

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



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

سال اول، شماره سوم، تابستان ۱۳۸۹

صفحات ۱۶۰-۱۵۳

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@kiaui.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 هموزن از بافتهای قلب، کلیه، کبد و طحال جنین بود. جهت استخراج DNA از روش پروتئیناز K استفاده شد. سپس آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن sr RNA 16 جهت شناسایی جنس لپتوسپیروا (*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 ۹/۸٪، پاییز ۱۰٪ و زمستان ۱۹/۲٪ بود. بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین شیوع در فصول بهار و زمستان می باشد که احتمالاً ناشی از رطوبت بالاتر محیط و آلودست بودن لپتوسپیروا 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 لپتوسپیروا 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 پلیمرز، ناباروری، کاهش تولید شیر

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@kiaiu.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

لیتوسپیروزیس توسط یک اسپیروکت پاتوژن از جنس لیتوسپیروا ایجاد می شود (۲۱). لیتوسپیرواها علاوه بر آلوده کردن جمعیت

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. سپس ۴۰۰ μ l از بافر لایز کننده (100mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH=7.4) که همراه SDS ۱٪ و ۴۰۰ μ l 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/ایزوامیل 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 لپتوسپیروا (*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>-TTCCCCCAATTGAGCAAGATT-3>

مخلوط واکنش بر اساس حجم کلی ۵۰ μ l بگونه ایی تنظیم گردید که شامل ۲۰۰ M μ l داکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTP)، ۵۰ mM KCl، ۱۰ mM Tris-HCl (pH=۹)، ۱/۵ U از MgCl_۲، ۱/۵ M μ l از پرایمر Lept 1 و Lept 2 و ۱/۵ U از آنزیم دی ان ای پلیمرز (Taq DNA polymerase) و ۵ μ l آب مقطر ultra pure باشد (۱۸). در کنار نمونه های مورد آزمایش کنترل منفی و کنترل مثبت نیز در نظر گرفته شدند (۱۸). سوش

انسانی و ایجاد عارضه های متفاوت، همواره به عنوان یکی از معضلات صنعت دامپروری نیز مطرح می باشند (۲۲) و ۱۱ و ۳). این بیماری عموماً 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 عموماً 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 منظور تشخیص این بیماری می توان از تست آگلوتیناسیون میکروسکوپی (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 مرز (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 لپتوسپیروا 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

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

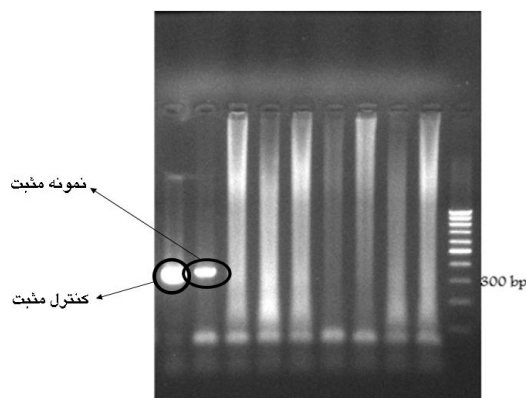
مخلوط واکنش بدست آمده در دستگاه ترموسایکلر با برنامه ذیل قرار داده و تعداد ۳۵ سیکل انجام شد (۱۸). (جدول ۲)

جدول ۲: شرح برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر

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

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

به منظور الکتروفورز و مشاهده باندها، پس از ریختن نمونه‌ها (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 الکتروفورز

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

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. ($\alpha \leq 0,05$)

تعیین میزان شیوع لپتوسپیرو در جنینهای سقط شده گاوداریهای استان تهران به روش ...

جدول ۳: درصد شیوع بیماری لپتوسپیرو در جنینهای سقط شده براساس ماه، فصل و سال

فصل	بهار			تابستان			پائیز			زمستان		
	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند	مهر	آبان
درصد شیوع	۰٪	۲۰/۱۸٪	۱۵/۳٪	۸/۱۱٪	۹/۱۶٪	۹/۳٪	۷/۱۶٪	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). ایس و همکاران در سال ۱۹۸۵ در ایرلند شمالی بررسی گسترده ای از لحاظ سرولوژیکی و هیستولوژیکی بر روی سرووار هارجو لپتوسپیرو در جنینهای سقط شده و گاوهای سقط کرده انجام دادند که نتیجه آن شیوع ۶۸,۷٪ لپتوسپیروز بود (۲۳). همچنین در تحقیق دیگری که ایس 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 کاملاً 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 لپتوسپیرو 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

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 لپتوسپیرو با شیوع ۱۲٪ نقش عمده ای 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، بررسی سرولوژیکی لپتوسپیروز در گاوهای اهواز، مجله تحقیقات دامپزشکی، سال شصتم، شماره ۲۳۷ (۱)، صفحات ۱۴-۷

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

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

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 لپتوسپیرو اینترگانس سرووار هاردجو در شیر تانک گاوداریهای استان تهران (پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ۱۳۸۸)، صفحه ۷

وجود درصد نسبتا مشابه در وقوع سقطهای لپتوسپیرویی است که احتمالا 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 الیزای غیر مستقیم شیوع سرولوژیکی سرووار هارجو را ۲۴/۲۶٪ بیان نمود (۵). حسنیپور 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 سروایدمیولوژی لپتوسپیروز در اهواز بیان نمود که ۵۳/۷۹٪ از نمونه ها حداقل به یک سروتیپ لپتوسپیرو آلوده بودند. (۱) سخایی در سال ۱۳۸۶ از مجموع ۳۸۰ نمونه سرومی اخذ شده، شیوع لپتوسپیروز را در دامداریهای اطراف تهران با استفاده از الیزا ۲۲/۳۷٪ اعلام نمود. (۴) کیخسروی در سال ۱۳۸۸ از مجموع ۲۱۸ نمونه سرومی از دامداریهای شهرستان سبزوار شیوع سرومی لپتوسپیروز را ۱۰/۵٪ اعلام نمود (۶). نتایج حاصل از تحقیق قاسمی کیا و سخایی ارتباط خاصی میان شیوع سرولوژیک لپتوسپیرو و سقط جنین ناشی از آن بیان میکنند، 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 سروایدمیولوژی 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 سرومی لپتوسپیروز در شهرستان سبزوار و مقایسه آن با استان تهران میتوان بیان داشت که شهرستان سبزوار 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 حسنیپور و همکاران که شیوع سرولوژیک بیشتری را در فصول پائیز و زمستان در تبریز بیان نمودند با

۶- کیخسروی، م.، بررسی سرواپیدمیولوژی لیتوسپیروز 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 fetuses, *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 leptospire in bovine semen by polymerase chain reaction. *Australian veteri-*

nary 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., Vargas 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 leptospire 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

enzyme-linked 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