

تایپینگ مولکولی لپتوسپیراهای بومی ناحیه مرکزی منطقه جلگه ای استان گیلان به روش تجزیه (REA) Restriction Endonuclease Analysis

مهدی آسمار^{۱*}، حمید رضا هنرمند^۲، مریم فتح الهی^۳

^{۱*} و ^۳ - دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

^۲ - دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات بیماری های گوارشی و کبد

mehdiassmar@yahoo.com

چکیده

لپتوسپیروز بیماری مشترک انسان - حیوان شایع در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری بوده و در استان گیلان آندمیک است. باکتریهای ترشح شده از حیوانات حامل، در آب و خاک مرطوب و در pH و دمای مناسب می توانند به مدت طولانی در کنار لپتوسپیراهای غیربیماریزای زنده دوام بیاورند. معمولاً در هر منطقه آندمیک، تعداد اندکی از سرووارها شایع هستند و شناسایی آنها به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی کمک می کند. این مطالعه به منظور جداسازی لپتوسپیراها از آب شالیزارها، کانال ها و رودخانه های منطقه و به منظور شناسایی سرووارهای شایع انجام شده است. نمونه برداری از آبهای سطحی شهرستان های منطقه در فاصله زمانی خرداد تا پایان شهریور سال ۱۳۸۵ صورت گرفت. هر نمونه بطور جداگانه در محیط مایع EMJH کشت داده شدند. کشت های مثبت و پر جمعیت با روش استاندارد استخراج گردید و برای آنها REA با استفاده از آنزیم EcoRI انجام شد. و پس از انجام الکتروفورز و رنگ آمیزی، تصویر باندها آنالیز گردید. در مجموع تعداد ۳۰۱ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. تطبیق الگوی باندهای حاصل با الگوهای مربوط به سرووارهای استاندارد، هویت گونه ای و زیر گونه ای ۲۷ ایزوله ها مشخص گردید که به ترتیب شامل گونه های ساپروفیت بی فلکسا و شامل سروگروپهای: آندامانا و پاتوک، بودند. گونه های بیماریزا شامل اینتروگانس، کیرشتری، بورگک پترسنی بودند که سروگروپهای: ایکترهومیورازی، پومونا، بالوم، هارجو، کانیکولا و گریپوتیفوزا را شامل می شدند. در این مطالعه حضور گونه های بیماریزا در شالیزارها بیشتر بود که می توان آن را به توقف آب و به رفت و آمد حیوانات به ویژه جوندگان نسبت داد و حضور گونه های غیر بیماریزا در رودخانه و کانال بیشتر بوده است.

کلمات کلیدی: گیلان، لپتوسپیرا، تایپینگ مولکولی، سروگروپ.

مقدمه

لپتوسپیروز بیماری مشترک انسان - حیوان شایع در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که توسط گونه‌های بیماریزای لپتوسپیراها حاصل می‌شود. این باکتری‌ها طیف میزبانی وسیعی دارند. تعداد زیادی از پستانداران اهلی و وحشی میزبان طبیعی انواع بیماریزا هستند و اغلب آنها پس از ابتلا به بیماری به مدت طولانی و معمولاً تا پایان عمر حامل باقی می‌مانند و به صورت دوره ای باکتری را از طریق ادرار خود دفع می‌کنند. باکتری‌های دفع شده از حیوانات مخزن، اگر در آب و یا خاک مرطوب ریخته شوند در pH و دمای مناسب می‌توانند به مدت طولانی زنده بمانند و در همین دوره می‌توانند از طریق زخم‌های جلدی به سایر حیوانات خونگرم منجمله انسان سرایت نمایند و منجر به بیماری شوند (۱۱و۱۰). آبهای سطحی از قبیل: رودخانه، نهر، مرداب و دریاچه‌های آب شیرین، منابع لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند (۱۱). استان گیلان به دلیل شرایط جغرافیایی خاص خود، آب و هوای معتدل و مرطوب، رواج کشت برنج که همواره به رطوبت بالای خاک نیاز دارد و متداول بودن نگهداری سنتی حیوانات اهلی بویژه گاو، همواره، شرایط مناسبی برای بروز این بیماری دارد. لپتوسپیروز در اغلب روستاهای ناحیه جلگه ای استان گیلان شیوع دارد و همه ساله موارد بسیار زیادی از بیماری از اواسط بهار تا اواخر تابستان به ویژه در شالیکاران بروز می‌کند. اغلب مبتلایان، سابقه کار در مزرعه برنج و یا تماس با آبهای سطحی را که را ذکر می‌کنند (۱۳و۱۴). لپتوسپیراها در ۷ گونه بیماریزا که شامل ۲۳ سروگروپ متشکل از حدود ۲۵۰ سرووار است دسته بندی شده اند و انواع ساپروفیت آن شامل ۳ گونه و ۱۴ سروگروپ هستند

(۱۱و۱۰). معمولاً در هر منطقه آندمیک، تعداد اندکی از سرووارهای بیماریزا شایع هستند و شناسایی آنها به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی بیماری کمک می‌کند و شناسایی مخازن بیماری، گام بزرگی در کنترل آن محسوب می‌شود (۱۱). این مطالعه به منظور جداسازی لپتوسپیراها از آب شالیزارها در فصل شیوع بیماری و نیز از برخی منابع آبیاری شالیزارها (از جمله کانال و رودخانه) و شناسایی آنها با یک روش قابل اطمینان با هدف شناسایی سرووارهای شایع منطقه انجام شده است.

مواد و روش کار

در این پژوهش جمعاً تعداد ۳۰۱ نمونه از آبهای سطحی (رودخانه، شالیزار و کانال آبیاری) ناحیه مرکزی منطقه جلگه ای استان گیلان شامل شهرستان‌های: لشت نشا، خشکیبجار، رشت، انزلی، فومن، صومعه سرا، شفت و سنگر در فاصله زمانی خرداد تا پایان شهریور سال ۱۳۸۵ جمع آوری و مقدار 1ml از هر نمونه پس از فیلتراسیون با استفاده از فیلترسرنگی ۲۲ نانومتر به یک لوله فالكون ۱۵ml حاوی محیط کشت مایع EMJH که به آن ۴۰۰µg/ml آنتی بیوتیک ۵- فلورواروسیل جهت ممانعت از رشد سایر باکتریها افزوده گردیده بود، وارد نموده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ هفته در انکوباتور قرار داده می‌شد و هر ۲ هفته یک بار با میکروسکوپ زمینه تاریک مورد مشاهده قرار می‌گرفت. سپس با حذف موارد منفی موارد مثبت به ارلن ۲۵۰ml حاوی EMJH فاقد آنتی بیوتیک ۵- فلورواروسیل انتقال داده شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور انتقال یافته تا به رشد پویا و به جمعیت مطلوب برسد. سپس با انجام

برای انجام REA برداشته و پس از رقیق کردن آن با آب مقطر دیونیزه و رساندن حجم آن به $18 \mu\text{l}$ ، مقدار $2 \mu\text{l}$ بافر مخصوص REA و مقدار $1 \mu\text{l}$ از آنزیم EcoRI را به آن افزوده و خوب مخلوط نمودیم و در دمای 37°C درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت انکوبه گردیده و با افزودن مقدار $5 \mu\text{l}$ از لودینگ بافر آبی رنگ به آن، عملیات الکتروفورز در آگارز 3% با ولتاژ 70 ولت به مدت 18 ساعت انجام گرفت و در پایان پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، توسط ژل داک، از باندهای ایجاد شده عکسبرداری و مورد آنالیز قرار گرفت. در این مطالعه از سایز مارکر $15-1 \text{ kbp}$ محصول شرکت فرمنتاز استفاده شد.

نتایج

از مجموع تعداد 301 نمونه، 190 نمونه از آب و خاک شالیزارها، 44 نمونه رودخانه ها و 67 نمونه از آب کانال جمع آوری گردید (جدول ۱).

تست رشد و عدم رشد در حضور ۸- آزاگوانین لپتوسپیراهای بیماریزا از انواع ساپروفیت ها تفکیک داده شود. وجود این ماده به مقدار 225 mg/ml در محیط کشت رشد انواع بیماری زا را متوقف می کند (1907). جهت استخراج DNA باید جمعیت میکروبی محیط کشت حداقل به 10^6 ml برسد. OD برابر $0/6$ در طول موج 550 نانومتر حاکی از جمعیت مطلوب باکتریایی است (1908). برای استخراج DNA، تمام حجم هر نمونه را در یک لوله فالكون 15 ml ریخته و با دور 9000 rpm به مدت یک ساعت سانتریفوژ نمودیم و رسوب حاصله نیز با PBS دو بار شستشو شده، سپس رسوب را در بافر TE حل نموده و سپس استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم انجام گرفت (20). DNA استخراج شده در $100 \mu\text{l}$ از بافر TE حل شده و تا زمان انجام REA، در دمای 20 - نگهداری گردید. پس از سنجش کیفیت DNA با روش اسپکتروفتومتری، با در نظر گرفتن غلظت DNA، مقدار $3 \mu\text{g}$ از آن را

جدول ۱: تعداد نمونه ها به تفکیک محل نمونه برداری و منابع

منابع شهرستان	شالیزار	کانال	رودخانه	جمع
لشت نشا	۲۴ (۱۲)	۱۲	۴	۴۰
خشکیچار	۱۹	۱۲	۹	۴۰
رشت	۲۴	۲	۴	۳۰
انزلی	۲۱	۱۲	۶	۳۹
فومن	۲۸ (۱۰)	۷	۵	۴۰
صومعه سرا	۲۵	۵	۴	۳۴
شفت	۲۹	۷	۲	۳۸
سنگر	۲۰	۱۰	۱۰	۴۰
جمع	۱۹۰	۶۷	۴۴	۳۰۱

* اعداد داخل پرانتز به تعداد مواردی اشاره دارند که به دلیل خشک بودن مزارع به جای آب از خاک نواحی مرطوب (گل) آنها نمونه برداری شده است.

زیادی از موارد مثبت به رشد مطلوب نرسیدند و تنها ۳۳ نمونه (۱۱ درصد) به رشد پویا و پر جمعیت رسیدند که برای انجام REA مناسب بودند (جدول ۲). از تعداد مزبور ۱۷ نمونه ساپروفیت و ۱۰ نمونه بیماریزا بودند (جدول ۳).

دامنه دمای نمونه آب ها ۲۶-۳۹ (با میانگین ۲۷/۷ درجه سانتی گراد) و دامنه pH نمونه ها ۶/۵-۸ (با میانگین ۷/۴۳) بوده است. در بررسی اولیه مجموعاً تعداد ۱۶۸ مورد (۵۵/۸ درصد) مثبت و ۱۳۳ مورد (۴۴/۲ درصد) منفی شدند. در پاساژهای بعدی تعداد

جدول ۲: میزان آلودگی نمونه های مورد بررسی به لپتوسپیروا بر حسب شهرستان و منابع

شالیزار			کانال				رودخانه			منابع فراوانی شهرستان		
درصد	موارد مثبت	موارد منفی	تعداد نمونه	درصد	موارد مثبت	موارد منفی	تعداد نمونه	درصد	موارد مثبت	موارد منفی	تعداد نمونه	
۴۲/۸٪	۹	۱۲	۲۱	۵۸/۳٪	۷	۵	۱۲	۶۶/۶٪	۴	۲	۶	انزلی
۶۶/۷٪	۱۶	۸	۲۴	۱۰۰٪	۲	۰	۲	۷۵٪	۳	۱	۴	رشت
۴۰٪	۱۰	۱۵	۲۵	۲۰٪	۱	۴	۵	۶/۷٪	۱	۳	۴	صومعه سرا
۱۰/۷٪	۳	۲۵	۲۸	۲۸/۶٪	۲	۵	۷	۶۰٪	۳	۲	۵	فومن
۳/۴٪	۱۰	۱۹	۲۹	۲۷/۴٪	۲	۵	۷	۵۰٪	۱	۱	۲	شفق
۶۰٪	۱۲	۸	۲۰	۹۰٪	۹	۱	۱۰	۸۰٪	۸	۲	۱۰	سنگر
۵۷/۹٪	۱۱	۸	۱۹	۶۶/۷٪	۸	۴	۱۲	۵۵/۵٪	۵	۴	۹	خشکیچار
۲۰/۸٪	۵	۱۹	۲۴	۳۳/۳٪	۴	۸	۱۲	۰	۰	۴	۴	لشت نشا
۴۰٪	۷۶	۱۱۴	۱۹۰	۵۲/۲٪	۳۵	۳۲	۶۷	۵۶/۸٪	۲۵	۱۹	۴۴	جمع

آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیروز انستیتو پاستور فرانسه، پاریس) تطبیق داده شد، هویت گونه ای و زیر گونه ای ۲۷ ایزوله مشخص گردید (جدول ۳) و ۶ ایزوله، الگوی نامشخص و غیر قابل تفسیر داشتند.

پس از انجام REA، الگوهای باندهای حاصله از انواع بیماریزا و ساپروفیت (شکل های ۱، ۲، ۳ و ۴) با الگوهای مربوط به سرووارهای استاندارد بیماریزا و ساپروفیت (با رجوع به database اخذ شده از

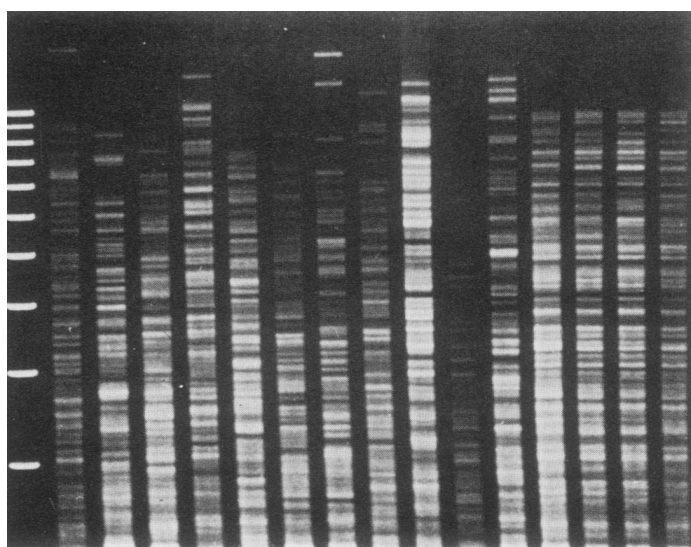
جدول ۳: تعیین فراوانی گروهها، گونه ها و زیرگونه های مختلف لپتوسپیراهای جداشده از منابع مختلف بر اساس الگوی باند REA در مقایسه با الگوی استاندارد

جمع	بیماریزا						غیر بیماریزا						گروه					
	اینتروگانس		بورگ پترسنی		کیرشتری		بایفلک		ولباشیا		گونه							
	پتوزا	کانیکولا	بالوم	هارجوبویس	گریپونفوزا	آنداهانا	پاتوک	کارانگا	فرآوانی									
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	منبع				
۸۲/۱۴	۲۳	۴/۳	۱	۳۰/۴	۷	۲۱/۷	۵	۸/۶	۲	۴/۳	۱	۴/۳	۱	۸/۶	۲	۱۳	۳	شالیزار
۱۴/۲۶	۴	۲۵	۱	۵۰	۲	۲۵	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	کانال
۳/۶	۱	-	-	۱۰۰	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	رودخانه
۱۰۰	۲۸	۳/۵	۱	۲۵	۷	۱۷/۸	۵	۷/۱۴	۲	۳/۵	۱	۳/۵	۱	۷/۱۴	۲	۱۰/۷	۳	جمع

لپتوسپیراهای غیر بیماریزا می باشد که در شالیزار به میزان ۳۰/۴ درصد و در کانالها به میزان ۵۰ درصد شیوع دارد (جدول ۳).

در این بررسی بیشترین فراوانی (۱۳ درصد) در گروه لپتوسپیراهای پاتوزن متعلق به لپتوسپرا دیکترو همورائیک می باشد که در شالیزار شیوع دارد. همچنین بیشترین فراوانی متعلق به سویه پاتوک از گروه

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

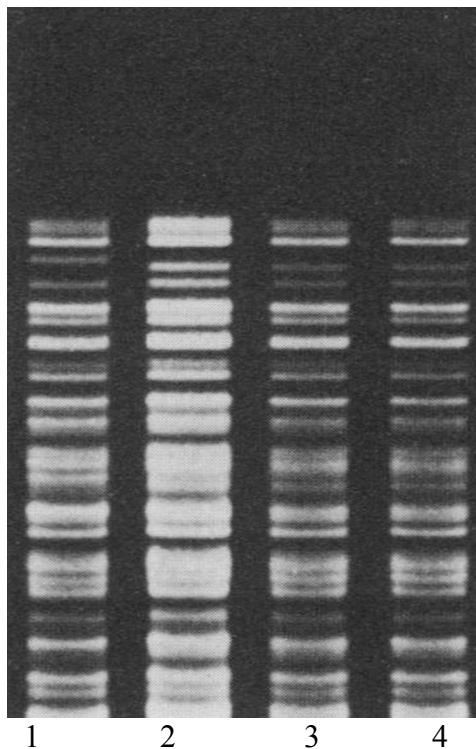


شکل ۱: الگوی باندی REA مربوط به تعداد ۱۵ ایزوله :

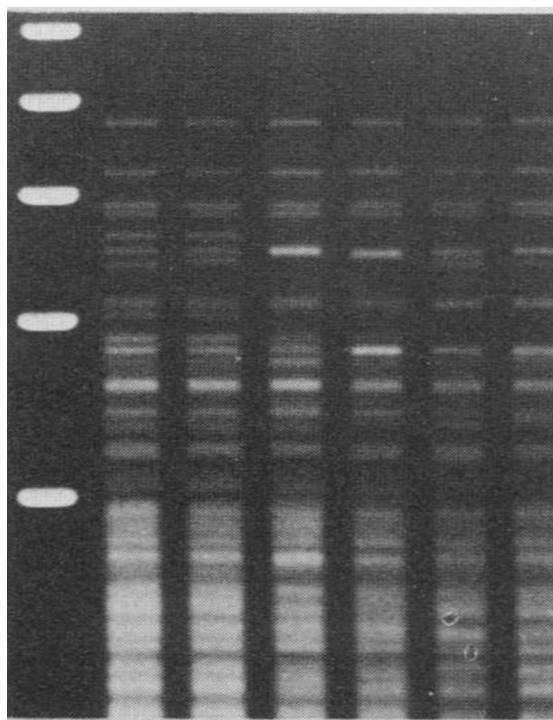
L: سایز مارکر 15-۱ kbp. در این تصویر ۱۲-۳ kbp موجودند و لادهای ۱ و ۲ کیلوبازی به دلیل طولانی بودن زمان الکتروفورز از ژل خارج شده اند.

ردیف ۱: سروگروپ هارجوبویس ردیف ۲: سروگروپ بالوم ردیف ۳: سروگروپ کانیکولا

ردیف ۴: سروگروپ گریپوتیفوزا
 ردیف ۵: سروگروپ آندامانا
 ردیف ۶: سروگروپ سمارانگا
 ردیف ۷: سروگروپ پومونا
 ردیف ۸: سروگروپ پومونا
 ردیف ۹: سروگروپ گریپوتیفوزا
 ردیف ۱۰: الگوی نامشخص
 ردیف ۱۱: سروگروپ ایکترههموراژی
 ردیف ۱۲-۱۵: سروگروپ پاتوک



شکل ۲: تصاویر واضح تر و متمرکز شده تراز بخش میانی ژل از الگوی بانندی REA مربوط به تعداد ۴ ایزوله ردیف ۱۲-۱۵ که در شکل ۱ بوده اند. این الگوی بانندی REA مربوط به بخش میانی الگوی بانندی سروگروپ پاتوک است. در این تصویر سایز مارکرها به دلیل متمرکز کردن تصویر ژل در اینجا دیده نمی شوند

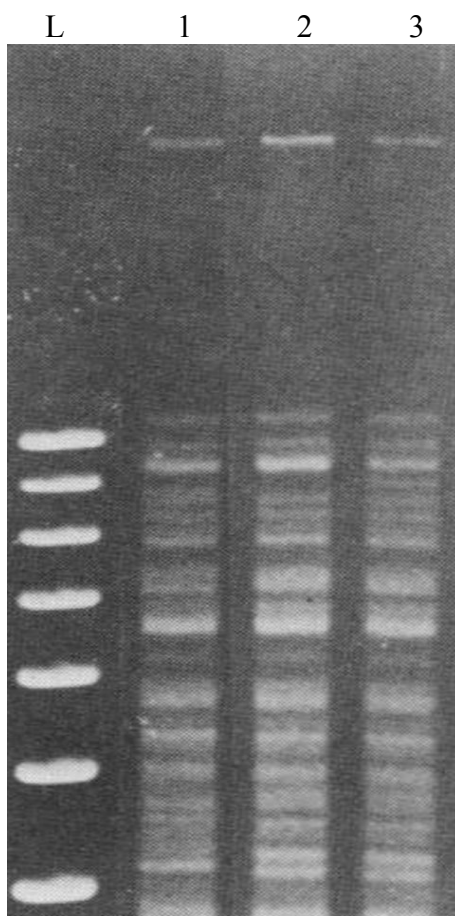


شکل ۳: تصاویر واضح تر و متمرکز شده تراز ۴ الگوی بانندی REA مربوط به تعداد ۶ ایزوله

L: سایز مارکر ۱۵-۱ kbp. در این تصویر ۱۲ kbp در بالا و ۷ kbp در پایین. بقیه لادرها به دلیل متمرکز کردن تصویر ژل در اینجا دیده نمی شوند.

ردیف ۱، ۲ و ۳: الگوی بانندی REA مربوط به سروگروپ پاتوک

ردیف ۴، ۵ و ۶: الگوی بانندی REA مربوط به سروگروپ آندامانا



شکل ۴: تصاویر واضح تر و متمرکز شده تراز ۳ الگوی بانندی REA مربوط به تعداد ۳ ایزوله. هر ۳ الگوی بانندی REA مربوط به سرو گروپ ایکتره‌هموراژی

L: سایز مارکر ۱۵-۱ kbp: در این تصویر ۱۲ kbp در بالا و ۷ kbp در پایین. بقیه لادرها به دلیل متمرکز کردن تصویر ژل در اینجا دیده نمی شوند.

بحث

بوده و به تخصص و تجربه زیاد نیاز دارد (۱۱). بنابراین دستیابی به یک روش ساده تر و مطمئن لازم بوده است. در سال های اخیر تایپینگ مولکولی میکروارگانیزم ها متداول شده و روشهای متعددی، ابداع و آزموده شده اند. تعدادی از این روش ها برای تایپینگ لپتوسپیراها نیز به کار گرفته شدند و نتایج متفاوتی نشان دادند (۱).

Herrmann روش PFGE را برای تمایز درون گونه ای و تعیین هویت سرووارها مفید ارزیابی نمود (۹). Hookey روش ریپو تایپینگ با استفاده از

متعدد بودن گونه ها و زیر گونه ها در جنس لپتوسپیرا، لزوم دسته بندی و متمایز نمودن آنها را بیشتر نموده است. سروتایپینگ با روش MAT هنوز در آزمایشگاههای مرجع لپتوسپیروز رایج است ولی انجام این روش پر هزینه، وقت گیر و بسیار دشوار است زیرا برای دستیابی به نتیجه کاملاً درست باید سویه مورد نظر را با لااقل ۲۰۰ آنتی سرم ضد سرووارهای استاندارد مواجه نمود (۸ و ۱۱). ضمناً خواندن نتایج نیز دشوار

شباهت نزدیکی داشته و تفکیک آنها را مشکل تر می‌کند. در صورت استفاده از چند آنزیم برش دهنده، قدرت تمایز افزایش می‌یابد ولی تعداد باندها زیادتر شده، تفسیر آنها مشکل تر می‌گردد و ضمناً تعداد زیادی باندهای کوچک بوجود می‌آیند که به صورت اسمیر نمایان می‌شوند (۱۱ و ۱۰). Ellis تعداد ۲۵۳ سویه متعلق به سرووار هارگو از گونه اینتروگانس و ۱۹۰ ایزوله جدا شده از گاو را با روش REA مورد مطالعه قرار داد و توانست الگوی باندهای متفاوت برای تیپ های هارجوبویس و هاجوراجیتورا تشخیص دهد (۶). همان محقق در یک مطالعه دیگر همان روش را با استفاده از ۲۰ آنزیم برای ۱۶۲ سویه جدا شده از خوک و تعداد زیادی سویه استرالیایی متعلق به سروگروپ های گونه اینتروگانس بررسی نمود و باز هم تفاوت الگوی باندها در سطح زیر گونه را مشاهده نمود (۵). Wu روش REA را با استفاده از ۷ آنزیم برش دهنده برای سروارهای مختلف بکار برد و به این نتیجه رسید که تفاوت باندها در منطقه وزن مولکولی بالا چشمگیرتر است و این تفاوت در سویه های متعلق به یک سرووار چندان مشهود نیست ولی در سطح سرووار کاملاً نمایان است (۲۱). Tamai روش REA را با استفاده از ۱۵ آنزیم برش دهنده با موفقیت برای تفکیک سروارهای ایکترو همورای و کپنهاگنی به کار برد (۱۶). Robinson همین روش را با استفاده از ۲ آنزیم برش دهنده برای برای تفکیک سروارهای سروگروپ پومونا بکار برد (۲۲) و مطالعه مشابهی توسط Zhu برای ایزوله های سروگروپ پومونا جدا شده از کلیه خوک در منطقه ویکتوریا با موفقیت بکار برد (۲۳) و مطالعه ای توسط Djordjevic برای ایزوله های جدا

تکنیک RFLP_PCR را آزمود و آن را روش سودمندی برای دسته بندی و مطالعات اپیدمیولوژی ارزیابی نمود (۱۰). Perolat سه روش Ribotyping، AP_PCR و MRSP را برای تعیین هویت ایزوله های متعلق به سروارها رجو به کار برده و مقایسه نمودند و آنها را روش موثری برای مطالعه ساختارهای یک جمعیت داخل گونه ای ارزیابی نمودند (۱۲). Tony و همکاران و همچنین Savio همکاران روش PCR-RFLP را برای تفکیک تعداد زیادی از سویه های استاندارد و ایزوله شده ها به کار بردند و آن را روش مفیدی برای شناسایی سریع زیر گونه های لپتوسپیراهای اینتروگانس اعلام نمودند (۱۷ و ۱۸). Corney روش RAPD را روش مفیدی برای تجزیه و تحلیل تاکسونومیکی و یافتن ارتباط بین سروارها بیان نمود (۳). روشهای ذکر شده همگی نیاز مند به اجرای PCR بوده و هزینه بردار هستند ولی اجرای روش REA بسیار ساده تر است. این روش برای تایپینگ باکتری های مختلف بکار برده شده است. قدرت تمایز در این روش به وجود مکان های برش آنزیم های برش دهنده، موجود بر روی ملکول DNA و پلاسمید و نیز به تعداد پلاسمید های میکرو ارگانیزم وابسته است و به طور عمده برای باکتری هایی مناسب است که پلاسمید ندارند و یا کم دارند از جمله لپتوسپیراها، زیرا وجود پلاسمید الگوی باندها را کمی مغشوش می‌کند. در واقع دقت روش REA در تفکیک گونه ها و زیر گونه ها به نوع و تعداد آنزیم های برش دهنده ای که بکار برده می‌شوند بستگی دارد. اگر از یک آنزیم استفاده شود تعداد باندهای حاصله کمتر بوده و تفسیر آنها آسان تر خواهد بود ولی الگوی باندها برای سروارتهای هم خانواده

شده از گاوهای مبتلا به آگالاکتیه و سقط جنین مکرر صورت گرفت (۴).

در این مطالعه روش REA با استفاده از یک آنزیم (آنزیم EcoRI ساخت شرکت فرمنتاز و خریدتاری شده از شرکت ایرانی سینا ژن) برای تعیین هویت سویه های جدا شده از آبهای سطحی استفاده شد. با توجه به نتایج حاصله و فهرست گونه ها و زیر گونه های شناسایی شده، وجود انواع بیماری زا و غیر بیماریزا در آبهای سطحی منطقه مسجل شده است. با توجه به این نکته که مخزن گونه های غیر بیماری زا همان آبهای سطحی است، وجود آنها دور از انتظار نبوده و نیز حضور آنها در شالیزارها نیز که بطور عمده با همان آبهای سطحی بویژه از: رودخانه ها، جویبارها، و کانال های آب رسانی آبیاری می شوند که غالباً مخزن لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند، قابل انتظار و طبیعی می باشد. نتایج این مطالعه نشان داده است که لپتوسپیراهای ساپروفیت به گونه بی فلکسا و گونه ولباشیا حضور زیادتری دارند و نسبت فراوانی این دو گونه به هم نزدیک است. در گونه بی فلکسا تنها زیر گونه های (سروگروپ) آندامانا و پاتوک و در گونه ولباشیا فقط سروگروپ سمارانگا شناسایی شدند. این سروگروپها علاوه بر آبهای سطحی در شالیزارها نیز یافت شدند.

یافته مهم دیگر این مطالعه، حضور انواع بیماریزا است که بطور عمده از شالیزارها جدا شدند. در این مطالعه گونه های: اینتروگانس، بورگ پترسنی، کیرشنری شناسایی شدند. در گونه اینتروگانس که مهم ترین و بزرگ ترین گونه بیماریزا در جنس لپتوسپیرا است و خود تعداد زیادی سروگروپ و بیش از ۲۰۰ سرووار دارد، سروگروپ های ایکتروهموراژی،

پومونا و کانیکولا شناسایی شدند. در گونه بورگ پترسنی سروگروپ بالوم و هاجو بوویس و در گونه کیرشنری سروگروپ گریپوتیفوزا شناسایی گردیدند. اصولاً چونندگان و سایر حیوانات وحشی و نیز حیوانات اهلی و حتی انواع دست آموز، مخزن طبیعی گونه های بیماری زا هستند. لپتوسپیراهای بیماری زا بطور عمده در کلیه این حیوانات استقرار دارند. اغلب حیوانات پس از ابتلا تا آخر عمر حامل باقی می مانند و باکتری را بطور دوره ای از طریق ادرار خود ترشح می کنند. بیشتر گونه ها و زیر گونه های بیماری زا می توانند در شرایط مناسب (دمای بالای ۲۰ درجه سلسیوس و pH خنثی) به مدت طولانی در آب و خاک مرطوب زنده بمانند و در این مدت فرصت می یابند به بدن میزبان دیگر وارد شوند. وفور چونندگان و برخی از حیوانات وحشی به ویژه شغال که در مجاورت نزدیک سکونت گاههای انسان به ویژه در مناطق روستایی به سر می برند و به راحتی در شالیزارها رفت و آمد می کنند و نیز وجود حیوانات اهلی از قبیل: گاو، سگ، اسب و گربه که می توانند بالقوه بیمار و یا حامل باشند و در مناطق روستایی بسیار فراوان هستند، این ها توجیه کننده حضور گونه و زیر گونه های بیماریزا در شالیزارها است. اغلب روستاییان بطور سنتی در منزل خود گاو نگه داری می کنند و از اسب برای برخی از فعالیت های کشاورزی و نیز برای حمل و نقل استفاده نموده و برای حفاظت خانه سگ نگه داری می کنند. بطور معمول سگ مخزن سروگروپ کانیکولا، اسب مخزن سروگروپ پومونا، موش مخزن سروگروپ ایکتروهموراژی، گاو مخزن سروگروپهای گریپوتیفوزا و هارجو و گراز مخزن سروگروپ پومونا و بالوم است. اغلب گونه ها و زیر گونه های بیماری زا از شالیزارها

6. Ellis, W.A.; Thiermann, A.B., Montgomery, J. and et al., 1988. Restriction endonuclease analysis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo isolates from cattle. Res Vet Sci.; 44(3): 375-9.
7. Fains, 2003. Guidance for the Diagnosis, Surveillance and Control of Human Leptospirosis. WHO offset publication Geneva. World Health Organization.; pp. 17-20.
8. Hartskeel, R.A.; Smits, H.L.; Korver, H.; Goris, M.G.A. and Terpstra, W.J., 2004. Instruction booklet of International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. KIT Royal Tropical Institute Publication: 38-42.
9. Herrmann, J.L.; Bellenger, E.; Perolat, P.; Baranton, G. and Girons, I.S., 1992. Pulsed-Field Gel electrophoresis of *Not I* digests of isolates of *Leptospira interrogans* DNA: a new rapid method of serovar identification. J Clin Microbiol.; 30 :1696-1702.
10. Hookey, J.V., 1993. Characterization of *Leptospira* by 16sDNA Restriction Length Polymorphism. J Gen Microbiol.; 139: 1681-9.
11. Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. Clin Micro Rev; 4: 296-326.
12. Perolat, P.; Merien, F.; Ellis, W.A. and Baranton, G., 1994. Characterization of *Leptospira* from serovar Hardjo by Ribotyping, Arbitrarily Primed PCR, and Mapped Restriction Site Polymorphism. J Clin Microbiol.; Aug :1949-57.
13. Plank, R. and Deborah, D., 2000. Overview of Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. Microbes and Infections.; 2: 1265-1267.
14. Resaei, A.R. and Delkhosh, J., 1998. Leptospirosis statistical report in Guilan, Iran, from 1996 to 1998. Abstract book of leptospirosis conference, Rasht, Iran. pp. 30-35.

جدا شدند و تنها یک مورد کانیکولا از کانال جدا شد که احتمال آلوده شدن آن با ادرار حیوان حامل وجود دارد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی و علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان انجام گرفته است. لذا بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی جناب آقای دکتر بیدریغ تشکر می گردد.

منابع

۱. منصور قناعی، ف. و هنرمند، ح.ر.، ۱۳۸۴. لپتوسپیروز و شیوع آن در استان گیلان. انتشارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان. ص ۸۹-۹۹.
۲. هنرمند ح.ر.؛ منصور قناعی، ف.؛ اشراقی، س. و خرمی زاده، م.ر.، ۱۳۸۵. بررسی شیوع لپتوسپیروز در استان گیلان در سال ۱۳۸۳. مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان. ص ۸-۱۵.
3. Corney, B.G.; Colley, J. and Graham, G.C., 1997. Simplified analysis of pathogenic leptospiral servers by random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. J Med Microbiol.; 46 :927-32.
4. Djordjevic, S.; Hornitzky, M.; Ross, A.D. and Whittington, R.J., 1993. Restriction endonuclease analysis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo from cattle with agalacia and abortion. Aus Vet J.;70(3): 98-100.
5. Ellis, W.A.; Montgomery, J.M. and Thiermann, A.B., 1991. Restriction Endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belong to the Australia serogroup of *Leptospira interrogans*. J Clin Microbiol.; 29(5) : 957-61.

15. Savio M.L.; Rossi C.; Fusi, P.; Taqlibue, S. and Paccicarini, M.L., 1994. Detection and Identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with Restriction endonuclease of amplified DNA. *J Clin Microbiol.*; 32(4):935-41.
16. Tamai, T.; Sada, E. and Kobayashi, Y., 1988. Restriction endonuclease analysis of *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* and *Copenhageni*. *Microbiol Immunol.*; 32(9):887-94.
17. Tahbaz, A.; Sarshad, A.; Vandyousefi, J.; Safavi, S. and Dabaghian, K., 1995. Preliminary study of leptospirosis in Guilan. *Journal of Infectious and Tropical Diseases of Iran.*; 113:109-110.
18. Tony, H.S.; Woo, Patel BKC, et al., 1997. Comparison of two PCR methods for rapid identification of *Leptospira* genospecies *interrogans*. *FEMS Microbiology Letters* ; : 169-177.
19. Turner, L.H., 1970. Leptospirosis III: Maintenance, Isolation and Demonstration of *lepeospires* . *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 64: 623-646.
20. Veloso, I.F.; Lopes, M.T.P.; Salas, C.E. and Moriera, E.C., 2000. A Comparison of three DNA extractive procedures with *lepeospires* for PCR analysis. *Mem Inst Oswaldo ruz. Rio de Janeiro.*; 95(3): 339-343.
21. Wu, W. and Dai, B., 1993. Restriction endonuclease analysis of *Leptospira* DNA from different serogroup and serovar. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.*; 24(3):258-61.
22. Robinson, A.J.; Ramadass, P.; Lee, A. and Marshal, A.B., 1982. Differentiation of subtypes within *Leptospira interrogans* serovars Hardjo, Balanica and Tarassovi, by bacterial restriction endonuclease DNA analysis. *J Med Microbiol.*; 15(3):331-8.
23. Zhu, S.; Chappel, R. and Amon, L., 1993. Restriction endonuclease analysis of *Leptospira* of Pomona serogroup of *Leptospira interrogans*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.*; 33(5):374-7.