ در نظر گرفته شد. در صورتی که تمامی اجرام باکتریایی آگلوتینه و هیچ باکتری آزادی وجود نداشت درجه آگلوتیناسیون +٤ در نظر گرفته شد. براساس استاندارد درجه +۱ منفی، +۲ مشکوک، +۳ و +٤ نیز در رقت ۱:۱۰۰ مثبت در نظر گرفته شدند. بعد از این مرحله نمونه‌هایی که مثبت بودند، عیارسنجی و تیتر آنتی‌بادی آن‌ها تعیین شد. به‌منظور تهیه رقت‌های سرمی دو برابر از ۱:۱۰۰ تا ۱:۸۰۰ در مورد نمونه‌هایی که در مرحله اول مثبت بودند، به روش زیر عمل شد:

در یک پلیت ۹٦ گوده‌ای ته گرد در ٤ ردیف آن، در هر گوده ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS ریخته شد. سپس از سرم اولیه با رقت ۱:۵۰ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در گوده اول ریخته و مخلوط گردید. سپس از گوده اول نیز ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به گوده دوم اضافه و مخلوط گردید. این عمل تا گوده چهارم ادامه پیدا کرد تا از گوده چهارم نیز پس از مخلوط کردن، میزان ۱۰۰ میکرولیتر را برداشته و دور ریخته شد. با این عمل در

گوده‌ها به ترتیب رقت های ۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰، ۱:٤۰۰ و ۱:۸۰۰ به‌دست آمد. به‌منظور انجام آزمایش MAT روی هر کدام از این رقت‌ها، مشابه مرحله اول رفتار شد. بالاترین رقتی که در آن حداقل واکنش +۳ مشاهده شد، تیتر نهایی پادتن در آن نمونه سرم در نظر گرفته شد.

تحلیل آماری داده‌ها

نتایج با استفاده از آزمون مربع کای (Chi-Square) و آزمون دقیق فیشر (Fisher's Exact Test) با درجه اطمینان ۹۵ درصد مورد واکاوی آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها

از مجموع ۱۵۲ رأس اسب مورد مطالعه متعلق به ۷ واحد اسب‌داری از اطراف تهران، که به منظور ردیابی پادتن علیه ۵ سروتیپ *لپتوسپیرا اینتروگانس* مورد آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی قرار گرفتند، ۲۳ نمونه (۱۵/۱۳ درصد) مثبت و عیار سرمی برابر یا بیشتر از ۱:۱۰۰ داشتند. پراکندگی آلودگی به سروتیپ‌های مختلف نشان داد که ایکترهموراژیه با ٤٤/٤٤ درصد دارای بیشترین پراکندگی و پس از آن به‌ترتیب گریپوتیفوزا با ۲۹/٦۲ درصد، کانیکولا با ۲۲/۲۲ درصد و پومونا با ۳/۷ درصد دارای پراکندگی بودند. پادتن ضد سروتیپ هارجو در سرم هیچ‌کدام از اسب‌ها وجود نداشت. هم‌چنین برخی از نمونه‌ها به چند سروتیپ آلوده بودند، به‌طوری‌که ٤ نمونه به ۲ سروتیپ و ۱۹ نمونه به ۱ سروتیپ آلودگی داشتند. نتایج عیار سنجی نشان داد که عیار سرمی ۱:۱۰۰ به میزان ۷۰/۳۵ درصد و ۱:۲۰۰ به میزان ۲۹/٦۱ درصد بود (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج عیارسنجی پادتن علیه سروتیپ‌های مختلف در سرم اسب‌های مورد مطالعه با روش MAT

عیار پادتن / سروتیپ	۱:۱۰۰		۱:۲۰۰		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
گریپوتیفوزا	۵	۱۸/۵۱	۳	۱۱/۱۰	۸	۲۹/٦۲
پومونا	–	–	۱	۳/۷	۱	۳/۷
ایکترهموراژیه	۸	۲۹/٦۲	٤	۱٤/۸۱	۱۲	٤٤/٤٤
کانیکولا	٦	۲۲/۲۲	–	–	٦	۲۲/۲۲
هارجو	–	–	–	–	۰	۰
جمع	۱۹	۷۰/۳۵	۸	۲۹/٦۱	۲۷	۱۰۰

فراوانی آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در اسب‌داری‌های شماره ۱ الی ۷ به ترتیب ۱۰/۸، ۱۰، ۱۷/۳۹، ۲٦/۰۸، ۳۰، ۱۱/٤۲ و صفر درصد بود. بررسی‌های آماری نشان داد بین اسب‌داری‌های مختلف از نظر میزان آلودگی سرمی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (p=۰/٤۲۳). فراوانی آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در اسب‌ها بر حسب جنس نشان داد که اسب‌های نر و ماده به ترتیب ۱۲/۳ و ۱۵/۷ درصد آلوده می‌باشند (جدول ۳). تحلیل آماری داده‌ها

نشان داد بین این دو گروه سنی اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد (p=۰/٤۹۸).

جدول ۳- مقایسه آلودگی به لپتوسپیرا اینتروگانس در اسب‌های نر و ماده اسب‌داری‌های اطراف تهران

آلودگی جنس	مثبت (درصد)	منفی(درصد)	جمع کل
نر	۹(٪۱۲/۳)	٥٤(٪۸۷/۷)	٦۳
ماده	۱٤(٪۱٥/۷)	۷٥(٪۸٤/۳)	۸۹
جمع کل	۲۳(٪۱٥/۱۳)	۱۲۹(٪۸٤/۸٦)	۱٥۲

بررسی فراوانی آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در اسب‌ها در سنین مختلف نشان داد که در گروه‌های مختلف سنی زیر ۱ سال، ٥-۱ سال، ۱۰-٦ سال و بالاتر از ۱۰ سال به ترتیب ۱٥/٤، ۱٤/٦، ۱۸/۸ و ۷/٤ درصد است (جدول ٤). مقایسه فراوانی آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* بر حسب سن نشان داد که بین میزان آلودگی و سن ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (p=۰/٥۸۹).

جدول ۴- مقایسه فراوانی آلودگی به لپتوسپیرا اینتروگانس در اسب‌های اسب‌داری های اطراف تهران بر حسب سن

آلودگی سن	مثبت (درصد)	منفی (درصد)	جمع
زیر ۱ سال	۲(٪۱٥/٤)	۱۱(٪۸٤/٦)	۱۳
٥-۱ سال	۷(٪۱٤/٦)	٤۱(٪۸٥/٤)	٤۸
۱۰-٦ سال	۱۲(٪۱۸/۸)	٥۲(٪۸۱/۳)	٦٤
بالاتر از ۱۰ سال	۲(٪۷/٤)	۲٥(٪۹۲/٦)	۲۷
جمع	۲۳(٪۱٥/۱۳)	۱۲۹(٪۸٤/۸٦)	۱٥۲

بحث و نتیجه‌گیری

لپتوسپیروز یکی از بیماری‌های زئونوز با پراکندگی جهانی می‌باشد که توسط سروتیپ‌های *لپتوسپیرا اینتروگانس* ایجاد می‌شود. این بیماری تقریباً تمام پستانداران را آلوده می‌کند و طیف وسیعی از نشانه‌های تحت بالینی تا فوق حاد را ایجاد می‌کند و می‌تواند منجر به مرگ شود (Radostits *et al.*, 2007). مطالعات صورت گرفته روی این بیماری عمدتاً بر پایه سرولوژی می‌باشد. این مطالعه نیز با استفاده از آزمایش سرولوژی به ارزیابی میزان فراوانی آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در اسب‌های اسب‌داری‌های اطراف تهران پرداخته است. از بین آزمایشاتی که برای پی بردن به آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* با استفاده از ردیابی پادتن ضد آن در سرم خون انجام می‌گیرد، آزمایش MAT به عنوان آزمایش استاندارد یا طلایی مطرح است و سایر روش‌ها نیز در مقایسه با این روش مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. در این روش از سروتیپ‌های زنده *لپتوسپیرا اینتروگانس* استفاده می‌شود. به‌دلیل وجود

انواع مختلف سروتیپ‌های این باکتری، معمولاً در ارزیابی آلودگی دام‌های هر منطقه از سروتیپ‌های شایع آن منطقه استفاده می‌گردد. با توجه به مطالعات گذشته که روی دام‌های مختلف در ایران انجام گرفته است، پنج سروتیپ گریپوتیفوزا، پومونا، ایکترهموراژیه، کانیکولا و هارجو از شایع‌ترین آن‌ها می‌باشند. لذا در این مطالعه از این پنج سروتیپ زنده استفاده گردید. نتایج حاصل از مطالعه حاضر که با استفاده از روش MAT و پنج سروتیپ زنده *لپتوسپیرا اینتروگانس* انجام گرفت، مشخص گردید که ۱۵/۱۳ درصد اسب‌های تحت مطالعه از ۷ اسب‌داری اطراف تهران به *لپتوسپیرا اینتروگانس* آلوده و دارای پادتن ضد حداقل یک سروتیپ از ۵ سروتیپ مورد آزمایش می‌باشند. در این بررسی ۸۲/٦ درصد نمونه‌های مثبت اسب‌ها تنها به یک سروتیپ و ۱۷/٤ درصد به دو سروتیپ آلوده بودند. بررسی آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در اسب‌های سایر نقاط ایران نشان می‌دهد که آلودگی در اسب‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، گنبد، ارومیه و خرم‌آباد به ترتیب ۷/۷، ۳۹/۲۳، ۱۲، ۱٦/۳ و ۷/٦۲ درصد گزارش شده است (رامین و همکاران، ۱۳۹۲؛ Hassanpour and Safarmashaei, 2012; Jahed Dashliboron *et al*., 2013; Maleki *et al*., 2015; Haji Hajikolaei *et al*., 2006; Khousheh *et al*., 2012).

بررسی‌های صورت گرفته در سایر کشورها نشان می‌دهد که آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در اسب‌های آرژانتین ۷٤/٦ درصد، ایرلند ۷۲/۲ درصد، برزیل ٥٤ درصد، کره جنوبی ۲٥ درصد، کرواسی ۳۷/۲ درصد، مغولستان ۱٦/۷ درصد، لهستان ۳۹ درصد و هندوستان ۱۳/٥ درصد می‌باشد (Mayers 1976; Langoni *et al*., 2004; Rao *et al*., 1985; Jung *et al*., 2010; Turk *et al*., 2013; Arent and Kedzierska-Mieszkowska, 2013). این مطالعات نشان می‌دهند که بین مناطق مختلف ایران و همچنین با سایر کشورها از نظر آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* تفاوت وجود دارد. این تفاوت را می‌توان به وضعیت آب و هوای این مناطق، نگه‌داری توام با سایر دام‌ها، تعداد سروتیپ‌هایی که در آزمایش MAT مورد استفاده قرار گرفتند و عوامل مدیریتی و بهداشتی محل نگه‌داری اسب ها نسبت داد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که بالا بودن میزان آلودگی سرمی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در اسب‌های یک منطقه جغرافیایی که در کنار حیوانات دیگر زندگی می‌کنند، به‌این علت است که این حیوانات آلوده به سروتیپ‌های عادت یافته‌اند و باعث انتقال بیماری به اسب‌ها می‌شوند. عوامل مدیریتی و بهداشتی محل نگه‌داری اسب‌ها مهم‌ترین نقش را در جلوگیری از ابتلا به *لپتوسپیرا اینتروگانس* ایفا می‌کنند. اسب‌هایی که با خاک و آب آلوده در تماس هستند، ریسک بالاتری در ابتلا به بیماری دارند (Barwick *et al*., 1998).

در این مطالعه از بین سروتیپ‌هایی که مورد آزمایش قرار گرفتند، ایکترهموراژیه با ٤٤/٤٤ درصد دارای بیشترین و پس از آن به ترتیب گریپوتیفوزا با ۲۹/٦۲ درصد، کانیکولا با ۲۲/۲۲ درصد و پومونا با ۳/۷ درصد پراکندگی بوده‌اند. پادتن ضد سروتیپ هارجو در سرم هیچ‌کدام از اسب‌ها وجود نداشت.

سروتیپ غالب در اسب‌های خرم‌آباد کانیکولا، اردبیل هارجو، آذربایجان‌شرقی پومونا، گنبد کانیکولا، اهواز گریپوتیفوزا و ارومیه هارجو گزارش شده است (رامین و همکاران، ۱۳۹۲؛ Haji Hajikolaei *et al*., 2006; Khousheh *et al*., 2012; Hassanpour and Safarmashaei, 2012; Jahed Dashliboron *et al*., 2013; Maleki *et al*., 2015). در مطالعات صورت

گرفته در سایر کشورها نیز به سروتیپ غالب در اسب‌های تحت مطالعه اشاره شده است، به‌طوری‌که سروتیپ غالب در اسب‌های ایرلند براتیسلاوا، آرژانتین پومونا، برزیل ایکتروهموراژیه، کره جنوبی سجرو، کرواسی براتیسلاوا، مغولستان براتیسلاوا و هارجو، لهستان گریپوتیفوزا و هندوستان پومونا گزارش شده‌اند (Ellis, 1983; Mayers, 1976; Langoni *et al*., 2004; Rao *et al*., 1985; Jung *et al*., 2010; Turk *et al*., 2013; Odontsetseg *et al*., 2005; Arent and Kedzierska-Mieszkowska, 2013). از بین سروتیپ‌هایی که در آزمایش MAT مورد استفاده قرار می‌گیرند، سروتیپی که دارای بیشترین فراوانی است را معمولاً به عنوان سروتیپ غالب در نظر می‌گیرند و عمدتاً سروتیپ غالب یک منطقه با منطقه دیگر یا یک کشور با کشور دیگر متفاوت است و این بیانگر آن است که این سروتیپ به دام‌های آن منطقه بیشتر عادت پیدا کرده است. میزبان‌های *لپتوسپیرا اینتروگانس* را به دو دسته عادت‌یافته و تصادفی دسته‌بندی می‌کنند. با آزمایشات سرولوژیکی یا MAT به‌تنهایی نمی‌توان به‌طور قطع اعلام نمود که سروتیپ غالب در یک منطقه در میزبانی خاص عادت‌یافته است، لذا نیاز به جداسازی باکتری از بافت کلیه و یا ادرار آن می‌باشد چراکه، در میزبان‌های عادت‌یافته باکتری به مدت طولانی در بافت کلیه باقی‌مانده و از طریق ادرار دفع می‌شود (Radostits *et al*., 2007).

با توجه به فراوانی آلودگی ۱۵/۱۳ درصدی اسب‌های اسب‌داری‌های تهران به *لپتوسپیرا اینتروگانس* و با توجه به اینکه ۷۰/۳۵ درصد اسب‌های آلوده تیتر پادتن برابر با ۱:۱۰۰ داشتند و حداکثر تیتر ۱:۲۰۰ بوده است، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که آلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در اسب‌های تهران اندمیک بوده و اسب‌ها می‌توانند در جابه‌جایی و انتقال آن به سایر دام‌های اهلی و انسان نقش داشته باشند. از طرف دیگر، با توجه به‌این‌که از بین ۵ سروتیپ *لپتوسپیرا اینتروگانس* که مورد استفاده قرار گرفتند، آلودگی سرمی به ٤ سروتیپ گریپوتیفوزا، پومونا، ایکترهموراژیه و کانیکولا وجود داشته است، لذا به‌منظور کنترل و پیشگیری از شیوع لپتوسپیروز در اسب‌ها پیشنهاد می‌شود از واکسن‌هایی استفاده شود که حتماً دارای این ٤ سروتیپ باشند.

منابع

- رامین، ع.ق.، ایران نژاد، س. و عبداله‌پور، غ. (۱۳۹۲). تعیین ابتلا سرمی تک سمی‌ها به گونه‌های لپتوسپیرا در ارومیه. نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران، دوره ۷، شماره ۱، صفحات: ٦٥-٥٩.
- Arent, Z.J. and Kedzierska-Mieszkowska, S. (2013). Seroprevalence study of leptospirosis in northern Poland. Veterinary Record, 172: 269-270.
- Barwicka, R.S., Mohammeda, H.O., McDonoughb, P.L. and Whitea, M.E. (1998). Epidemiologic features of equine Leptospira interrogans of human significance. Preventive Veterinary Medicine, 36(2): 153-165.

- Bolin, C. (2010). Generalized condition. In: The Merck Veterinary Manual. Kahn, C.M. editors. 10th ed., USA: Merck and CO., pp: 590-596.
- Ellis, W.A., O'brien, J.J., Cassels, J.A. and Montgomery, J. (1983). Leptospiral infection in horses in Northern Ireland: Serological and microbiological findings. Equine Veterinary Journal, 15(4): 317-320.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. (1999). Leptospira and Leptospirosis. 2nd ed., Australia: Melbourne, MediSci, pp: 272-276.
- Haji Hajikolaei1, M.R., Gorbanpour, M., Haidari, M. and Abdollapour, G.R. (2005). Comparison of leptospiral infection in the horse and donkey. Bulletin Veterinary Institute in Pulawy, 49: 175-178.
- Hamond, C., Martins, M., Reis, J., Kraus, E., Pinna, A. and Lilenbaum, W. (2011). Pulmonary hemorrhage in horses seropositive to leptospirosis. Pesquisa Veterinária Brasileira *(*Brazilian Journal of Veterinary Research), 31(5): 413-415.
- Hassanpour, A. and Safarmashaei, S. (2012). Seroprevalence of leptospiral infection in horses, donkeys and mules in East Azerbaijan province. African Journal of Microbiology Research, 6(20): 4384-4387.
- Jahed Dashliboron, O., Hassanpour, A. and Abdollahpour, G.R. (2013). Serological Study of Leptospirosis in Horses in Gonbad, Iran. Global Veterinaria, 10(1): 51-54.
- Joung, B.Y., Lee, K.W. and Ha, T.Y. (2009). Seroprevalence of Leptospira spp. in clinically healthy racing horses in Korea. Journal of Veterinary Medicine Sciences, 72(2): 197-201.
- Khousheh, Y., Hassanpour, A., Abdollahpour, G.R. and Moghaddam, S. (2012). Seroprevalence of Leptospira Infection in Horses in Ardabil-Iran. Global Veterinaria, 9(5): 586-589.
- Langoni, H., Da Silva, A.V., Pezerico, S.B. and De Lima, V.Y. (2004). Anti-leptospirose agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goias and Mato Grosso do Sul, Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 10(3): 207-218.
- Maleki, S., Sookhtehzari, A. and Abdollahpour, G.R. (2015). Seroepidemiologic Study of Horses Leptospirosis in Khorramabad, west Iran. Buletin Teknology Tanaman Bil, 12(1): 135-138.
- Mayers, D.M. (1976). Serological studies and isolations of serotype hardjo and Leptospira biflexa strains from horses of Argentina. Journal of Clinical Microbiology, 3(6): 975-984.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgenson, H.J., Pfaller, M.A. and Yolken, R.H. (2003). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed., USA: Washington, D.C., ASM Press, pp: 809-823.
- Odontsetseg, N., Boldbaatar, D., Mweene, A.S. and Kida, H. (2005). Serological prevalence of Leptospira interrogans serovar bratislava in horses in Mongolia. Veterinary Record, 157: 518-519.
- Radostitis, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. And Constable, P.D. (2007). Diseases Associated With Bacteria. In: Veterinary Medicine, 10th ed., W.B. London: Saunders, pp: 1094-1123.
- Rao, S.A., Rao, K.R., Ramakrishna, K. and Reddy, K.B. (1985). Serological and clinical evidence of leptospiral infection in horses. Indian Veterinary Journal, 62: 273-277.
- Sellon, D.C. and Long, M.T. (2007). Equine Infectious Diseases. 2nd ed., USA: Saunders, pp: 301-309.
- Turk, N., Milas, Z., Habus, J., Stritof Majetic, Z., Mojcec Perko, V., Barbic, Lj., *et al*. (2013). Equine leptospirosis in Croatia - occurrence of subclinical infections and abortions. Veterinarski Arhiv, 83: 253-262.
- Walker, R.L. (2004).Veterinary Microbiology. 2nd ed., USA: Saunders, pp: 148-169.
- World Health Organization. (2003). Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Printed in Malta, pp: 1-52.

Seroprevalence of *Leptospira interrogans* infection in horses from some horse clubs in Tehran by Microscopic Agglutination Test (MAT)

Haji Hajikolaei, M.R.[1*], Nafisi Mozaffar, A.[2], Lotfollazadeh, S.[3], Ghorbanpour, M.[4], Abdollapour, G.R.[3]

1- Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2- Graduate of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3- Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
4- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
*Corresponding author email: mhajih@scu.ac.ir
(Received: 2015/11/9 Accepted: 2016/1/30)

Abstract

In order to evaluate the seroprevalence of Leptospira interrogans infection in horses, blood samples were taken from 152 horses from 7 horse clubs in Tehran. Serum samples were examined using a microscopic agglutination test to detect the presence of antibodies against five live serotypes of Leptospira interrogans (grippotyphosa, pomona, icterohaemorrhagiae, canicula and hardjo). Of the tested samples, 23 horses (15/13%) were positive to one or more serotypes. Titer levels ranged from 1:100 to 1:200. Icterohaemorrhagiae (44/44%) was the most frequently detected serovar followed in descending order by gripotyphosa (29/62%), canicula (22/22%), pomona (3/7%) and serotype hardjo was negative. Statistical analysis using the chi-squared test showed there was no significant correlation differences between Leptospira interrogans infection and factors such as sex and age. The serum titers of infected horses ranged from 1:100 (n=19) to 1:200 (n=78). These results suggest that the icterohaemorrhagiae serovar may be the most prevalent serovar in the horse population Tehran.

Key words: Leptospira interrogans, Horse, MAT, Seroprevalence, Tehran.