در
امور دام و آبزیان شماره ۷۴، بهار ۱۳۸۶
پژوهش و سازندگی

استفاده از روش‌های مولکولار جهت تشخیص لپتوسپیرا

• صدیقه سادات صفویه
مربی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج
• خسرو آقایی‌پور
عضو هیأت علمی‌موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج
E-mail: s.safavieh@rvsri.com

چکیده

تشخیص سریع لپتوسپیرا یکی از ضروریات در درمان این بیماری زئونوز می‌باشد. عدم توانایی روش‌های سرولوژیک در تشخیص سریع این باکتری (این روش برای تشخیص و ایجاد پادتن دارند) موجب گردیده است که روش PCR به دلیل حساسیت و دقت بالای آن به عنوان کاندیدای مناسبی بدین منظور مطرح شد. در ایران نیز با توجه به شیوع فرم حاد و مزمن این بیماری باید درمان و یا کنترل آن برنامه‌ریزی گردد و تشخیص عامل بیماری اولین گام بدین منظور می‌باشد. در این تحقیق جهت تشخیص سریع این بیماری از تکنیک PCR استفاده گردید. که از سه سروواریته غالب شناخته شده در ایران *L.canicola, L. grippotyphosa, L. sejroe hardjo* مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور به‌عنوان هدف دو نقطه ژنی اختصاصی برای لپتوسپیراهای پاتوژن انتخاب گردید پرایمرهای G1/G2 با شناسایی قطعه اول محصول PCR به طول ۲۸۵bp ایجاد نمودند و پرایمرهای ۵۹۰DIR1/۵۹۰REV2 با هدف قرار دادن قسمتی از یک ناحیه جدید تکرار شونده ژنوم محصول PCR به طول ۵۷۱bp ایجاد نمودند. برای تائید محصول PCR از آنزیم‌های محدودگر استفاده گردید که از آنزیم AluI برای محصول ۵۷۱bp و آنزیم MboI برای محصول ۲۸۵bp بکار رفت.

کلمات کلیدی: PCR – Leptospira، واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمریزه- لپتوسپیرا

www.SID.ir

Pajouhesh & Sazandegi no 74 pp: 182-188

Molecular methods for detection of Leptospira

By: S. Sadat Safavieh, and Kh. Aghaiypour

Biotechnology Department Razi Vaccine and Serum Research Institute Karaj- Iran

Rapid detection of Leptospira is one of necessities in treatment of this zeonostic disease. The unability of serologic methods for detection of these bacteria in initial steps of infection (these methods needs to progress of infection and development of antibody) has candidated molecular methods based on PCR, as an important goal for rapid detection of Leptospirosis. Because of the exiestance of this disease in Iran, it seems a necessity to program for control and treatment of it. For this purpose, the first step is the detection of this bacteria. In this research we developed two PCR methods for detection of the bacteria. Three identified dominant serovars of Leptospira in Iran *L.canicola*, *L. sejroe hardjo, L. grippotyphosa* were used in development of PCR. The first one was targeted to a non coding locus producting 285bp with G1/G2 set of primers and the second was part of a novel repetitive sequence producing a 571 bp product with primers 590DIR1/590REV2 .

Comfirmation of PCR product was done with RFLP. AluI and MboI were used for 571 and 285 bp products, reppectively.

Keywords: Leptospira-ONA Extraction-PCR

مقدمه

لپتوسپیروز بیماری عفونی خطرناک، حاد سیستمیک و سپتی سمیک می‌باشد. این بیماری مشترک بین انسان و دام حاصل از نوعی اسپیروکت به نام لپتوسپیرا است که انسان و گونه‌های متعددی از جانوران اهلی و وحشی را آلوده می‌کند، که خطری بالقوه برای بهداشت عمومی، توسعه اقتصادی، تجارب و صنعت است. پس تشخیص صحیح لپتوسپیرا اهمیت زیادی در جهت سلامت جامعه و جلوگیری از عوارض گسترده آن دارد و با توجه به روند بیماری تشخیص زود رس آن مهمترین مسئله در درمان آن می‌باشد (۲۴،۲۱،۱۹،۱۵،۷،۶،۳). مطالعه سرواپیدمیولوژیک و باکتریولوژیک که در مؤسسه تحقیقاتی رازی در ایران انجام پذیرفته و افزایش ابتلا به این بیماری بر اساس گزارشهای بدست آمده از سطح کشور لزوم توجه به این بیماری و روشن نمودن وضعیت آن را در سطح کشور بیش از پیش آشکار می‌سازد (۲،۱). در سالیان اخیر مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی با انجام تحقیقات گسترده به‌صورت مرکز تشخیص و تحقیق بر روی لپتوسپیرا و بیماری لپتوسپیروز در آمده است. در حال حاضر علاوه بر تولید واکسن بر علیه این بیماری وظیفه تشخیص نمونه‌های سرمی مشکوک به لپتوسپیروز ارسالی از مناطق مختلف کشور به روش سرولوژی را نیز عهده دار می‌باشد. بنابراین ضروری بود تا تحقیقات لازم جهت توسعه و راه‌اندازی روش‌های مولکولی در تشخیص لپتوسپیرا پاتوژن شروع گردد. این تحقیق بدین منظور صورت پذیرفت تا اولین گام در این راستا در کشور برداشته شود.

امروزه در دنیا جهت تشخیص لپتوسپیرا از روش‌های کشت و جداسازی عوامل، روش‌های سرولوژیک ELISA, IFA, MAT و نیز روش‌های مولکولی بر پایه PCR استفاده می‌نمایند. البته تشخیص سرولوژیکی لپتوسپیروز معمولاً با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی MAT صورت می‌گیرد. لازم به ذکر است که استفاده از روش‌های سرولوژیک منوط به گذشت حداقل ۱ تا ۲ هفته و ایجاد پاسخ هومورال در بیمار می‌باشد و در مورد کشت هم این زمان به چند هفته افزایش می‌یابد(۴، ۱۰، ۱۲، ۱۴،۱۵،۱۹،۲۱،۲۴). با توجه به اهمیت تشخیص زودرس عامل بیماری به‌نظر می‌آید تنها سرعت و حساسیت بالای روش PCR برای مسئله فوق کارساز باشد بنابراین در این تحقیق سعی گردید با راه اندازی و طراحی تکنیک PCR جهت تشخیص لپتوسپیرای امکان تشخیص زودرس لپتوسپیرا فراهم آید.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش

در این مطالعه از سوش‌های لپتوسپیرا *L. canicola, L. grippotyphosa, L. sejroe hardjo* از بانک میکروبی مؤسسه رازی تهیه و استفاده شد. جهت بررسی کیفیت و سرعت عمل در روش استخراج DNA برای PCR از سه روش Boiling ، کلروفرم-فنل- ایزوآمیل الکل به همراه پروتئیناز K و کیت استخراج DNA شرکت Roche استفاده گردید(۲۹،۲۰،۱۱،۸). و با بررسی بانک‌های اطلاعاتی از بین توالی‌ها و پرایمرهای مطرح شده برای شناسایی گونه‌های لپتوسپیرای پاتوژن دو جفت پرایمر انتخاب گردید، از این دو جفت پرایمر یکی به نام‌های G1/G2 ایجاد یک قطعه ۲۸۵ جفت بازی و دیگری پرایمر ۵۹۰DIR۱/۵۹۰REV۲ محصولی به طول ۵۷۱ جفت باز ایجاد نمود. در مرحله بعد بهینه سازی PCR جهت بدست آوردن بهترین شرایط انجام واکنش PCR بررسی گردید (۲۵،۱۹،۱۷،۱۶،۹).

تائید اختصاصی بودن PCR برای لپتوسپیرا: جهت بررسی عدم تشخیص دیگر گونه‌های نزدیک از نظر هموژوی DNA تعدادی از باکتری‌های دیگر (بر اساس مقایسه و Blast انجام شده در GeneBank) انتخاب و با انجام PCR در حضور کنترل داخلی (Internal Control) ، عدم تشخیص تمامی باکتری‌های مشابه *Staph.aureus, Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes, E. coli* توسط این روش PCR نشان داده شد و اختصاصی بودن PCR برای لپتوسپیرا تائید گردید.

تائید محصول PCR: جهت تائید صحت محصول PCR از هضم بوسیله اندونوکلئازهای محدود کننده استفاده گردید. بدین منظور از آنزیم AluI جهت تائید محصول ۵۷۱bp و آنزیم MboI جهت تائید محصول ۲۸۵bp استفاده شد. در این روش محصول PCR بعد از خالص سازی در حضور ۲ واحد آنزیم‌های فوق به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا هضم آنزیمی کامل صورت پذیرد. امکان هضم آنزیمی محصول PCR خالص نشده هم بررسی گردید. الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز صورت پذیرفت و نمونه‌های حاصل از هضم آنزیمی نیز بر روی ژل آگارز بررسی گردید.جهت مشاهده باند از روش رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید جهت ژل‌های آگارز استفاده شد (۲۸،۲۷،۱۶،۵).

نتایج

جهت انتخاب پرایمر اولین خصوصیت پرایمر، سکانس صحیح آن جهت مکان مورد نظر برای تکثیر است. پرایمر G1/G2 جفت نواحی غیر کد کننده اختصاصی لپتوسپیرا انتخاب گردید. جهت افزایش حساسیت روش پرایمرهای ۵۹۰DIR۱/۵۹۰REV۲ برای نواحی تکرار شونده ژنوم انتخاب، تا حساسیت بالاتری در تشخیص بدست آید (شکل۱).

هر دو روش PCR قدرت تحمل خوبی در برابر غلظت‌های مختلف Mg^{2+} داشت و کیفیت محصول PCR از غلظت‌های ۰/۵ تا ۳/۵ میلی مول تغییر چندانی نمی‌نمود. مزیت این مسئله در امکان سنجش DNA هدف در غلظت‌های پائین تا بسیار بالا بدون اختلال در PCR و بدون نیاز به رقیق سازی می‌باشد (شکل ۴).

مجموع بررسی‌های فوق نشان دهنده تکرار پذیری در شرایط مختلف این دو روش PCR می‌باشد که جهت ارائه بصورت تست آزمایشی تشخیص لپتوسپیرای پاتوژن در سطح آزمایشگاههای مناطق درگیر می‌توان استفاده نمود. همچنین مشخص گردید که پرایمرهای ۵۹۰DIR۱/۵۹۰REV۲ حساسیت بالاتری از خود نشان دادند ولی در عین حال میزان رنگ زمینه (اسمیر) حاصله از آنها هم بیشتر است (شکل‌های ۲ و ۳). بررسی اختصاصی بودن این روش با استفاده از Blast در GeneBank و بررسی تمامی‌باکتری محتمل برای PCR مثبت با این پرایمرها در آزمایشگاه صورت پذیرفت، سویه‌های متعددی از باکتری‌ها از جمله *Staph.aureus, Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes, E.coli* بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت که هیچکدام PCR مثبت ایجاد ننمودند (شکل ۵).

تائید محصول PCR با RFLP صورت پذیرفت، دو آنزیم AluI و MboI بدین منظور انتخاب که AluI با هضم قطعه ۵۷۱bp در دو نقطه ایجاد سه قطعه ۹۲ و ۷۶ و ۴۰۳ نوکلئوتیدی باید بنماید که بر روی ژل آگارز قابل مشاهده است. و MboI محصول ۲۸۵ نوکلئوتیدی را در جایگاه ۱۹۸ بریده و ایجاد دو قطعه ۱۹۸ و ۸۷ نوکلئوتیدی می‌نماید (شکل ۶). جهت هضم آنزیمی‌ابتدا محصول PCR خالص گردیده و سپس هضم آنزیمی‌صورت پذیرفت. این دو آنزیم طوری انتخاب گردیده بود که شرایط عمل آن نزدیک به آنزیم Taq پلیمراز باشد تا جهت سهولت و سرعت عمل بیشتر بررسی امکان هضم آنزیمی‌مستقیم محصول PCR با افزودن آنزیم به تیوب PCR هم میسر باشد، موفقیت هضم آنزیمی‌مستقیم محصول PCR صحت و درستی انتخاب فوق را تائید نمود.

بحث

PCR برای شناسایی تعداد وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله آنهایی که از لحاظ کلینیکی حائز اهمیت هستند استفاده

شکل۱: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)
۱و۲- پرایمر۳ ، G1/G2و۴- ۵۹۰DIR۱/۵۹۰REV۲

www.SID.ir
Archive of SID

شکل۲: تعیین غلظت مناسب از پرایمر G1/G2 در واکنش PCR
۱ – ۱۰۰nM، و ۲ – ۲۰۰nM، و ۳ – ۳۰۰nM، و ۴ – ۴۰۰nM، و ۵ – ۵۰۰nM، و ۶ – ۶۰۰nM، و ۷ – ۷۰۰nM، و ۸ – ۸۰۰nM، و ۹ – ۹۰۰nM، و ۱۰ – ۱۰۰۰nM
ردیف وسط ۱۰۰ bp DNA Ladder می‌باشد

می‌گردد. حساسیت تست PCR طوری می‌باشد که دیگر نیاز به جداسازی و کشت ارگانیسم نمی‌باشد در نتیجه این روش، روش ایده آل برای شناسایی سریع ارگانیسم‌های درگیر در عفونت‌های حاد می‌باشد (۱۵).

ارزش عملی PCR برای تشخیص لپتوسپیروزیس به علت توان آن در شناسایی باکتری لپتوسپیرا در مراحل اولیه در افراد بیمار می‌باشد. لپتوسپیروزیس یک بیماری حاد بوده و به سرعت گسترش می‌یابد. بنابراین تشخیص زودرس و سریع آن اهمیت بسیاری در درمان آن دارد. روش‌های کنونی برای تشخیص بر مبنای روش‌های سرولوژیک MAT، IFA، ELISA و کشت و PCR می‌باشد (۱۸، ۱۹).

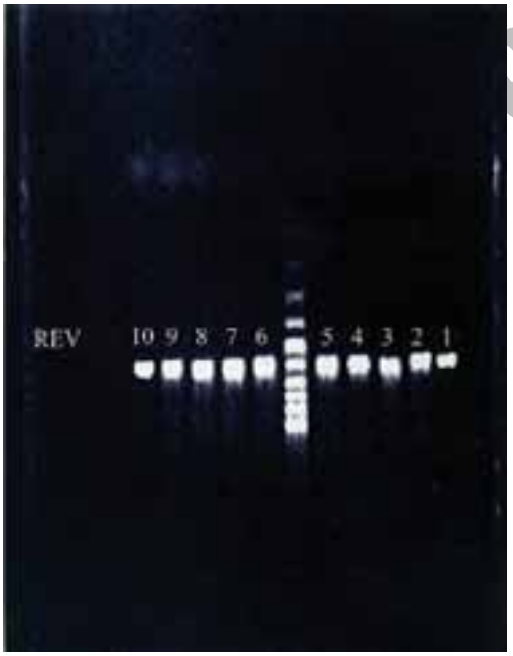
لازم به ذکر است که استفاده از روش‌های سرولوژیک نیاز به گذشت دوره زمانی بیماری و پاسخ ایمنی مناسب در بدن دارد از طرف دیگر روش‌های سرولوژیک موجود، وجود پادتن بر علیه لپتوسپیرا را نشان داده و وجود لپتوسپیرا را نمی‌توانند نشان دهند در حالی که PCR می‌تواند وجود لپتوسپیرا را حتی در روزهای اول آلودگی نشان دهد (۱۹، ۲۳). اولین گزارش موجود بدین منظور در سال ۱۹۸۹ توسط Van Eys انجام پذیرفت. در مطالعه‌ای که Brown در سال ۱۹۹۵ انجام داد نتیجه گرفت PCR می‌تواند لپتوسپیرا را در مراحل حاد عفونت لپتوسپیرایی نشان دهد و روش با ارزشی جهت تشخیص لپتوسپیروز در مراحل اولیه می‌باشد.

در این تحقیق سعی گردید با راه اندازی و طراحی PCR جهت تشخیص لپتوسپیرای پاتوژن امکان تشخیص زودرس لپتوسپیرا فراهم آید.

طبق نتایج بدست آمده می‌توان گفت این روش PCR روشی سریع و دقیق جهت شناسایی *L. interrogans* می‌باشد طوری که وجود گونه‌های پاتوژن با این روش به سرعت قابل ردیابی است. آزمایش PCR می‌تواند در مورد سایر نمونه‌ها چون خون و ادرار، علاوه بر سرم به‌کار رود. در این روش امکان اینکه در عین واحد تعداد زیادی از نمونه‌ها را بتوان آزمایش کرد وجود دارد (۲۰، ۲۶) توانایی PCR در تمایز بین گونه‌های لپتوسپیرایی پاتوژنیک و غیر پاتوژنیک، آزمایش نمونه‌های محیطی با منبع احتمالی بیماری انسانی را تسهیل می‌کند (۱۹).

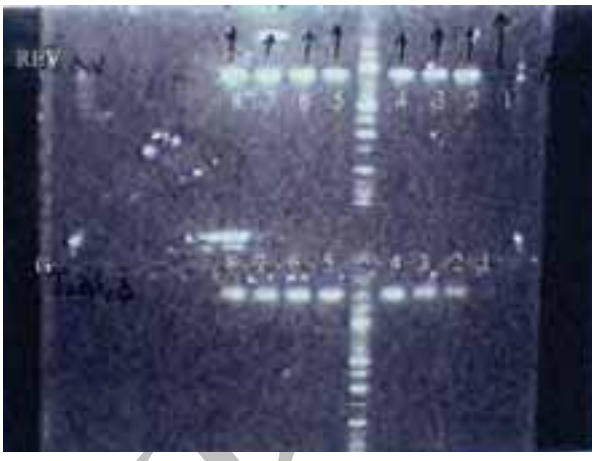
نتایج نشان داد که بهترین کیفیت DNA در استخراج با فنل،کلروفرم،ایزوآمیل الکل بدست آمد. این DNA در الکتروفورز بر روی ژل آگارز حداقل اسمیر را داشت و به صورت باند قوی بر روی ژل ظاهر می‌گردد. ظاهراً روش جذب DNA بر روی فیبرهای شیشه به‌دلیل ماهیت جذبی آن از طریق اتصالات الکترواستاتیک با جذب قطعات کوچک و بزرگ DNA بالاترین راندمان استخراج را دارد منتها میزان اسمیر آن به دلیل وجود قطعات کوچک بیشتر می‌باشد. در حالیکه به دلیل عدم امکان رسوب قطعات کوچک در روش فنل،کلروفرم،ایزوآمیل الکل DNA استخراج شده دارای راندمان کمتر ولی کیفیت و یکنواختی بیشتر است.

در این تحقیق غلظت‌های مختلفی از یون منیزیم در محلول PCR بکار گرفته شد. غلظت مناسب Mg^{2+} ، ۱/۵ mm بدست آمد. در غلظت‌های بالاتر منیزیم قدرت اتصال پرایمرها افزایش، در نتیجه اتصال پرایمرها به

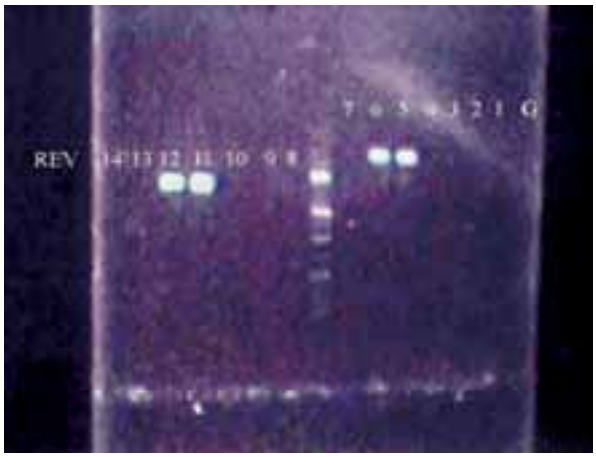


شکل۳: تعیین غلظت مناسب از پرایمر DIR1/REV2 در واکنش PCR
۱ – ۱۰۰nM، و ۲ – ۲۰۰nM، و ۳ – ۳۰۰nM، و ۴ – ۴۰۰nM، ۵ – ۵۰۰nM، و ۶ – ۶۰۰nM، وو۷ – ۷۰۰nM، و ۸ – ۸۰۰nM، و ۹ – ۹۰۰nM، و ۱۰ – ۱۰۰۰nM
ردیف وسط ۱۰۰ bp DNA Ladder می‌باشد

www.SID.ir



شکل۴: تعیین بهترین غلظتی از MgCl۲ برای هر دو جفت پرایمر G۱/G۲ و ۵۹۰REV۲/۵۹۰DIR۱
۰٫۵mm-۱، و ۱mm-۲، و ۱٫۲۵mm-۳، و ۱٫۵mm-۴،
۱٫۷۵mm-۵، و ۲mm-۶، و ۲٫۵mm-۷، و ۳mm-۸



شکل ۵: نتایج باکتریهای مورد استفاده در PCR
۱و۸- Staph، و ۲و۹- Bacillus، و ۳و۱۰- Listeria،
۴و۱۳- E.coli، و ۵و۱۱- Grippotyphosa،
۶و۱۲- Control positive، و ۷و۱۴- Control negative

شکل ۶: تائید محصول PCR با RFLP
۱- Mbo۱، و ۲- کنترل، و ۳- Alu۱، و ۴- کنترل

سکانس هدف و اتصال غیر اختصاصی نیز افزایش می‌یابد و پرایمردایمر نیز ایجاد می‌گردد که باعث می‌شود تا پرایمرها با خودشان به صورت دوتایی اتصال یابند. در غلظت‌های کم (۰/۵ mm) مورد استفاده هیچ باند و محصول PCRای ایجاد نگردید وجود یون منیزیم برای فعالیت آنزیم Taq DNA Polymerase نیز ضروری است (۱۶).

در سال ۱۹۹۴ Savio و همکارانش غلظت‌هایی از Mg^{2+} (۰/۵ mm تا ۳ mm) را مورد بررسی قرار دادند و بهترین غلظتی که انتخاب شد، ۱/۵ mm بود. همچنین Veloso و همکاران در سال ۲۰۰۰ غلظتی از منیزیم که جهت PCR استفاده نمودند ۲ mm بود. یون منیزیم یکی از فاکتورهای مهم جهت ورود صحیح و جایگزین شدن نوکلئوتیدها در زنجیره DNA است زیرا یون منیزیم با نوکلئوتیدها ترکیب و کمپلکس محلولی را تولید می‌نماید که یک نیاز اساسی جهت ورود و جایگزین شدن آنها در زنجیره DNA است (۲۲).

توالی DNA انتخاب شده اختصاصی لپتوسپیرا بود. با توجه به اینکه شانس وجود داشتن اتفاقی یک توالی در مولکول DNA از رابطه 4^n محاسبه می‌گردد (n= تعداد نوکلئوتیدها) و پرایمرهای مورد استفاده در اینجا ۲۰ mer بوده‌اند این شانس معادل ۱ در ۱۱۰ Gbp می‌باشد. کل ژنوم لپتوسپیرا حدود ۵Mbp می‌باشد. احتمال تکرار تصادفی این توالی تقریباً معادل صفر می‌باشد (۱۳،۱۱). جهت بررسی شباهت این پرایمر با توالی باکتری‌های دیگر، به صورت عملی با برنامه BLAST بانک ژن نیز بررسی گردید. به طور کلی هیچ ژنومی‌غیر از لپتوسپیرا پاتوژن با این پرایمرها همولوژی کامل نداشتند ولی تعدادی از باکتریها که دارای همولوژی نسبی بودند انتخاب گردید. باکتری‌ها شامل *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* بود که از بانک میکروبی موسسه رازی تهیه و سپس با کشت و استخراج DNA از آنها PCR صورت گرفت که هیچکدام با این روش PCR قابل تشخیص نبودند.

پرایمرهای G۱ و G۲ به ترتیب از انتهای ۵′ و انتهای ۳′ توالی پلاسمید

Archive of SID
www.SID.ir

نوترکیب PLIPS۶۰ طراحی گردیده است. این پلاسمید حاوی قطعه‌ای از DNA اختصاصی لپتوسپیرا می‌باشد. مطالعات دو رگه سازی نشان داده است که این قطعه DNA اختصاصی برای گونه‌های متعددی لپتوسپیرای پاتوژن بوده و به کمک PCRهای طراحی شده برای آن حداقل ۶ گونه لپتوسپیرا قابل شناسایی می‌باشد *(L.interrogans, L.weilii, L.borgpetersenii, L.noguchii, L. santarosai, L. meyeri)* (۸). پرایمرهای DIR۱-۵۹۰ و REV۲-۵۹۰ برای گسترش فرگمنت e اختصاص داده شدند که متشکل از یک توالی تکراری بوده و این توالی تنها در سروارهای لپتوسپیرا پاتوژن قابل مشاهده می‌باشد. این پرایمرها بر اساس یک توالی گزارش شده از *L. interrogans serovar hardjo type hardjoprajitno* طراحی گردیده است (۱۷).

تکنیک آنالیز آنزیمی‌محدود کننده (REA)، روشی روتین جهت شناسایی و تائید محصول PCR است. در این تکنیک با استفاده از PCR می‌توان بخش مورد نظر از DNA را تکثیر و سپس هضم آنزیمی(Restriction Analysis) را بر روی محصول انجام داد. مشخصا هضم آنزیمی‌محصول PCR با آنزیم‌های محدود کننده، تائیدی بر حضور محصول صحیح تکثیر شده می‌باشد. قطعات تکثیر شده در PCR را می‌توان از طریق HPLC خالص نمود ولی به دلیل پیچیدگی و گرانقیمت بودن، روشی متداول به خصوص جهت تعداد زیادی از نمونه‌ها نمی‌باشد (۱۷، ۲۷، ۲۹).

در این تحقیق تائید محصول PCR با RFLP صورت پذیرفت، دو آنزیم AluI و MboI بدین منظور انتخاب شدند. آنزیم AluI با هضم قطعه ۵۷۱ bp در دو نقطه ایجاد سه قطعه ۹۲، ۷۶ و ۴۰۳ نوکلئوتیدی نمود که برروی ژل آگارز ۲/۵ یا ۳ درصد قابل مشاهده است. و آنزیم MboI محصول ۲۸۵ نوکلئوتیدی را در جایگاه ۱۹۸ بریده و ایجاد دو قطعه ۱۹۸ و ۸۷ نوکلئوتیدی می‌نماید. نتایج حاصل درستی آزمایش فوق را تائید می‌نماید.

منابع مورد استفاده

۱ - وندیوسفی جلیل، ۱۳۷۳؛ یافته‌های تازه پیرامون لپتوسپیروز در مؤسسه رازی، مجله پژوهش وسازندگی، شماره ۲۵، صفحه ۷۲ الی ۷۵.

۲ - وندیوسفی جلیل، ۱۳۷۸؛ تهیه واکسن سه ظرفیتی لپتوسپیرا، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی جهاد سازندگی.

3- Brown,C.A., A.W.Roberts, M.A.Miller, D.A.David, S.A.Brown, C.A.Bolin, J.Jarecki-Black, C.E.Greene, and D.Miller-Liebl.1996; *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa infection in dogs. J. Am.Vet. Med. Assoc. 209:1265-1267.

4- Brown,P.D., C.Gravekamp, D.G.Carrington, H.Van de Kemp, R.A.Hartskeerl, C.N.Edwards, C.O.R.Everard, W.J.Terpstra, and P.N.Levett. 1995; Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis .J. Med. Microbiol.43:110-114.

5- Brown,P.D., and P.N.Levett.1997; Differentiation of Leptospira species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. J. Med. Microbiol. 46:173-181.

6- Faber,N.A., M.Crawford, R.B.Lefever, N.C.Buyukmihci, J.E.Madigan, and N.H.Willits.2000; Detection of Leotospira spp. In the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. J. Clin. Microbiol. 38:2731-2733.

7- Faine,S.1994. Leptospira and leptospirosis. CRC Press, Boca Raton, Fla. Fine,S.1988; Leptospirosis p.344-352. In A.Balows, W.J.Hausler, M.Ohashi, and A.Turano (ed.), Laboratory diagnosis of infections diseases: principles and practice, vol.1. Springer-Verlag, New York, N.Y.Faine, S.,B.Adler, C.Bolin, and P.Perolat.1999. Leptospira and leptospirosis, 2 nd ed. MedSci, Melbourne, Australia.

8- Gravekamp,C., H.van de Kemp, D.Carrington, G. J. J. M. van Eys, C.O.R.Everard, and W.J.Terpstra.1991; Detection of leptospiral DNA by PCR in serum from patients with copenhageni infections, p.151-164. In. Y. Kobayashi (ed.). Leptospirosis. proceedings of the Leptospirosis Research conference 1990.University of Tokyo press, Tokyo. Japan.

9- Gravekamp,C., H.van de Kemp, M.Franzen, D.Carrington, G.J.Schoone, G.J.J.M.van Eys, C.O.R.Everard, R.A.Hartskeerl, and W.Jterpstra.1993; Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J. Gen. Microbiol. 139:1691-1700.

10- Guidugli,F., A.A.Castro, and A.N.Atallah.2000; Antibiotics for preventing leptospirosis (Cochrane Review), Cochrane Library, issue 4. Update Software. oxford, U.K.

11- Kee,S.H., I.K.Kim, M.S.Choi, and W.H.Chang.1994; Detection of leptospiral DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 32: 1035-1039.

12- Kelley,P.W.1998; Leptospirosis, P.1580-1587. In S.L.Gorbach, J.G.Bartlett, and N.R.Blacklow (ed.), Infectious diseases. 2 nd ed.W.B.Saunders, Philadelphia, Pa.

13- Masri,S.A., P.T.Nguyen, S.P.Gale, C.J.Howard, and S.C.Jung.1997; A polymerase chain reaction assay for the detection of Leptospira spp.in bovine semen. Can. J. Vet. Res. 61:15-20.

14- Merien, F., G.Baranton, and P.Perolat.1995; Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J. Infect. Dis. 172:281-285.

15- Levett. Paul N.2001; Leptospirosis. Clin. Microbiology. Reviews. P: 296-326.

16- Sambrook. Joseph, Russel. David W. 2001; Molecular cloning a laboratory manual.

17- Savio,M.L., C.Rossi P.Fusi, S.Tagliabue, and M.L.Pacciaarini.1994; Detection and identification of Leptospira interrogans serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J. Clin. Microbiol.

Archive of SID

www.SID.ir

32:935-941.
18- Smythe,L., M.Dohnt, M.Symonds, L.Barnett, M.Moore, D.Brookes, and Vallanjon.2000; Review of leptospirosis notification in Queensland and Austealia: January 1998-June 1999. Commum. Dis. Intell. 24:153-157.
19- Smjthe, L., Ina L. Smith, Greg A. Smith, Michacl F. Oohnt, Meegan L. Symands Leonie J. Barnett and Oavid B. mckaj. .2000; A quantitative PCR (Taq Man) assay for pathogenic Leptospira sp. WHO/FAO/OIE collaborating center for Reference and Research on Leptospira, Brisbane, Australia. P:1-22.
20- Veloso,I.M.Lopes, C.Salas, and E.Moreira.2000; A comparison of three DNA extractive procedures with Leptospira for polymerase chin reaction analysis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95:339-343.
21- Wagenaar,J., R.L.Zuerner, D.Alt, and C.A.Bolin.2000; Comparison of polymerase chin reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. Am. J. Vet. Res. 61:316-20.
22- Woo,T.H.S., B.K.C.Patel, L.D.Smythe, M.A.N.Norris, M.L.Symonds, and M.F.Dohnt 1997; Comparison of two PCR methods for rapid identification of Leptospira genospecies interrogans. FEMS Microbiol. Lett. 155:169-177
23- World Health Organization.2000; Leptosirosis, India: Report of the investigation of a post-cycline outbreak in Orissa, Novermber 1999. Wkly. Epidemiol. Rec. WHO 75:217-223.
24- World Health Organization.1999. Leptosirosis wworld,1999; wkly. Epidemiol. Rec. 74:237-242.
25- Yersin,C., P.Bovet, H.L.Smits, and P.Perolat.1999; Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptosirosis in the Seychlles. Trop . Med.Int. Health 4:38-45.
26- Zuerner,R.L., and C.A.Bolin.1997; Differntiation of Leptospira interrogans isolates by Is 1500 hybridization and PCR assays.I. Clin. Microbiol. 35:2612-2617.
27- Zuerner,R.L., and C.A.Bolin.1990; Nucleic acid probe characterizes *Leptospira interrogans* serovars by restriction fragment lengh polymorphisms. Vet. Microbiol. 24:355-366.
28- Zuerner,R.L., W.A.Ellis, C.A.Bolin, and J.M.Monotgomery.1993; Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersnii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. J. Clin. Microbiol. 31:578-583.
29- Zuerner,R.L., J.L.Herrman, and I.Saint Girons.1993; Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. L. Bacteriol. 175:5445-5451.

Archive of SID

www.SID.ir