مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی
JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH
سال اول، شماره سوم، تابستان ۱۳۸۹
صفحات ۱۶۰-۱۵۳

تعیین میزان شیوع لپتوسپیرا در جنین های سقط شده گاوداریهای استان تهران به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز

آریا بدیعی[۱]، فرهاد موسی خانی*[۲]، محمد ملکان[۳]، محسن ظفری [۴]

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۴- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

*fmosakhani@kiau.ac.ir **

چکیده

لپتوسپیروزیس یک بیماری زئونوز بوده که از طریق ایجاد عوارضی مانند سقط، مرده زایی، ناباروری، کاهش تولید شیر و... می تواند خسارات اقتصادی سنگینی به بار آورد. در این تحقیق تعداد ۲۵۱ نمونه جنین سقط شده ارجاعی از گاوداریهای صنعتی استان تهران به آزمایشگاه در مدت یکسال مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های مورد آزمایش شامل مخلوطی هموژن از بافتهای قلب، کلیه، کبد و طحال جنین بود. جهت استخراج DNA از روش پروتئیناز K استفاده شد. سپس آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن s r RNA 16 جهت شناسایی جنس لپتوسپیرا (.Leptospira Spp) انجام گرفت.. پس از PCR نمونه های دارای باند bp331 در ژل الکتروفورزیس مثبت قلمداد گردیدند. شیوع تقریبی سقط جنین ناشی از لپتوسپیروزیس در استان تهران بطور میانگین در طول سال ۱۲/۸٪ و براساس فصل به ترتیب در بهار ۱۵٪، تابستان ۹/۰۸٪، پائیز ۱۰٪ و زمستان ۱۹/۲٪ بود. بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین شیوع در فصول بهار و زمستان می باشد که احتمالا ناشی از رطوبت بالاتر محیط و آبدوست بودن لپتوسپیرا و فعالیت بیشتر باکتری است. بطور کلی با توجه به میانگین شیوع ۱۲/۸ درصدی، یکی از مهمترین عوامل سقط در گاوداریهای صنعتی استان تهران لپتوسپیرا می باشد؛ در نتیجه اقدام جهت کنترل و ریشه کنی این بیماری با توجه به زئونوز بودن و خسارات اقتصادی سنگین، بسیار ضروری است.

واژه های کلیدی: لپتوسپیروز، سقط جنین، واکنش زنجیره ای پلیمراز، ناباروری، کاهش تولید شیر

Archive of SID

www.SID.ir

Prevalence of Leptospira spp. In bovine aborted fetuses of dairy cattle herds by PCR in Tehran province

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res.1(3)153-160,2010

Badii, A.[1], Mousakhani, F.[2*], Malekan, M.[3], Zafari M.[3]

1- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University karaj Branch, karaj-Iran

2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Karaj Branch, karaj-Iran

3- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine ,Islamic Azad University Karaj Branch, Karaj-Iran

[*] ***Corresponding author:*** *fmosakhani@kiau.ac.ir*

Leptospirosis is a zoonotic disease that can cause heavy economic losses through complications including abortion, stillbirth, infertility, reduced milk production, etc. In this study, 251 referred samples of aborted fetuses in industrial dairy herds of Tehran province evaluated in MABNA laboratory during one year. Tested samples included a homogenous tissue mixture of fatal heart, kidney, liver and spleen. For DNA extraction, the Proteinase K Method was used. Then polymerase chain reaction (PCR) was performed to recognize Leptospira Spp. by using specific 16s rRNA gene primers. Samples with 331bp band in electrophoresis gel were considered positive. Prevalence of leptospiral abortion in average was 12.8 % in Tehran province during a year and based on season, respectively, the amount in spring was 15%, summer 9.08 %, autumn 10 % and winter 19.2 %. Based on these results, it was most prevalent in spring and winter that is probably due to higher environmental humidity, hydrophilic nature of leptospira and more bacterial activities. Generally according to the prevalence of 12.8 %, the major cause of abortion in Tehran province in industrial dairy herds is leptospiral infection so that any activities in order to eradicate and control the disease is essential.

Key words: Leptospirosis, Abortion, PCR, Infertility, Reduced milk production

مقدمه

لپتوسپیروزیس توسط یک اسپیروکت پاتوژن از جنس لپتوسپیرا ایجاد می شود (۲۱). لپتوسپیراها علاوه بر آلوده کردن جمعیت

Archive of SID

www.SID.ir

انسانی و ایجاد عارضه های متفاوت، همواره به عـنوان یکی از معضلات صنعت دامـپروری نیز مطـرح می باشند (۲۲ و ۱۱ و ۳). این بیماری عموما در سراسر دنیا و از جمله در ایران شیوع دارد. این باکتری می تواند از طریق پوست آسیب دیده پاها و همچنین غشاهای مخاطی دهان، حلق، بینی و چشم وارد شود (۲۲). اهمیت ویژه این بیماری در ایجاد عوارض تولید مثلی از جمله سقط، مرده زایی، ناباروری و حتی کاهش تولید و مرگ می باشد که میتواند ضررهای اقتصادی زیادی را به همراه داشته باشد (۲۲ و ۹ و ۸ و ۲۱). این بیماری تک گیر بوده و عموما سقطها در دامهایی که در نیمه دوم آبستنی هستند روی می دهد (۲۳). از لحاظ بالینی، تشخیص به دلیل داشتن نشانیهای غیر اختصاصی مشکل می باشد (۲۲). به منـظور تشـخیص این بیمـاری می توان از تسـت آگلوتیناسـیون میکـروسکوپـیک (Microscopic Agglutination Test) استفاده نمود ولی به دلیل تاثیر عوامل مختلف در این روش می تواند جوابهای مثبت و منفی کاذب ایجاد نماید (۲۲ و ۲۱). میتوان از روشهای کشت مستقیم هم برای تشخیص این بیماری استفاده نمود ولی بزرگترین مشکل این روشها زمانبر بودن و خطرناک بودن آنهاست (۱۷ و ۲۰ و ۱۰ و ۱۲ و ۱۳).

از زمان مطرح شدن واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)، به عنوان یک روش تشخیصی سریع و دقیق، مقالات متعددی به منظور استفاده از این روش در تشخیص بیماری لپتوسپیروزیس به چاپ رسیده است (۱۲ و ۱۶ و ۱۴ و ۱۵ و ۲۴).

در مقاله حاضر سعی بر آن شده است که با استفاده از روش PCR، علاوه بر شناسایی جنس لپتوسپیرا در جنینهای سقط شده، میزان شیوع تقریبی سقط ناشی از لپتوسپیروز در سطح دامداریهای استان تهران بررسی شود.

مواد و روش کار

در این تحقیق تعداد ۲۵۱ نمونه از جنینهای سقط شده ارجاعی به آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. پس از کالبد گشایی جنینها بخشی از کلیه، طحال و کبد آنها جدا شده و مورد استفاده قرار گرفتند (۲۲). سپس نمونه های بافتی جمع آوری شده از هر جنین در یک هاون استریل قرار داده و کاملا هموژن گردیدند. مخلوط هموژن بدست آمده تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۲).

DNA تمام نمونه های بدست آمده بوسیله پرتکل پروتئیناز K بگونه ایی که در ذیل شرح داده خواهد شد، استخراج شدند. در این روش ۲۰۰ mg از سوسپانسیون بافتی را در میکروتیوب PCR grade قرار داده شد. سپـس ۴۰۰ lμ از بافر لایـز کننـده (100mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH=7.4) که همراه SDS ۱٪ و ۴۰۰ lμ پروتئیناز K است را به سوسپانسیون بافتی اضافه نموده و به مدت یک شب در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد (۱۱). سپس توسط فنل/کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به نسبت حجمی ۱:۲۴:۲۵ جداسازی و استخراج انجام گرفت و محصول نهایی توسط اتانول رسوب داده شد (۱۱). در نهایت DNA استخراج شده و رسوب کرده را با ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل، هموژن نموده و سوسپانسیون بدست آمده برای انجام مراحل بعدی استفاده شد.

بمنظور شناسایی جنس لپتوسپیرا (Leptospira spp.) از ژن s rRNA 16 باکتری استفاده شد (۱۸).(جدول ۱)

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده (۱۹)

Lept1	5›-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3›
Lept2	5›-TTCCCCCCATTGAGCAAGATT-3›

مخلوط واکنش بر اساس حجم کلی ۵۰ lμ بگونه ایی تنظیم گردید که شامل ۲۰۰ Mμ داکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTP)، ۵۰ mM KCl، ۱۰ mM Tris-HCl (pH =۹)، mM، ۱/۵ $MgCl_2$، ۰/۵ Mμ از پرایمر Lept 1 و Lept 2 و ۱/۵ U از آنزیم دی ان ای پلیمراز (Taq DNA polymerase) و ۵ lμ آب مقطر ultra pure باشد (۱۸). در کنار نمونه های مورد آزمایش کنترل منفی و کنترل مثبت نیز در نظر گرفته شدند (۱۸). سوش

Archive of SID

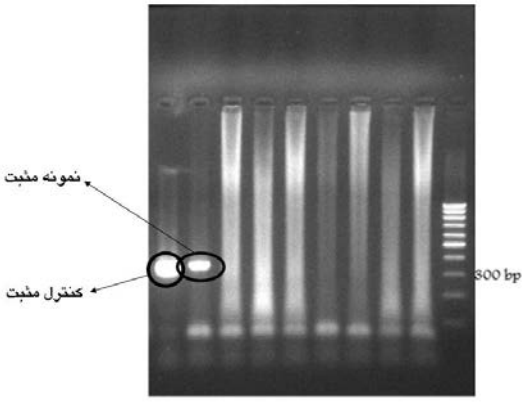
www.SID.ir

باکتری مورد استفاده به عنوان کنترل مثبت، سوش لپتوسپیرا اینتروگانس سروووار هارجو از مرکز تحقیقات لپتوسپیرای ایران (وابسته به دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) تهیه شد و پس از کشت و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و تائید نهایی در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۲: شرح برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر

مراحل	دما (درجه سانتیگراد)	زمان
Initial Denaturation	۹۴	۳ دقیقه
Denaturation	۹۴	۳۰ ثانیه
Annealing	۶۰	۳۰ ثانیه
Extension	۷۲	۳۰ ثانیه
Final Extension	۷۲	۷ دقیقه

به منظور الکتروفورز و مشاهده باندها، پس از ریختن نمونه ها (loading) در داخل ژل آگارز ۱,۵ درصد، ژل در معرض جریان برق ۱۱۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه قرار گرفت. در انتها با استفاده از



تصویر ۱: باندهای نمایان شده در ژل الکتروفورزیس

نتایج

در تحقیق حاضر در شرایط متوسط بارش سالانه ۲۸۲ میلی متر (از ابتدای تیرماه سال ۱۳۸۸ تا انتهای خرداد ماه سال ۱۳۸۹) از ۲۵۱ نمونه جنین سقط شده مورد آزمایش تعداد ۳۲ نمونه لپتوسپیرا مثبت بودند.($\alpha \leq ۰,۰۵$)

مخلوط واکنش بدست آمده در دستگاه ترموسایکلر با برنامه ذیل قرار داده و تعداد ۳۵ سیکل انجام شد (۱۸). (جدول ۲)

نور فرا بنفش محصولات بدست آمده نمایان شدند. باندهایی که دارای bp331 بودند به عنوان مثبت قلمداد گردیدند (تصویر ۱).

شیوع تقریبی سقط جنین بر اثر جنس لپتوسپیرا در فصل بهار ۱۵٪، تابستان ۹,۱۸٪، پائیز ۱۰٪ و زمستان ۱۹,۲٪ بودند (جدول ۳ و نمودار ۱).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۳: درصد شیوع بیماری لپتوسپیرا در جنینهای سقط شده براساس ماه، فصل و سال

فصل	بهار			تابستان			پائیز			زمستان		
ماه	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	مرداد	شهریور	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند
درصد شیوع	٪۰	٪۲۰/۸	٪۱۵/۳	٪۸/۱	٪۹/۶	٪۹/۳	٪۷/۶	٪۱۰	٪۱۳/۳	٪۲۵	٪۲۶/۶	٪۱۴/۲
درصد شیوع در فصل	٪۱۵			٪۹/۱۸			٪۱۰			٪۱۹/۲		
درصد شیوع سال	٪۱۲/۸											

بحث

شیوع بیماری لپتوسپیروز در سالها و در مکانهای جغرافیایی مختلف متفاوت است. نکته کلیدی در شیوع این بیماری وجود رطوبت و شرایط مناسب برای بقای آن می باشد (۷ و ۲۳).

الیس و همکاران در سال ۱۹۸۵ در ایرلند شمالی بررسی گسترده ایی از لحاظ سرولوژیکی و هیستولوژیکی بر روی سروار هارجو لپتوسپیرا در جنینهای سقط شده و گاوهای سقط کرده انجام دادند که نتیجه آن شیوع ٪۶۸,۷ لپتوسپیروز بود (۲۳). همچنین در تحقیق دیگری که ا لیس و همکاران در سال ۱۹۸۴ بر روی ۴۷۲ جنین سقط شده انجام دادند، مشخص گردید که ٪۵۶ از آنها در اثر لپتوسپیروز بوده است (۲۳). با مقایسه نتایج بدست آمده در ایرلند شمالی و نتایج حاصله در استان تهران کاملا مشخص است که ما به دلیل داشتن آب و هوایی گرم و خشک و میزان بارش سالانه خیلی کم شیوع بسیار پائینتری را نسبت به آن کشور دارا باشیم. همچنین سیستم دامپروری هم به احتمال زیاد در شیوع بسیار تاثیرگذار است بگونه ایی که ایرلند شمالی به دلیل دارا بودن سیستم چرای آزاد و دسترسی بیشتر دامها به برکه های آبهای راکد شیوع بیشتری را نسبت به سیستم دامپروری گله ایی ما در استان تجربه نموده است.

پرسکات و همکاران در سال ۱۹۸۹ تحقیقی را در آنتاریوی کانادا ترتیب دادند که بر اساس آن مشخص گردید ٪۶ سقط ها در اثر لپتوسپیروز بوده است (۷). با بررسی تحقیق پرسکات میتوان به این نتیجه دست یافت که کانادا به دلیل داشتن آب و هوای سرد، شرایط مناسبی برای بقا و رشد لپتوسپیرا ندارد این در حالیست که در استان تهران به دلیل داشتن زمستان معتدل در سال ۸۸ ما شیوع بالاتری داشتیم.

کرکبرد و همکاران در سال ۱۹۸۹ تحقیق دیگری بر روی شیوع سقط ناشی از لپتوسپیروز در ایالات متحده ترتیب دادند و ٪۱۰ سقطها را ناشی از این بیماری اعلام نمودند (۷). نکته قابل توجه در بررسی نتایج حاصله در تحقیق کرکبرد و مقایسه آن با نتایج بدست آمده در استان تهران

Archive of SID

www.SID.ir

وجود درصد نسبتا مشابه در وقوع سقطهای لپتوسپیرایی است که احتملا ناشی از سیستم مشابه دامپروری (سیستم گله ایی) در هر دو ناحیه است..

.قاسمی کیا در سال ۱۳۸۸ از شیر تانک ۱۶۹ گله در استان تهران نمونه گیری کرده و با روش الایزای غیر مستقیم شیوع سرولوژیکی سرووار هارجو را ۲۴/۲۶٪ بیان نمود (۵). حسنپور و همکاران در سال ۱۳۸۶ بیشترین آلودگی سرولوژیکی ناشی از لپتوسپیروز را در دامداریهای اطراف تبریز به ترتیب در فصول زمستان ۳۴/۷٪ و پائیز ۳۲/۷٪ گزارش نمودند. (۲). حاجیگلایی در سال ۱۳۸۴ با بررسی سرواپیدمیولوژی لپتوسپیروز در اهواز بیان نمود که ۵۳/۷۹٪ از نمونه ها حداقل به یک سروتیپ لپتوسپیرا آلوده بودند. (۱) سخایی در سال ۱۳۸۶ از مجموع ۳۸۰ نمونه سرومی اخذ شده، شیوع لپتوسپیروز را در دامداریهای اطراف تهران با استفاده از الایزا ۲۲/۳۷٪ اعلام نمود. (۴) کیخسروی در سال ۱۳۸۸ از مجموع ۲۱۸ نمونه سرمی از دامداریهای شهرستان سبزوار شیوع سرمی لپتوسپیروز را ۱۰/۵٪ اعلام نمود(۶). نتایج حاصل از تحقیق قاسمی کیا و سخایی ارتباط خاصی میان شیوع سرولوژیک لپتوسپیرا و سقط جنین ناشی از آن بیان میکند، بگونه ایی که در تحقیق قاسمی کیا بیشترین زمان شیوع در استان تهران مربوط به زمستان بوده درحالیکه بیشترین شیوع سقط جنین ناشی از لپتوسپیروز نیز در این فصل اتفاق افتاده است. با مقایسه سرواپیدمیولوژی شهرستان اهواز و شیوع سرولوژیکی و شیوع سقط جنین ناشی از لپتوسپیروز در استان تهران میتوان شیوع بالاتر اهواز را به شرایط آب و هوایی گرم و شرجی آن نسبت داد. همچنین در ارتباط با شیوع سرمی لپتوسپیروز در شهرستان سبزوار و مقایسه آن با استان تهران میتوان بیان داشت که شهرستان سبزواور به دلیل داشتن آب و هوای گرم و خشکتر نسبت به استان تهران شیوع پائینتری را دارا می باشد. با مقایسه نتایج بدست آمده توسط حسنپور و همکاران که شیوع سرولوژیک بیشتری را در فصول پائیز و زمستان در تبریز بیان نمودند با نتایج حاصل از سقط حداکثری در فصول پائیز و زمستان در استان تهران، میتوان بیان نمود که دلیل احتمالی آن افزایش میزان رطوبت در فصول یاد شده و همچنین کاهش کیفیت بستر (تجمع آب در بهاربندها) می باشد.

در پایان با بررسی نتیجه حاصله از تحقیق حاضر می توان بیان نمود که جنس لپتوسپیرا با شیوع ۱۲٪ نقش عمده ایی در شیوع سقط جنین در استان تهران به عهده داشته و جهت شناسایی لپتوسپیروز در جنین روش PCR با ارزش و کاربردی می باشد.

منابع

۱- حاجیگلایی، م.، قربانپور نجف آبادی، م.، عبدالله پور، غ.، ۱۳۸۴، بررس سرولوژیکی لپتوسپروز در گاوهای اهواز، مجله تحقیقات دامپزشکی، سال شصتم، شماره ۲۳۷ (۱)، صفحات ۱۴-۷

۲- حسنپور، ع.، فرتاشوند، م.، عبدالله پور، غ.، مقدم، غ.، نادعلیان، م.، ۱۳۸۶، تعیین میزان شیوع سرولوژیک آلودگی به لپتوسپیرا در گاوداری های شهری اطراف تبریز، فصلنامه پژوهش و سازندگی، سال نوزدهم، شماره ۷۴ (۲)، صفحات ۶۷-۶۷۰

۳- حسنی طباطبایی ع، فیروزی ر (۱۳۸۴)، بیماریهای باکتریایی دام، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، ایران، ۴۴۰-۴۳۱

۴- سخایی، ا.، بررسی سرو باکتریولوژیک لپتوسپیروز در گاوهای آلوده دامپروریهای اطراف تهران (پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ۱۳۸۵)، صفحه ۸

۵- قاسمی کیا، م.، بررسی میزان شیوع سرولوژیکی باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس سرووار هاردجو در شیر تانک گاوداریهای استان تهران (پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ۱۳۸۸)، صفحه ۷

www.SID.ir

۶- کیخسروی، م.، بررسی سرواپیدمیولوژی لپتوسپیروز در گاوداریهای صنعتی شهرستان سبزوار، (پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ۱۳۸۸)، صفحه ۶

7-Arthur G., Noakes D., Pearson H., Parkinson T. (1996), veterinary reproduction and obstetrics, 7th ed., WB saunders co., Great Britain,408-410

8-Dhaliwal G.S., Ellis R.D, (1996), Reproductive performance of dairy herds infected with Leptospira interrogans serovar hardjo relative to the year of diagnosis, Veterinary Record, 138: 272–276

9-Ellis W.A., O'Brien J.J., Neill S.D.,. Ferguson H.W, Hanna J (1982), Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted foetuses, Veterinary Record, 110: 147–150

10-Faine, S., (1982) Guidelines for the Control of Leptospirosis. WHO, Geneva, 67, 171.

11-Fearnley C., Wakeley P., Gallego-Beltran J. (2008), The development of a real-time PCR to detect pathogenic Leptospira species in kidney tissue, Research in Veterinary Science, 85(1) 8-16

12- Gerritsen M.J., Olyhoek T., Smits M.A. and Bokhout B.A.(1991) Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of Leptospira interrogans serovar hardjo subtype hardjobovis in bovine urine. Journal of clinical microbiology, 29: 2805–2808

13-Heinemann M., Fernando Garcia F, Nunes C.M. (2000) Detection and defrentiation of leptospire spp. Serovars in bvine semen by pcr and rflp, Veterinary Microbiology, 73 (4) 261-267

14-Heinemann M.B., Garcia J.F., Nunes C.M., Moraes Z.M., Gregori F. (1999) Detection of leptospires in bovine semen by polymerase chain reaction. Austerialian veterinary journal, 77: 32–34

15-Heinemann M.B., Garcia J.F., Nunes C.M., Moraes Z.M., Gregori F.(2000) Detection and differentiation of Leptospira spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Veterinary microbiology, 73: 261–267

16-Kee S.H., Kim I.S., Choi M.S., Chang W.H. (1994) Detection of leptospiral DNA by PCR. Journal of Chinese microbiology, 32: 1035–1039

17-Kirkbride, C.A.. (1990) Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion. Iowa State University Press, Ames, IA, 260.

18-Lilenbaum W., Varges R., Ristow P., Cortez A., Souza S.O.(2009) Identification of Leptospira spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction, Research in Veterinary Science,87 (1) 16-19

19-Mérien F., Amouriaux P, Perolat P., Baranton G., Saint Girons I. (1992) Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples Journal of clinical microbiology, 30: 2219–2224

20-Nielsen, K.H., Duncan, J.R. (1990) Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton, FL, 453

21-Quaresma Bomfim M., Barbosa-Stancioli F, Cota Koury M. (2008) Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR, The Veterinary Journal, 178(2) 251-256

22-Richtzenhain L., Cortez A., Heineman M., Soares R. (2002) A multiplex PCR for the detection of Brucella spp. and Leptospira spp. DNA from aborted bovine fetuses, Veterinary Microbiology, 87(2) 139-147

23- Roberts S. (1991) veterinary obstetrics and genital diseases, 3th ed., Woodstock, USA, 131-134

24-Romero C., Pardo M., Grillo M.J., Diaz R., Blasco J.M.,López-Goni I.(1995) Evaluation of PCR and indirect

Archive of SID

www.SID.ir

enzyme-links immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle, Journal of clinical microbiology, 33: 3198–3200

25-Savio M.L., Rossi C., Fusi P., Tagliabue S. and. Pacciarini M.L. (1994) Detection and identification of Leptospira interrogans serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA.. Journal of clinical microbiology, 32: 935–941

26-Van Eys G.J.J.M., Gravekamp C., Gerritsen M.J., W. (1989) Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction, Journal of clinical microbiology. 27: 2258–2262

27-Woodward M.J. and Redstone J.S. (1991) Differentiation of Leptospira serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Veterinary Research, 132: 325–326

28-Woodward M.J., Sullivan J., Palmer N.M.A., Woolley J.C. and Redstone J.S. (1991) Development of a PCR test specific for Leptospira hardjo genotype bovis. Veterinary research, 128: 282–283

Archive of SID

www.SID.ir