

Seroepidemiological evaluation of the frequency of *Leptospira interrogans* serum varieties in the stray dog population of Qazvin using microscopic agglutination test

Imandar, M.^{1*}, Javadi, A.², Abdollahpour, G.³, Mirzaie, K.⁴, Rahimi-Siahkal Mahale, P.⁵, Qanbari, A.⁶, Mirzaalimohammadi, M.⁷, Taherkhani, E.⁸, Sadeghi Alvijeh, J.⁹

1- D.V.M. & D.V.Sc. in Veterinary Microbiology, The Head of Health and Management of Animal Diseases Unit of Qazvin Province Directorate of Iran Veterinary Organization, Qazvin, Iran.

2- D.V.M. & D.V.Sc. in Large Animal Internal Medicine, Deputy of Health of Qazvin Province directorate of Iran Veterinary Organization, Qazvin, Iran

3- Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

4- Animal and Animal Products-Borne Diseases Research Center, Iran Veterinary Organization, Tehran, Iran.

5- D.V.M., Board Certificate in Poultry Medicine, The Head of Diagnosis and Treatment Unit of Qazvin Province Directorate of Iran Veterinary Organization, Qazvin, Iran.

6- D.V.M., Supervisor of the Hygiene Staff of Dashte Bareh Slaughterhouse, Qazvin Province Directorate of Iran Veterinary Organization, Qazvin, Iran.

7- D.V.M., Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Orumiye Branch, Islamic Azad University, Orumiye, Iran.

8- D.V.M., Expert in Combating Animal Disease, Qazvin Province Directorate of Iran Veterinary Organization, Qazvin, Iran.

9- Expert in the Clinical Pathology, Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

*Corresponding author's email: dr.imandar@gmail.com

(Received: 2024/1/6 Accepted: 2024/5/28)

Abstract

Leptospirosis is an infectious and zoonotic disease with global spread, and its agent, which is a serovar of *Leptospira interrogans* bacterium, is transmitted by contact with the urine of infected animals. The dog, as one of the important reservoirs of the mentioned bacteria, causes contamination in humans and domestic animals. The aim of the present study was to evaluate seroepidemiological *Leptospira interrogans* serum varieties using microscopic agglutination test (MAT) in stray dogs of Qazvin. For this purpose, a total of 74 serum samples were examined for the detection of antibodies against the mentioned bacteria, of which 15 samples showed a positive reaction with one or two serovars of *Leptospira interrogans*. The results showed that most infected dogs had serum titers of 1:100 (47.1%) and 1:1600 (17.65%). The highest contamination was with *Canicula* serovars with 70.6% and *Harjo* 11.76%, and *Gripotyphosa*, *Pomona* and *Icterohemorrhagia* serovars were in the next positions. Among the positive samples, three samples were related to female dogs and 12 samples belonged to male dogs, and the result of Chi square test showed that there was a significant relationship between gender and serum contamination ($p < 0.05$). Also, 8 samples belonged to the age groups above 3 years and 7 samples belonged to the age groups less than 3 years, and there was no significant relationship between age groups and the positive results ($p > 0.05$). Presence of serum contamination among the population of stray dogs in Qazvin can lead to a high prevalence of clinical infection in pet dogs and domestic and wild animals especially sheep flocks, which may also affect public health due to the zoonotic nature of the disease.

Conflict of interest: None declared.

Key words: Dog, Leptospirosis, MAT, Qazvin, Seroepidemiology.

ارزیابی سرواپیدمیولوژیک فراوانی وارپته‌های سرمی باکتری لپتوسپیرا/اینتروگانس در جمعیت سگ‌های بلاصاحب قزوین با استفاده از آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی

محسن ایمان‌دار^{۱*}، امیر جوادی^۲، غلامرضا عبدالله‌پور^۳، کامران میرزائی^۴، پریسا رحیمی سیاهکل محله^۵، علیرضا قنبری^۶، مصطفی میرزاعلیمحمدی^۷، اسحاق طاهرخانی^۸، جواد صادقی علویجه^۹

۱- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، متخصص میکروپزشکی دامپزشکی، رئیس اداره بهداشت و مدیریت بیماری‌های دامی اداره کل دامپزشکی استان قزوین، قزوین، ایران.

۲- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، متخصص بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، معاونت سلامت اداره کل دامپزشکی استان قزوین، قزوین، ایران.

۳- استاد گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۴- گروه آموزشی مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از دام و فرآورده‌های دامی، سازمان دامپزشکی، تهران، ایران.

۵- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، برد تخصصی بهداشت و بیماری‌های پرندگان، رئیس اداره تشخیص و درمان اداره کل دامپزشکی استان قزوین، قزوین، ایران.

۶- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، سرپرست کادر بهداشتی کشتارگاه صنعتی دام قزوین دشت بره، قزوین، ایران.

۷- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۸- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، کارشناس مبارزه با بیماری‌های دامی، اداره کل دامپزشکی استان قزوین، قزوین، ایران.

۹- کارشناس کلینیکال پاتولوژی، گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: dr.imandar@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۸)

چکیده

لپتوسپیروزیس بیماری عفونی و زئونوز با انتشار جهانی است و عامل آن که سروواری از باکتری لپتوسپیرا/اینتروگانس می‌باشد، در اثر تماس با ادرار حیوانات آلوده انتقال می‌یابد. سگ، به عنوان یکی از مخازن مهم باکتری مذکور، باعث ایجاد آلودگی در انسان و دام‌های اهلی می‌شود. هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی سرواپیدمیولوژیک وارپته‌های سرمی لپتوسپیرا/اینتروگانس با استفاده از آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی (Microscopic Agglutination Test; MAT) در سگ‌های بلاصاحب قزوین بود. بدین منظور تعداد ۷۴ نمونه سرم جهت تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد باکتری مذکور بررسی شدند که ۱۵ نمونه با یک یا دو سرووار واکنش مثبت نشان دادند. نتایج نشان داد که سگ‌های آلوده بیشتر تیترهای سرمی ۱:۱۰۰ (۴۷/۱ درصد) و ۱:۱۶۰۰ (۱۷/۶۵ درصد) دارند. بیشترین آلودگی با سرووارهای کنیکولا با ۷۰/۶ درصد و هارجو ۱۱/۷۶ درصد و سرووارهای گریپوتیفوزا، پومونا و/یکتره‌موراژیه در جایگاه‌های بعدی بودند. در بین نمونه‌های مثبت، تعداد ۳ نمونه به سگ‌های ماده و ۱۲ نمونه به سگ‌های نر تعلق داشت و نتیجه آزمون مربع کای نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین جنسیت و آلودگی سرمی مذکور وجود دارد ($p < 0.05$). همچنین ۸ نمونه به گروه‌های سنی بالای ۳ سال و ۷ نمونه به گروه‌های سنی کمتر از ۳ سال تعلق داشتند که ارتباط معنی‌داری بین گروه‌های سنی و مشاهده نتیجه مثبت وجود نداشت ($p > 0.05$). حضور آلودگی سرمی در بین جمعیت سگ‌های بلاصاحب قزوین می‌تواند منجر به شیوع بالای عفونت بالینی در سگ‌های دارای سرپرست و حیوانات وحشی و اهلی، به ویژه گله‌های گوسفند شود که با توجه به زئونوز بودن بیماری ممکن است بهداشت عمومی را نیز تحت تاثیر قرار دهد.

کلیدواژه‌ها: لپتوسپیروزیس، سگ، سرواپیدمیولوژی، آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی، قزوین.

مقدمه

لپتوسپیروزیس یا تب شالیزار یک بیماری عفونی و ژئونوز با انتشار جهانی است که در اثر عفونت ناشی از سرووارهای بیماری‌زای نوعی باکتری اسپیروکتی متعلق به جنس لپتوسپیرو، در پستانداران وحشی، اهلی و انسان بروز می‌کند (Grippi et al., 2023). البته عامل بیماری لپتوسپیروزیس دارای طیف میزبانی وسیع بوده و علاوه بر پستانداران، از خزندگان، پرندگان، دوزیستان و ماهی‌ها نیز جدا شده‌است (McCallum et al., 2019). بیماری مذکور در مناطق گرمسیری و آب و هوای گرم و مرطوب و نیز در نواحی دشتی کنار رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و برکه‌ها شیوع بیشتری دارد و به عنوان یکی از بیماری‌های قابل اختطار سازمان جهانی بهداشت دام محسوب می‌گردد (Knific et al., Grippi et al., 2023). عفونت‌های لپتوسپیروزیس در مناطق مختلف ایران (2019) هم باعث بروز بیماری و ضررهای اقتصادی فراوانی شده‌است (Jafari ; Firouzi and Vand Yousefi, 2000). البته استان‌های شمالی کشور به واسطه رطوبت بالا و بارش‌های فراوان، شرایط مساعدتری برای وقوع بیماری لپتوسپیروزیس دارند (Mansour-). وقوع بیماری در آفریقای جنوبی در سگ و گاو، در نیوزیلند در گاو، در کلمبیا در سگ و در پاناما در خوک و حیوانات وحشی گزارش شده‌است (Bettelheim and Fogg., 2002). برخی از حیوانات مذکور به عنوان مخزن بیماری لپتوسپیروزیس عمل می‌کنند که چونندگان و حیوانات وحشی از این نظر در درجه اول اهمیت قرار دارند (Kikuti et al., 2012). البته برخی از حیوانات اهلی مثل سگ، گاو و خوک هم به عنوان مخزن در انتشار عفونت‌های

لپتوسپیروزیس دخیل‌اند و با توجه به این که سگ می‌تواند به عنوان مخزن برای یک یا چند سروتیپ لپتوسپیرو عمل کند، لذا به عنوان عامل اصلی انتقال عفونت مذکور به انسان شناخته می‌شود (Grippi et al., 2023).

تاکنون سرووارهای متعددی در جنس لپتوسپیرو شناخته شده و براین اساس، بیش از ۲۵۰ سرووار بیماری‌زای شناسایی شده، در ۱۵ سروگروه مختلف طبقه‌بندی شده‌اند (Grippi et al., 2023). در این بین، سرووارهای کنیکولا و ایکتروهموراژیة گونه لپتوسپیرو اینتروگانس به عنوان شایع‌ترین و شناخته شده‌ترین سرووارهای آلوده‌کننده سگ، از سراسر دنیا گزارش شده‌اند (Ramirez et al., 2017)؛ هر چند که آنتی‌بادی‌های اختصاصی زیادی مربوط به سایر سرووارها مثل اتومنالیس، براتیسلاوا، گریپوتیفوزا، هارجو، پومونا و زانونی هم در سرم سگ‌های مبتلا به عفونت‌های لپتوسپیروزیس یافت شده‌است (Chou et al., 2014). از لحاظ تئوری، هر جایی که خطر تماس مستقیم یا غیرمستقیم با ادرار حیوانات آلوده وجود داشته باشد، هر پستاندار مستعدی مبتلا به لپتوسپیروزیس خواهد شد، از این رو ادرار خونی که در بعضی از سگ‌ها دیده می‌شود، می‌تواند راهی در جهت پخش عفونت باشد؛ هر چند موارد زیادی از ابتلاء سگ‌های به ظاهر سالم نیز گزارش شده‌است (Tajbakhsh, 1997). سگ‌ها ممکن است در هر سنی مبتلا شوند ولی هیچ‌گونه استعداد نژادی در این خصوص مطرح نیست (Quinn et al., 2002).

بررسی اپیدمیولوژیک بیماری لپتوسپیروزیس بسیار پیچیده می‌باشد، چرا که گردش باکتری لپتوسپیرو در یک منطقه، نیاز به شرایط با ثبات در آن منطقه دارد

انتشار عفونت در سگ‌ها دارد؛ لذا تشخیص سگ‌های آلوده، به عنوان یک قدم اساسی در جهت کنترل بهداشت عمومی مطرح می‌باشد. سگ‌های بلاصاحب با توجه به سبک زندگی و عدم اجرای برنامه‌های واکسیناسیون در مقایسه با سگ‌های صاحب‌دار و اهلی، بیشتر در معرض خطر آلودگی به این عفونت قرار دارند (Miotto *et al.*, 2018). علی‌رغم این‌که روش‌های آزمایشگاهی متعددی جهت تشخیص حضور لپتوسپیراها وجود دارد، اما در حال حاضر با توجه به غیرقابل اعتماد بودن تشخیص میکروسکوپی باکتری لپتوسپیراها به دلیل نازک بودن آن و نیز شرایط رشد آهسته باکتری فوق و وقت‌گیر بودن فرآیند کشت آن در آزمایشگاه، استفاده از روش‌های سرمی و مولکولی جهت تعیین میزان آلودگی لپتوسپیروسی توصلیه شده است (Murray *et al.*, 2015). امروزه آگلوتیناسیون میکروسکوپی (Microscopic Agglutination Test; MAT)، به طور گسترده‌ای برای تشخیص سرمی بیماری لپتوسپیروزیس مورد استفاده قرار گرفته و حتی به عنوان روش استاندارد طلایی تشخیص سرمی بیماری مذکور مطرح می‌باشد، به طوری که علاوه بر شناسایی سرووار آلوده‌کننده حیوان، میزان تیترا آنتی‌بادی‌های ضد لپتوسپیروسی نیز به کمک روش فوق، در سرم قابل سنجش می‌باشد (Fahimipour *et al.*, 2021; Grippi *et al.*, 2023). البته روش‌های نوین مولکولی از قبیل PCR نیز به جهت سرعت بالا در شناسایی عامل باکتریایی، توان تشخیص مرحله عفونت را دارا می‌باشند (Khaki, 2016).

افزایش بی‌رویه تعداد سگ‌های بلاصاحب در سالیان اخیر و نبود اطلاعات و شواهد کافی در خصوص شیوع آلودگی لپتوسپیروسی در سگ‌های استان قزوین و با

(Goldstein, 2010)، همچنین طیف بیماریزایی ناشی از سرووارهای باکتری مذکور، می‌تواند بسیار متنوع و از یک عفونت تحت بالینی ملایم تا یک سندرم شدید بالینی با درگیری همزمان چند ارگان در بدن و حتی مرگ و میر متغیر باشد (Chou *et al.*, 2014; Miotto *et al.*, 2018). در سگ‌ها، ۳ شکل از بیماری لپتوسپیروزیس دیده می‌شود که شامل فرم حاد توأم با نارسایی کلیوی و کبدی که شایع‌ترین علامت آن ادرار خونی است (Minke *et al.*, 2009) و در سگ‌های جوان متداول می‌باشد (Tajbakhsh, 1997)، فرم تحت حاد همراه با زردی که شایع‌تر بوده و معمولاً در حیوانات با آلودگی مزمن رخ می‌دهد و با توجه به این‌که در طی آن، حضور باکتری در ادرار بدون بروز علائم بالینی رخ می‌دهد (WHO, 2003)، لذا حیوانات مبتلا به فرم مذکور برای سال‌ها به عنوان ناقل بیماری عمل می‌کنند. شکل سوم هم فرم اورمی (تیفوس سگ یا تب کینیکولا) است که شامل دهیدراتاسیون، استفراغ و زخم‌های دهانی می‌باشد (Miotto *et al.*, 2018). البته در طی دوره کمون ۴ الی ۱۲ روزه بیماری لپتوسپیروزیس نیز ممکن است علائم غیراختصاصی همچون تب، افسردگی، بی‌اشتهایی و درد عمومی بروز نماید. همچنین در مواردی مننژیت، التهاب سیستم بافت لایه میانی چشم یا Uveitis و سقط جنین هم گزارش شده است (Alonso *et al.*, 2001). از طرف دیگر، لپتوسپیروزیس به عنوان یک بیماری شغلی در دامپزشکان، پرورش دهندگان یا صاحبان سگ‌ها، چوپانان، گله‌داران، کشاورزان، شالیکاران و کارگران کشتارگاه‌های دام مشاهده می‌شود (Tajbakhsh, 1997). کاهش خطر انتقال بیماری به انسان بستگی به تشخیص به موقع بیماری و میزان

توجه به این که پژوهش پیش‌رو، نخستین بررسی عفونت لپتوسپیروزی در سگ‌های بلاصاحب ساکن در منطقه قزوین می‌باشد، لذا مطالعه حاضر با هدف تجزیه و تحلیل سرواپیدمیولوژیکی عفونت لپتوسپیروزی در سگ‌های بلاصاحب استان قزوین با استفاده از روش MAT انجام گردید.

مواد و روش‌ها

- نحوه نمونه‌گیری: در این مطالعه مقطعی (cross-sectional) که در فاصله اسفند ماه سال ۱۴۰۰ لغایت شهریور ماه سال ۱۴۰۱ به طول انجامید، تعداد ۷۴ نمونه خون به صورت تصادفی از بین جمعیت سگ‌های بلاصاحب استان قزوین (سگ‌هایی که فاقد سابقه واکسیناسیون و هر گونه علائم بالینی بودند) جمع‌آوری گردید. لازم به ذکر است که با عنایت به عدم اطلاع دقیق از جمعیت سگ‌های مورد نظر، با استفاده از فرمول تعیین حجم نمونه در مطالعات مقطعی (رابطه زیر) و با فرض وجود ۲۵ درصد آلودگی لپتوسپیروزی در جمعیت مذکور براساس مطالعات قبلی و نیز احتساب ۹۵ درصد سطح اطمینان و ۱۰ درصد دقت مطالعه، می‌بایست حداقل از تعداد ۷۴ قلاده سگ بلاصاحب، نمونه خون اخذ می‌شد:

$$n = \frac{z^2 \cdot 1 - \frac{\alpha}{2} \cdot pq}{d^2}$$

سگ‌های مذکور از هر دو جنس نر و ماده بوده و در محدوده سنی ۱ الی ۱۱ سال قرار داشتند. عمل خونگیری از ورید سافن سگ‌های مورد نظر و با استفاده از لوله ونوجکت خلاءدار (Clot activation 10 ml ساخت ایران، شرکت فرزانه آرمان) انجام شد. بدین

منظور مقدار ۷-۵ میلی‌لیتر خون از هر سگ گرفته شد تا در آزمایشگاه از آن ۳-۱ میلی‌لیتر سرم تهیه شود. لذا ابتدا لوله‌های حاوی نمونه‌های خون به مدت ۲ ساعت در دمای محیط قرار داده می‌شدند تا لخته خونی به صورت کامل تشکیل گردد و سپس به یخچال ۴ درجه سلسیوس منتقل می‌گردید. صبح روز بعد لوله‌ها از یخچال خارج می‌شد و با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (Heraeus مدل LaboFuge200 ساخت کشور آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیده و سپس سرم‌های حاصله، جداگانه به داخل میکروتیوب‌های دیگری منتقل می‌گردیدند. لازم به ذکر است که در این مرحله، میکروتیوب‌های مذکور کدگذاری می‌شدند تا مشخصات سگ‌های نمونه‌برداری شده تا پایان قابل ردیابی باشند. همچنین میکروتیوب‌های کدگذاری شده به فریزر منفی ۲۰ درجه سلسیوس منتقل می‌شدند تا زمان انجام آزمایش، در شرایط انجماد حفظ شوند.

- نحوه انجام آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT): چند ساعت قبل از شروع آزمایش MAT، سرم‌های تهیه شده در مرحله قبل از فریزر خارج گردیده و در دمای آزمایشگاه به تدریج ذوب شدند. در ادامه برای تهیه رقت‌های سریالی ۱:۵۰ و بالاتر از سرم‌ها (تا رقت ۱:۳۲۰۰)، از محلول رقیق‌کننده EMJH base یا Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (محیط کشت غنی‌کننده پایه جداسازی لپتوسپیروها ساخت شرکت Difco: حاوی ترکیبات دی‌سدیم فسفات ۱ گرم، مونوپتاسیم فسفات ۰/۳ گرم، سدیم کلراید ۱ گرم، آمونیوم کلراید ۰/۲۵ گرم و تیامین ۰/۵ گرم) استفاده گردید. لازم به یادآوری است با توجه به اینکه

سرورار مورد نظر در گونه لپتوسپیروا/ایتروگانس، در هر یک از نمونه‌های سرمی، تعیین گردید.

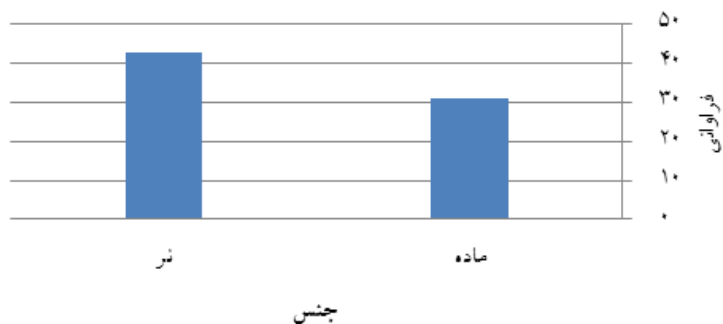
شایان ذکر است با توجه به خطر انتقال بیماری به انسان و نیز جلوگیری از آلودگی محیط کشت، تمامی مراحل کارهای عملی فوق در شرایط بهداشتی و در داخل هود میکروبیولوژی که جزء تجهیزات آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز بیمارستان آموزشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بود، انجام گردید و میزان آگلوتیناسیون در مورد نمونه‌های سرمی هم با استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک (Dark field Mic. Olympus BX50) ارزیابی شد.

- **تحلیل آماری داده‌ها:** نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ver27 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و جهت بررسی اختلافات آماری معنی‌دار بین نسبت موارد مثبت جدا شده در گروه‌های مختلف از نظر جنسیت و گروه‌های سنی کمتر و بیشتر از سه سال، از آزمون مربع کای (Chi-square) استفاده گردید.

یافته‌ها

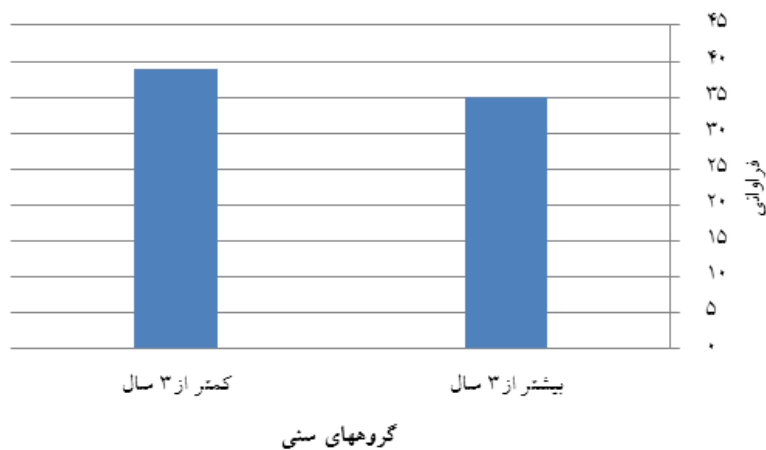
در طی مطالعه حاضر، در کل تعداد ۷۴ نمونه سرم خون مورد آزمایش MAT قرار گرفتند که تعداد ۳۱ نمونه (۴۱/۹ درصد) مربوط به سگ‌های ماده و ۴۳ نمونه (۵۸/۱ درصد) هم مربوط به سگ‌های نر بود (نمودار ۱).

در آزمایش MAT مقدار هم حجم سرم رقیق شده آنتی‌ژن بر روی لام اضافه می‌شود، لذا رقت نهایی نمونه سرمی دو برابر می‌شود. بنابراین حداقل رقتی که در بررسی حاضر مثبت تلقی شد، رقت ۱:۱۰۰ بود. همچنین با توجه به نتایج مطالعات سرولوژیک که قبلاً انجام گرفته و نیز به منظور صرفه‌جویی در مصرف محیط کشت پایه و نیز تسریع در انجام آزمایش، از ۵ نوع سرورار لپتوسپیروا شایع در ایران شامل سرورارهای گریپوتیفوزا، کنیکولا، هارجو پومونا و ایکتروهموراژیه گونه لپتوسپیروا/ایتروگانس، به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. ضمناً در بررسی حاضر، MAT انجام گرفته، بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت مربوط به سال ۲۰۲۱ با کمی تغییرات بود (WHO, 2021). اساس آزمایش MAT، بررسی میزان آگلوتیناسیون بین آنتی‌ژن مورد نظر و آنتی‌بادی‌های موجود در رقت‌های سریالی هر نمونه سرمی بود؛ بدین صورت که میزان آگلوتیناسیون در هر نمونه از یک مثبت تا ۴ مثبت درجه‌بندی می‌شد. البته نمونه‌هایی که آگلوتیناسیون آنها در حد یک مثبت بودند، منفی تلقی شدند و تنها نمونه‌های ۴ مثبت و ۳ مثبت به عنوان موارد مثبت و نمونه‌های ۲ مثبت تحت عنوان مشکوک ارزیابی شدند. همچنین برای تعیین تیتیر نهایی آنتی‌بادی در نمونه‌های ۳ و ۴ مثبت، آزمایش MAT بر روی رقت‌های ۱:۱۰۰ الی ۱:۳۲۰۰ آنها اجرا گردید. در نهایت هم بالاترین رقتی که در آن حداقل میزان آگلوتیناسیون ۳ مثبت مشاهده شد، به عنوان تیتیر نهایی آنتی‌بادی‌های ضد



نمودار ۱- توزیع فراوانی سگ‌های مورد مطالعه از نظر جنسیت

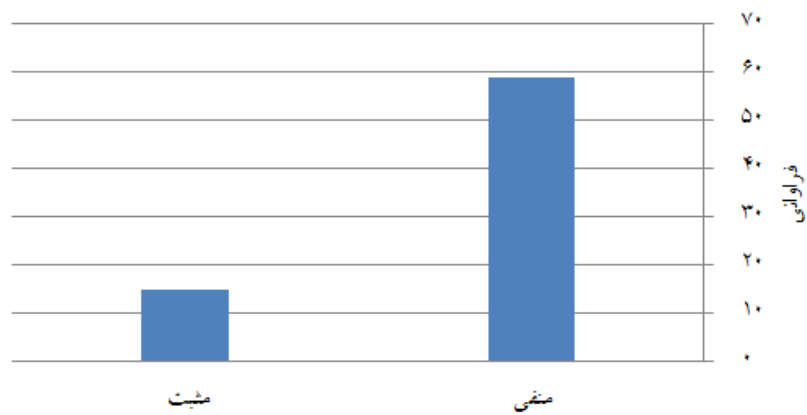
همچنین تعداد ۳۵ نمونه (۴۷/۳ درصد) مربوط به سگ- های با محدوده سنی بالای ۳ سال و ۳۹ نمونه (۵۲/۷ درصد) هم مربوط به سگ‌های با سن کمتر از ۳ سال بود (نمودار ۲).



نمودار ۲- توزیع فراوانی سگ‌های مورد مطالعه از نظر سن

(۲۰/۳ درصد) از نمونه‌های مذکور، دارای واکنش مثبت سرمی بر علیه حداقل یکی از ۵ سرووار مورد نظر از گونه لپتوسپییرا/اینتروگانس، بودند (نمودار ۳).

بر اساس نتایج آزمایشگاهی MAT در تحقیق حاضر، تعداد ۵۹ مورد (۷۹/۷ درصد) از نمونه‌های مورد آزمایش، فاقد واکنش مثبت سرمی بوده و ۱۵ مورد



نتیجه تست آزمایشگاهی

نمودار ۳- توزیع فراوانی سگ‌های مورد مطالعه از نظر نتایج منفی و مثبت در آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی

گرفته‌اند، نتایج حاصله از آزمون MAT همچنین نشان داد که در سگ‌های آلوده تیترهای سرمی ۱:۱۰۰ به تعداد ۸ مورد (۴۷/۱ درصد)، ۱:۲۰۰ به تعداد ۲ مورد (۱۱/۷۶ درصد)، ۱:۴۰۰ به تعداد یک (۵/۸۸ درصد)، ۱:۸۰۰ به تعداد ۲ مورد معادل ۱۱/۷۶ درصد، تیتر ۱:۱۶۰۰ به تعداد ۳ مورد (۱۷/۶۵ درصد) و ۱:۳۲۰۰ با یک مورد معادل ۵/۸۸ درصد از نمونه‌های مثبت سرمی را شامل بودند (جدول ۱).

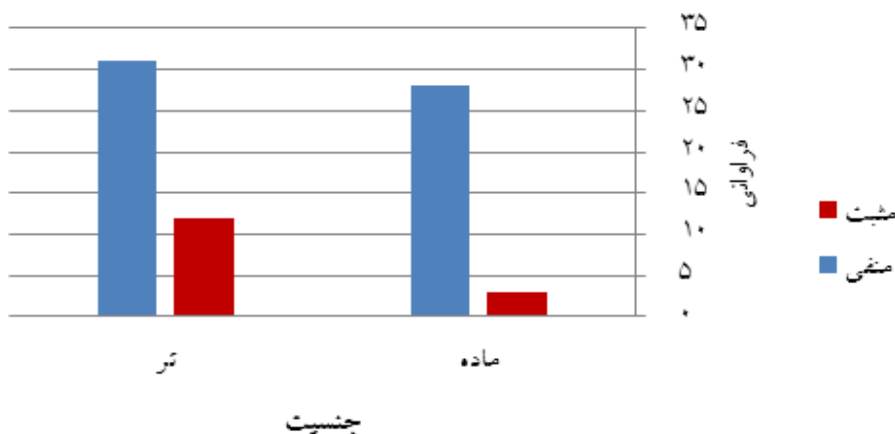
همچنین از نظر میزان فراوانی سرمی سرووارهای مورد نظر در تحقیق حاضر، بیشترین آلودگی مربوط به سرووار کنیکولا با ۷۰/۶ درصد موارد سرمی مثبت بود (۱۲ مورد). سرووار هارجو هم با فراوانی ۱۱/۷۶ درصد در رتبه دوم (۲ مورد) و سرووارهای گریپوتیفوزا، ایکتروهومورائیه و پومونا هر کدام با فراوانی ۵/۸۸ درصد (یک مورد)، از نظر میزان فراوانی سرمی در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند. از طرف دیگر نظر بر این که در طی مطالعه حاضر، تیترهای سریالی ۱:۱۰۰ تا ۱:۳۲۰۰ مورد استفاده قرار

جدول ۱- میزان فراوانی سرووارهای گونه لپتوسپیرو ایتروگانس بر اساس تیترهای موارد سرمی مثبت حاصله در آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی

سرووار مورد نظر	فراوانی براساس تیتر سرمی						
	۱:۱۰۰	۱:۲۰۰	۱:۴۰۰	۱:۸۰۰	۱:۱۶۰۰	۱:۳۲۰۰	تعداد کلی
کنیکولا	۳	۲	۱	۲	۳	۱	۱۲ (۷۰/۶)
گریپوتیفوزا	۱	-	-	-	-	-	۱ (۵/۸۸)
پومونا	۱	-	-	-	-	-	۱ (۵/۸۸)
ایکتروهومورائیه	۱	-	-	-	-	-	۱ (۵/۸۸)
هارجو	۲	-	-	-	-	-	۲ (۱۱/۷۶)
تعداد موارد مثبت (درصد)	۸ (۴۷/۱)	۲ (۱۱/۷۶)	۱ (۵/۸۸)	۲ (۱۱/۷۶)	۳ (۱۷/۶۵)	۱ (۵/۸۸)	۱۷ (۱۰۰)

بیشتر از سگ‌های ماده (۹/۷ درصد) می‌باشد. نتیجه آزمون مربع کای هم نشان داد که ارتباط معنی‌دار آماری بین جنسیت و نتایج مثبت سرمی مشاهده شده در آزمون MAT وجود دارد ($p < 0.05$).

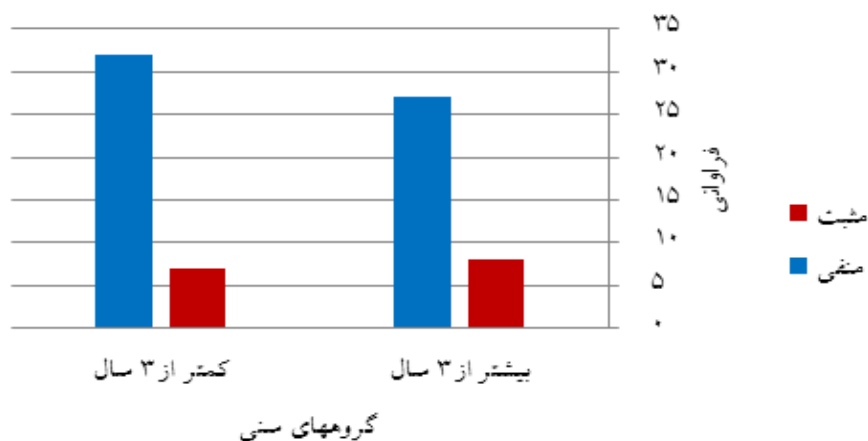
توزیع فراوانی نتایج آزمون آزمایشگاهی در جنس‌های مختلف جمعیت سگ‌های مورد مطالعه هم در نمودار ۴ نمایش داده شده است. همانطور که در نمودار مشخص است، در تحقیق حاضر فراوانی موارد مثبت مشاهده شده در سگ‌های نر ۲۷/۹ درصد بوده که



نمودار ۴- توزیع فراوانی نتایج مثبت و منفی در آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی براساس جنسیت سگ‌های مورد مطالعه

درصد بود که تا حدودی بیشتر از سگ‌های جوان‌تر از ۳ سال (۱۷/۹ درصد) می‌باشد؛ اما نتیجه آزمون مربع کای نشان داد که ارتباط معنی‌دار آماری بین گروه‌های سنی مذکور و نتایج مثبت سرمی مشاهده شده در آزمون MAT وجود ندارد ($p > 0.05$).

همچنین توزیع موارد مثبت و منفی در گروه‌های سنی مختلف در جمعیت سگ‌های مورد مطالعه در نمودار ۵ ارائه شده است. همانطور که در نمودار مشخص است، در این مطالعه فراوانی موارد مثبت مشاهده شده در سگ‌های با سن بیشتر از ۳ سال ۲۲/۹



نمودار ۵- توزیع فراوانی نتایج مثبت و منفی در آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی براساس گروه سنی سگ‌های مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از آزمون MAT در مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی آلودگی سرمی در نمونه‌های اخذ شده از سگ‌های بلاصاحب استان قزوین به میزان ۲۰/۳ درصد می‌باشد که در مقایسه با نرخ آلودگی‌های گزارش شده در این خصوص در مطالعات پیشین، متفاوت می‌باشد:

نتایج به دست آمده در برخی از مطالعات با یافته‌های مطالعه حاضر، همخوانی ندارد؛ به طوری که در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳ میزان ۴۱/۶ درصد از سگ‌های مورد بررسی دارای واکنش مثبت در برابر آنتی‌ژن‌های لپتوسپیرو/اینتروگانس بودند. شایان ذکر است که در مطالعه مذکور، تعداد ۲۴ قلاده سگ نگهدارنده در سطح گله‌های گاوهای شیری اطراف مشهد تحت آزمایش MAT قرار گرفتند و تعداد ۱۰ قلاده از آن‌ها، سرم مثبت گزارش گردیدند (Talebkhani Garossi et al., 2003). در یک بررسی دیگر هم در اهواز که در سال ۲۰۰۸ توسط آویژه و همکاران انجام گرفته، از تعداد ۱۴۹ قلاده سگ تحت بررسی، تعداد ۸ نمونه سرمی مربوطه (۵/۴ درصد) بر علیه حداقل یکی از سروتیپ‌های لپتوسپیرو واکنش نشان دادند. در پژوهش مذکور که با هدف مقایسه میزان شیوع عفونت لپتوسپیرو در سگ‌های مناطق شهری و روستایی انجام گرفته بود، نرخ شیوع در سگ‌های شهری بسیار پایین و در مقابل در سگ‌های روستایی و بلاصاحب با وضعیت بهداشتی ضعیف، بالا گزارش گردیده است (Avizeh et al., 2008). در یک بررسی دیگر در مکزیک در سال ۲۰۱۳ از تعداد ۹۲ قلاده سگ نگهداری شده در سطح پناهگاه‌ها، جهت تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد لپتوسپیرو، ۸ نمونه سرمی

معادل ۸/۶ درصد نمونه‌ها در آزمایش MAT دارای واکنش مثبت بودند (Cruz-Romero et al., 2013). آرزمانی و همکاران نیز در سال ۲۰۲۱ در منطقه بجنورد، شیوع بالای سرمی لپتوسپیرو در سگ‌های بلاصاحب آن منطقه با استفاده از روش MAT را با میزان آلودگی ۷۱ درصد گزارش نموده‌اند (Arzamani et al., 2021). همچنین در مطالعه‌ای در تایوان در سال ۲۰۱۴، میزان آلودگی سرمی با سویه‌های لپتوسپیرو در جمعیت سگ‌های بلاصاحب با استفاده از روش PCR، ۳۹/۷۲ درصد گزارش شده است (Chou et al., 2014). به نظر می‌رسد تفاوت‌های موجود در جمعیت مورد مطالعه، تعداد و نحوه انتخاب نمونه‌ها و نوع آزمایشات مورد استفاده، از دلایل احتمالی مربوط به تفاوت‌های مشاهده شده در نتایج حاصله از تحقیقات ذکر شده در بالا نسبت به یافته‌های تحقیق حاضر باشند. البته از طرف دیگر هم نتایج حاصله در تحقیق حاضر، با نتایج بسیاری از مطالعات انجام گرفته در داخل و خارج از کشور همخوانی دارد، به طوری که در مطالعه فهیمی‌پور و همکاران در سال ۲۰۲۱ در استان البرز، میزان شیوع آلودگی لپتوسپیرو در سگ‌های بلاصاحب، ۲۱/۸۴ درصد برآورد گردیده است (Fahimipour et al., 2021). همچنین در مطالعه‌ای در کشور بوسنی و هرزگوین در سال ۲۰۱۹ که تعداد ۳۰۰ نمونه سرم خون اخذ شده از ۳ گروه سگ‌های خانگی، بلاصاحب و نگهدارنده با استفاده از ۱۲ سرووار لپتوسپیرو/اینتروگانس با روش MAT مورد آزمایش قرار گرفتند، ۲۱/۶ درصد از سگ‌های بلاصاحب، سرم مثبت شدند (Knific et al., 2019). همچنین سرم مثبت بودن در روش MAT، در برخی از کشورهای دنیا هم به این شرح

گرفته، سرووارهای غالب به ترتیب کنیکولا، *براتیسلایا* و *ایکتروهموراژی* گزارش شده‌اند (Grippi et al., 2023). این در حالی است که در برخی مطالعات، سایر سرووارها به عنوان شایع‌ترین سویه غالب مطرح می‌باشند، به طوری که در مطالعه طالب‌خان گروسی و همکاران در مشهد در سال ۲۰۰۳، سرووارهای آلوده کننده در سگ‌ها به ترتیب *ایکتروهموراژی* و *کنیکولا* بودند (Talebkhani Garossi et al., 2003). همچنین در سال ۲۰۰۸، سرووارهای *هارجو*، *بالوم*، *ایکتروهموراژی* و *گریپوتیفوزا*، به عنوان سرووارهای غالب در سگ‌های منطقه اهواز گزارش شده‌اند و نکته جالب اینکه سرووار *کنیکولا* در سگ‌های منطقه مذکور، غالب نبوده‌است (Avizeh et al., 2008). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹ در بوسنی و هرزگوین توسط کنیفیک و همکاران هم انجام شده، بالاترین میزان نتایج سرمی مثبت متعلق به سرووار *پومونا* بوده و سرووارهای *کنیکولا* و *ایکتروهموراژی* در رده‌های بعدی قرار داشتند (Knific et al., 2019). در مطالعه آرزمانی و همکاران در سال ۲۰۲۱ در منطقه بجنورد نیز سروتیپ غالب، *گریپوتیفوزا* گزارش شده‌است (Arzamani et al., 2021). مقایسه مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد عفونت ناشی از *لپتوسپیراها* توسط سروتیپ‌های بومی آن منطقه که به عوامل محیطی و اکولوژیکی وابسته هستند، ایجاد می‌گردد (Maleki et al., 2021). از سوی دیگر، سگ‌ها می‌توانند در گسترش سویه‌های *لپتوسپیرای* بیماری‌زا در محیط نقش ایفا کنند (Maleki et al., 2021). همچنین یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تیرهای مثبت حاصله در آزمون MAT، در محدوده ۱:۱۰۰ تا ۱:۳۲۰۰ قرار دارند و بیشترین نمونه‌های مثبت

می‌باشد؛ شیلی ۲۵/۹ درصد (Lelu et al., 2015)، برزیل ۲۱/۴ درصد (Seva et al., 2020) و تایلند ۱۰/۹ درصد (Pamipuntu and Suwannarong., 2016). مقایسه مطالعات مختلف صورت گرفته در این حوزه و وجود دامنه وسیع عفونت نشان می‌دهد که میزان آلودگی سرمی، گردش و حضور باکتری در یک منطقه نیاز به شرایط با ثبات در آن منطقه دارد و بدیهی است وجود عوامل متغیر در مناطق مختلف منجر به دستیابی به نتایج با میزان رخداد آلودگی متفاوت در آن مناطق خواهد گردید (Goldstein, 2010).

از طرف دیگر در مطالعه حاضر بر اساس نتایج آزمون MAT مشخص گردید که بیشترین آلودگی در بین نمونه‌های مثبت، به سرووار اختصاصی سگ یعنی *کنیکولا* با فراوانی ۷۰/۶ درصد تعلق داشت و سرووارهای *هارجو*، *گریپوتیفوزا*، *ایکتروهموراژی* و *پومونا* به ترتیب در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند. نتایج بیشتر مطالعات انجام گرفته قبلی نیز با یافته‌های تحقیق حاضر همخوانی دارند. در این راستا، در مطالعه انجام شده توسط کیکوتی و همکاران در سال ۲۰۱۲ و کروزی - رومرو در سال ۲۰۱۳ در مکزیک هم، شایع‌ترین سرووار شناسایی شده، *کنیکولا* بوده‌است (Kikuti et al., 2012; Cruz-Romero et al., 2013). فهیمی‌پور و همکاران در سال ۲۰۲۱ در استان البرز نیز توانستند سرووار *کنیکولا* را به عنوان سروتیپ غالب در سگ‌های سرم مثبت شناسایی نمایند. قابل ذکر اینکه در مطالعه نامبردگان هم سرووار *پومونا* کمترین میزان آلودگی را دارا بود که این یافته نیز با نتایج مطالعه حاضر کاملاً همخوانی دارد (Fahimipour et al., 2021). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۳ در جنوب ایتالیا انجام

مثبت نشان داده‌اند (Arzamani et al., 2021). در این خصوص قابل ذکر است، همانگونه که قبلاً نیز اشاره شده، در طی مطالعه حاضر، تمام نمونه‌هایی که رقت ۱:۵۰ آن‌ها در حد ۳ مثبت و ۴ مثبت بود، آزمایش MAT نهائی نمونه‌های مذکور با استفاده از رقت‌های ۱:۱۰۰ تا ۱:۳۲۰۰ انجام گردیده‌است، در حالی‌که در اروپا، تیتراهای بالاتر یعنی از ۱:۴۰۰ تا ۱:۸۰۰ جهت شناسایی سروورهای مسئول ایجاد عفونت‌های بالینی لپتوسپیروسی در روش MAT در نظر گرفته می‌شوند.

از طرف دیگر در نتایج مطالعه حاضر نیز، تعداد موارد مثبت سرمی در سگ‌های نر بیشتر از سگ‌های ماده بوده‌است ($p < 0/05$)، که این یافته مشابه با نتایج مطالعه‌ای قبلی می‌باشد که نشان از درصد بالای نمونه‌های سرم مثبت در جنس نر نسبت به جنس ماده می‌باشد (Ward et al., 2004). در مطالعه طالب خان و همکاران در مشهد نیز از تعداد ۲۰ قلاده سگ نر نگرهبان ۹ مورد (۴۵ درصد) و از ۴ قلاده سگ ماده فقط یک مورد (۲۵ درصد) دارای آنتی‌بادی مثبت بر علیه باکتری لپتوسپیروسی بودند (Talebkhani Garossi et al., 2003). هر چند که بررسی نتایج برخی مطالعات هم نشان می‌دهد که فراوانی آلودگی سرمی بین نرها و ماده‌ها یکسان بوده و اختلاف معنی‌داری بین جنسیت و آلودگی لپتوسپیروسی وجود ندارد (Cruz-Chou et al., 2014; Romero et al., 2013)؛ اما آنچه که در مورد یافته‌های تحقیق حاضر در این خصوص منطقی به نظر به نظر می‌رسد این است که می‌توان به نوع کاربرد بیشتر سگ‌های نر به عنوان سگ‌های گله و نگرهبان اشاره کرد که احتمالاً در مواجهه بیشتر با ناقلین آلوده خواهند بود

دارای تیترا ۱:۱۰۰ بودند (جدول ۱) که این یافته با نتایج مطالعات مشابه انجام گرفته در ایران، همخوانی دارد (Zeynali et al., 2003; Fahimipour et al., 2021). در مطالعه انجام گرفته در سال ۲۰۱۹ در بوسنی و هرزگوین هم، بیشترین مقدار پاسخ مثبت در رقت ۱:۱۰۰ و به میزان ۳۹/۳ درصد به دست آمده که با نتایج مطالعه حاضر مشابهت دارد (Knific et al., 2019). البته لازم به ذکر است که بر اساس استانداردهای معرفی شده توسط گروه مشاورین عالی سازمان بهداشت جهانی در زمینه لپتوسپیروسی (WHO/LEERG)، یکی از معیارهای تشخیص قطعی لپتوسپیروسی مشاهده تیترا ۱:۴۰۰ و بالاتر می‌باشد (Abdollahpour, 2015) و همانگونه که در جدول ۱ تحقیق حاضر گزارش شده، نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که ۸ مورد از سگ‌های تحت مطالعه دارای تیترا ۱:۴۰۰ و بالاتر بودند که این امر نشان دهنده عفونت فعال در آن‌ها بوده‌است و این یافته بدان معنی است که به احتمال زیاد، ۸ قلاده سگ مذکور، علی‌رغم این‌که در زمان اخذ نمونه ظاهراً سالم به نظر رسیده‌اند، اما در حال دفع باکتری از ادرار بوده‌اند. از طرف دیگر در سیسیل ایتالیا نیز آزمایش سرم یک قلاده سگ با روش MAT که به طور بالینی علائم بیماری را تظاهر می‌نمود، نتایج مثبت برای سرووار کنیکولا را در رقت ۱:۴۰۰ نشان داده‌است (Chetta et al., 2014). همچنین در مطالعه فهیمی‌پور و همکاران در استان البرز، عمده تیتراهای سرمی در سگ‌های دارای سرم مثبت، رقت‌های ۱:۲۰۰ و ۱:۴۰۰ گزارش گردیده‌است (Fahimipour et al., 2021). در بررسی آرزمانی و همکاران در سال ۲۰۲۱ نیز تعداد ۲ نمونه از نمونه‌های مثبت، با تیترا ۱:۱۶۰۰ برای سرووار گریپوتیفوزا واکنش

و این امر را می‌توان به عنوان یکی از دلایل احتمالی آلودگی بیشتر در سگ‌های نر بیان نمود.

همچنین تجزیه و تحلیل آماری نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین گروه‌های سنی مختلف و نتایج مثبت سرمی وجود ندارد که این یافته با نتایج مطالعه‌ای در ایالات متحده آمریکا همخوانی دارد (Ward et al., 2004). البته این در حالی است که نتایج مطالعات انجام گرفته در مشهد و البرز نشان داده، سگ‌های جوان (عمدتاً ۲ الی ۳ ساله) حساسیت بیشتری در برابر ابتلا به عفونت لپتوسپیروئی دارند (Talebkhani et al., 2021; Garossi et al., 2003; Fahimipour et al., 2021). لذا نویسندگان مطالعه حاضر بر اساس مطالعات قبلی مذکور تصمیم گرفتند که یافته‌های مثبت مشاهده شده در گروه‌های سنی بیشتر و کمتر از ۳ سال را با هم مقایسه نمایند که نتایج این مقایسه نشان داد تفاوت معنی‌دار آماری بین نسبت موارد مثبت مشاهده شده در این دو گروه وجود ندارد.

نتیجه نهائی این که یافته‌های حاصله از مطالعه حاضر نشان داد که سگ‌های بلاصاحب قزوین در معرض خطر ابتلا به لپتوسپیرو قرار دارند و حضور سطوح مختلف آنتی‌بادی‌های ضد لپتوسپیرو در سرم این سگ‌ها، می‌تواند منجر به شیوع عفونت‌های بالینی در آن‌ها گردد. در این راستا به نظر می‌رسد که سگ‌ها فارغ از جنسیت، سن و نژاد در صورتی که فاقد ایمنیت بر علیه بیماری لپتوسپیروزیس باشند، می‌توانند به عنوان یک خطر بالقوه برای گسترش لپتوسپیرو مطرح باشند و به عنوان منبع عفونت به ویژه برای سرووار کنیکولا برای سایر حیوانات اهلی، وحشی و حتی انسان عمل کنند و از این طریق بهداشت عمومی را تحت تاثیر قرار

دهند. همچنین با توجه به مشترک بودن بیماری لپتوسپیروز، باید مطالعات سروولوژیک مدونی در دستور کار قرار گیرد؛ لذا نیاز به مطالعات جامع‌تری است که درک بیشتری از اپیدمیولوژی بیماری در بین جمعیت سگ‌ها در مناطق مختلف را ارائه نماید، لذا پیشنهاد می‌گردد مطالعات اپیدمیولوژیک جامع به منظور تعیین عوامل خطر بروز این بیماری در مناطق مختلف کشور صورت پذیرد. همچنین مدیریت صحیح سگ‌های مبتلاء به فرم مزمن بیماری، باید برای کاهش آلودگی محیطی اجرا گردد؛ هر چند که شناسایی چنین سگ‌هایی همچنان چالش برانگیز می‌باشد. با توجه با این که سگ‌ها به ویژه سگ‌های بلاصاحب منبع مهمی برای شیوع لپتوسپیروز در میان گونه خود و نیز سایر پستانداران می‌باشند، لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی علاوه بر آزمایش MAT، از روش‌های دیگر مانند کشت باکتری به منظور جداسازی و شناسایی عامل بیماری و نیز از آزمایش PCR و دیگر روش‌های نوین مولکولی به منظور بررسی ژنتیکی سویه‌های شایع در منطقه استفاده گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از سازمان مدیریت پسماند شهرداری قزوین اعلام می‌کنند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافع ندارند.

منابع

- Abdollahpour, G. (2015). Leptospirosis, a disease that can be transmitted from animals to humans. 1st ed. Tehran University Press, (No.3720), pp: 6-30. [In Persian]
- 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 in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 52(2): 109-117.
- Arzamani, K., Abdollahpour, G., Ghasemzadeh-Moghaddam, H.M., Alavinia, M., Neela, V., and Hashemi, S.A. (2021). High prevalence of Leptospirosis among stray dogs of Bojnurd County, Northeast of Iran. *Zoonoses & infections in animals / International Journal of Infectious Diseases*, 101(1): 529-546. [In Persian]
- Avizeh, R., Ghorbanpoor, M., Hatami, S., and Abdollahpour, G. (2008). Seroepidemiology of canine Leptospirosis in Ahvaz, Iran. *International Journal of Veterinary Research*, 2(1): 75-79. [In Persian]
- Bettelheim, K.A. and Fogg, T.R. (2002). Serological studies on Leptospiral antibodies in dairy milkers in three region of South Island of New Zealand. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, 9(4): 355-364.
- Chetta, M., Vicari, D., Agnello, S., Percipalle, M., Ferrantelli, V. and Vitale, M. (2014). Canin Leptospirosis cases and molecular screening for *Leptospira interrogans* infection. *Pakistan Veterinary Journal*, 34(2): 260-262.
- Chou, C.H., YeH, T.M., Lu, Y.P., Shih, W.L., Chang, C.D. Chien, C.H., *et al.* (2014). Prevalence of Zoonotic Pathogens by Molecular detection in Stray Dogs in Central Taiwan. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 44(3): 363-375.
- Cruz-Romero, A., Romero-Salas, D., Ahuja Aguirre, C., Aguilar-Domínguez, M. and Bautista-Piña, Ch. (2013). Frequency of canine Leptospirosis in dog shelters in Veracruz, Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 7(16): 1518-1521.
- Fahimipour, A., Khaki, P. and Moradi Bidhendi, S. (2021). Seroepidemiological Analysis of Leptospiral infection using MAT in Stray Dogs in Alborz, Iran. *Archives of Razi Institute*, 76(2): 391-396.
- Firouzi, R. and Vand Yousefi, J. (2000). Serological investigation of Leptospirosis in cattle farms around Shiraz. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 1(2): 118-123. [In Persian]
- Goldstein, R.E. (2010). Canine Leptospirosis. *Veterinary Clinics Northern America Small Animal Practice*, 40(6): 1091-1101.
- Grippi, F., Cannella, V., Macaluso, G., Blanda, V., Emmolo, G., Santangelo, F., *et al.* (2023). Serological and Molecular Evidence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Stray Dogs and Cats of Sicily (South Italy), 2017-2021. *Microorganisms*, 11(2): 385-396.
- Jafari, S.M., Vand Yousefi, J. and Azarvandi, A. (1997). Evaluation of clinically suspected Leptospirosis and identifying strains involved in bovine *Leptospira* in the uromia city. *Pajouhesh va Sazandeghi*, 10(1): 120-122. [In Persian]
- Khaki, P. (2016). Clinical laboratory diagnosis of human leptospirosis. *International Journal of Enteric Pathogens*, 4(1): 1-7.
- Kikuti, M., Langoni, H., Nobrega, D., Corrêa, A. and Ullmann, L. (2012). Occurrence and risk factors associated with canine Leptospirosis. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18(1): 124-127.
- Knific, R.L., Čutuk, A., Gračner, G.G. and Dovč, A. (2019). Seroprevalence of Leptospirosis in various categories of dogs in Bosnia and Herzegovina. *Veterinarski Arhiv*, 89(5): 627-640.
- Lelu, M., Muñoz-Zanzi, C., Higgins, B. and Galloway, R. (2015). Seroepidemiology of Leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Rios Region, Chile. *BMC Veterinary Research*, 11(31): 1-8.

- Maleki, S., Zakian, A. and Abdollahpour, G. (2021). Seroepidemiology of *Leptospira interrogans* infection in ruminants of Lorestan Province: A Cross-Sectional Study. *Journal of Veterinary Research*, 75(4): 486-497. [In Persian]
- Mansour-Ghanaei, F., Sarshad, A., Fallah, M.S., Pourhabibi, A., Pourhabibi, K. and Yousefi-Mashhoor M. (2005). Leptospirosis in Guilan, a northern province of Iran: Assessment of the clinical presentation of 74 cases. *Medical Science Monitor*, 11(5): 219-223.
- McCallum, K.E., Constantino-Casas, F., Cullen, J.M., Warland, J.H., Swales, H. and Lingham, N. (2019). Hepatic Leptospiral infections in dogs without obvious renal involvement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(1): 141-150.
- Minke, J.M., Bey, R., Tronel, J.P., Latour, S., Colombet, G., Yvarel, J., *et al.* (2009). Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated Leptospirosis vaccine. *Veterinary Microbiology*, 137(1-2): 137-145.
- Miotto, B.A., Guilloux, A.G.A., Tozzi, B.F., Moreno, L.Z., da Hora, A.S. and Dias, R.A. (2018). Prospective study of canine Leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different *Leptospira* species infecting dogs. *PLoS one*, 13(7): 1-23.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Pfaller, M.A. (2015). *Medical microbiology*. E-book, 8th ed. Elsevier Health Sciences. Chapter-32: *Treponema*, *Borrelia* and *Leptospira*, pp: 389-392.
- Pumipuntu, N. and Suwannarong, K. (2016). Seroprevalence of *Leptospira* spp. in cattle and dogs in Mahasarakham province, Thailand. *Journal of Health Research*, 30(3): 223-226.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2nd ed., Blackwell Publishing, Oxford, pp: 175-184, 453-455, 484.
- Ramírez, I., Enríquez Verdugo, I., Castro del Campo, N. and López Moreno, H.S. (2017). Prevalence and risk factors associated with serovars of *Leptospira* in dogs from Culiacan, Sinaloa. *Veterinaria México OA*, 4(2): 1-12.
- Seva, P., Brandao, D., Godoy, N., Souza, O., Filho, A., Villegas, T., *et al.* (2020). Seroprevalence and incidence of *Leptospira* spp. in domestic dogs in the Southeast region of São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research*, 40(5): 399-407.
- Tajbakhsh, H. (1997). *General Bacteriology*. 4th ed., Tehran University Press, Tehran. [In Persian]
- Talebkhan Garossi, M., Vand Yousefi, J., Familghadakchi, H. and Nowrouzian, I. (2003). Seroepidemiological investigation of leptospirosis in herd dogs around Mashhad. *Journal of Veterinary Research*, 58(2): 177-179. [In Persian]
- Ward, M.P., Guptill, L.F., Prah, A. and Ching, W.C. (2004). Serovar-specific prevalence and risk factors for Leptospirosis among dogs: 90 cases (1997–2002). *Journal of Veterinary Medicine Associated*, 224(12): 1958-1963.
- World Organization of Animal Health. (2021). Leptospirosis- WOA. www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.
- World Health Organization. (2003). Human leptospirosis - WHO. www.who.int/publications/i/item/human-leptospirosis-guidance-for-diagnosis-surveillance-and-control.
- Zeynali, A., Rad, M., Vand Yousefi, J., Tabatabayi, A.H. and Bokaei, S. (2003). Serological findings of Leptospiral infection by microscopic agglutination test (MAT) in dogs of Tehran and suburbs. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 58(2): 133-137. [In Persian]