AF ۴۵۱

یافته‌های تازه پیرامون لپتوسپیروز در مؤسسه رازی

دکتر جلیل وند یوسفی،
سهیلا مرادی بیدهندی،
دکتر پرویز اهورایی
اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی

چکیده

لپتوسپیروزیس یکی از مهمترین بیماریهای زئونوز بوده که به علت داشتن میزبانان مختلف، انتشار جغرافیایی وسیعی دارد که مطالعه و شناسایی کانونهای آلوده از نظر اقتصادی و بهداشت عمومی قابل اهمیت می‌باشد. نتیجهٔ آزمایش سرولوژیکی بر روی ۹۳۲ نمونه سرم با استفاده از روش MAT نشانگر پراکندگی وسیع سروواریته‌های مختلف این باکتری در ایران می‌باشد و برای اولین بار وجود آنتی کرهای ضد C.chiffon, S. sejroe, Ict. copenhageni و جداسازی ۲ مورد باکتری لپتوسپیرا از نمونه‌های ارسالی در ایران گزارش می‌شود.

مقدمه

لپتوسپیروزیس یک بیماری حاد سیستمیک و سپتی سمیک است که عامل آن با انتشار جغرافیایی وسیع بوسیله میزبانان مختلف، یکی از مهمترین بیماریهای زئونوز محسوب می‌گردد. با توجه به اینکه ۱۶۰ گونه پستاندار وحشی و اهلی میزبانان این باکتری را تشکیل می‌دهند. بدین علت این باکتری را Poly phage گویند.

برای اولین بار در سال ۱۸۸۶ دانشمندی به نام Weil بیماری را از نظر کلینیکی شرح داد و بیماری به نام Weil's Disease نامگذاری شد تا اینکه Stimson در سال ۱۹۰۷ عامل بیماری را به وسیله میکروسکوپ زمینه سیاه مشاهده نمود و در سال ۱۹۱۷ دانشمندی به نام Inada عامل بیماری را با استفاده از محیطهای غذایی غنی کننده جدا و گزارش نمود. از اینکه عوامل بیماری می‌توانند به طور مستقیم و غیرمستقیم از حیوانات اهلی و وحشی به انسان انتقال یابند، دو تابلوی کلینیکی Icteric و Anicteric در انسان و حیوان ایجاد می‌کنند که شناسایی آنها از نظر بهداشت عمومی و اقتصادی قابل اهمیت می‌باشد (تصویر شماره ۱).

مطالعه سرواپیدمیولوژیک و باکتریولوژیک که در مؤسسه تحقیقاتی رازی با به کارگیری ۲۰ سروگروپ برای اولین بار در ایران انجام پذیرفته (جدول ۱) و همچنین جداسازی لپتوسپیرا از نمونه‌های مرضی، نشانگر پراکندگی سروواریته‌های مختلف در ایران می‌باشد. در ایران مطالعات کانونهای آلوده بیماری با استفاده از تستهای سرولوژیک MAT و CFT و همچنین جداسازی عامل، مورد شناسایی قرار می‌گیرند که نتایج این بررسیها تاکنون نمایانگر شناسایی سروواریته‌های جدید و پراکندگی آنها در ایران بوده است (جدول ۲). همچنین، از نتایج این بررسی در جهت تهیه آنتی ژن و یک واکسن Poly valent جهت پیشگیری بیماری در کانونهای آلوده استفاده خواهد شد.

خصوصیات باکتری

لپتوسپیرا یک باکتری هوازی مطلق، به شکل فنر و متحرک به طول ۸ تا ۲۰ و به عرض ۰/۱ تا ۰/۲ میکرومتر است که دارای پیچهای ریز و منظم و فشرده که فاصله هر پیچ ۰/۲ تا ۰/۳ و عمق آنها ۰/۵ میکرومتر می‌باشد. این باکتری در دو یا در یکی از دو انتهای خود دارای قلاب می‌باشد (تصویر شماره ۲).

با مطالعات الکترون میکروسکپی مشخص گردیده که بدنه سلول دارای سیتوپلاسم، پرده سیتوپلاسمی و دیوارهٔ سلولی می‌باشد که از پلی ساکارید، پپتید و گلیکان تشکیل یافته است. در این جنس به جای اورنیتین، اسید دی آمینوپایمیلیک شرکت کرده که آن را از سایر جنسهای راسته اسپیروکتها جدا می‌سازد.

رشته محوری سیتوپلاسمیک که به وسیله دو

نقشه شماره ۱: استانهایی که نمونه‌های سرمی و مرضی جهت آزمایشات لپتوسپیرا ارسال کرده‌اند.

فلاژل پری پلاسمیک محصور می‌گردد، عامل حرکت میکروارگانیسم محسوب می‌شود. که این اندامها به وسیله یک پوشش خارجی که از ۳ تا ۵ لایه تشکیل یافته، احاطه می‌شوند (تصویر شماره ۳). تولید مثل مستقیم و عرضی است به طوری که در شرایط طبیعی در هر ۱۲ ساعت و در شرایط آزمایشگاهی در هر ۸ ساعت یک بار تولید مثل انجام می‌گیرد. به دلیل اینکه گونه‌های مهم لپتوسپیراهای بیماریزا نمی‌توانند اسیدهای چرب را ایجاد کنند. باید به محیط غذایی آنها این اسیدها اضافه گردد که بهترین منبع تأمین این مواد سرم نرمال خرگوش می‌باشد.

لپتوسپیرا دارای دو جنس مهم بوده که عبارتند از: *L. interogans* بیماریزا، که ۲۲ سروگرپ و ۲۴۰ سرووارپته برای این جنس شناسایی شده است. جنس دیگر *L. biflexa* ساپروفیت، که دارای ۳۸ سروگروپ و ۶۵ سرووارپته می‌باشد. رده‌بندی لپتوسپیراها براساس میزان C+C در ملکول DNA و هیبریداسیون و خواص بیوشیمیایی می‌باشد.

بیماری‌زائی

پس از نفوذ لپتوسپیرا از پوشش مخاطی، بدون ایجاد واکنشهای التهابی در فاصله زمانی بین ۱۰ تا ۱۲ روز دوره کمون، عامل وارد سیستم خونی می‌گردد و باعث آلودگی ارگانهای داخلی و سیستم عصبی می‌شود که این مرحله را Septicemic stage یا Early نامگذاری کرده‌اند. در این مرحله می‌توان عامل را از خون و مایع نخاع شوکی جدا نمود. لپتوسپیراها توکسین خاصی را ترشح نمی‌کنند ولی آسیبهای پاتولوژیک حاصله از آنها نفوذپذیری مویرگهای آندوتلیال را افزایش می‌دهد و باعث اختلال در اکسیژن رسانی به بافتها می‌گردد. در هفته‌های دوم و سوم پس از ظهور آنتی بادی تب پائین افتاده و میکروارگانیسم درکلیه حیوان یا انسان مبتلا جایگزین می‌گردد و به دلیل جایگزین شدن لپتوسپیرا در توبولهای کلیه از عمل فاگوسیتوز مصون مانده و می‌تواند ماهها از راه ادرار دفع شود.

اگر محیط ادرار اسیدی باشد لپتوسپیرا در مدت زمان کوتاهی از بین می‌رود ولی اگر پس از دفع در محیط قلیایی و یا خنثی قرار گیرد برای ۳ تا ۴ هفته زنده می‌ماند. معمولاً" به این مرحله Immune stage یا Later گفته می‌شود. در این حالت میکروارگانیسم را می‌توان از ادرار جدا نمود و میزان پادتن سرم خون را با استفاده از روشهای سرولوژیکی تعیین عیار نمود (تصویر شماره ۱).

به دلیل اینکه پادگن ژن سوماتیک در اغلب گونه‌ها مشترک و از جنس لیپو پلی‌ساکارید می‌باشد که اختصاص به گروه دارد لذا در تعیین عیار آنتی بادی از آنتی ژن هر سروتیپ استفاده می‌شود. پس از نفوذ لپتوسپیرا از راه پوشش مخاطی دو فرم Icteric و Anicteric با علایم مندرج در تصویر شماره ۱ تظاهر کلینیکی پیدا می‌کنند که یرقان اپیدمیک، آلبومینوری، سقط جنین و نازایی از مهمترین علایم آن می‌باشند.

جدول شماره ۲: نتایج عیارسنجی سرمهای ارسالی از نقاط مختلف ایران با استفاده از روش MAT

Serotype	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
Grippotyphosa	17	13	62	13	-
Pomona	17	41	44	6	-
Canicola hondutrech	30	25	33	1	1
Canicola chiffon	28	39	28	6	2
Icterohaemorragie	32	45	34	3	1
Icterohaemorragie					
Icterohaemorragie	35	24	36	7	1
Copenhageni					
Sejroe sejroe	3	-	4	5	2
Sejroe hardjo	30	12	27	11	-
جمع کل	192	199	268	52	7

مواد و روش کار

متداولترین روشهای تشخیص آزمایشگاهی لپتوسپیرا عبارتند از روش مستقیم، کشت، تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی و آزمایشات سرولوژیکی. در روش مستقیم باید به مدت زمان سیر بیماری توجه خاصی مبذول نمود. اگر آلودگی در هفته اول بیماری باشد می‌توان از خون و مایع نخاع شوکی لام Wet mount تهیه و به وسیله میکروسکپ زمینه سیاه باسیلهای فنری شکل نازک (Thin Coiled Bacilli) را جستجو نمود. پس از سقوط تب از هفته دوم به بعد می‌توان عامل را در ادرار بیماران مشاهده و جداسازی کرد. به طور کلی جهت دید مستقیم و جداسازی لپتوسپیرا از خون و ادرار به شرح زیر می‌توان عمل نمود.

الف: خون

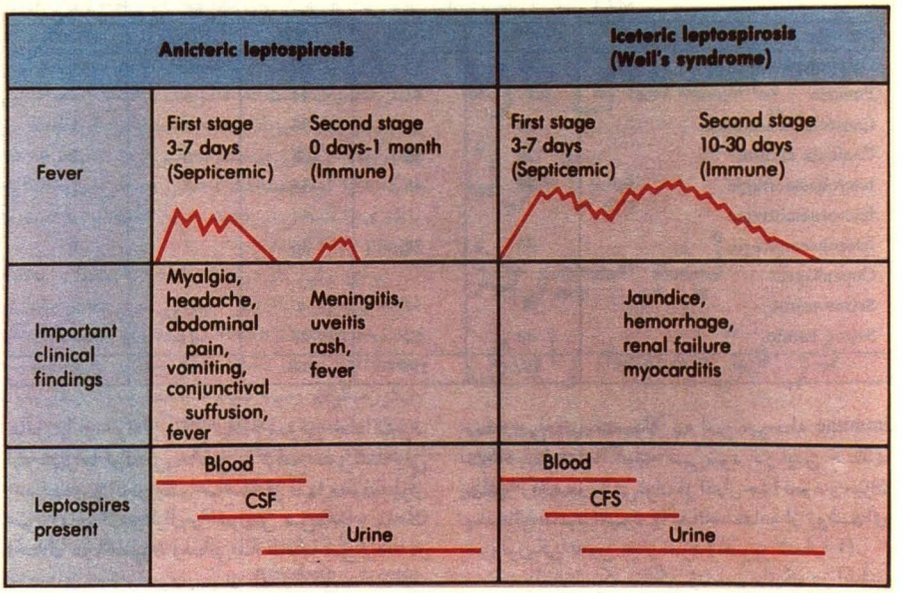
۱- ابتدا در لوله‌های استریل به میزان نیم سانتی متر مکعب از محلول یک درصد اکسالات سدیم و یا یک دهم سی‌سی از محلول یک درصد هپارین به ازای هر ۵ سانتیمتر مکعب خون اضافه می‌نمائیم.

۲- نمونه‌های فوق را به مدت ۱۵ دقیقه به میزان ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم، سپس مایع رویی را به لوله‌های دیگری انتقال می‌دهیم.

۳- لوله‌های مرحله دوم را به مدت یک الی دو ساعت به میزان ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ دور در دقیقه

جدول شماره ۱: سروگروپ و سرووارپته‌های موجود در بخش میکروبشناسی مؤسسه رازی

Serogroup	Serotype	Strain
Australis	Australis	Ballico
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Ballum	Castellon	Castellon
Bataviae	Braviae	Vantienen
Canicola	Canicola	Hondutrech IV
Canicola	Canicola	Chiffon
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Grippotyphosa	Grippotyhosa	Moskva V
Hebdomatis	Hebdomatis	Hebdomatis
Icterohaemorragie	Copenhageni	Wijnberk
Icterohaemorragie	Icterohaemorragie	Verdun
Javanica	Javanica	Veldratbotaviae 46
Pomona	Pomona	Pomona
Panama	Panama	Cz214 K
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sejroe	Hardjo	Hardjo
Sejroe	Sejroe	M 84
Sejroe	Wolffi	3705
Semaranga	Potac	Potacl
Tarassovi	Tarassovi	Mitis Johnson



تصویر شماره ۱ - نمایانگر فرم Icteric, Anicteric لپتوسپیروز

سانتریفوژ کرده و سپس مایع رویی را دور ریخته و از مایع ته‌نشین شده لامهای مستقیم جهت مشاهده لپتوسپیرا تهیه و سپس مورد بررسی قرار می‌دهیم.

ب: ادرار

۱- پس از تهیه نمونه‌ها، ادرار را به وسیله NaOH و HCl یک دهم نرمال خنثی می‌کنیم.
۲- پس از انجام عمل خنثی سازی، نمونه‌ها را به مدت یک ساعت با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ می‌کنیم.
۳- مایع رویی ر ادور ریخته و از مایع ته نشین شده لامهای Wet mount تهیه و اجسام فنری شکل نازک را جستجو می‌کنیم.

ج: کشت

پس از تهیه نمونه‌های مرضی و انتقال سریع آنها به آزمایشگاه، از نمونه‌های خون به طور مستقیم روی محیطهای اختصاصی لپتوسپیرا کشت می‌دهیم که در بخش میکروبشناسی مؤسسه رازی علاوه بر استفاده از محیط EMJH، Fletcher و Gardner و مقایسه کیفیت باکتریولوژیکی آنها از محیط تغییر فرمول یافته‌ای به نام Gardner Razi استفاده می‌گردد. جهت جلوگیری و کاهش آلودگیهای باکتریایی ادرار می‌توان از رقتهای 10^{-2}، 10^{-3} و 10^{-4} و یا با اضافه کردن ۲۰۰ میلی گرم 5-Fluorouracil در هر سانتیمتر مکعب ادرار استفاده نمود. محیطهای کشت را به مدت ۴ الی ۶ هفته در شرایط ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری و هر هفته مراحل و چگونگی رشد را با تهیه لام Wet mount بررسی می‌نمائیم.

د: جداسازی

جهت جداسازی لپتوسپیرا از نمونه‌های فوق‌الذکر لازم است از مایع ته‌نشین شده به میزان ۱/۵-۱ سانتیمتر مکعب داخل صفاق خوکچه هندی و یا هامستر جوان تزریق و پس از ۲ الی ۴ روز در صورتی که درجه حرارت بدن حیوان بالا رود لام مستقیم از خون تهیه و با روش مستقیم Wet mount و رنگ آمیزی اختصاصی فونتانا و یا مستقیم و جداسازی و هیستوپاتولوژیکی نمونه‌برداری می‌کنیم.

ه: آزمایشات سرولوژیکی

در بخش میکروبشناسی مؤسسه تحقیقاتی رازی جهت تعیین عیار آنتی بادی از دو روش MAT و CFT استفاده می‌شود. در روش MAT از سروتیپهای زنده ۲۰ سروگروپ لپتوسپیرا استفاده می‌گردد. در این آزمایش از کشتهای ۱۴-۴ روزه باکتری در حرارت 30^{c}-25^{c} در محیط مایع و با تراکم 2×10^{8}-1×10^{8} لپتوسپیرا در میلی لیتر استفاده می‌گردد. آنتی ژنهای مورد استفاده باید فاقد هرگونه اتوآگلوتیناسیونی باشند. ابتدا از سرم رقت $\frac{1}{50}$ تهیه و سپس در یک لوله آزمایش استریل هم حجم سرم، آنتی ژن رقیق شده را به آن می‌افزائیم. سپس این لوله‌ها را به مدت ۴-۱/۵ ساعت در گرمخانه 30^{c}-25^{c} قرار می‌دهیم.

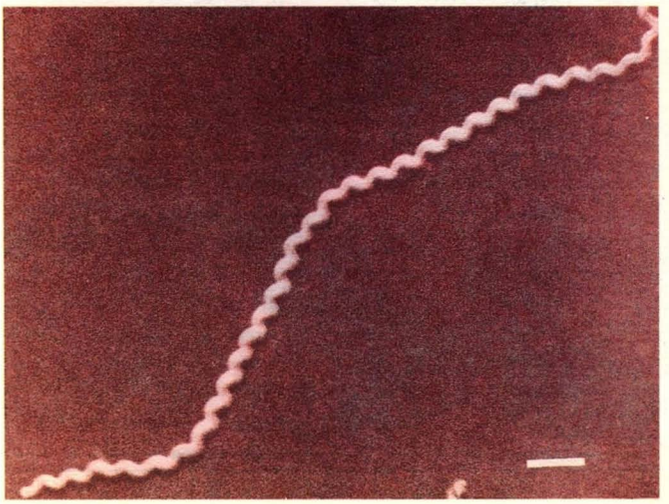
بعد از طی زمان انکوباسیون با تهیه لام Wet mount و مشاهده به وسیله میکروسکوپ زمینه تاریک میزان درصد تحرک لپتوسپیراها را بررسی می‌کنیم. در صورتی که بیش از ۵۰ درصد از لپتوسپیراها بی حرکت یا آگلوتینه شده باشند از نمونه رقتهای بالاتر تهیه و آزمایش را تکرار می‌کنیم تا عیار مورد نظر به دست آید که نتایج آن در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

جهت انجام آزمایش CFT سروتیپهای مختلف لپتوسپیرا در محیط G.R کشت گردیده سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و مایع ته‌نشین شده از سروتیپ‌های مختلف با دستگاه اولتراسونیک سونیکه می‌گردیدند و به صورت لیوفیلیزه جهت انجام آزمایشات CFT مورد استفاده قرار می‌گرفتند. به دلیل حساس بودن روش MAT ادامه آزمایشات با روش فوق انجام می‌گردد.

و: آزمایشات باکتریولوژیکی

نمونه‌های ارسالی به بخش میکروبشناسی مؤسسه رازی اغلب شامل ادرار- خون و نسج کلیه بودند جهت انجام آزمایشات باکتریولوژیک از نمونه‌های فوق‌الذکر بر روی محیط Fletcher EMJH, G.R, کشت داده شد و نمونه‌ها در شرایط لازم نگهداری شدند سپس هر ۴ روز یک بار از نمونه‌ها به طریق Wet mount جهت وجود اجسام

تصویر شماره ۲ - شکل میکروسکوپ الکترونی لپتوسپیرا



لپتوسپیرایی لام تهیه و با میکروسکپ زمینه تاریک مشاهده می‌گردیدند. از نمونه‌های فوق‌الذکر ۲ نمونه ادرار از نظر لپتوسپیرا مثبت بودند که نمونه‌ها جهت تعیین سرووواریته نگهداری می‌شوند.

نتایج

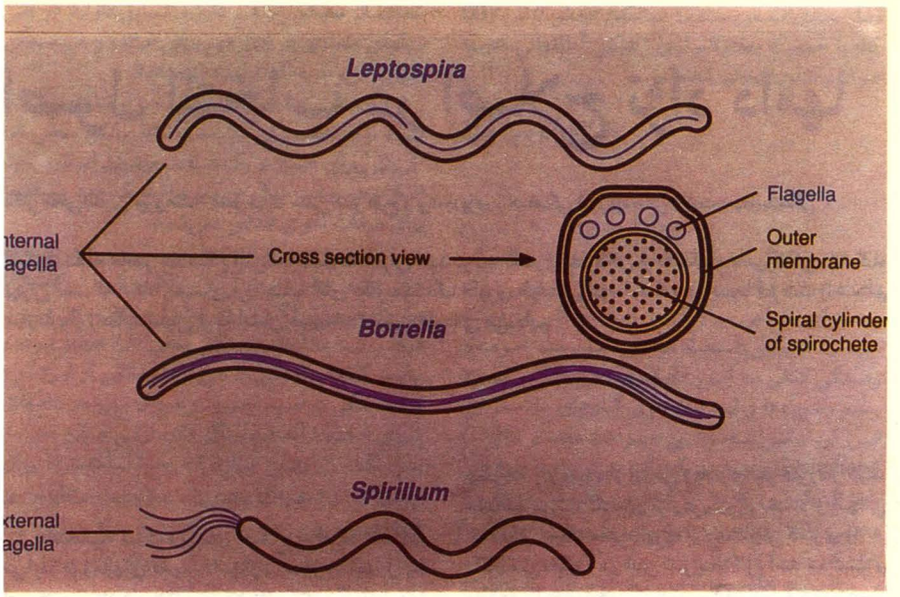
نتایج به دست آمده از آزمایش MAT بر روی ۹۳۲ نمونه سرم که از نقاط مختلف ایران به بخش میکروبشناسی ارسال گردیده بود نشانگر پراکندگی هشت سروتیپ مختلف لپتوسپیرا می‌باشد که درصد عیارسنجی آنها در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. وجود عیار $\frac{1}{100}$ به میزان ۵/۶ درصد، عیار $\frac{1}{1600}$ به میزان ۲۸/۸ درصد و عیار $\frac{1}{8000}$ به میزان ۱۲۱/۴ درصد نشانگر آلودگی در مناطق فوق بوده است (نقشه شماره ۱).

وجود پادتن ضد *C. chiffon* و *Ict.copenhageni* و *S. sejroe* برای اولین بار در ایران نشان داده شد. در مقایسه با پژوهشهایی که در سالهای ۱۳۶۶ و ۱۳۶۷ در ایران با آزمایشات سرولوژیکی بر روی ۲۵ نمونه سرم گاوی انجام پذیرفته پادتن‌های ضد Canicola, Icterohaamorragie, ballum و Grippotyphosa مورد شناسایی قرار گرفتند که بدون تعیین عیار به عنوان کانون آلودگی گزارش شده‌اند. از نظر اپیدمیولوژیکی و آماری این تعداد نمی‌تواند جواب معنی‌داری داشته باشد. با توجه به نتایج عیار سنجی و درصد عیارها (جداول شماره ۲ و ۳) می‌توان تذکر داد که اگر از دامها با این عیارهای

جدول شماره ۳:درصد نتایج عیار سنجی ۹۳۲ سرم خون با استفاده از روش MAT

عیارسرمها	مجموع	درصد
۱/۲۰۰	۱۹۲	۲۰/۶
۱/۴۰۰	۱۹۹	۲۱/۴
۱/۸۰۰	۲۶۸	۲۸/۸
۱/۱۶۰۰	۵۲	۵/۶
۱/۳۲۰۰	۷	۰/۸

بالا با توجه به سیر بیماری، نمونه‌های مرضی جهت آزمایشات باکتریولوژیکی به منظور جدا نمودن عامل بیماری گرفته شود، درصد بالایی از نمونه‌ها از نظر کشت مثبت خواهند بود. به طوری که آزمایشات باکتریولوژیکی انجام شده بر روی نمونه‌های مرضی ارسالی از مناطق مختلف ایران که شامل ادرار، خون و نسج کلیه بوده است و جداسازی ۲ مورد لپتوسپیرا از موارد فوق‌الذکر نشانگر پراکندگی و وجود لپتوسپیرا با سرووواریته‌های مختلف در ایران می‌باشد. که نتایج سرولوژیکی با عیار بالاتر از $\frac{1}{400}$ مؤید این موضوع است که اگر نمونه‌های مرضی در شرایط خاصی از بیماری تهیه و با رعایت اصول استاندارد، نمونه‌ها جهت کشت به آزمایشگاه ارسال گردند درصد جداسازی از میزان بالاتری برخوردار خواهد بود و بدین وسیله می‌توان سرووواریته‌های مسئول را علاوه بر شناسایی از راه عیار پادتن، از راه باکتریولوژیکی نیز جدا و تعیین سروتیپ نمود. همچنین، با بررسیهایی که در پی‌آمد بروز نشانیهای درمانگاهی و کالبد گشایی و آسیب شناسی انجام می‌پذیرد کانونهای آلوده مورد شناسایی و از نظر تعیین سروتیپ‌های غالب در منطقه از گاوهای آلوده و غیرآلوده و سایر حیواناتی که به عنوان ذخیره عامل بیماری شناخته شده‌اند، همچنین افرادی که با حیوانات آلوده سروکار دارند خونگیری و آزمایشهای لازم انجام می‌شود. در نظر است که پس از ارزیابی نتایج این مطالعه پادتن و واکسن پلی والان مناسب جهت کنترل بیماری در کانونهای آلوده تهیه و در دسترس قرار گیرد.



تصویر شماره ۳- مقایسه شکل ظاهری سه جنس مهم خانواده اسپیروکتاسه

منابع مورد استفاده

۱- محرمی مجتبی - بررسی سرواپیدمیولوژیک لپتوسپیروز در دامداریهای اطراف تهران ۷۰-۱۳۶۹ پایان نامه ۱۹۲۸

2. Brown, A.J., 1991, Protein and Antigen profiles ofprevalent serovars of *Leptospira interrogans*. Infect. Immun. Vol. 59,No.3,P. 1772, 1777.

3. Faine, S., 1982. Guidline for the control of leptospirosis. Who offser publication, No 67, 105-121.

4. Galton, M.M., 1958, A rapid macroscopic-silde screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. Am.Jvet. Res. Vol.10, 505-512

5. Myers, DM., 1958, Manual of laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. PAZC/WHO, No. 30.

6. Bolin, C.A., 1989, Effect of Vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjs infection of prognant cattle. Am,. J.vet Res. 50(1): 161-165.

7. Katz, AR., 1991, Leptospirosis on Kauai;investigation of a Common source waterborn outbreak. Am.J. public-Heath. 81(10), 1310-1312

8. Ezeh-Ao., 1991, Serological and cultural examination for humman leptospirosis in Nigeria. Cent. Afr. J. Med-37(1). 11-5

9. Randall, R. Sonic-Vibrated leptospirae as antigens in the complement fixation test for the diagnosis of leptospirosis. J. lab. clin. Men. Vol 37;1411-15

10. Stalheim, OHV. 1966, Effect of antimicrobial agent on leptoppiral Growth, respiration/ motility and viability. Am. J. vet. Res. Vol:27:797:80

11. Takenchi, A., 1974, Spiral-shaped organisms on the surface colonic epithelium of the monkey and man. Am. J. Clin. Nut, Vol 27: 1287- 1296.

12. Abdollahpour, G., 1990, A sero epidemiological study on canine and bovine leptospirosis in Tehran province. The 75th Anniversary of the L.R.C. 34-38-JAPAN. 13. Hoshmand Rad, P., Maghami, GH., 1976, Leptospirosis in small mammels of IRAN. Arch. Inst. Razi,28:39-44.

14. Maghami. GH., Hoshmand Rad, P., Leptospirosis in small mammels of Iran. J. of wild life disease, 1977,13:286-289.