شناسایی و تایپینگ مولکولی لپتوسپراهای بومی ناحیه مرکزی منطقه جلگه ای استان گیلان با روش آنالیز الگوی باندی ژنوم برش داده شده

حمید رضا هنرمند[1*]، مریم فتح الهی[2]، مهدی آسمار[3]، فریبرز منصور قناعی[1]

1) گروه باکتری شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارشی و کبد ، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

2)گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان

3) گروه انگل شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان

تاریخ دریافت: 87/2/15 تاریخ پذیرش:88/4/1

چکیده

مقدمه: لپتوسپیروز نوعی بیماری مشترک بین انسان و حیوان، شایع در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری بوده و در استان گیلان آندمیک است. باکتری های ترشح شده از حیوانات حامل، در آب و خاک مرطوب در pH و دمای مناسب می توانند به مدت طولانی در کنار لپتوسپیراهای غیر بیماری زا زنده بمانند. معمولا در هر منطقه آندمیک، تعداد اندکی از سروارها شایع هستند و شناسایی آن ها به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی کمک می کند. این مطالعه به منظور جداسازی لپتوسپیراها از آب شالیزارها، کانال و رودخانه های منطقه به منظور شناسایی سروارهای شایع انجام شده است.

مواد و روش ها: نمونه برداری از آب های سطحی شهرستان های منطقه در فاصله زمانی خرداد تا پایان شهریور سال 1385 صورت گرفت. هر نمونه به طور جداگانه در محیط مایع EMJH کشت داده شد. DNA کشت های مثبت با روش استاندارد استخراج گردید. سپس REA با استفاده از آنزیم EcoRI انجام شد و پس از انجام الکتروفورز و رنگ آمیزی، تصویر الگوهای باندهای حاصل، با الگوهای مربوط به سروارهای استاندارد تطبیق داده شد.

یافته های پژوهش: در مجموع تعداد 301 نمونه مورد بررسی قرار گرفت. تعداد 168 نمونه مثبت شدند ولی در پاساژهای بعدی تنها 33 نمونه به رشد پویا و پر جمعیت رسیدند که با REA بررسی شدند. هویت گونه ای و زیر گونه ای 27 ایزوله ها مشخص گردید که به ترتیب شامل گونه های ساپروفیت بی فلکسا و ولباشیا شامل سروگروپ های: آنداماناً، پاتوک و سمارانگا بودند. همچنین گونه های بیماری زا شامل اینتروگانس، کیرشنری و بورگ پترسنی بودند که سروگروپ های: ایکتروهموراژی، پومونا،بالوم، هارجو، کانیکولا و گریپو تیفوزا را شامل می شدند.

بحث و نتیجه گیری: در این مطالعه حضور گونه های بیماری زا 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 بیماری زا در رودخانه و کانال بیشتر بود.

واژه های کلیدی: لپتوسپیرا، تایپینگ مولکولی، سروگروپ

***نویسنده مسئول:** گروه باکتری شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارشی و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

E-mail: honarmand_٣٦@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-09]

مقدمه

لپتوسپیروز یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان شایع در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که توسط گونه های بیماری زای لپتوسپیراها به وجود می آید. این باکتری ها طیف میزبانی وسیعی دارند. تعداد زیادی از پستانداران اهلی و وحشی و نیز جوندگان، میزبان طبیعی انواع بیماری زا هستد و اغلب آن ها پس از ابتلا به بیماری، به مدت طولانی و معمولا تا پایان عمر، حامل باقی می مانند و به صورت دوره ای باکتری را از ادرار خود ترشح می کنند. باکتری های دفع شده از حیوانات حامل، اگر در آب و یا خاک مرطوب ریخته شوند در pH و دمای مناسب می توانند به مدت طولانی زنده بمانند و در همین دوره می توانند از طریق زخم های جلدی به بدن میزبان دیگر(حیوان یا انسان) وارد شده و بیماری به وجود آورند،(3-1). آب های سطحی از قبیل: رودخانه، نهر، مرداب، و دریاچه های آب شیرین، مخزن لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند،(3). استان گیلان به دلیل شرایط جغرافیایی خاص خود از جمله دارا بودن آب و هوای معتدل و مرطوب، رواج کشت برنج که همواره به رطوبت بالای خاک نیاز دارد و متداول بودن نگهداری سنتی حیوانات اهلی به ویژه گاو، شرایط مناسبی برای بروز این بیماری دارد. لپتوسپیروز در اغلب روستاهای ناحیه جلگه ای استان گیلان شیوع دارد و همه ساله موارد بسیار زیاد بیماری از اواسط بهار تا اواخر تابستان به ویژه در شالی کاران بروز می کند و اغلب مبتلایان، سابقه کار در مزرعه برنج و یا تماس با آب های سطحی راکد را ذکر می کنند،(4-7). لپتوسپیراهای بیماری زا به 7 گونه و 23 سروگروپ که شامل حدود 250 سروار و انواع ساپروفیت به 3 گونه و 14 سروگروپ، دسته بندی شده اند،(3-1). معمولا در هر منطقه آندمیک، تعداد اندکی از سروارهای بیماری زا شایع هستند و شناسایی آن ها به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی بیماری کمک می کند و شناسایی مخازن بیماری نیز گام بزرگی در کنترل کردن آن است،(3). این مطالعه به منظور جداسازی لپتوسپیراها از آب شالیزارها در فصل شیوع بیماری و نیز از برخی مخازن آبیاری شالیزارها(از جمله کانال و رودخانه) و شناسایی آن ها با یک روش قابل اطمینان با هدف شناسایی سروارهای شایع منطقه انجام شده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری از آب های سطحی(رودخانه، شالیزار، کانال آبیاری) ناحیه مرکزی منطقه جلگه ای استان گیلان شامل شهرستان های: لشت نشا، خشکبیجار، رشت، انزلی، فومن، صومعه سرا، شفت و سنگر در فاصله زمانی خرداد تا پایان شهریور سال 1385 انجام شد. مقدار 1 ml از آب هر نمونه پس از فیلتراسیون با فیلترسرنگی 22 نانومتر به لوله فالکون 15l حاوی محیط کشت مایع EMJH که به آن آنتی بیوتیک 5-فلوروآروسیل به نسبت ٤٠٠ µg/ml برای ممانعت از رشد سایر باکتری ها افزوده شده بود، وارد شده و در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت 12 هفته در انکوباتور قرار داده می شد و هر 2 هفته یک بار با میکروسکوپ زمینه تاریک مورد مشاهده قرار می گرفت. سپس موارد منفی حذف شده و موارد مثبت به ارلن 250 ml حاوی EMJH فاقد آنتی بیوتیک 5-فلوروآروسیل انتقال داده شده و در دمای 30 درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور انتقال قرار داده می شد تا به رشد پویا و به جمعیت مطلوب برسد. سپس با انجام تست رشد و عدم رشد در حضور 8- آزاگوانین لپتوسپیراهای بیماری زا با انواع ساپروفیت تفکیک داده می شد وجود این ماده به مقدار 225g/ml در محیط کشت رشد انواع بیماری زا را متوقف می کند،(9-8). برای انجام استخراج DNA باید جمعیت میکروبی محیط کشت حداقل 108 ml برسد. یک OD برابر 0/6 در طول موج 550 نانومتر حاکی از جمعیت مطلوب باکتریایی است،(9-8). استخراج DNA را با روش فنل-کلروفرم انجام می گردید،(10). پس از سنجش کیفیت DNA باروش اسپکترو فتومتری، با در نظر گرفتن غلظت DNA، مقداری معادل 3µg از DNA برای انجام REA اختصاص داده می شد. پس از رقیق کردن آن با آب مقطر دیونیزه و رساندن حجم آن به 18 µl، مقدار 2 µl با فر مخصوص REA و مقدار 1 µl از آنزیم EcoRI را به آن افزوده و خوب مخلوط نموده و در دمای 37

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-09]

درجه سلسیوس به مدت 3 ساعت انکوبه نموده و با افزودن مقدار 5 µl از لودینگ بافر آبی رنگ به آن، عملیات الکتروفورز در آگارز 3 درصد با ولتاژ 70 ولت به مدت 16 ساعت(4 مرحله 4 ساعته برای اجتناب از بالا رفتن دما) انجام می شد و در پایان پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، توسط ژل داک، از تصویر باندها عکسبرداری شده و آنالیز انجام می گردید. در این مطالعه از سایز مارکر kbp 15- 1ساخت شرکت فرمنتاز خریداری شده از سینا ژن استفاده شد.

یافته های پژوهش

از مجموع تعداد 301 نمونه، 190 نمونه از آب و خاک شالیزارها، 44 نمونه از رودخانه و 67 نمونه از آب کانال ظرف 4 ماه جمع آوری گردید. دامنه دمای نمونه آب ها 39-26 (با میانگین 27/7 درجه سانتی گراد) و دامنه pH نمونه ها 8 – 6/5 (با میانگین 7/43) بوده است. در بررسی اولیه در مجموع تعداد 168 نمونه مثبت و 133 نمونه منفی شدند(به ترتیب 55/8 و 44/2 درصد) ولی در پاساژهای بعدی تعداد زیادی از موارد مثبت به رشد مطلوب نرسیدند و تنها 33 نمونه به رشد پویا و پر جمعیت رسیدند(11 درصد از کل نمونه ها) که برای انجام REA مناسب بودند(جدول 1).

جدول 1. تعداد و درصد موارد مثبت براساس شهرستان و منابع نمونه برداری

منابع / فراوانی / شهرستان	رودخانه			کانال			شالیزار		
	تعداد نمونه	موارد مثبت		تعدادنمونه	موارد مثبت		تعداد نمونه	موارد مثبت	
		تعداد	درصد		تعداد	درصد		تعداد	درصد
انزلی	6	4	66/6%	12	7	58/3%	21	9	42/8%
رشت	4	3	75%	2	2	100%	24	16	66/7%
صومعه سرا	4	1	6/7%	5	1	20%	25	10	40%
فومن	5	3	60%	7	2	28/6%	28	3	10/7%
شفت	2	1	50%	7	2	27/4%	29	10	3/4%
سنگر	10	8	80%	10	9	90%	20	12	60%
خشکبیجار	9	5	55/5%	12	8	66/7%	19	11	57/9%
لشت نشا	4	0	0	12	4	33/3%	24	5	20/8%
جمع	44	25	56/8%	67	35	52/2%	190	76	40%

از نمونه های مزبور 17 نمونه ساپروفیت و 10 نمونه بیماری زا بودند(جدول 2).

جدول 2. جدول هویت گونه ها و زیر گونه های ایزوله ها بر اساس الگوی باندی REA آن ها در مقایسه با الگوی باندی موارد استاندارد

گونه	فراوانی و منشا / زیر گونه	سروگروپ	تعداد	منبع
بیماری زا	اینتروگانس	ایکتروهموراژی	۳	شالیزار
		پومونا	۲	شالیزار
		کانیکولا	۱	شالیزار
	بورگ پترسنی	بالوم	۱	شالیزار
		هارجوبوویس	۱	شالیزار
	کیرشنری	گریپوتیفوزا	۲	شالیزار
غیر بیماری زا	بی فلکسا	آندامانا	٦	کانال(1) شالیزار(5)
		پاتوک	۱۰	کانال(2) شالیزار(7)رودخانه(1)
	ولباشیا	سمارانگا	۲	کانال(1) شالیزار(1)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-09]

پس از انجام REA و با تطبیق دادن الگوهای باندهای حاصله از انواع بیماری زا و ساپروفیت،(تصاویر 1و2). با الگوهای مربوط به سروارهای استاندارد بیماری زا و ساپروفیت(با رجوع به database اخذ شده از آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیروز انستیتو پاستور فرانسه، پاریس)، هویت گونه ای و زیر گونه ای 27 ایزوله ها مشخص گردید،(جدول 2). و تعداد شش ایزوله، الگوی نا مشخص و غیر قابل تفسیر داشتند که منظور نشدند.

بحث و نتیجه گیری

متعدد بودن گونه ها و زیر گونه ها در جنس لپتوسپیرا، لزوم دسته بندی و متمایز نمودن آن ها را بیشتر نموده است. سروتایپینگ با روش MAT هنوز در آزمایشگاه های مرجع لپتوسپیروز رایج است ولی انجام این روش پر هزینه، وقت گیر و بسیار دشوار است زیرا برای دستیابی به نتیجه کاملا درست باید سویه مورد نظر را با لااقل 200 آنتی سرم ضد سروارهای استاندارد مواجه نمود،(8،3). ضمنا خواندن نتایج نیز دشوار بوده و به تخصص و تجربه زیاد نیاز دارد،(3). بنابراین دستیابی به یک روش ساده تر و مطمئن لازم به نظر می رسد. این مطالعه نیز به همین منظور انجام شد. در سال های اخیر تایپینگ مولکولی میکروارگانیزم ها متداول شده و روش های متعدی، ابداع و آزموده شده اند. تعدادی از این روش ها برای تایپینگ لپتوسپیراها نیز به کار گرفته شدند و نتایج متفاوتی نشان دادند،(1). Herrmann(1992)روش PFGE را برای تمایز درون گونه ای و تعیین هویت سروارها مفید ارزیابی نمود،(11). Hookey (1993) روش ریبوتایپینگ با استفاده از تکنیک RFLP_PCR را آزمود و آن را روش سودمندی برای دسته بندی و مطالعات اپیدمیولوژی ارزیابی نمود،(12). Perolat (1994) سه روش Ribotyping , AP_PCR و MRSP را برای تعیین هویت ایزوله های متعلق به سروارهارجو به کار برده و مقایسه نمودند و آن ها را روش موثری برای مطالعه ساختار های یک جمعیت داخل گونه ای ارزیابی نمودند،(13). Tony و همکاران(1997) و همچنین Savio و همکاران(1994) 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 لپتوسپیرا اینتروگانس اعلام نمودند،(14-15). Corney (1997) RAPD را روش مفیدی برای تجزیه و تحلیل تاکسونومیکی و یافتن ارتباط بین سروارها بیان نمود،(16). روش های 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 به کار برده شده است. قدرت تمایز در این روش به وجود مکان های برش آنزیم های برش دهنده، موجود بر روی مولکول DNA و پلاسمید و نیز به تعداد پلاسمیدهای میکروارگانیزم وابسته است و به طور عمده برای باکتری هایی مناسب است که پلاسمید ندارند یا به تعداد کم دارند از جمله لپتوسپیراها، زیرا وجود پلاسمید الگوی باندها را مغشوش می کند. در واقع دقت روش REA در تفکیک گونه ها و زیر گونه ها به نوع و تعداد آنزیم های برش دهنده ای که به کار برده می شوند بستگی دارد. اگر از یک آنزیم استفاده شود تعداد باندهای حاصله کمتر بوده و تفسیر آن ها آسان تر خواهد بود، ولی الگوی باند ها برای سروارهای هم خانواده شباهت نزدیک تری داشته و تفکیک آن ها را مشکل تر می کند. در صورت استفاده از چند آنزیم برش دهنده، قدرت تمایز افزایش می یابد ولی تعداد باندها زیادتر شده و تفسیر آن ها مشکل تر می گردد، ضمنا تعداد زیادی باندهای کوچک به وجود می آیند که به صورت اسمیر نمایان می شوند،(3،1). Ellis (1998) تعداد 253 سویه متعلق به سروارهارجو از گونه اینتروگانس و 190 ایزوله جدا شده از گاو را با روش REA مورد مطالعه قرار داد و توانست الگوی باندی متفاوت برای تیپ های هارجو بویس و هاجو راجیتنو را تشخیص دهد،(17). همان محقق در یک مطالعه دیگر، همان روش را با استفاده از 20 آنزیم برای 162 سویه جدا شده از خوک و تعداد زیادی سویه استرالیایی متعلق به سروگروپ های گونه اینتروگانس بررسی نمود و باز هم تفاوت الگوی باندها را در سطح زیر گونه مشاهده نمود،(18). Wu (1993) روش REA را با استفاده از 7 آنزیم برش دهنده برای

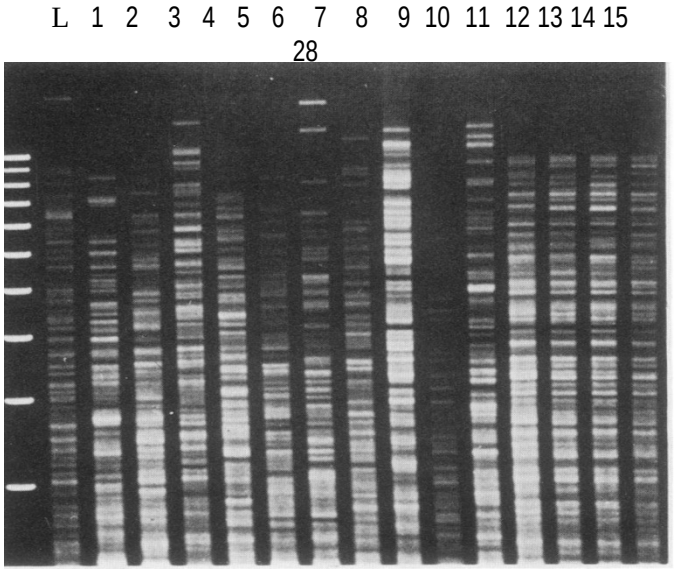
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-09]

سروارهای مختلف به کار 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 کاملا نمایان است،(19). Tamai(1988) روش REA را با استفاده از 15 آنزیم برش دهنده با موفقیت برای برای تفکیک سروارهای ایکترو هموارای و کپنهاگنی به کار برد،(20). Robinson(1992) همین روش را با استفاده از 2 آنزیم برش دهنده برای برای تفکیک سروارهای سروگروپ پومونا به کار برد،(21). در مطالعه مشابهی، Zhu (1993) برای ایزوله های سروگروپ پومونا جدا شده از کلیه خوک در منطقه ویکتوریا این روش را با موفقیت به کار برد،(22). و مطالعه ای توسط Djordjevic برای ایزوله های جدا شده از گاوهای مبتلا به آگالاکتیه و سقط جنین مکرر صورت گرفت.(23)

در این مطالعه روش REA با استفاده از یک آنزیم(آنزیمEcoRI ساخت شرکت فرمنتاز و خریداری شده از شرکت ایرانی سینا ژن) برای تعیین هـــویت سویه های جدا شده از آب های سطحی استفاده شد. با توجه به نتـــایج حاصله و فهـــرست گونه ها و زیـــر گونه های شناسایی شده، وجود انواع بیماری زا و غیر بیماری زا در آب های سطحی منطقه مسجل شده است. با توجه به این نکته که مخزن گـــونه های غیر بیمـــاری زا همان آب های سطحی است، وجود آن ها دور از انتظار نبوده و حضور آن ها در شالیزار ها نیز که به طور عمده با همان آب های سطحی به ویژه از رودخانه ها، جویبارها، و کانال های آب رسانی آبیاری می شوند که غالبا مخزن لپتوسپیراهای ساپروفیت هستند، قابل انتظار و طبیعی می باشد. نتایج این مطالعه نشان داده است که دو گونه از لپتوسپیراهای ساپروفیت که عبارتند از گونه بی فلکسا و گونه ولباشیا حضور زیاد تری 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 سروگروپ ها علاوه بر آب های سطحی در شالیزارها نیز یافت شدند.

یافته مهم دیگر این مطالعه، حضور انواع بیماری زا است که به طور عمده از شالیزار ها جدا شدند. در این مطالعه گونه های: اینتروگانس، بورگ پترسنی، کیرشنری شناسایی شدند. در گونه اینترگانس که مهم ترین و بزرگ ترین گونه بیماری زا در جنس لپتوسپیرا است و خود تعداد زیادی سرو گروپ و بیش از 200 سرووار دارد، سرو گروپ های ایکتروهموراژی، پومونا و کانیکولا شناسایی شدند. در گونه بورگ پترسنی سرو گروپ بالوم و هاجو بوویس و در گونه کیرشنری سروگروپ گریپو تیفوزا شناسایی گردیدند. وفور جوندگان و برخی از حیوانات وحشی بویژه شغال که در مجاورت سکونت گاه های انسان به ویژه در مناطق روستایی به سر می برند و به راحتی در شالیزار ها 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، توجیه کننـــده حضور گونه و زیر گونه های بیماری زا در شالیزار ها است. اغلب روستاییان به طور سنتی در منزل خود گاو نـــگه داری می کنند و از اسب برای برخی از فعالیت های کشاورزی و نیز برای حمل و نقل استفاده نموده و برای حفاظت خانه نیز سگ نگه داری می کنند. به طور معمول سگ مخزن سروگروپ کانیکولا، اسب مخـــزن سروگروپ پومونا، موش مخزن ســـروگروپ ایکترو همـــــوراژی، گاو مخزن سروگروپ های گریپوتیفوزا و هارجو، و گـــــراز مخزن ســـروگروپ پومونا و بـــــالوم است،(3). اغلـــب گـــونه ها و زیر گونه های بیماری زا از شالیـــزار ها جدا شدند و تنها یک مورد کـــــانیکولا از کانال جدا شد که احتمال آلوده شدن آن با ادرار حیوان حامل وجود دارد.

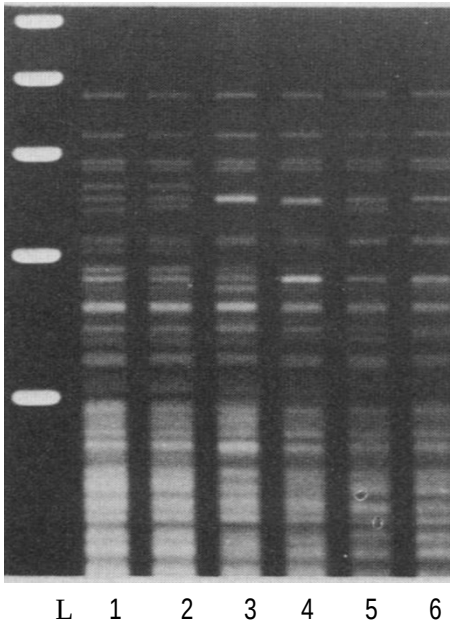
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-09]



تصویر شماره 1. الگوی باندی REA مربوط به تعداد 15 ایزوله

L : سایز مارکر kbp 15-1 . در این تصویر kbp 12-3 موجودند و لادرهای 1 و 2 کیلو بازی به دلیل طولانی بودن زمان الکتروفورز از ژل خارج شده اند

ردیف 1 : سروگروپ هارجوبوویس ردیف 2 : سروگروپ بالوم ردیف 3 : سروگروپ کانیکولا
ردیف 4 : سروگروپ گریپوتیفوزا ردیف 5 : سروگروپ آندامانا ردیف 6 : سروگروپ سمارانگا
ردیف 7 : سروگروپ پومونا ردیف 8 : سروگروپ پومونا ردیف 9 : سروگروپ گریپوتیفوزا
ردیف 10: الگوی نامشخص ردیف 11: سروگروپ ایکتروهموراژی ردیف 12-15 : سروگروپ پاتوک



تصویر شماره 2 . تصاویر واضح تر و متمرکز شده تراز 4 الگوی باندیREA مربوط به تعداد 6 ایزوله .

L : سایز مارکر kbp 15-1 . در این تصویر kbp 12 در بالا و kbp 7 در پایین. بقیه لادر ها به دلیل متمرکز کردن تصویر ژل در اینجا دیده نمی شوند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-09]

ردیف 1 و2 و 3: الگوی باندی REA مربوط به سروگروپ پاتوک
ردیف 4 و5 و 6 : الگوی باندی REA مربوط به سروگروپ آندامانا

References

١-Levett P N.leptospirosis. Clin Micro Rev ٢٠٠١; ٤: ٢٩٦-٣٢٦.

٢-Plank R, Deborah D. Overiew of epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. Microbes and Infections ٢٠٠٠ ; ٢: ١٢٦٥-٧.

٣-Fains. Guidance for the diagnosis, surveillance and control of human Lepeospirosis. WHO offset publication; Geneva ٢٠٠٣:١٧-٢٠.

٤-Mansour ghanaei F, Honarmand H. [Leptospirosis and its prevalence in Guilan]. Ilia Publications ٢٠٠٥:٨٩-٩٩.(Persian)

٥-Honarmand H, Mansour ghanaei F, Eshraghi S, Khoramizadeh MR. [Assessment of Leptospirosis prevalence in Guilan province in ٢٠٠٤]. J of Gorgan Med University٢٠٠٦: ٨-١٥.(Persian)

٦-Tahbaz A, Sarshad A, Yousefivand J, Safavi S , Dabaghian K . [Preliminary study of leptospirosis in Guilan]. Journal of Infectious and Tropical Diseases of Iran ١٩٩٥; ١١٣:١٠٩-١٠. (Persian)

٧- Rezaei AR, Delkhosh J. [Statistical report about Leptospirosis In Guilan from ١٩٩٦ to ١٩٩٨]. Abstract book of lepeospirosis conference, Rasht, Iran; ١٩٩٨: ٣٠-٥.

٨-Hartskeel RA, Smits H.L, Korver h, Goris MGA, Terpstra WJ. Instruction booklet of International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. KIT Royal Tropical Institute Publication ٢٠٠٤: ٣٨-٤٢.

٩-Turner LH. Leptospirosis III: maintenance, isolation and demonstration of *lepeospires* . Trans R Soc Trop Med Hyg ١٩٧٠; ٦٤: ٦٢٣-٤٦.

١٠- Veloso IF, Lopes MTP, Salas CE, Moriera EC . A Comparison of three DNA extracive procedures with *lepeospires* for PCR analysis. Mem Inst Oswaldo ruz , Rio de Janeiro ٢٠٠٠ ; ٩٥(٣): ٣٣٩-٤٣.

١١-Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Girons IS. Pulsed-Field Gel electrophrosis of *Not* I digests of isolates of Leptospira interogans DNA: a new rapid method of serovar identification. J Clin Microbiol ١٩٩٢ ;٣٠ :١٦٩٦-٧٠٢.

١٢-Hookey JV. Characterization of leptospira by ١٦ DNA restriction length polymorphism. J Gen Micribiol ١٩٩٣;١٣٩: ١٦٨١-٩.

١٣-Perolat P, Merien F, Ellis WA, Baranton G . Charactrization of leptospira from serovar Hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphism. J Clin Microbiol ١٩٩٤;١٩٤٩-٥٧.

١٤-Tony H, Woo S, Patel BKC et al. Comparison of two PCR methods for rapid identification of Leptospira genospecies interrogans. FEMS Micribiology Letters ١٩٩٧ : ١٦٩-٧٧.

١٥-Avio ML, Rossi C, Fusi P, Taqlibue S, Paccicarini ML . Detection and identification of leptospira interogans serovars by PCR coupled with restriction endonuclease of amplified DNA. J Clin Microbiol ١٩٩٤ ;٣٢(٤):٩٣٥-٤١.

١٦-Corney BG, Colley J,Graham GC . Simplified analysis of pathogenic leptospiral servers by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. J Med Microbiol ١٩٩٧; ٤٦:٩٢٧-٣٢.

١٧-Ellis WA, Thiermann AB, Montgomery J et al . Restriction endonuclease analysis of leptospira interogans serovar hardjo isolates from cattle. Res Vet Sci ١٩٩٨; ٤٤(٣):٣٧٥-٩.

١٨-Ellis WA , Montgomery JM, Thiermann AB. Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belong to the Australia sero-group of

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-09]

leptospira interrogans. J Clin Microbiol ۱۹۹۱; ۲۹(٥): ۹٥۷-٦۱.

۱۹-Wu W, Dai B. Restriction endonuclease analysis of leptospira DNA from different serogroup and serovar. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao ۱۹۹۳ ;۲٤(۳):۲٥۸-٦۱.

۲۰-Tamai T, Sada E, Kobayashi Y. Restriction endonuclease analysis of leptospira introgans serovar icterohaemorrhagiae and copenhageni. Microbiol Immunol ۱۹۸۸; ۳۲(۹):۸۸۷-۹٤.

۲۱-Robinson AJ, Ramadass P, Lee A, Marshal AB. Differentiation of subtypes within leptospira interogans serovars Hardjo, Balanica and Tarassovi, by bacterial restriction endonuclease DNA analysis. J Med Microbiol ۱۹۸۲; ۱٥(۳):۳۳۱-۸.

۲۲-Zhu S, Chappel R, Amon L. Restriction endonuclease analysis of leptospira of Pomona serogroup of leptospira interogans. Wei Sheng Wu Xue Bao ۱۹۹۳; ۳۳(٥):۳۷٤-۷.

۲۳-Djordjevic S, Hornitzky M, Ross AD, Whittington RJ. Restriction endonuclease analysis of leptospira introgans serovar hardjo from cattle with agalacia and abortion. Aus Vet J ۱۹۹۳; ۷۰(۳):۹۸-۱۰۰.

Molecular Typing of Endemic Isolates of Leptospires in Guilanm, Iran, by Restriction Endonuclease Analysis(REA)

Honarmand H[1], Fatalahi M[2], Asmar M[3], Mansour–Ghanaei F[1]*

(Received: 4 May, 2008 Accepted: 22 Jun, 2009)

Abstract

Introduction: Leptospirisis is an important zoonosis disease with the most widespread prevalence in tropical and semitropical regions. It is also very common in flat areas of Guilan province (northern Iran). Pathogenic leptospires excreted from carrier animals can survive in surface waters and humid soil along with nonpathogenic serovars for a long time.A limited number of serovars are usually common in any endemic region and whose characterization is helpful in revealing epidemiological features of the disease and detecting the source(s). This study has been planed to isolate and identify the common leptospira strains from surface waters of central regions of the flat areas of Guilan province.

Matrial&Methods: Sampling from surface waters of the area was done from May to late September 2006. Each sample was inocculated in EMJH medium. DNA extraction was performed for all the positive cultures by the standard method and REA was done for DNA of each strain using EcoRI. Each band profile was compared and analysed by band profile of standard strains.

Findings: 168 samples of all the 301ones were positive in the first round of culturing, but only 33 samples showed high rate bacterial numbers in the following culturing stage, so were in good position to perform ERA. Band profiles of only 27 isolates were comparable and similar to some pathogenic (Interrogans, Kirchnery, and Borgpetersenii), and saprophytic (Biflexa, and Wolbachia) species belong to pathogenic serogroups: Icterohaemorrahgia, Pomona, Ballum, Hardjo, kanicola, and grippotyphosa, and finally nonpathogenic serogroups: Andamana,Patoc, and semaranga.

Discussion&Conclussion: Our study showed that pathogenic serovars are more common in rice paddies, because of the long time stop of water and high trafficking rate of domestic and wild animals and rodents. Saprophytic serovars were more common in rivers and irrigation canals.

Key words: leptospire, molecular typing, sero-group

1. *Dept of Bacteriology, Gastrointestinal and Liver Research Center, Guilan University of Medical Sciences,Guilan, Iran*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-09]

2. *Dept of Microbiology, Islamic Azad University Lahijan,Guilan, Iran*

3. *Dept of Parasitology, Islamic Azad University Lahijan,Guilan, Iran*

** (Corresponding auther)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-09]