Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 16, Issue 4, 2025 p: 64-73

OPEN ACCESS

Research Paper

Serological and Etiological Investigation for Diagnosing Bovine Leptospirosis in Markazi Province

Ladan Tahouri[1], Meysam Moravedji[2], Gholamreza Abdollahpour[3], and Javad Sadeghi Alavije[4]

1- Department of Clinical Sciences, Sa.C., Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
2- Department of Clinical Sciences, Sa.C., Islamic Azad University, Sanandaj, Iran,
(Corresponding aouthor: meysam.moravedji@iau.ac.ir)
3- Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4- Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 09 April, 2025 Revised: 12 July, 2025 Accepted: 27 August, 2025

Extended Abstract

Background: Leptospirosis, caused by serovars of the bacterium *Leptospira interrogans*, is one of the most dangerous zoonotic diseases. It produces a wide range of sub-acute to acute clinical signs and can lead to infertility, abortion, reduced production, and significant economic losses to Iran's livestock industry. Leptospirosis diagnosis is of particular importance due to its potential risks to human communities, as the disease is easily transmitted by hosts such as rats and dogs, which are often found in significant numbers in livestock environments. However, since this disease can cause highly misleading symptoms in animals, such as mucosal jaundice, swollen lymph nodes, uveitis, hematuria, mastitis, a sharp drop in milk production and discoloration, abortion, birth of weak calves, weight loss, and fertility disorders, it increases the likelihood of diagnostic errors by veterinarians, thereby affecting the health status of human communities. Various laboratory methods can be used to diagnose the disease, including direct microscopic observation, culture, PCR, the Microscopic Agglutination Test (MAT), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and Immunofluorescence Assay (IFA). This research aimed to study and compare three methods—serology, culture, and PCR—for diagnosing bovine leptospirosis.

Methods: In this study, blood and urine samples were collected from 400 heads of cattle with a history of at least one symptom of leptospirosis. Blood was drawn from the jugular vein under hygienic conditions. Serum samples were used for serological testing (MAT). Serum was separated from clotted blood tubes by placing them in a 37 °C water bath for 20 min, followed by centrifugation at 3000 × g for 10 min. To preserve the separated sera until the start of the MAT test, they were transferred using a sampler to sterile 2-mL microtubes and stored at -20 °C. The standard MAT procedure was as follows. The antigen used in this method (*Leptospira interrogans*) was cultured in a liquid medium for 7-10 days. The concentration of leptospires used was evaluated by counting in a chamber, and the volume was adjusted to contain 2 × 10^8 leptospires per milliliter. Urine samples were used for urine culture and PCR testing. Primers specific to *L. interrogans* were evaluated for the PCR assay. PCR reactions were set up in 25 µL volumes using a ready-made master mix (BIOFACT Company, Korea; composition: ddH2O: 5.50 µL, Buffer: 12.50 µL, Forward primer: 1.00 µL, Reverse primer: 1.00 µL, DNA: 5.00 µL). The required urine volume was 50 mL, collected in bottles containing 0.5 mL of filtered formaldehyde (0.45 µm). For bacterial culture and isolation, 5 µL of the collected urine was inoculated into a specific bacterial culture medium (semi-solid EMJH medium). Culture media were incubated at 30 °C for at least 5 weeks and examined every week for leptospiral growth using Dark-Field Microscopy (DFM). Data were analyzed using the Chi-square test and Fisher's exact test with SPSS statistical software version 23.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA, 2007). Significant differences between means were considered at a significance level of $P < 0.05$.

Results: The MAT test was positive in five heads of cattle (1.2%). The most common serovars were *Icterohaemorrhagiae* (2 head = 40%), *Grippotyphosa* (2 head = 40%), and *Canicola* (1 head = 20%). All five samples that tested positive by MAT, plus all cattle showing clinical signs of leptospirosis, were candidates for PCR testing, four heads of which (1%) yielded a positive result. Urine cultures were prepared for all suspected cattle with positive MAT, PCR, and clinical signs. Despite the contamination of two culture media with environmental bacteria, none of the other media showed contamination, and no growth of *Leptospira* was observed

Copyright ©2025. Tahouri et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 Unported License, which allows users to read, copy, distribute, and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

(0%). Since animals in the early stages of the disease, whose immune systems have not yet completely cleared the bacteria from the blood, may not have allowed sufficient time for bacterial colonization in the kidneys; this could lead to negative urine samples. Additionally, *Leptospira* bacteria are sensitive to many antibiotics (treatment is doxycycline and azithromycin); therefore, these antibiotics may be used in cases where the animal has another disease, resulting in bacterial elimination and negative cultures.

Conclusion: The results of this study indicated that the prevalence of *Leptospira* infection in cattle in Markazi Province was much lower than in other studies, which is why an accurate comparison of the three methods was not feasible. An interesting point in this study was the lack of overlap between positive tests in the MAT and PCR methods, suggesting that more studies are needed for a more precise comparison of these two methods. Based on the results of this research, the urine culture method is not recommended due to its lengthy process and the specific conditions required for bacterial colonization.

Keyword: Serology, MAT, PCR, Leptospirosis, Cow, Markazi province

How to Cite This Article: Tahouri, L., Moravedji, M., Abdollahpour, G., & Sadeghi Alavije, J. (2025). Serological and Etiological Investigation for Diagnosing Bovine Leptospirosis in Markazi Province. *Res Anim Prod,* 16(4), 64-73. DOI: 10.61882/rap.2025.1540

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

بررسی سرولوژیک و اتیولوژیک تشخیص لپتوسپیروز در گاوهای استان مرکزی

لادن طهوری[۱]، میثم مروجی[۲]، غلامرضا عبداله پور[۳] و جواد صادقی علویجه[۴]

۱- گروه علوم درمانگاهی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
۲- گروه علوم درمانگاهی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران، (ایمیل نویسنده مسوول: meysam.moravedji@iau.ac.ir)
۳- گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴- گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۰ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۰۵
صفحه ۶۴ تا ۷۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: بیماری لپتوسپیروز که توسط سروتیپ‌های باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس ایجاد می‌شود، یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های زئونوز به‌شمار می‌رود که طیف وسیعی از نشانه‌های بالینی تحت حاد تا حاد را ایجاد می‌کند، می‌تواند سبب ناباروری، سقط جنین و کاهش تولید شود و خسارات اقتصادی زیادی به صنعت دامپروری کشور وارد نماید. تشخیص بیماری لپتوسپیروز، به‌دلیل مخاطرات بالقوه‌ی آن برای جوامع بشری، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا این بیماری به راحتی توسط میزبانانی نظیر موش و سگ که در اغلب موارد به تعداد قابل توجهی در محیط‌های نگهداری دام‌ها پیدا می‌شوند، انتقال می‌یابد. اما از آن جایی که این بیماری قادر است علائمی بسیار گمراه‌کننده مانند زردی مخاطات، تورم غدد لنفاوی، التهاب عنبیه، خون‌شاش، ورم پستان، افت شدید تولید شیر و تغییر رنگ آن، سقط جنین، تولد گوساله‌های ضعیف، کاهش وزن و اختلال در باروری را در دام‌ها ایجاد کند، احتمال افزایش خطا در تشخیص بیماری را از سوی دامپزشکان مهیا می‌کند و به این‌ترتیب وضعیت سلامت جوامع انسانی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. برای تشخیص آزمایشگاهی بیماری از روش‌های مختلفی مانند مشاهده مستقیم میکروسکوپی، کشت، PCR، آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT)، روش الیزا (ELISA) و ایمونوفلورسانس (IFA) می‌توان استفاده نمود. هدف از این تحقیق مطالعه بررسی سه روش سرولوژی، کشت و PCR در تشخیص لپتوسپیروز گاوها بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۴۰۰ راس گاو که حداقل سابقه یکی از علائم لپتوسپیروز را داشتند، نمونه‌های خون و ادرار برداشت شدند. خون‌گیری از ورید وداج تحت شرایط بهداشتی انجام گرفت. از نمونه سرم خون برای آزمایش سرولوژی (MAT) استفاده شد. جداسازی سرم‌ها از لوله‌های حاوی لخته‌ی خون با قراردادن آن‌ها در بن‌ماری ۳۷ °C به‌مدت ۲۰ دقیقه، و سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰× g و به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. به‌منظور حفظ سرم‌های جدا شده تا زمان شروع آزمایش MAT، سرم‌ها توسط سمپلر به میکروتیوب‌های استریل ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شدند تا در دمای ۲۰°C- نگهداری شوند. برای انجام روش تست استاندارد MAT، آنتی‌ژن مورد استفاده در این روش (لپتوسپیرا اینتروگانس) به‌مدت ۷ الی ۱۰روز در یک محیط کشت مایع کشت داده شد. میزان حجم لپتوسپیرای مورد استفاده توسط شمارش اتاقک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و این حجم به‌نحوی تنظیم شد که در هر میلی‌لیتر، ۲×۱۰^{۸} لپتوسپیرا وجود داشته باشد. از نمونه‌های ادرار برای کشت ادرار و آزمایش PCR استفاده گردید. برای انجام آزمایش PCR، پرایمرهای باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس مورد بررسی قرارگرفتند. گسترش واکنش‌های PCR در حجم‌های واکنش ۲۵ میکرولیتری با استفاده از مسترمیکس آماده (شرکت BIOFACT، کره، ddH_2O: 5.50 µL, Buffer: 12.50 µL, Forward primer: 1.00 µL, Reverse primer: 1.00 µL, DNA: 5.00 µL) انجام گرفت. حجم ادرار مورد نیاز ۵۰ میلی‌لیتر بود که این حجم در بطری‌های حاوی ۰/۵میلی‌لیتر فرمالدئید فیلترشده (۰/۴۵ µm) جمع‌آوری گردید. سپس به منظور انجام کشت و جداسازی باکتری لپتوسپیرا، ۵ میکرولیتر از ادرار جمع‌آوری در محیط کشت اختصاصی باکتری (محیط کشت نیمه‌جامد EMJH) تلقیح شد. محیط‌های کشت حداقل به‌مدت ۵ هفته در درمای ۳۰ °C انکوبه گردیدند و هر یک‌هفته در میان برای بررسی رشد لپتوسپیرا با استفاده از میکروسکوپ زمینه‌سیاه (DFM) مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون کای‌اسکوئر و آزمون دقیق فیشر با استفاده از نرم‌افزار آماری (SPSS 23.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA 2007) تجزیه و تحلیل شدند. تفاوت‌های معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: تست MAT در پنج راس گاو (۱/۲ درصد) مثبت بود. سروتیپ‌های ایکتروهموراژیه (۲ راس= ۴۰ درصد)، گریپوتیفوزا (۲ راس=۴۰ درصد) و کانیکولا (۱ راس=۲۰ درصد) شایع‌ترین بودند. هر پنج نمونه‌ای که تست MAT آن‌ها مثبت اعلام شد، به‌علاوه تمام گاوهایی که علائم بالینی لپتوسپیروز را داشتند کاندید انجام آزمایش PCR شدند که در این میان، نتیجه چهار راس گاو (۱ درصد) مثبت شد. برای تمامی گاوهای مشکوک که تست MAT، PCR و علائم بالینی مثبت داشتند، از نمونه‌های ادرار، کشت تهیه شد. علی‌رغم آلودگی دو نمونه از محیط کشت‌ها به باکتری‌های محیطی، هیچ یک از دیگر محیط‌ها آلودگی نشان ندادند و رشد لپتوسپیرا در محیط ملاحظه نشد (صفر درصد). از آن جایی که حیواناتی که در مراحل اولیه بیماری هستند و سیستم ایمنی بدن آن‌ها هنوز باکتری‌ها را از خون به‌طور کامل پاک نکرده است، باکتری‌ها ممکن است زمان کافی برای کلونیزاسیون در کلیه پیدا نکرده باشند و این منجر به نمونه ادرار منفی شده‌است. همچنین، باکتری لپتوسپیرا به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها حساس است (درمان آن داکسی‌سایکلین و آزیترومایسین است)، لذا در مواردی که دام بیماری دیگری دارد ممکن است این آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده گردد، در نتیجه باعث از بین رفتن باکتری و منفی شدن کشت گردد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان دادند که شیوع آلودگی لپتوسپیرا در گاوهای استان مرکزی بسیار کمتر از دیگر مطالعات بود که به‌همین دلیل امکان مقایسه دقیق سه روش باهم امکان‌پذیر نبود، نکته جالب در این مطالعه، عدم همپوشانی تست‌های مثبت در دو روش MAT و PCR بود که به‌نظر می‌رسد مطالعات بیشتری برای مقایسه دقیق‌تر این دو روش ضروری است. با توجه به نتایج این پژوهش، روش کشت ادرار به‌دلیل طولانی بودن فرآیند آن و شرایط خاص کلونیزاسیون باکتری توصیه نمی‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سرولوژی، MAT، PCR، لپتوسپیروز، گاو، استان مرکزی

مقدمه

بیماری لپتوسپیروز که توسط سروتیپ‌های باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس ایجاد می‌شود یکی از خطرناک‌ترین بیماری های زئونوز به‌شمار می‌رود (Smith, 2019). عامل ایجادکننده لپتوسپیروز یک باکتری رشته‌ای است که به شکل اسپیروکت فنرمانند محکمی است به ضخامت یک‌دهم میکرومتر و به طول ۶ تا ۲۰ میکرومترکه از طریق حرکت چرخشی یامارپیچی و قلاب ویژه‌ای که دریک یاهردوانتهای آن قرار دارد به سادگی قابل تشخیص است. جنس لپتوسپیرا از دو گونه تشکیل شده است که شامل لپتوسپیرا اینتراگانوس

(پاتوزن) و لپتوسپیرابیفلکسا (غیرپاتوژن) است. تشخیص بیماری لپتوسپیروز به‌دلیل مخاطرات بالقوه‌ی آن برای جوامع بشری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

این بیماری به راحتی توسط میزبانانی‌نظیر موش (Maleki *et al*., 2015) و سگ (Smith *et al*., 2019) که در اغلب موارد به‌تعداد قابل توجهی در محیط‌های نگهداری دام‌ها پیدا می‌شوند، انتقال می‌یابد. اما از آن‌جایی‌که این بیماری قادر است علائمی بسیار گمراه‌کننده مانند زردی مخاطات، تورم غدد لنفاوی، التهاب عنبیه، خون‌شاش، ورم پستان، افت شدید تولید شیر و تغییر رنگ آن، سقط جنین، تولد گوساله‌های ضعیف، کاهش وزن و اختلال در باروری در دام‌ها ایجاد کند (Silva *et al*., 2012؛ Constable *et al*., 2016)، لذا احتمال افزایش خطا در تشخیص بیماری را از سوی دامپزشکان مهیا می‌کند و به این‌ترتیب وضعیت سلامت جوامع انسانی (Szyfres, 1976) را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

از جمله روش‌های تشخیص این بیماری شامل معاینه مستقیم، کشت، PCR، روش‌های ایزوترمال، آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) و روش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم IgM (ELISA) هستند که تست MAT به‌عنوان یک آزمایش استاندارد طلایی برای شناسایی لپتوسپیروز مطرح است (Aqib *et al*., 2019). اما از آن‌جایی که هریک از این روش‌های تشخیصی لپتوسپیروز مزایا و معایب خاص خود را دارد، لذا به‌نظر می‌رسد که با به‌کارگیری انواع روش‌های آزمایشگاهی بتوان از وضعیت بیماری دام‌ها آگاهی یافت و ضمن مقایسه نتایج روش‌های مختلف به تشخیص دقیق‌تری دست یافت. لذا، با توجه به سابقه‌ی گزارشات متعدد بیماری در جمعیت دام‌های کشور (Esmaeili *et al*., 2016؛ Khalili *et al*., 2020)، بالاخص برخی از استان‌های هم‌جوار با استان مرکزی (Maleki *et al*., 2015) و حتی اثبات وجود ردپای دیرینه‌ی بیماری در گاوهای شهرستان‌های اراک و قم (Nateghian *et al*., 2012)، و نیز عدم انجام مطالعات جامع و چندجانبه (سرولوژی، کشت و PCR) به‌جهت بررسی بیماری در جمعیت گاوهای سطح استان مرکزی، انجام تحقیق کنونی ضروری به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

۴۰۰ رأس گاو براساس جنس، سن و موقعیت جغرافیایی محل نمونه‌گیری (اعم از: زرندیه، ساوه، تفرش، کمیجان، آشتیان، فراهان، خنداب، اراک، دلیجان، محلات، خمین و شازند) مورد بررسی قرار گرفتند. گاوهایی که سابقه‌ی یک یا چند مورد از علائم بالینی لپتوسپیروز (شامل: زردی مخاطات، تورم غدد لنفاوی، التهاب عنبیه، خون‌شاش، ورم پستان، افت شدید تولید شیر و تغییر رنگ آن، سقط جنین، تولد گوساله‌های ضعیف، کاهش وزن و اختلال در باروری) را داشتند، وارد مطالعه شدند. از تمام ۴۰۰ راس دام نمونه ادرار جهت انجام تست MAT گرفته شد. همچنین، افرادی که تست MAT آنان مثبت شد و یا مشکوک اعلام شد کاندید انجام پی‌سی‌ار شدند. نمونه‌های ادرار دام‌هایی که تست MAT و PCR آن‌ها مثبت و دست‌کم دارای یکی از علایم علایم بالینی شرح داده شده بودند، جهت تهیه کشت ادرار استفاده شدند. تست‌ها در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شدند.

مطالعات آزمایشگاهی

بررسی سرولوژی (MAT)[1]

به‌منظور تهیه‌ی سرم از خون گاوها، در ابتدا خون‌گیری از ورید وداج تحت شرایط بهداشتی انجام گرفت. حجم خون مورد نیاز از هر مورد ۱۰ میلی‌لیتر بود که بلافاصله پس از اخذ، سریعاً به لوله‌های استریل فاقد ماده‌ی ضد انعقاد انتقال یافت. سپس، برای جداسازی سرم‌ها، لوله‌های حاوی لخته‌ی خون تحت شرایط زنجیره سرد سریعاً به آزمایشگاه دامپزشکی فرستاده شدند تا پس از دکلوته نمودن لخته توسط اپلیکاتور و قراردادن در بن‌ماری ۳۷°C به‌مدت ۲۰ دقیقه، با سرعت g ×۳۰۰۰ و به‌مدت۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردند. به‌منظور حفظ سرم‌های جداشده تا زمان شروع آزمایش MAT، سرم‌ها توسط سمپلر به میکروتیوب‌های استریل ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شدند تا در دمای ۲۰ °C− نگهداری شوند (Sakhaee *et al*., 2007). در خاتمه، میکروتیوب‌های منجمد شده‌ی حاوی سرم‌ها، برای انجام آزمایش، به آزمایشگاه تحقیقاتی لپتوسپیروز دانشگاه تهران ارسال شدند.

برای انجام تست استاندارد MAT، آنتی‌ژن مورد استفاده در این روش (لپتوسپیرا اینتروگانس) به‌مدت ۷ الی ۱۰روز در یک محیط‌کشت مایع کشت داده شد. میزان حجم لپتوسپیرای مورد استفاده توسط شمارش اتاقک‌ها مورد ارزیابی قرارگرفت و این حجم به‌نحوی تنظیم شد که در هر میلی‌لیتر، ۲×۱۰^{۸} لپتوسپیرا وجود داشته باشد. در این آزمایش، شش سروار اصلی باکتری *L. interrogans*، با نام‌های کانی کولا، ریپوتایفوز، ایکتروهمورازیه، پومونا، هارجوی (hardjo, Pomona, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, & canicola) به‌عنوان آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفتند و تیترهای ۱:۱۰۰ ≥ مثبت درنظر گرفته شدند. اینتر اسی ۸/۷۵ و اینترا اسی سنجش‌ها ۶/۲۵ به‌دست آمدند. بیشترین رقت سرمی که در آن حداقل ۵۰ درصد لپتوسپیراها آگلوتینه شدند، به‌عنوان تیتر نهایی در نظر گرفته شد (Turner, 1968;Sakhaee *et al*., 2007).

PCR

DNA با استفاده از کیت High Pure PCR Template Prepration Kit (Roche، آلمان) استخراج شد. حدود ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه برداشته و واردفرآیند استخراج DNA شد. ۲۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده و ۴۰ میکرولیتر از پروتئیناز کا به نمونه اضافه شدند. بعد از ورتکس به‌مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری بادمای ۵۵ درجه قرار داده شد و طبق پروتکل کیت باقی‌کار انجام شد. برای انجام آزمایش PCR، پرایمرهای باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس (LEP-1: 5’-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3’ و LEP-2: 5’-TTCCCCCCATTGAGCAAGATT-3’) در قطعه‌ی bp ۳۳۰ مورد بررسی قرار گرفتند. بسط PCR در حجم‌های واکنش ۲۵ میکرولیتری با استفاده از مسترمیکس آماده (شرکت BIOFACT، کره، ddH_2O: 5.50 µL, Buffer: 12.50 µL, Forward primer: 1.00 µL,

[1] Microagglutination Test

(Reverse primer: 1.00 µL, DNA: 5.00 µL) انجام گرفت. در مرحله بعدی، واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD) و مطابق با جدول ۱ صورت گرفت.

جدول ۱- برنامه دمایی و زمانی (سیکل‌های) واکنش PCR
Table 1. The thermal and temporal program (cycles) of the PCR reaction

Step	Temperature (°C)	Time	No of Cycles
Initial Denaturation	95	15 min	1
Denaturation	94	30 sec	35
Annealing	58	90 sec	35
Extension	72	180 sec	35
Final Extension	72	10 min	1
Hold	4	Unlimited	Unlimited

بعد از اتمام PCR، محصولات PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. در انتها، نتایج با استفاده از چراغ UV دستگاه ژل‌داک (BIO-RAD) و با استفاده از برنامه نرم‌افزاری قرائت شدند (Lucchesi *et al*., 2004).

کشت ادرار گاوها

جهت اخذ نمونه‌ی ادرار در گاوهای ماده بعد از شستشوی ناحیه‌ی فرج و پرینه با محلول آب و ساولن، از وسط جریان ادراری توسط سوند نمونه‌گیری شد. در گاوهای نر با توجه به این‌که امکان سونداژ ادراری وجود ندارد، نواحی اطراف غلاف قضیب با محلول آب و ساولن شستشو شد، سپس به‌کمک روش حبس تنفسی با دست و یا استفاده از کیسه‌ی هوایی اقدام به جمع‌آوری ادرار شد. مقدار 10 سی‌سی ادرار در دو لوله مجزا اخذ و به یکی از این دو لوله مقدار ۵ درصد فرمالین خالص فیلترشده (۰/۴۵ µm) اضافه شد و به دومی بدون افزودن فرمالین نمونه فرمالینه برای آزمایش مستقیم با میکروسکپ زمینه تاریک و یا برای پی‌سی‌آر استفاده گردید. نمونه غیر فرمالینه برای کشت در محیط اختصاصی استفاده شد (Sakhaee *et al*., 2007). به‌منظور انجام کشت و جداسازی باکتری لپتوسپیرا، ۵ میکرولیتر از ادرار جمع‌آوری در محیط کشت اختصاصی باکتری (محیط کشت نیمه‌جامد Ellinghausen, McCullough, Johnson, and) (EMJH Harris) تلقیح شد. محیط‌های کشت حداقل به‌مدت ۵ هفته در درمای ۳۰°C انکوبه گردیدند و هر یک هفته درمیان برای بررسی رشد لپتوسپیرا با استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک (DFM) مورد بررسی قرار گرفتند (Ahmed *et al*., 2012؛ Abdollahpour, 1995).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

اطلاعات و داده‌های آماری به‌دست‌آمده در این مطالعه توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون مربع کای و همچنین آزمون Fisher's Exact Test مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

بررسی ویژگی‌های جنسیت و سن در جمعیت دام

تعداد ۴۰۰ راس گاو مشکوک به لپتوسپیروز وارد مطالعه شدند که ۸۵ درصد جمعیت گاوها ماده بودند (n = ۳۴۰). رده سنی ۲ تا ۴ سال (n = ۱۵۷) بیش از سایر رده های سنی شیوع داشت (۳۹/۲٪). ۱۴۶ راس گاو (۳۶ درصد) آبستن بودند و شایع‌ترین علائم بالینی در گاوها شامل سابقه سقط (n=۱۱۴، ۲۸/۵ ٪)، سخت‌زایی و یا جفت‌ماندگی (n = ۹۴، ۲۳/۵ ٪)، ورم پستان (n = ۶۸، ۱۷ ٪)، زردی (n = ۳۷، ۹/۲۵ ٪)، افت تولید شیر (n = ۳۴، ۸/۵ ٪)، مرده‌زایی (n = ۲۶، ۶/۵ ٪)، خون‌شاش (n = ۱۹، ۴/۷۵ ٪) و دفع ادرار غیرطبیعی (n = ۶، ۱/۵ ٪) بودند. سابقه سقط، سخت‌زایی و یا جفت‌ماندگی بیشترین شیوع را داشت.

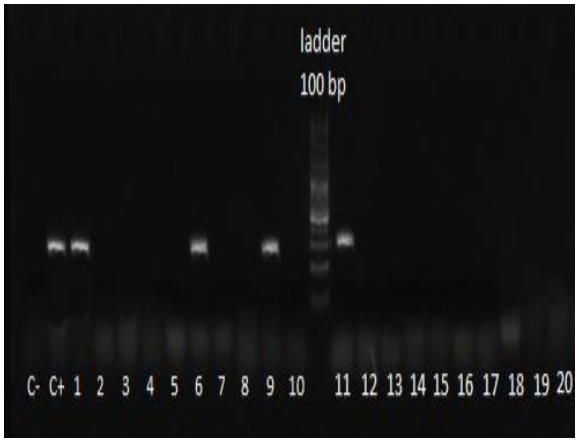
مطالعات آزمایشگاهی

بررسی سرولوژی (MAT)

این تست در پنج راس گاو (۱/۲ درصد) مثبت گزارش شد که شامل سروتیپ‌های ایکتروهموراژیه (۲ راس = ۴۰ درصد)، گریپوتیفوزا (۲ راس = ۴۰ درصد) و کانیکولا (۱ راس = ۲۰ درصد) بودند.

نتایج PCR

هر پنج نمونه‌ای که تست MAT آن‌ها مثبت اعلام شد، به‌علاوه تمام گاوهایی که علائم بالینی لپتوسپیروز را داشتند، کاندید انجام PCR شدند که در این میان، چهار راس گاو (۱ درصد) در bp ۳۳۰ باند مشاهده شدند.



شکل ۱- نتایج PCR (-c: کنترل منفی، +c: کنترل‌مثبت، نمونه‌های ۱، ۶، ۹ و ۱۱ مثبت بودند)
Figure 1. PCR results/ Negative control (C−); Positive control (C+); Samples 1, 6, 9, and 11 tested positive

کشت ادرار

برای تمامی گاوهای مشکوک که تست MAT، PCR و علائم بالینی مثبت داشتند، از نمونه‌های ادرار کشت تهیه شد. علی‌رغم آلودگی دو نمونه از محیط‌های کشت به باکتری‌های محیطی، هیچ‌یک از دیگر محیط‌ها آلودگی نشان ندادند و رشد لپتوسپیرا در محیط ملاحظه نشد (صفر درصد).

جدول ۲- نتایج نمونه‌های مثبت با استفاده از روش‌های مختلف تشخیصی مانند ام ای تی پی سی ار کشت ادرار
Table 2. Results of positive samples using different methods in cattle

ردیف Row	نوع/ جنسیت Sex/Type	سن (سال) Age (year)	MAT	PCR	کشت ادرار Urine culture	علائم بالینی Clinical signs	توضیحات Descriptions
1	گاو/ ماده Cow / Female	2-3	+	−	−	سابقه جفت ماندگی، سخت‌زایی History of retained placenta and dystocia	غیر آبستن Non-pregnant
2	گاو/ ماده Cow / Female	4-5	+	−	−	سابقه سقط History of abortion	آبستن تعداد آبستنی سه مورد Pregnant cows with a history of three pregnancies
3	گاو/نر Cow / Male	< 1	+	−	−	سابقه زردی، لامپی اسکین، زگیل پوستی، بی‌اشتهایی، لاغری History of jaundice, lumpy skin, cutaneous warts, anorexia, and emaciation	−
4	گاو/ ماده Cow / Female	3-4	+	−	−	سابقه سقط، بی‌اشتهایی History of abortion and anorexia	آبستن Pregnant
5	گاو/ ماده Cow / Female	1-2	+	−	−	بی‌اشتهایی، لاغری، وضعیت تنفسی نامطلوب Anorexia, emaciation, and poor respiratory condition	آبستن (اولین بارداری) Pregnant (first pregnancy)
6	گاو/ماده Cow / Female	2-3	−	+	−	زردی، لاغری، بی‌اشتهایی، گوارش غیرنرمال، اسهال Jaundice, emaciation, anorexia, abnormal digestion, and diarrhea	غیر آبستن Not pregnant
7	گاو/ ماده Cow / Female	1-2	−	+	−	زردی، تنفس و گوارش غیرنرمال، اسهال Jaundice, abnormal respiration and digestion, diarrhea	غیر آبستن Not pregnant
8	گاو/ ماده Cow / Female	2-3	−	+	−	مرده‌زایی، زردی Stillbirth, jaundice	آبستن (دومین بارداری) Pregnant (second pregnancy)
9	گاو/ ماده Cow / Female	5-6	−	+	−	سابقه زایمان گوساله آنرمال، زردی، مشکوک به BVD-MD History of abnormal calf delivery, jaundice, suspected BVD-MD	آبستن (پنجمین بارداری) Pregnant (fifth pregnancy)
جمع (Total)			(1.2%) 5	(1%) 4	0	−	−

لپتوسپیروز یکی از بیماری‌های زئونوز با پراکندگی جهانی است که تقریباً تمام پستانداران را آلوده می‌کند، طیف وسیعی از نشانه‌های تحت بالینی تا فوق حاد را ایجاد می‌کند و می‌تواند منجر به مرگ شود (Radostits *et al*., 2007). بر پایه تحقیقات زیادی که در رابطه با روش‌های تشخیصی لپتوسپیروز انجام شده‌اند، این‌طور به‌نظر می‌رسد که هر یک از روش‌های تشخیصی لپتوسپیروز محدودیت‌ها و معایب خاص خود را دارد. بنا بر این، توصیه می‌شود که از چند روش تشخیصی به‌طور همزمان استفاده شود تا بتوان با مقایسه

نتایج حاصل به تشخیص دقیق‌تری دست یافت. لذا، در این مطالعه از سه روش سرولوژی، کشت و PCR استفاده گردید.

بررسی‌های متعددی که روی سرواپیدمیولوژی لپتوسپیروز در نواحی مختلف کشور انجام گرفته‌اند نشان می‌دهند که نه‌تنها فراوانی سروتیپ‌ها در مناطق مختلف کشور متفاوت است بلکه در یک منطقه خاص نیز با گذشت زمان به‌تدریج سروتیپ‌های شایع تغییر می‌کند (Kabiri *et al*., 2016). در مطالعه ما بر روی ۴۰۰ راس گاو، ۵ راس (۱/۲ درصد) تست MAT مثبت گزارش شد که ۲ راس (۴۰ درصد) ایکتروهموراژیه، ۲ راس گریپتیفوزا (۴۰ درصد) و ۱ راس (۲۰ درصد) کانیکولا بودند.

در مطالعه انجام گرفته بر روی گاوهای شیری منطقه مهاباد، میزان شیوع سرمی عفونت لپتوسپیرایی در بین گاوها ۱۷درصد بود (Gorbani et *al*., 2016). در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۷ در منطقه شهرکرد انجام شد، ۱۹ درصد از نمونه‌های ۱۰۰ گاو از هشت گاوداری لبنی برای لپتوسپیرا مثبت بودند که بیشترین و کم‌ترین آلودگی سروار به‌ترتیب ۳۶/۸ درصد و ایکتروهموراژیه و ۱۰/۵ درصد سروار کانیکولا بود (Hajikolaei, *et al*., 2007). ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al.,* 2004) با استفاده از روش MAT دریافتند که ۱۸/۷۵ درصد از نمونه‌های سرم جمع‌آوری شده از ۴۰۰ راس گاو از دامداری‌های صنعتی در منطقه شهرکرد برای لپتوسپیرا مثبت بود که بیشترین و کمترین شیوع سروار به‌ترتیب کانیکولا (۵۰/۶ درصد) و پومونا (۴ درصد) بودند (Ebrahimi *et al*., 2004). طبق تحقیقات انجام‌شده برروی گاومیش‌های ارومیه، سروتیپ پومونا با ۱۶/۲ درصد بیشترین میزان درگیری و ایکتروهموراژیه با ۱/۵۲ درصد کمترین درگیری را داشتند (Abdollah *et al*., 2016). بسیاری از مطالعات دیگر نیز پومونا را آنتی‌ژن غالب لپتوسپیرا در گاومیش‌ها گزارش کردند (Radostits *et al*., 2007) که این امر می‌تواند به‌علت تفاوت‌های گونه‌ای بین گاومیش و سایر دام‌ها از جمله گاوها باشد که باید این موضوع بیشتر مورد تحقیق و بررسی قرار گیرد. نتایج مطالعات انجام‌شده بر روی گاوها در مشهد و مازندران نشان دادند که سروتیپ غالب ایکتروهموراژیه بود (Abd elahpour *et al*., 2009). نتایج نشان دادند که ۳۱ درصد گاوها با سروتیپ‌های گریپوتیفوزا، پومونا و ایکتروهموراژیه واکنش سرمی مثبت داشتند. مطالعات پیشین (Hajikolaei *et al*., 2007) و (Abd elahpour *et al*., 2009) گریپوتیفوزا، (Talebkhan Grousi *et al*., 2003) ایکتروهموراژیه و (Ebrahimi *et al*., 2004) کانیکولا را در گاو ذکر کردند. در مطالعه جعفری دهکردی و همکاران (Jafari Dehkordi et al., 2011)، سروارهای غالب گریپتیفوزا و پومونا بودند (Jafari Dehkordi *et al*., 2011). از آن‌جایی که سروارهای غالب می‌توانند با گذشت زمان در مناطق تغییر کنند، لذا نمی‌توان مقایسه درستی انجام داد. در مطالعات ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۲ در شهرکرد، سروارهای غالب از ایکتروهموراژیه به کانیکولا تغییر کردند (Ebrahimi *et al*., 2004).

رودیگاس و همکاران (Rodrigues *et al.,* 1999) متوجه شدند که ایکتروهموراژیه و پومونا به‌عنوان سروار غالب در گاوهای برزیل طی سال‌های ۱۹۹۶ و ۱۹۹۷ بودند. در حالی‌که مطالعات قبلی نشان داده بودند که سروتیپ‌های هاردجو و پومونا غالب بودند. در تحقیقی که توسط Durham و همکاران طی سال‌های ۱۹۹۱–۱۹۹۲ در استرالیا انجام شد (Durham & Paine, 1997)، تروسووی و هارجو به‌ترتیب دارای بالاترین و کمترین شیوع بودند و هیچ‌یک از این نمونه‌ها واکنش مثبتی در برابر پومونا نشان ندادند، به‌دلیل کم بودن بارندگی در محوطه از آن‌جا که میزان بارندگی در شیوع سروار بسیار نقش دارد (Haji Hajikolaei *et al*., 2007). سروار کانیکولا وهارجو در گیلان و اهواز یافت شد (Haji Hajikolaei *et al*., 2007). در مطالعه ما نیز سه سروار در استان مرکزی شامل ایکتروهموراژیه، گریپتفوزا و کانیکولا یافت شدند. با توجه به نتایج این مطالعه، باید توجه داشت که تغییرات سروار شایع‌ترین و مربوط به شرایط آب‌وهوایی است. بنا بر این، برای جلوگیری از شیوع بیماری لازم است سروارها در هر منطقه مرتباً غربال شوند. ضمنا، آلودگی به این باکتری در بین کارگران گاوداری‌های استان مرکزی به‌صورت تحت بالینی اتفاق افتاد که این نیز می‌تواند به دلایل تفاوت در برخورد سیستم ایمنی افراد و مصرف داروهای آنتی‌بیوتیکی جهت درمان سایر مشکلات و یا عفونت و درمان تصادفی این باکتری با آنتی‌بیوتیک‌ها سبب کاهش نتایج مثبت و یا ایجاد علایم تحت بالینی شده باشد. این نتایج با تحقیقات در گاومیش‌های تبریز هم‌خوانی دارد اما با گاوهای ارومیه (Ramin *et al*., 2012) و گوسفندها و گاوهائی که از ۱:۲۰۰، ۱:۴۰۰ و بالاتر ذکر کرده‌اند متفاوت است (Hassanpour *et al*., 2007). این تفاوت می‌تواند نشانگر این باشد که گاوها نسبت به عفونت لپتوسپیراها مقاوم‌تر از سایر نشخوارکنندگان هستند و اغلب فرم مزمن بیماری را با عیارهای پایین‌تری بروز می‌دهند. علی‌رغم محدودیت‌های موجود در روش MAT، این آزمایش هنوز هم یکی از آزمایشات استاندارد WHO در تشخیص لپتوسپیروز محسوب می‌گردد. برای تشخیص قطعی بیماری لپتوسپیروز براساس استاندارد WHO، لازم است تا دو نمونه به فاصله ۲ تا ۳ هفته از دام اخذ شوند تا افزایش دوبرابری تیتر مشکوک گردد و یا این که در نمونه اول تیتر سرمی ۴۰۰:۱ و بالاتر به‌دست آید. نکته دیگر این که روش MAT نسبت به IgG بیشتر به وجود IgM در سرم حساسیت نشان می‌دهد، لذا در تشخیص فرم‌های مزمن بیماری و نیز در حاملین از حساسیت کمتری برخوردار است. به نظر می‌رسد که یکی از علل پایین‌تر بودن میزان شیوع سرمی لپتوسپیروز در گاوهای استان مرکزی همین نکته باشد و همان‌گونه که اشاره شد احتمال داده می‌شود که این گاوها احتمالاً بیشتر فرم مزمن بیماری را بروز دهند و در مواردی هم نقش حاملین یا ناقلین پنهان لپتوسپیراها را ایفا کنند که با توجه به محدودیت‌های روش MAT قابل ردیابی نباشند. به‌همین دلیل، بسیاری از منابع توصیه کرده‌اند که برای ارزیابی دقیق‌تر بیماری در یک منطقه از دو یا سه روش تشخیصی همزمان با MAT استفاده شود.

از طرفی، از آن‌جایی‌که در آزمایشات سرولوژیک لپتوسپیروز مانند MAT نتایج معمولاً عفونت را در مورد بیش از یک سروووار مشخص می‌کنند (Park *et al*., 1992)، این مسأله ممکن است در نتیجه وجود عفونت همزمان با چند سروووار اتفاق افتد، اما وجود واکنش متقاطع بین سروووارها در آزمایش MAT می‌تواند باعث انحراف در گزارش آن شود. ولی در این تحقیق، هرکدام از نمونه‌های مثبت فقط به یکی از آنتی‌ژن‌ها پاسخ مثبت دادند و چه بسا اگر در این بررسی از آنتی‌ژن‌های دیگر نظیر آنتی‌ژن مربوط به سروووارهای بالوم و اتومنالیس هم استفاده می‌شد شاید تعداد دام‌های آلوده یا تعداد دام‌هایی که علاوه‌بر یک سروووار به سروووار دیگر هم جواب مثبت می‌دادند بیشتر می‌شد که این مسئله جای بررسی‌های بیشتری دارد. همچنین، چون این باکتری یک باکتری بسیار حساس به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها همچون داکسی سایکلین وآزیترومایسین است، لذا در مواردی که دام بیماری دیگری دارد ممکن است این آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده گردد، در نتیجه باعث ازبین رفتن باکتری و منفی شدن نتایج شده است. چنانچه در مطالعه بر روی تک‌سمی‌های ارومیه، ۵/۹ درصد از تک‌سمی‌ها همزمان به دو سروووار متفاوت پاسخ مثبت دادند (Ramin *et al.,* 2012). طبق تحقیقات انجام شده در تبریز، هشت مورد (۱۶ درصد) از نمونه‌های مورد سرمی مثبت برای بیش از یک سروتیپ، مثبت بودند (Hassanpour *et al*., 2007). همچنین تحقیقی که بر روی گاوها و گوسفندان منطقه ارومیه انجام شد نشان دادند که احتمال رخداد درگیری با بیش از یک سروووار در گاوها بیشتر از گوسفندان بود ولی اغلب دام‌ها به یک سروووار مبتلا بودند (Ramin *et al.*, 2012).

یکی دیگر از دلایل میزان پایین موارد مثبت لپتوسپیروز در این پژوهش را می‌توان به آب‌وهوا نسبت داد. لپتوسپیروز پراکندگی جهانی دارد، در مناطق با بارندگی زیاد، آب‌وهوای مرطوب و معتدل، pH نزدیک به ۷، باتلاق‌های گوناگون و نیز در مناطقی که فاضلاب‌های شهری جریان دارد بیشتر مشاهده می‌شود (Abdollah *et al*., 2016). بنا بر این، می‌توان گفت که این بیماری یک بیماری فصلی است (Zakeri *et al*., 2010). پژوهش حاضر در فصل پاییز و ماه اول زمستان انجام شد که در این مدت بارندگی‌های کمی هم در منطقه رخ داد. به‌طور کلی، طبق آمار هواشناسی ایران، بارندگی‌ها در ایران طی پاییز ۹۹ کمتر و ضعیف‌تر از حد معمول بودند و پاییز کم‌بارشی نسبی در کشور حاکم بود. به‌طوری‌که میزان بارش در طی ۵۰ سال گذشته، در سال ۹۹ حداقل میزان را نسبت به سال‌های قبل داشت. لذا، این‌طور به‌نظر می‌رسد که با وجود این‌که ردپای بیماری لپتوسپیروز در تعدادی از انسان‌ها و دام‌های استان مرکزی یافت شد، اما با توجه به میزان کم بارش به آن صورت که باید باشد، شیوع قابل‌توجهی نسبت به مطالعات مشابه نداشت. برای مثال، در استان گیلان یا اهواز طی سال‌های قبل با توجه به میزان بارش بالا و شرایط گرم و رطوبتی، ابتلا به این بیماری خیلی بالا گزارش شد. لذا، شیوع کم لپتوسپیروز در مطالعه حاضر به‌دلیل شرایط یکسان نبودن شرایط آب‌وهوایی در مناطق مختلف کشور و به‌ویژه مساله کم‌بارشی در سال مطالعه (۱۳۹۹) قابل‌توجیه است. پس می‌توان به این نتیجه رسید که با کاهش میزان بارندگی‌ها و گرم وخشک بودن هوای استان مرکزی، میزان درگیری به بیماری لپتوسپیروزیس می‌تواند کاهش یابد. همچنین، مطالعات دیگران در گونه گاو نشان می‌دهد که آنتی‌ژن غالب در نقاط مختلف کشور ایران که دارای شرایط گوناگون آب‌وهوایی و جغرافیایی هستند نیز با هم تفاوت دارد (Abdollah *et al*., 2016).

از معایب روش‌های سرولوژیک آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT)، عدم تشخیص سریع و زود هنگام بیماری و وقت‌گیر بودن آن است. روش مولکولی PCR یک آزمایش سریع با حساسیت و ویژگی خوب برای تشخیص باکتری لپتوسپیرا به‌شمار می‌آید به‌طوری‌که حتی می‌تواند تا ۹۰٪ جانشین کشت باشد (Bal *et al*., 1994). لذا استفاده از روش‌های مولکولی با حساسیت و ویژگی بسیار بالا به‌عنوان جایگزین روش‌های سرولوژیک منطقی به‌نظر می‌رسد و به‌همین دلیل در مطالعه حاضر از این روش نیز برای شناسایی باکتری‌ها استفاده گردید.

در مطالعه حاضر، در چهار راس گاو (۱ درصد) نتایج PCR مثبت بودند، در حالی که این چهار نمونه، تست MAT منفی داشتند. یکی از دلایل می‌تواند این باشد که بعد از طی مرحله اول بیماری (۴ تا ۹ روز) با ظهور پادتن‌ها، لپتوسپیراها از خون محو و در کلیه‌ها جایگزین می‌گردند و به‌طور متناوب از طریق ادرار دفع می‌شوند. این مرحله که به آن مرحله لپتوسپیروری می‌گویند می‌تواند تا ماه‌ها ادامه داشته باشد.

در مطالعاتی که به روش PCR در نقاط مختلف ایران انجام شدند، لپتوسپیرا اینتروگانس شیوع متفاوتی داشت، به‌طوری‌که در یک مطالعه در اردبیل که به روش PCR Nested بر روی گوسفندان انجام گرفت ۱۷/۳۳ درصد لپتوسپیرا اینتروگانس بودند (Zakeri *et al*., 2010). همچنین، در تبریز باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس به‌عنوان عامل سقط جنین در ۸/۵۷ درصد موارد سقط جنین در گوسفندهای تبریز شناسایی شد (Froutani *et al.,* 2014). در مطالعه دیگری در تبریز، فراوانی سقط جنین لپتوسپیرایی ۱۶ مورد (۲۱ درصد) بود (Hamali *et al*., 2013). این تفاوت میزان شیوع باکتری را هم به زمان نمونه‌گیری و بهبود و افزایش کنترل و پیشگیری بیماری‌های دامی و هم به نحوه نمونه‌گیری می‌توان نسبت داد.

در مطالعه حاضر، کشت تمامی نمونه‌ها منفی شد. از آنجایی‌که برخی از لپتوسپیراها پس از خروج از سیستم ایمنی بدن، ممکن است در توبول‌های کلیه، کبد، رحم، چشم و مننژ باقی بمانند، حیواناتی که از لپتوسپیروز حاد بهبود یافته‌اند ممکن است ناقل بیماری باشند و لپتوسپیراها از چند روز تا چند سال در لوله‌های کلیه آن‌ها باقی بمانند؛ اگرچه در این موارد، عامل در خون یافت نمی‌شود اما از طریق ادرار دفع می‌شود. حیواناتی که در مراحل اولیه بیماری هستند و سیستم ایمنی بدن آن‌ها هنوز باکتری‌ها را از خون به طور کامل پاک نکرده است، باکتری‌ها ممکن است زمان کافی برای کلونیزاسیون در کلیه پیدا نکرده باشند و این منجربه نمونه

ادرار منفی شده باشد (Radostits *et al.*, 2007). از طرفی از آن‌جایی که باکتری لپتوسپیرا به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها حساس است (درمان آن داکسی‌سایکلین و آزیترومایسین است)، لذا در مواردی که دام بیماری دیگری دارد ممکن است این آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده گردد، در نتیجه باعث از بین رفتن باکتری و منفی شدن کشت گردد (Aqib *et al*., 2019). از طرفی، افزایش آگاهی عمومی دامپزشکان و دامپروران درسال‌های اخیر به‌ویژه در دوران کرونا که این پژوهش در آن زمان انجام شد، در کاهش میزان آلودگی دام‌ها نقش مؤثری داشته‌است هر چند که کاهش میزان بارندگی و موقعیت جغرافیایی استان مرکزی درکاهش میزان آلودگی قطعا در نتایج این پژوهش مؤثر بودند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان دادند که شیوع عفونت لپتوسپیرا در گاوهای استان مرکزی ایران در مقایسه با پژوهش‌های پیشین به‌طور قابل‌توجهی کمتر بود. به‌دلیل پایین بودن میزان شیوع، مقایسه دقیق بین سه روش تشخیصی (MAT، PCR و کشت ادرار) امکان‌پذیر نبود. از سوی دیگر، این مطالعه در طول همه‌گیری کووید-۱۹ انجام شد. به‌نظر می‌رسد که افزایش آگاهی عمومی در زمینه بهداشت عمومی در میان دامپزشکان و دامداران در سال‌های اخیر، نقش مؤثری در کاهش شیوع بیماری‌های عفونی از جمله لپتوسپیروز در جمعیت دامی داشته است. نکته حائز اهمیت، عدم‌همپوشانی نتایج مثبت بین روش‌های MAT و PCR بود که نشان می‌دهد برای ارزیابی دقیق‌تر دقت تطبیقی این آزمون‌ها، انجام مطالعات بیشتر ضروری است. همچنین، روش کشت نیازمند شرایط کاملاً استریل، زمان طولانی فرآوری و پروتکل‌های سخت‌گیرانه جداسازی باکتری است که اجرای قابل اعتماد آن مستلزم دقت فنی و تخصص بالا است.

References

Abdollahpour, G. R., Shafighi, S. T., & SATARI, T. S. (2009). Serodiagnosis of leptospirosis in cattle in north of Iran, Guilan.

Abdollah, G., Ramin, A., & Sanajoo, D. (2016). Seroinvestigation of buffaloes leptospirosis in Urmia district. *Animal Science Research*, 26(2), 59–68.

Abdollahpour, G. (1995). Bovine Leptospirosis: With a Special Reference to Leptospira Interrogans Serovar Hardjo. University of Sydney.

Ahmed, S. A., Sandai, D. A., Musa, S., Hoe, C. H., Riadzi, M., Lau, K. L., & Tang, T. H. (2012). Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 19(3), 9.

Aqib, A. I., Ijaz, M., Farooqi, S. H., Shoaib, M., Kulyar, M. F.-A., & Yasmeen, K. (2019). Leptospirosis: Rising Nuisance for cattle and threat to public health. In *Bacterial Cattle Diseases*. IntechOpen.

Bal, A. E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R. A., De Meza-Brewster, J., Korver, H., & Terpstra, W. J. (1994). Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8), 1894–1898.

Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., & Grünberg, W. (2016). Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Elsevier Health Sciences.

Durham, P. J. K., & Paine, G. D. (1997). Serological survey for antibodies to infectious agents in beef cattle in northern South Australia.

Ebrahimi, A., Nasr, Z., & Kojouri, G. A. (2004). Seroinvestigation of bovine leptospirosis in Shahrekord district, central Iran. *Australian Veterinary Journal,* 75(2), 139-40

Esmaeili, S., Naddaf, S. R., Pourhossein, B., Hashemi Shahraki, A., Bagheri Amiri, F., Gouya, M. M., & Mostafavi, E. (2016). Seroprevalence of brucellosis, leptospirosis, and Q fever among butchers and slaughterhouse workers in south-eastern Iran. *PloS One*, 11(1), e0144953.

Froutani, P., Hamali, H., Jozani, R. J., Abdollahpour, G., Katayon, N., & Norsaadat, G. (2014). A survey on abortions caused by Leptospira spp. in sheep flocks located on the suburb of Tabriz-Iran. *Wulfenia*, 21(1), 134–144.

Gorbani, I., Hassanpour, A., & Hassanpour, A. (2016). Seroprevalence of Leptospira interrogans infection in the dairy cows in Mahabad area in Iran. *International Journal of Advanced Life Sciences*, 9(2), 212–216.

Haji Hajikolaei, M. R., Ghorbanpour, M., Gharibi, D., & Abdollapour, G. R. (2007). Serologic study on leptospiral infection in sheep in Ahvaz, southwestern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8(4), 333–336.

Hamali, H., Jafari Jozani, R., Nofouzi, K., Ashrafi Helan, J., & Jabbari, H. (2013). Prevalence survey of abortions caused by Leptospira, Brucella and Campylobacter spp. in the dairy cattle by molecular method. *Iranian Veterinary Journal*, 9(2), 51–59.

Hassanpour, A., Fartashvand, F., Abdollahpour, G., Mogaddam, G. A., Nadalian, M. G., & Sattari, S. (2007). Seroprevalence of leptospiral infection in dairy herds in Tabriz-Iran. *Pajouhesh and Sazandegi*, 74, 67-77.

Jafari Dehkordi, A., Shahbazkia, H., & Ronagh, N. (2011). Evaluation of pathogenic serovars of Leptospira interrogans in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(3), 135–139.

Kabiri, F., Mahzounieh, M., Ebrahimi, K. A., & Mokhtari, A. (2016). Genomic identification of campylobacter fetus and leptospira introgans in aborted sheep fetuses in the selected provinces of Iran by PCR. Journal of Comparative Pathobiology, 13(2), 1917-1926.

Khalili, M., Sakhaee, E., Amiri, F. B., Safat, A. A., Afshar, D., & Esmaeili, S. (2020). Serological evidence of leptospirosis in Iran; A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 138, 103833.

Lucchesi, P., Arroyo, G. H., Etcheverría, A. I., Parma, A. E., & Seijo, A. C. (2004). Recommendations for the detection of Leptospira in urine by PCR. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37, 131–134.

Maleki, S., Sookhtehzari, A., & Abdollahpour, G. (2015). Serodiagnosis of leptospirosis in Cattle in Khorramabad, west Iran. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*, 9, 173–176.

Nateghian, A., Hoseini, S., & Lavasani, A. (2012). Leptospirosis mimicking collagen vascular disease in a thirteen-year-old Iranian girl. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 7(2), e13948

Park, Y. G., Gordon, J. C., Bech-Nielsen, S., & Slemons, R. D. (1992). Factors for seropositivity to leptospirosis in horses. *Preventive Veterinary Medicine*, 13(2), 121–127.

Radostits OM., CC, Gay., & KW, H. (2007). Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats. 10. ed. (10th ed.). Philadelphia: Saunders.

Ramin A. Gh., & Abdollahpour G., Azizzadeh F., Ghahramani P.3, M. A., and R. S. (2012). Seroepidemiological detection of antibodies against leptospira using microscopical agglutination test in Urmia cow and sheep. *Iranian Veterinary Journal*. 9(3), 54-61.

Rodrigues, C. G., Müller, E. E., & Freitas, J. C. D. (1999). Leptospirose bovina: sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Paraná, Brasil. *Ciência Rural,* 29, 309-314.

Sakhaee, E., Abdollahpour, G.R., Bolourchi, M., Hasani Tabatabayi, A.M., & Sattari Tabrizi, S. (2007). Serologic and bacteriologic diagnosis of bovine leptospirosis in Tehran suburb dairy farms. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8(4), 325–332.

Silva, R. C. D., Costa, V. M. D., Shimabukuro, F. H., Richini-Pereira, V. B., Menozzi, B. D., & Langoni, H. (2012). Frequência de Leptospira spp. em ovinos abatidos em matadouros brasileiros e sua associação com variáveis epidemiológicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira,* 32, 194-198.

Smith, B. P., Van Metre, D. C. & Pusterla, N. (2019). *Large Animal Internal Medicine* (Sixth Edit). Elsevier Health Sciences. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/book/9780323554459/large-animal-internal-medicine#book-description

Szyfres, B. (1976). Leptospirosis as an animal and public health problem in Latin America and the Caribbean area. *Bulletin of the Pan American Health Organization (PAHO); 10 (2), 1976*.

Talebkhan Garousi, M., Vandyousefi, J., Familghadakchi, H., & Nowrouzian, I. (2003). A seroepidemiological survey of leptospiral infection in dairy cattle herds and their employees in Mashhad suburb in Iran. *Journal of Veterinary Research,* 58(1), 89-94.

Tooloei, M., Abdollapour, G., Karimi, H., & Hasanpor, A. (2008). Prevalence of serum antibodies against six leptospira serovars in sheep in Tabriz, Northwestern Iran. *Journal of Buffalo Science,* 3(3), 76-81

Turner, L. H. (1968). Leptospirosis II. Serology.

Zakeri, S., Khorami, N., Ganji, Z. F., Sepahian, N., Malmasi, A.-A., Gouya, M. M., & Djadid, N. D. (2010). Leptospira wolffii, a potential new pathogenic Leptospira species detected in human, sheep and dog. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 273–277.

Zakeri, S., Sepahian, N., Afsharpad, M., Esfandiari, B., Ziapour, P., & Djadid, N. D. (2010). Molecular epidemiology of leptospirosis in northern Iran by nested polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism and sequencing methods. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5), 899.