دوفصلنامه طب جنوب
پژوهشكده زيست- پزشكي خليج فارس
مركز تحقيقات طب گرمسيري و عفوني خليج فارس
دانشگاه علوم پزشكي و خدمات بهداشتي درماني بوشهر
سال دهم، شماره ۱، صفحه ۱۸- ۹ (شهريور ۱۳۸۶)

شناسايي لپتوسپيروز به روش مولكولي PCR در تب خونريزي دهنده دامي دلتاي رود حله بندر بوشهر در سال ۱۳۸۲*

رويا اميري نژاد[۱]، دكتر كتايون وحدت[۲]، دكتر ايرج نبي‌پور[۳]**، سيد مجتبي جعفري[۴]، دكترامرالله فاجاري[۵]، دكتر رضا حاجي حسيني[۶]، دكتر سيد جواد حسيني[۷]، دكتر كيوان زندي[۸]، دكتر محمد هادي ظفرمند[۹]، دكتر مهدي معتمدي[۱۰]، زهرا سنجيده[۱۱]

[۱] كارشناس ارشد بيوشيمي، دانشكده علوم پايه، دانشگاه پيام نور
[۲] استاديار بيماري‌هاي عفوني، بخش بيماري‌هاي گرمسيري پروفسور حقيقي، مركز تحقيقات طب گرمسيري و عفوني خليج فارس
[۳] دانشيار بيماري‌هاي داخلي، مركز تحقيقات طب گرمسيري و عفوني خليج فارس
[۴] كارشناس ارشد ايمني شناسي، دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي خليج فارس
[۵] دامپزشك، اداره كل دامپزشكي استان بوشهر
[۶] استاديار بيوشيمي، دانشكده علوم پايه، دانشگاه پيام نور
[۷] استاديار سلولي و مولكولي مركز مطالعات و پژوهش‌هاي خليج فارس، دانشگاه خليج فارس بوشهر
[۸] استاديار ويروس شناسي، دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي بوشهر.
[۹] پزشك عمومي، معاونت بهداشتي، دانشگاه علوم پزشكي بوشهر
[۱۰] دانش آموختة پزشكي، دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي بوشهر
[۱۱] كارشناس آزمايشگاه، مركز تحقيقات طب گرمسيري و عفوني خليج فارس

چكيده

زمينه: لپتوسپيروز بيماري مهم مشترك انسان و دام است كه انتشار جهاني دارد و توسط اسپيروكت‌هاي پاتوژن متعلق به جنس لپتوسپيرا ايجاد مي‌شود. تشخيص بر پايه يافته‌هاي سرولوژي نياز به آزمون سرم‌هاي حاد و دوران نقاهت دارد و تكنيك مولكولي PCR داراي اختصاصيت و حساسيت بالايي براي تشخيص زود هنگام اين بيماري مي‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از ۷ الي ۱۰ روز از گسترده رخداد تب خونريزي دهندة دامي منطقة تالاب رود حله شهرستان بوشهر كه در اواخر دي ماه ۱۳۸۲ در پي بارندگي شديد و جاري شدن سيلاب در اين منطقه روي داد، سرم‌هاي ۴۹ دامدار و ۲۰۰ دام منطقه تالاب به عنوان گروه مورد توسط واكنش زنجيره‌اي پليمراز كه براساس ژن SrRNA ۱۶ طراحي شده بود مورد بررسي قرار گرفتند. اين روش PCR همچنين بر روي نمونه‌هاي سرمي ۶۰ دامدار در چهارده روستاي اطراف منطقه تالاب به عنوان شاهد نرمال انجام شد. سرم‌هاي نمونه‌هاي انساني از لحاظ IgM لپتوسپيرايي توسط روش اليزا مورد آزمون قرار گرفتند.

يافته‌ها: در ۱۶ دامدار (۳۲/۶۵ درصد) و ۱۹ دام (۹/۵ درصد) منطقه، ژنوم لپتوسپيرا با روش PCR تشخيص داده شد. در گروه شاهد نرمال با روش PCR ژنوم لپتوسپيرا شناسايي نگرديد. بر اساس نتايج اليزا IgM براي لپتوسپيروز تعداد ۱۵ نفر از دامداران تالاب حله داراي سرولوژي مثبت بودند. از كساني كه داراي PCR مثبت براي لپتوسپيروز بودند (۱۶نفر)، تعداد ۱۰ نفر داراي نتيجه سرولوژي منفي و ۶ نفر داراي سرولوژي مثبت بودند.

نتيجه گيري: تب خونريزي دهندة دامي منطقة تالاب رود حلة بوشهر در نتيجة لپتوسپيروز بوده است. روش واكنش زنجيره‌اي پليمراز كه بر اساس ۱۶SrRNA طراحي شده بود، داراي پتانسيل شناسايي لپتوسپيراي پاتوژنيك در نمونه‌هاي باليني بوده و شرايط براي تشخيص زودرس و قطعي آن در هنگام عفونت فعال را ميسر مي‌سازد.

واژگان كليدي: لپتوسپيروز، PCR، تب خونريزي دهنده، دام
دريافت مقاله: ۱۳۸۶/۳/۳۰ - پذيرش مقاله: ۱۳۸۶/۵/۱۲

* اين پروژه از پروژه‌های مصوب مركز تحقيقات طب گرمسيري و عفوني خليج فارس مي‌باشد كه در قالب پايان‌نامه دانشجويي مقطع كارشناسي ارشد انجام گرديده است.

** بوشهر، خيابان امام خميني، مركز تحقيقات طب گرمسيري و عفوني خليج فارس، كد پستي: ۷۵۱۴۷-۶۳۴۴۸ Email: nabipourpg@bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

مقدمه

لپتوسپيروز بيماري زونوتيک (zoonotic) مهم حياتي است که توسط اسپيروکت‌هاي جنس لپتوسپيرا ايجاد مي‌شود. سالانه ده‌ها ميليون مورد از اين بيماري در سرتاسر دنيا اتفاق مي‌افتد که ميزان مرگ و مير آن در بعضي مناطق به ۲۵-۲۰ درصد مي‌رسد (۱).

اين بيماري در انسان از طريق آب‌هاي سطحي محيطي آلوده با ادرار حيوانات اهلي و پستانداران وحشي که به صورت مزمن با لپتوسپيرا کلونيزاسيون شده‌اند، روي مي‌دهد (۲). اين بيماري هم در کشورهاي در حال توسعه و هم کشورهاي صنعتي ديده مي‌شود ولي به طور ويژه در کشورهاي گرمسيري شايع است، زيرا شرايط زيست محيطي و اقتصادي-اجتماعي در اين مکان‌ها براي انتقال آن بسيار مناسب مي‌باشد و دليل ديگر آن است که لپتوسپيرا در خاک مرطوب و گرم و نيز در آب براي ماه‌ها و سال‌ها، به حيات خود ادامه مي‌دهد (۳).

اگر چه هنوز بحث‌هايي درباره ارزش درمان ضد ميکروبي براي لپتوسپيروز وجود دارد، عموماً باور بر اين است که عوامل ضد ميکروبي، تنها زماني مؤثر هستند که هر چه زودتر تجويز شوند (۴)، اما متأسفانه تشخيص لپتوسپيروز معمولاً به صورت گذشته نگر توسط سرولوژي صورت مي‌گيرد، چرا که کشت نياز به محيط‌هاي اختصاصي و انکوباسيون براي چندين هفته دارد (۵). تشخيص بر پايه يافته‌هاي سرولوژي توسط آزمون مت (MAT)[1] نياز به آزمون سرم‌هاي حاد و دوران نقاهت دارد، زيرا آنتي‌بادي‌هاي آگلوتينه کننده، اغلب در بيماري حاد قابل تشخيص نيستند. آنتي‌بادي‌ها از نوع IgM طي ۷-۵ روز بعد از علائم باليني، قابل شناسايي بوده و کاربرد روش اليزا براي شناسايي IgM در تشخيص فرضي لپتوسپيروز در جمعيت‌هاي مختلف مورد بررسي قرار گرفته است (۶).

تعدادي از روش‌هاي وابسته به PCR[2] براي شناسايي DNA لپتوسپيرايي توصيف شده‌اند، اما دو مورد از اين روش‌ها در مطالعات باليني مورد ارزيابي قرار گرفته‌اند و به صورت گسترده براي تشخيص استفاده مي‌شوند (۷ و ۸).

تا کنون ۱۷ گونة لپتوسپيرا با تکنيک هيبريداسيون DNA-DNA شناسايي شده‌اند (۹ و ۱۰). اين گونه‌ها خود به گروه‌هاي پاتوژنيک، غير پاتوژنيک و فرصت طلب (احتمالاً پاتوژنيک لپتوسپيرا)، تقسيم مي‌شوند. تا کنون، کوشش‌هاي فراواني براي طراحي پرايمرهاي PCR که اختصاصي براي گونه‌هاي لپتوسپيرا باشد، صورت گرفته است (۵)، اما در هر صورت مشکل شناسايي تمام گونه‌هاي پاتوژنيک است و در بعضي موارد، شناخت ميان گونه‌هاي پاتوژنيک و غير پاتوژنيک نيز مشکل است. هر چند که از زمان معرفي تکنيک‌هاي مولکولي، شناسايي گونه‌هاي لپتوسپيرايي از طريق هيبريداسيون DNA-DNA يا توالي ژن ۱۶SrRNA انجام مي‌پذيرد، اما بايد اذعان داشت هر دو روش فوق داراي محدوديت‌هايي هستند. تکنيک اول بسيار وقت‌گير بوده و نياز به ايزوتوپ‌هاي نشان‌دار دارد و در تکنيك دوم نيز به دليل وجود تشابه چشمگير توالي ميان گونه‌ها، نياز است که توالي عمده‌اي از ژن براي شناسايي دقيق لپتوسپيرا تعيين سکانس شود (۹).

هر چند روش PCR (real-time) با استفاده از شيمي تگمن (Taqman) براي شناسايي لپتوسپيراهاي کلينيکي و محيطي و نيز توالي ژن کد کننده زير واحد

[1] Microscopic Agglutination Test

[2] Polimerase Chain Reaction

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

B دي ان ژيراز[3] استفاده شده‌اند (۹ و ۱۱)، اما شايع ترين ژن‌هاي هدف كه در تكنيك PCR مورد استفاده قرار مي‌گيرند، ژن‌هاي ۱۶SrRNA يا ۲۳SrRNA مي‌باشند (۵). ما نيز در اين پژوهش از روش PCR بر اساس توالي ژن ۱۶SrRNA براي بررسي وجود لپتوسپيرا در بيماري تب خونريزي دهندة دامي منطقه كره‌بند شهرستان بوشهر كه در اواخر دي‌ماه ۱۳۸۲ در پي بارندگي شديد و جاري شدن سيلاب در تالاب رود حلة اين منطقه روي داد، استفاده نموديم. در اين مطالعه همچنين از تمام دامداران منطقه رود حله نمونه‌هاي خوني جهت بررسي سرولوژيك و PCR اخذ گرديد و ۲۰۰ دام نيز كه هنوز پس از ۷ الي ۱۰ روز از شروع اپيدمي زنده مانده بودند، از دامداران مختلف انتخاب و مورد نمونه‌گيري قرار گرفتند.

مواد و روش‌كار

الف- نمونه‌هاي باليني و جامعه مورد مطالعه

در اواخر دي ماه ۱۳۸۲ در پي بارندگي شديد و جاري شدن سيلاب در منطقه‌كره‌بند «تالاب رود حلّه شهرستان بوشهر» شاهد يک گسترده رخداد بيماري تب خونريزي دهنده در دام‌هاي منطقه بوديم. اين منطقه در سواحل دريا و به فاصله ۱۰ كيلومتري شمال شرقي بندر بوشهر واقع گرديده است و مساحت آن ۴۲۶۰۰ هكتار است كه حدود ۲۰۰۰۰ هكتار آن تالابي مي‌باشد. منبع تامين‌كننده آب تالاب، رودخانه حلّه است كه از بهم پيوستن رودخانه شور دالكي و رودخانه شيرين شاپور در شمال غربي روستاي درودگاه تشكيل مي‌گردد. متعاقب بارندگي سنگين پنج روزه (متجاوز از ۲۰۰ ميلي‌متر) در اين منطقه، در اواخر خرداد ماه سال ۱۳۸۲ بيماري تب خونريزي دهنده به صورت ادرار خونی، دوره كوتاه باليني، مرگ ناگهاني، تراوش خون و مايعات آماسي از منافذ بدن در هنگام مرگ و بعضاً پس از مرگ، در جمعيت‌هاي گوسفندي، بز و گاوي بروز نمود. اين بيماري تلفات بالايي در جمعيت‌هاي گوسفندي و بز و در درجات كمتر در گاوها ايجاد كرد.

از تمام دامداران منطقه تالاب رودخانه حله و روستاي كره‌بند اين منطقه كه ۴۹ نفر بودند و در زمان بروز بيماري تب خونريزي دهنده دامي در منطقه حضور داشتند در فاصله ۷ الي ۱۰ روز پس از شروع اپيدمي در منطقه نمونه‌گيري شد. ميانگين گروه سني مورد مطالعه ۱۴/۶۸± ۳۱/۳۴ سال بود.

همچنين از ۲۰۰ دام افراد جامعه مورد مطالعه كه شامل بز، گاو، گوسفند بود و با گذشت ۷ الي ۱۰ روز از شروع اپيدمي در منطقه هنوز زنده مانده بودند، نمونه هاي خوني گرفته شد. نمونه‌هاي خوني براي تهيه سرم، در دماي اتاق قرارگرفتند تا لخته شدند و سرم‌ها با سانتريفوژ كاملاً جداسازي شدند. سرم‌ها به لوله‌هاي استريل منتقل و در دماي ۱۲۰- درجه سانتي‌گراد در بانك سرمي مركز پژوهش‌هاي سلامت خليج فارس جهت آناليزهاي مختلف نگهداري شدند. در اين مطالعه از سرم‌هاي فريز شده جهت استخراج DNA و عمل PCR استفاده گرديد.

ب- نمونه‌هاي شاهد نرمال

نمونه‌هاي سرمي ۳۵۹ دامدار ساكن ۱۴ روستاي اطراف روستاي كره‌بند در زمان شيوع بيماري تب خونريزي دهندة دامي همانند جامعه مورد مطالعه، تهيه و در دماي ۱۲۰- درجه سانتي‌گراد جهت آناليزهاي مختلف نگهداري شد. در اين پژوهش از ۶۰ سرم استفاده گرديد.

ج- استخراج DNA

استخراج DNA ژنوميك لپتوسپيرا از نمونه‌هاي سرمي با روش سليكاژل-گوانيدينيوم تيوسيانات انجام

[3] DNA Gyrase subunit B encoding gene

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

شـد (۱۲). بـراي ايـن منظـوراز محلـول‌هـاي L6-lysis buffer [EDTA با غلظت ۰/۲ مول و PH ۸، GUSCN (سـاخت شـركت fluka)، TritonX-۱۰۰ (سـاخت شـركتmerck)]، سـيليكاژل (۱۳)، L2-wash buffer (GUSCN در Tris-Hcl بـا غلظت ۰/۱ مول و PH ۶/۴)، اتانل ۷۰ درجه، استون، پروتئيناز k (۲۰۰ نانوگرم بر ميلي‌ليتـر) اسـتفاده شـد. ميزان ۳۰-۱۰ ميكروليتـر از محلـول DNA اسـتخراج شده جهت واكنش PCR مورد اسـتفاده قـرار گرفـت. حداكثر حجم سرم مورد استفاده بيشتر از ۱ ميلـي‌ليتـر نبود.

د- DNA شاهد مثبت

براي اين هدف از DNA ژنوميك لپتوسپيراي پـاتوژن (ساخت شركت Genekam) به عنوان شاهد مثبت در PCR استفاده گرديد.

هـ- واكنش زنجيره‌اي پليمراز

به منظور تشخيص لپتوسـپيراي پـاتوژن در سـرم‌هـا از ست پرايمـر طراحـي شـده (نـرم افـزار Oligo5) بـر اساس تـرادف ژنـي ۱۶SrRNA جهـت تكثيـر قطعـة ۴۵۶bp استفاده شد. تـوالي پرايمرهـاي طراحـي شـده براي اين پژوهش به صورت زير بوده است:

L16SF:5'-CACCAAGGCGACGATCGGTAGC-3'

L16SR:5'-CAAGTCGCCTTCGCCACTGGTG-3'

PCR در يك حجـم ۵۰ مـايكرو ليتـر، حـاوي ۲/۵ واحد آنزيم Taq DNA پليمـراز، ۴ ميلـي مـولار از $MgCl_2$، ۲۰۰ مـايكرو مـولار از dNTP، ۱ مـايكرو مـولار از هريـك از پرايمرهـا، ۵ مـايكرو ليتـر از PCRbuffer10X و ۳۰-۱۰ مايكرو ليتـر از DNA استخراج شده از نمونه‌هـاي سـرمي، انجـام گرفـت. واكنش PCR شامل سه مرحلـه بـود. مرحلـه اول ۵ دقيقه در ۹۵ درجه سانتي‌گراد، مرحله دوم كه بـراي ۳۵ سيكل انجام شد، شـامل: ۱ دقيقـه در ۹۵ درجـه سانتي گراد، ۵۵ ثانيه در ۶۲ درجـه سـانتي‌گـراد و ۱ دقيقه در دماي ۷۲ درجه سانتي‌گراد بود. در مرحلـه آخر نيز به مدت ۵ دقيقه در ۷۲ درجـه سـانتي‌گـراد قـرار گرفتنـد. واكـنش‌هـا در ترموسـايكلر ۵۱۲ Techne-TCانجام شد. در هر مرحله PCR جهـت شاهد منفي از تيوپ محتوي PCR mixture بـدون DNA الگـو وDNA لپتوسـپيرا (Genekam) بـه عنوان شاهد مثبت استفاده گرديد.

و- آشكار سازي و آناليز محصول PCR

محصولات PCR بر روي ژل آگاروز ۲ درصد كـه بـا استفاده از TBE و آگاروز و اتيديوم بروماید تهيه شده بود آناليزشد. ماركر مورد استفاده ۱۰۰bp بود و انـدازة قطعات تكثير يافتـه در مقايسـه بـا ايـن مـاركر تعيـين گرديد.

ز- تعيين حساسيت

جهت تعيين حساسيت واكنشPCR، رقـت‌هـايي از ۱ نـانوگرم تـا ۱۰ فمتـوگرم از DNA لپتوسـپيرا (شـاهد مثبـت) تهيـه و PCR بـر روي آنهـا انجـام گرفـت. حساسيت اين تست بر مبناي بيشترين رقت كـه در آن DNA قطعات مورد نظر از لپتوسپيرا تكثير يافته و بـر روي ژل آگاروز قابل رؤيت باشد ارزيابي شد.

ح- تعيين ويژگي

ويژگي PCR بكار رفته در اين تحقيـق بـا اسـتفاده از DNA ژنوميـك اسـتخراج شـده از ۵ بـاكتري غيـر لپتوسپيرا شامل: كلبسـيلا پنومـوني، اسـتافيلوكوكوس اورئـوس، پروتئـوس ميـرابيليس، اشريشـيا كلـي، استرپتوكوكوس تعيين شد.

ط- سرولوژي

براي سنجش تيتر آنتي‌بادي IgM لپتوسپيروز از كيت SERION-ELISA Classic Leptospira ساخت

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

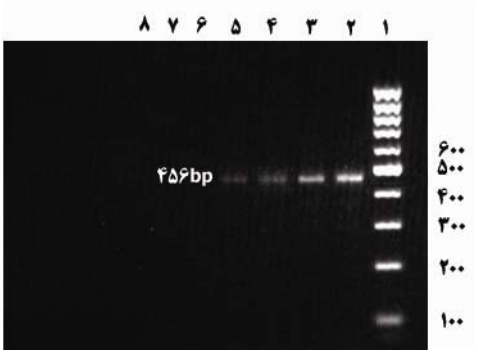
Institut Virion / Serion GmbH آلمان استفاده شد. براي ساخت اين كيت از سرووارهاي Leptospira interrogans شامل: L. Pomona، L. icterohaemorrhagiae، L. copenhagenil، L. canicola، L. Bratislava، L. grippotyphosa، L. hebdomadis، L. sejroe، L. bataviae، L. tarassovi و L. hardjo استفاده شده بود.

براي جلوگيري از تداخل فاكتورهاي روماتوئيدي در اندازه‌گيري سطح سرمي IgM نمونه‌ها با جاذب فاكتور روماتوئيدي (SERION Rheumatoid Factor Absorbent Z ۲۰۰) مورد تماس قرار داده شدند. بر اساس داده‌هاي موسسة سازنده كيت، ميزان فعاليت آنتي‌بادي IgM ليپتوسپيروزي بالاتر از ۲۰ واحد در سي‌سي (>۲۰U/ml) به عنوان مثبت قلمداد شد.

يافته‌ها

اختصاصي بودن اليگو نوكلئوتيدها براي ليپتوسپيرا با بررسي پرايمر بر روي باكتري‌هاي غير ليپتوسپيرا وليپتوسپيرا نشان داد كه اين پرايمرها براي ليپتوسپيرا اختصاصي بود و در اين باكتري توليد محصول bp ۴۵۶ نمود و هيچ‌گونه مثبت كاذبي براي ساير گونه-هاي باكتريايي مورد آزمايش مشاهده نشد. توانايي پرايمر براي شناسايي توالي16SrRNA در۴۷ سروار پاتوژن ليپتوسپيرا (توالي‌ها از سايتNCBI گرفته شد) توسط نرم افزار جين‌رانر (Generunner) نشان داد كه در تمام موارد قادر به تكثير و توليد قطعة ۴۵۶bp مي باشد.

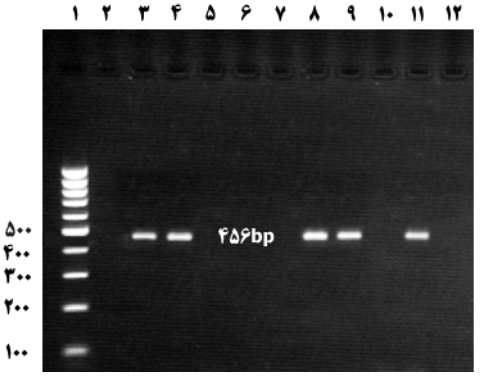
حساسيت واكنش PCR كه در محدوده‌اي از رقت‌هاي ۱ نانوگرم تا ۱۰ فمتوگرم انجام شد بر اساس بيشترين رقت تعيين گرديد. كمترين مقدار DNA ليپتوسپيرا كه توسط الكتروفورز بر روي ژل آگاروز قابل رؤيت بود ۱ پيكوگرم تعيين شد (شكل۱).



شكل۱: الكتروفورز محصول **PCR** ,(۱) مـاركر **100bp** (۲) **ng** ۱ (۳) **pg** ۱۰۰ (۴) **pg** ۱۰ (۵) **pg** ۱ (۶) **fg** ۱۰۰ (۷) **fg** ۱۰ (۸) بدون **DNA**.

نتيجه PCR بر روي ۶۰ نمونه شاهد نرمال، منفي بـود و هيچ محصولي بر روي ژل آگاروز مشاهده نشد.

از مجموع ۴۹ نمونه سرم انساني كه PCR بر روي آنها انجام شد، ۱۶ مورد (۳۲/۶۵ درصد) مثبـت و نشـانگر وجود DNA ليپتوسپيرا در اين سرم‌ها بود (شكل۲). در ۱۶ نمونـــه ســـرمي محصـــول ۴۵۶bp توســـط ژل الكتروفورز قابل رؤيت شد.



شـــكل۲: الكتروفـــورز محصـــول **PCR** نمونـــه‌هـــاى ســـرمى (۱) ماركر **۱۰۰bp** (۲) شاهد منفى (۳) شاهد مثبت (٤.٨.٩.١١) نمونه‌هاى سرمى مثبت ليپتوسپيرا (٥.٦.٧.١٠) نمونه‌هاى ســرمى منفى ليپتوسپيرا.

بر اساس نتايج اليزا IgM براي ليپتوسـپيروز ۱۵ نفـر

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

از دامداران تالاب حله داراي سرولوژي مثبت بودنـد. از كساني كـه داراي PCR مثبـت بـراي لپتوسـپيروز بودند (۱۶نفر)، ۱۰ نفر داراي نتيجه سرولوژي منفي و ۶ نفر داراي سرولوژي مثبـت بودنـد (جـدول ۱). در ميان افراد داراي PCR مثبت سه نفر داراي تب، سـر درد و درد عضلاني و يك نفر نيز داراي افـت فشـار خون بودند و همگـي ايـن افـراد داراي IgM مثبـت بودند، بقيه افراد داراي هيچ‌گونه علائم خاص نبودند.

جدول ۱: مقايسه نتايج PCR و اليزا IgM در ۴۹ نمونه سرم انساني منطقة تالاب رودحله بوشهر

نتايج اليزا IgM	نتايج PCR		
	مثبت	منفي	كل
مثبت	۶ (۱۲/۲۴)*	۹ (۱۸/۳۷)	۱۵ (۳۰/۶۱)
منفي	۱۰ (۲۰/۴۱)	۲۴ (۴۸/۹۸)	۳۴ (۶۹/۳۹)
كل	۱۶ (۳۲/۶۵)	۳۳ (۶۷/۳۵)	۴۹ (۱۰۰)

*اعداد به صورت (درصد) تعداد می باشند.

ميانگين سني افـرادي كـه داراي جـواب مثبـت بـراي PCR بودند ۱۳/۱۰±۳۱/۳۷ سـال بـود: ۴ نفـر از ايـن افراد زن و ۱۲ نفر مرد بودنـد و ميـانگين سـني گـروه مورد داراي سرولوژي مثبت ۱۲/۵۹±۳۱/۷۳ بود: ۴ نفر از اين افراد زن و ۱۱ نفر مرد بودند.

بيماري لپتوسپيروز كه داراي دورة كوتاه باليني بود، تلفات ۵۰ تا۲۰ درصدي را در كلية گله‌هاي منطقة كره‌بند ايجاد كرد، از ۲۰۰ دام زنده‌اي كه پس از فاز اوليه گسترده رخداد لپتوسپيروز مورد آزمايش قرار گرفتند، ۱۹ رأس دام (۹/۵ درصد) داراي PCR مثبت بودند. از بين نمونه‌هاي مثبت ۱۶ مورد گوسفند ماده، ۲ مورد گوسفند نر و يك مورد بز نر بودند.

بحث

در ايـن پـژوهش، مـا موفـق شـديم در ۱۶ دامـدار (۳۲/۶۵ درصد) و ۱۹ دام (۹/۵ درصد) منطقه كـره‌بنـد شهرستان بوشهر، وجـود لپتوسـپيرا را در اپيـدمي تـب خونريزي دهنده دامي پس از رخداد سـيلاب دي مـاه ۱۳۸۲ اثبـات كنـيم. از ايـن رو روش PCR مـا داراي پتانسيل شناسايي لپتوسپيراي پاتوژنيك در نمونـه‌هـاي باليني بـوده و شـرايط را بـراي تشـخيص زودرس و قطعي آن در هنگام عفونت فعال، ميسر مي‌سازد.

پـيش از كـاربرد PCR و تكنيـك‌هـاي مولكـولي، تشخيص لپتوسپيروز عمدتاً بر اسـاس شناسـايي آنتـي بادي‌هـا بـا اسـتفاده از روش اليـزا يـا MAT بـود. در بسياري موارد، بـه ويـژه در فـاز اوليـة عفونـت، نبـود آنتي بادي‌ها در سرم بيماران، موجـب عـدم شناسـايي لپتوسپيروز مـي‌شـود (۱۰)، ايـن در حـالي اسـت كـه بيمـاراني كـه بـا تـابلوي لپتوسـپيروز خـود را نشـان مي‌دهند، با كاربرد روش‌هاي PCR، امكـان شناسـايي زودرس اين بيماري در آنها با بررسي يك نمونه خوني فراهم شده و لذا شانس آغاز درمان طبي آنها در زمـان مناسب وجود دارد. از دهه پيش، روش‌هاي گونـاگوني از PCR در نمونـه‌هـاي خـوني، ادرار، مـايع مغـزي نخاعيCSF، نمونه‌هاي بـاليني و محيطـي بكـار بـرده شده‌اند (۳، ۹ و ۱۴). در يك ارزيابي بـاليني PCR بـا

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

MAT و كشت براي تشخيص لپتوسپيروز، نتايج نشان دادند كه PCR ابزاري مؤثر در تشخيص زودرس اين بيماري در ده روز اول، يعني زماني كه تابلوي باليني بيماري گمراه كننده است مي‌باشد (۸).

همان‌گونه كه اشاره شد، پر كاربردترين ژن‌هاي هدف در روش‌هاي شناسايي وابسته به PCR لپتوسپيروز، ژن‌هاي S ۱۶ يا SrRNA ۲۳ مي‌باشند (۵). اما اين روش‌هاي PCR داراي محدوديت‌هايي هستند. پرايمرهايي كه توسط مرين (Merien) و همكاران توصيف شد قطعه ۳۳۱bp ژن ۱۶SrRNA را در لپتوسپيراهاي پاتوژن و غير پاتوژن تكثير كرده و از اين رو، در مواقعي كه آلودگي با لپتوسپيراهاي غيرپاتوژن باشد توليد نتايج مثبت كاذب مي‌نمايد (۱۵). پرايمرهاي G_1 وG_2 توصيف شده توسط گريوكامپ و همكاران نيز، سرووارياته كيرشنري (L.Kirschneri) را تكثير نكرده و لازم است دو جفت پرايمر براي شناسايي تمام سرووارياته‌هاي پاتوژن به‌كار برده شود (۱۶). در روش PCR (real-time) با كاربرد شيمي تگمن كه براي شناسايي لپتوسپيروز نمونه‌هاي باليني و محيطي طراحي شده بود، مشخص شد كه بسيار حساس بوده و مي‌تواند بين گونه‌هاي پاتوژن و غير پاتوژن افتراق گذارد، هر چند كه مطالعات بيشتر براي تأييد اين موضوع لازم است و چنانچه ثابت شود، مي‌تواند براي تشخيص زودرس اين بيماري بكار برده شود، زيرا اين روش حتي در بيماراني كه آنتي‌بيوتيك را آغاز كرده‌اند كاربرد خواهد داشت (۱۰).

به عنوان روش جايگزين براي۱۶SrRNA جهت شناسايي گونه‌هاي لپتوسپيرا، اخيراً ژن كدكننده زير واحد B دي‌ان‌اي ژيراز، براي شناسايي لپتوسپيرا، با موفقيت مورد آزمايش قرار گرفته است و علاوه بر اين از اين روش براي نمونه‌هاي باليني كه داراي غلظت بالايي از ميكروارگانيسم لپتوسپيرا، هستند مانند بافت كليه مي‌توان استفاده نمود ولي براي تشخيص عفونت انسان در بخش‌هايي كه داراي غلظت پايين از لپتوسپيرا هستند مانند خون قادر به عملكرد نيست (۹). لوت و همكاران نيز براي رفع محدوديت-هاي روش‌هاي وابسته به PCR، از PCR به روش real-time با كاربرد هدف۴۲۳bp روي ژنLipL۳۲ استفاده كرده‌اند كه اين هدف، در سرووارياته‌هاي لپتوسپيراي پاتوژن به خوبي حفظ شده است (۱۷). اين روش DNA لپتوسپيرا را در نمونه‌هاي سرمي و ادراري بيماران تشخيص داده و به عنوان روشي سريع و حساس در تشخيص لپتوسپيروز حاد معرفي شده است.

در يك مطالعة جديد، PCR داراي اختصاصيت و حساسيت ۹۹/۵ و۹۶/۴ درصد بوده است كه اين نتايج نشان مي‌دهد، روش Light cycler Taqman تغيير يافته، مي‌تواند به جاي كشت در تشخيص لپتوسپيراي پاتوژن در شرايط باليني به‌كار برده شود (۱۴). در مطالعه‌اي ديگر كاربرد PCR در كنار آزمون‌هاي سرولوژيك براي بهبود حساسيت تشخيص لپتوسپيروز در فاز اولية بيماري اشاره شده است (۱۸).

هر چند كه در اين مطالعه ما توانستيم DNA لپتوسپيرا را از بيماران و دام‌ها جدا كنيم ولي نتوانستيم نشان دهيم كه آيا روش PCR توصيف شده ما مي‌تواند بين لپتوسپيراهاي پاتوژن و غيرپاتوژن افتراق گذارد. با وجودي كه ما از سرووارياته هاي غير پاتوژن در اين روش استفاده نكرديم ولي داشتن گروه شاهد افراد سالم كه از دامداران مناطق مجاور منطقة دچار اپيدمي شده، به صورت تصادفي انتخاب شده بودند و فاقد PCR مثبت بودند نشانگر آن است كه DNA

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

لپتوسپيراي جدا شده از دامداران منطقه در شرايط اپيدمي، از آن لپتوسپيراي پاتوژن بوده است.

از محدوديت‌هاي ديگر مطالعه ما، همانند روش‌هاي ديگر PCR، آن است كه ما نمي‌توانيم سروواريتة عامل اپيدمي را در اين منطقه مشخص كنيم. هرچند اين موضوع از لحاظ درمان طبي بيماران اهميتي ندارد، ولي شناخت سروواريتة لپتوسپيرا، از ديدگاه اپيدميولوژي و سلامت عمومي، بسيار حائز اهميت است. استراتژي‌هايي براي فائق آمدن بر اين مسئله طراحي شده‌اند كه شامل هضم محصولات PCR توسط آنزيم‌هاي محدودالاثر، تعيين سكانس مستقيم آمپليكان‌ها و روش SSCP[4] مي‌باشند (۵).

امروزه لپتوسپيروز هنوز به صورت خطر عمدة سلامت عمومي در مقياس جهاني خودنمايي مي‌كند. نه تنها لپتوسپيروز داراي تظاهرات باليني غير اختصاصي و بسيار متغير بوده، بلكه تشخيص آن نيز دشوار مي‌باشد، و نياز به شك باليني بسيار بالا در مواقعي كه برخورد با عوامل محيطي بالقوه وجود دارد نيز محسوس مي‌باشد (۳).

عمدة موارد عفونت با لپتوسپيروز يا به صورت تحت حاد يا با شدت بسيار ملايم است و بيماران در اين موارد در جستجوي مداواي طبي بر نمي‌آيند. نسبت كمي از عفونت‌ها، ولي عمدة موارد باليني آن خود را به صورت بيماري تب‌دار با شروع ناگهاني نشان مي دهند. علائم ديگر به صورت تب، سردرد، درد عضلاني، درد شكمي، برافروختگي ملتحمه و در موارد نادرتر به صورت بثورات جلدي است. سردرد بسيار شديد بوده و مانند تب دانگ (Dengue) خود را نشان داده و توأم با درد پشت حدقة چشمي و نور گريزي است. درد عضلاني در ناحية كمر، ران و ساق پاها بوده و اغلب داراي شدت بالايي است (۱۹).

هر چند كه بيماران منطقة تالاب رودحله در پي گسترده رخداد تب خونريزي دهندة دامي، دچار علائم آزمايشگاهي و باليني خونريزي و يرقان نشدند، ولي سه علامت شايع كه در۹۰ درصد كساني كه علائم باليني از خود نشان دادند يافت شد، شامل تب، سردرد، درد عضلاني و كمردرد بود و از اين رو مشابه سري بيماران گزارش شده از گيلان مي باشد (۲۰). بنابراين در منطقه‌اي كه دچار سيلاب شده است، با بروز تب، سردرد و درد عضلاني در ساكنين منطقه، لپتوسپيروز مي‌بايست در صدر تشخيص‌هاي افتراقي قرار گيرد.

در هر صورت، عفونت بدون علائم در لپتوسپيروز شايع بوده و در چندين مطالعه گزارش شده است (۲۱). در يك گسترده رخداد سال ۱۹۹۵ لپتوسپيروز در نيكاراگوا، تنها ۲۵نفر (۲۹/۴ درصد) از ۸۵ نفر ساكن آنجا كه داراي سرولوژي مثبت بودند، يك بيماري تب دار را طي دو ماه قبل از مطالعه گزارش كردند (۲۲). از اين رو به نظر مي‌رسد كه عفونت بدون علامت با لپتوسپيرا در مناطق آندميك شايع است (۲۱). در مطالعه ما نيز تنها ۲۵ درصد از افراد داراي علائم باليني به صورت تب، سردرد و درد عضلاني بودند و ۷۵ درصد مابقي عفونت با لپتوسپيروز، از خود تابلوي باليني بروز ندادند.

ما در اين پژوهش از روش الیزا براي شناسايي IgM استفاده كرديم. حساسيت الیزا براي IgM از ۶۷ درصد تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است و منطقة جغرافيايي ممكن است بر روي عملكرد الیزا تأثير گذار باشد و حساسيت ۷۳/۷ درصد در تايلند تا ۱۰۰ درصد در ايالات متحده آمريكا گزارش شده است (۶). ويژگي الیزا نيز ۹۳ درصد گزارش گرديده است (۲۳ و ۲۴).

[4] Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

همچنين حساسيت اليزا براي لپتوسپيروز بيش از MAT است و حتي موارد عفونت را پيش از MAT تشخيص مي‌دهد (۲۳). در مطالعه ما تنها ۶ نفر از ۱۶ نفر كه داراي PCR مثبت بودند، واجد سطح بالاي IgM به روش اليزا بودند. از اين رو همانند ديگر مطالعات، به نظر مي‌رسد كه PCR در تشخيص لپتوسپيروز در مراحل ابتدايي تشخيص بيماري انساني، داراي ارزش بسيار بالايي است (۸، ۱۴ و ۲۵). در يك مطالعه ديگر، PCR خود را در نمونه‌هاي سرمي كه فاقد آنتي‌بادي‌هاي اختصاصي با بررسي توسط هر روش سرولوژيك بودند، به صورت حساس ترين تست نشان داد (۱۸). از اين رو شايد بتوان PCR را در تركيب با آزمون‌هاي سرولوژيك به‌كار برد و از اين طريق مي‌توان حساسيت تشخيص لپتوسپيروز را در فاز اوليه بيماري افزايش داد (۱۸).

نكته آخر آن كه همان گونه كه اشاره شد، بيماري لپتوسپيروز در دام‌هاي منطقه خود را به صورت بيماري تب خونريزي دهنده به صورت ادرار خونی و تراوش خون و مايعات آماسي از منافذ بدن در جمعيت‌هاي گوسفندي، بز و گاوي نشان داد. اين بيماري كه داراي دورة كوتاه باليني بود، تلفات ۲۰ تا ۵۰ درصدي را در كلية گله‌هاي منطقة كره‌بند ايجاد كرد، از اين رو دام‌هاي زنده پس از فاز اوليه گسترده رخداد لپتوسپيروز كه ۲۰۰ راس بودند نيز مورد بررسي قرار گرفتند، تنها ۱۹ رأس دام داراي PCR مثبت بودند كه اين نشانگر آن است كه بيماري بر عكس نمونه‌هاي انساني خود را به صورت تابلوي خونريزي دهنده-يرقان با مرگ و مير بالا نشان داده است و شيوع ۹/۵ درصدي لپتوسپيروز در دام هاي منطقه در پي گسترده رخداد اپيدمي مؤيد اين مطلب است. نكته باليني ديگر آنكه، در هنگام گسترده رخداد تب خونريزي دهندة باليني در دام، مي‌بايست لپتوسپيروز را در ليست تشخيص‌هاي افتراقي جاي داد (۲۶).

در يك نتيجه‌گيري كلي، مطالعه ما حاكي از وجود يك گسترده رخداد لپتوسپيروزي در دامداران و دام‌هاي منطقة تالاب رودحله كره‌بند در شهرستان بوشهر است، بنابراين روش‌هاي كنترل لپتوسپيروزي شامل اقدامات واكسيناسيون دامي در منطقه توصيه مي‌شود.

تشكر و قدرداني

اين مطالعه با حمايت مالي سازمان انتقال خون بوشهر اجرا گرديد.

References:

1. World Health Organization. Leptospirosis worldwide. Wkly Epidemiol Rec 1999; 76: 109–16.
2. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 2003; 3:757–71.
3. Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic Leptospira. PLoS Med 2006; 3:e308.
4. Vinetz JM. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 2001; 14: 527-38.
5. Levett, PN. Leptospira and Leptonema. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. Editors. In: Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology 2003, 929–36.
6. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 2003;4: 803-9.
7. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol 1995; 43: 110-4.
8. Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J Infect Dis 1995;172: 281-5.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]

9. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic Leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. BMC Microbiol 2006;6:95.
10. Romero EC, Yasuda PH. Molecular characterization of Leptospira sp. strains isolated from human subjects in Sao Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 373-8.
11. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic Leptospira spp. BMC Infect Dis 2002;2: 13.
12. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, et al. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 1994;32: 1894-8.
13. Glenn T, Bavis R, Bollback J.DNA Extraction Protocols Using Silica.Laboratory of Molecular Systematics.MRC 534, MSC. Smithsonian Institution. Washington, DC. 20560. (Accessed October 10, 2007, at http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/TSilicaDNA.rtf.)
14.Slack Slack A, Symonds M, Dohnt M, et al. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic Leptospira spp. against culture and Leptospira-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;57: 361-6.
15. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples. J Clin Microbiol 1992;30: 2219-24.
16. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J Gen Microbiol 1993;139: 1691-700.
17. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J Clin Microbiol 2005;54: 45-9.
18. de Abreu Fonseca C, Teixeira de Freitas VL, Calo Romero E, et al. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. Trop Med Int Health 2006;11: 1699-707.
19. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001;14: 296-326.
20. Mansour-Ghanaei F, Sarshad A, Fallah MS, et al. Leptospirosis in Guilan, a northern province of Iran: assessment of the clinical presentation of 74 cases. Med Sci Monit 2005;11: CR219-23.
21. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 2003; 3:757-71.
22. Ashford DA, Kaiser RM, Spiegel RA, et al. Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. Am J Trop Med Hyg 2000;63: 249-54.
23. Silva MV, Camargo ED, Batista L, et al. Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. Am J Trop Med Hyg 1995; 98:268-72.
24. Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, et al. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. J Clin Microbiol 1997;35: 1938-42.
25. Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. J Microbiol Methods 2006; 65: 247-57.
26. Glyn Davies F, Martin V. Recognizing rift valley fever. FAO animal health Manual. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Rome, 2003. (Accessed October 10, 2007, at http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4611E/Y4611E00.HTM .)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-07]