فراوانی آلودگی به لپتوسپیروزیس در کشتارگاه صنعتی استان زنجان با استفاده از روش آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی(MAT)

ناهید سلطانی مجد[۱] ، ابراهیم خداوردی داریان[۲]، سهیلا مرادی بیدهندی[۳] پژواک خاکی[۴*]

۱-کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی بخش میکروب شناسی مرکز تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج
۳- باکتری شناس، دانشیار بخش میکروب شناسی مرکز تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج
۴-باکتری شناس، استادیار بخش میکروب شناسی مرکز تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج

* نشانی برای مکاتبه: کرج - حصارک - مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش میکروب شناسی. تلفن: ۰۲۶۱۴۵۷۰۰۳۸ داخلی: ۲۲۵۰ ، khaki.pejvak@yahoo.com

دریافت مقاله: بهمن نود پذیرش برای چاپ: فروردین نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *لپتوسپیرا یک بیماری زئونوز با گستردگی جهانی و مخازن متعدد است که در اثر عفونت ناشی از سروارهای لپتوسپیرا ایجاد می گردد. آزمون میکرو آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) برای تشخیص این بیماری یک روش استاندارد محسوب می شود.این مطالعه جهت تعیین فراوانی آلودگی لپتوسپیرا در دام های کشتارگاه استان زنجان در فاصله زمانی بهمن ۱۳۸۹ لغایت خرداد ماه ۱۳۹۰ انجام گردیده است.*

روش کار: *در این مطالعه جمعاً ۱۳۵ گاو واکسینه نشده در کشتارگاه صنعتی زنجان از بهمن ۱۳۸۹ تا خرداد ۱۳۹۰ بررسی شد. نمونه های خون گاوها تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا بخش میکروب شناسی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج منتقل گردید و با استفاده از ۲۰ نوع آنتی ژن زنده لپتوسپیرائی و با آگلوتیناسیون میکروسکوپی MAT مورد آزمایش قرار گرفتند.*

یافته ها: *از ۱۳۵نمونه گرفته شده ،۶۰ نمونه (۴۴/۴٪) با یک یا تعداد بیشتری آنتی ژن واکنش مثبت نشان دادند. ۲۰ نمونه (۱۳/۸ ٪) آتومنالیس ، ۲۲ نمونه (۱۷/۹٪) با سروتیپ کانیکولا ، ۸ نمونه (۶/۵٪) با سروتیپ گریپوتایفوزا ، ۱۷ نمونه (۱۳/۸٪) با سروتیپ ایکتروهموراژیه و۵ نمونه (۴/۱٪) با سروتیپ پومونا ، ۱۵ نمونه (۱۲/۲٪) سرجو سرجو ، ۳۶ نمونه (۲۹/۳٪) با سروتیپ سرجو هارجو واکنش سرمی نشان دادند. بیشترین واکنش سرمی مربوط به سروتیپ سرجو هارجو و کمترین آن مربوط به سروتیپ پومونا می باشد، نمونه های مثبت عیار های ۱:۲۰۰ به میزان ۵۴.۴۷٪ ، ۱:۴۰۰ به میزان ۲۷.۶۴٪،۱:۸۰۰ به میزان ۱۰.۵۷٪،۱:۶۰۰ به میزان ۳.۲۵٪،۱:۳۲۰۰ به میزان ۴.۰۷٪ داشتند.*

نتیجه گیری: *فراوانی بالای آلودگی و بالا بودن عیار سرمی مبین حضور عفونت لپتوسپیرا در استان زنجان می باشد. آلودگی در استان زنجان در مقایسه با مطالعات مشابه در سایر شهرهای ایران بعد از اهواز دارای بالاترین فراوانی می باشد. این مطالعه اولین گزارش از مطالعه لپتوسپیرا در استان زنجان است.*

واژگان کلیدی: *لپتوسپیرا، MAT ، استان زنجان*

مقدمه

لپتوسپیروزیس یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان است که توسط باکتری لپتوسپیرا ایجاد می گردد(۱،۲). لپتوسپیراها به دو گونه بیماری زا (L.interrogans) وساپروفیت (L.biflexa) طبقه بندی می شوند که هر کدام از این گونه ها دارای تعداد زیادی سروارهای مختلف می باشد. این بیماری دارای انتشار جهانی بوده و در مناطق معتدل و مرطوب که میزان بارندگی زیاد می باشد بیشتر رخ می دهد و حیوانات اهلی و وحشی و جوندگان مخزن اصلی این بیماری محسوب می شوند و اغلب آنها پس از ابتلا به بیماری معمولاً تا پایان عمر خود حامل باقی می مانند و باکتری را از طریق ادرار دفع می کنند، بنابراین انتقال این بیماری از طریق تماس افراد با آب یا خاک آلوده به ادرار این حیوانات صورت می گیرد(۳،۴). لپتوسپیروزیس به عنوان یک بیماری شغلی در کشاورزان، دام داران ،کارکنان کشتارگاه ها و ماهی گیران مطرح می باشد .برخی از سروتیپ های لپتوسپیرا در میزبان های خاصی مشاهده می گردند که این میزبان ها به عنوان میزبان مخزن مطرح است، در آنها آلودگی بیشتر به شکل لپتوسپیروزیس مزمن بروز می کند که با توجه به جنبه های اقتصادی حائز اهمیت است. در گاو بیماری به اشکال لپتوسپیروز حاد،تحت حاد و مزمن با علائم تب ناگهانی ، کم خونی همولیتیک حاد، تولد گوساله های مرده یا ضعیف و کاهش باروری، ورم سرد پستان، سندروم کاهش شیر بروز می نماید.

باکتری را می توان از ادرار، شیر،آب مایع مغزی نخاعی و مایع آمینیوتیک و حتی از خون در مرحله سپتی سمی جدا نمود(۶،۵). برای تشخیص لپتوسپیروزیس مشاهده مستقیم لپتوسپیرا در زیر میکروسکوپ زمینه تاریک در نمونه های کلینیکی بسیار مشکل می باشد و به علت سخت رشد بودن و احتمال بالای آلوده شدن محیط کشت جدا کردن آن از نمونه های کلینیکی به روش کشت بسیار مشکل و زمان بر بوده و در اغلب موارد با موفقیت همراه نمی باشد. آزمون میکرو آگلوتیناسیون (MAT) برای تشخیص این بیماری یک روش استاندارد سرولوژیکی محسوب می شود که مطمئن ترین و متداول ترین روش به حساب می آیدکه در تمام آزمایشگاه های رفرانس برای تائید تشخیص این بیماری و نیز شناسایی عامل آن در حد گونه و سروگروپ استفاده می شود (۸،۷) .

براساس تحقیقات انجام شده در موسسه رازی و نیز مطالعات سرواپیدمیولوژیکی و باکتریولوژیکی انجام شده دیگر محققین این بیماری در کشور ما نیز رو به گسترش می باشد که بهداشت عمومی و تولیدات در این کشور را تهدید می کند(۱۰،۹). تشخیص آلودگی لپتوسپیرا مخصوصاً در نقاط دیگر که هنوز مطالعه نشده،حائز اهمیت است. به طوری که تشخیص لپتوسپیراهای بیماری زای شایع و بومی در هر منطقه عامل مهمی در شناسایی مخازن بیماری می باشد بنابراین این تحقیق به منظور تعیین میزان شیوع آلودگی به لپتوسپیروزیس بر روی گاوها در کشتارگاه صنعتی استان زنجان با استفاده از آزمون میکرو آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) انجام شد.

روش کار

این بررسی روی ۱۳۵ گاو واکسینه نشده که به طور تصادفی انتخاب شده بودند در کشتارگاه صنعتی زنجان از بهمن ۱۳۸۹ تا خرداد ۱۳۹۰ انجام گرفت. از گاوها خون گیری به عمل آمد و نمونه ها تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا بخش میکروب شناسی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج منتقل گردید. خونها با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و سرم ها را بعد جدا سازی فریزر شدند. کلیه نمونه های سرمی با استفاده از ۲۰ سروتیپ زنده لپتوسپیرا اینتروگانس موجود در کلکسیون میکروبی این آزمایشگاه تحت آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) قرار گرفتند.

برای انجام آزمایش آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) از کشت های خالص و عاری از هر گونه آلودگی ثانویه ۷ تا ۱۴روزه پس از کشت، که توسط میکروسکوپ زمینه تاریک حرکت آنها مورد بررسی قرار گرفته بود در محیط مایع و با تراکم استاندارد و با رعایت دقیق دستورات ایمنی و بهداشتی به شرح زیر استفاده گردید:

ابتدا از نمونه های سرم رقت ۱/۵۰ تهیه گردید و سپس با آنتی ژن زنده لپتوسپیرا مواجه داده شد. پس از یک دقیقه واکنش آگلوتیناسیون آنتی بادی علیه لپتوسپیرا توسط میکروسکوپ زمینه تاریک مورد بررسی قرار گرفت. در صورتی که بیش از ۵۰٪ لپتوسپیراها آگلوتینه شده بودند از نمونه ها رقت های بالاتر به صورت رقت های سریالی تهیه گردید.آخرین رقتی که در آن آگلوتیناسیون مشاهده شد را در نظر گرفته وتیتر آن را به دست آوردیم.

در نمونه هایی که هیچ آگلوتیناسیونی مشاهده نشد و کلیه اجرام لپتوسپیرایی زنده و فعال بودند آگلوتیناسیون آنها منفی در نظر گرفته شدند. به منظور کنترل صحت آزمایش انجام شده فوق، دو شاهد در کنار نمونه ها قرار گرفت که شاهد اول سرم استاندارد مثبت و شاهد دوم سرم استاندارد منفی بود. اطلاعات به دست آمده با استفاده از آزمون MAT مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها

از ۱۳۵ نمونه سرمی که تحت آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی MAT قرار گرفتند ۶۰ نمونه(۴۴/۴٪) حداقل به یک سروتیپ لپتوسپیرا واکنش مثبت نشان دادند ۷۵ نمونه نیز از لحاظ سرولوژیکی منفی بودند. در کل نمونه ها تعداد سرجو هارجو ۳۶نمونه (۲۹/۲۷٪)، کانیکولا ۲۲ نمونه(۸۹ /۱۷٪)، آتومنالیس ۲۰ نمونه (۲۶ /۱۶٪)، ایکتروهموراژیه ۱۷ نمونه (۸۲ /۱۳٪) ، سرجو سرجو ۱۷ نمونه (۲۰ /۱۲٪) ، گریپوتایفوزا ۸ نمونه(۶/۵۰٪) ، پومونا ۵ نمونه (۰۷ /۴٪) واکنش مثبت نشان دادند. غالب ترین سروارها به ترتیب شامل: سرجو هارجو با ۲۹/۲۷ درصد و کانیکولا ۱۷/۸۹درصد دارای بیشترین و پومونا ۴/۰۷ درصد دارای کمترین فراوانی بودند.

در بررسی از کل موارد مثبت در دام ها ۵۴/۶۷٪ به تیتر ۱:۲۰۰، ۲۷/۶۴٪به تیتر ۱:۴۰۰ ، ۱۰/۵۷٪ به تیتر ۱:۸۰۰ ، ۳/۲۵٪ به تیتر ۱:۶۰۰، ۴/۰۷٪ به تیتر ۱:۳۲۰۰ تعلق داشتند که نتایج عیار سنجی پادتن ضد سروتیپ های مختلف نشان می دهد که عیار سرمی ۱:۲۰۰به میزان۵۴/۶۷ درصد بیشترین و ۱:۶۰۰ به میزان ۳/۲۵ درصد کمترین بودند(جدول ۱) .

از مجموع ۶۰ (۶۶/۷٪) نمونه مثبت حداقل به یک سروتیپ واکنش نشان دادندوتعدادی از نمونه ها واجد آلودگی به بیش از یک سروتیپ بودند به طوری که ۲۴/۴٪ نمونه های سرمی با دو سروتیپ، ۸/۹٪ با سه سروتیپ، واکنش مثبت نشان دادند.

جدول ۱:نتایج عیار سنجی پادتن ضد سروتیپ های مختلف لپتوسپیرا اینتروگانس در سرم گاوهای استان زنجان با روش MAT

سروتیپ / عیار پادتن	۱:۲۰۰		۱:۴۰۰		۱:۸۰۰		۱:۶۰۰		۱:۳۲۰۰		جمع	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
سرجو هارجو	۱۵	۱۲.۲۰	۱۴	۱۱.۳۸	۵	۴.۰۷	۰	۰.۰۰	۲	۱.۶۳	۳۶	۲۹.۲۷
کانیکولا	۱۹	۱۵.۴۵	۰	۰.۰۰	۱	۰.۸۱	۱	۰.۸۱	۱	۰.۸۱	۲۲	۱۷.۸۹
اتومنالیس	۸	۶.۵۰	۷	۵.۶۹	۳	۲.۴۴	۱	۰.۸۱	۱	۰.۸۱	۲۰	۱۶.۲۶
ایکتروهموراژیه	۱۰	۸.۱۳	۶	۴.۸۸	۰	۰.۰۰	۰	۰.۰۰	۱	۰.۸۱	۱۷	۱۳.۸۲
سرجو سرجو	۶	۴.۸۸	۳	۲.۴۴	۴	۳.۲۵	۲	۱.۶۳	۰	۰.۰۰	۱۵	۱۲.۲۰
گریپوتیفوزا	۷	۵.۶۹	۱	۰.۸۱	۰	۰.۰۰	۰	۰.۰۰	۰	۰.۰۰	۸	۶.۵۰
پومونا	۲	۱.۶۳	۳	۲.۴۴	۰	۰.۰۰	۰	۰.۰۰	۰	۰.۰۰	۵	۴.۰۷
جمع	۶۷	۵۴.۴۷	۳۴	۲۷.۶۴	۱۳	۱۰.۵۷	۴	۳.۲۵	۵	۴.۰۷	۱۲۳	۱۰۰.۰۰

بحث

لپتوسپیروزیس به عنوان یکی از مهمترین بیماری زئونوز شایع در جهان مطرح شده است و در مناطق معتدل و مرطوب مانند شمال کشورمان دارای شیوع بیشتری می باشد (۱۲،۱۱). استان زنجان هم جوار شمال کشور ایران است و بیشتر دام های زنجان از شمال کشور تهیه می گردد بنابراین در استان زنجان نیز شرایط مساعدی برای رشد لپتوسپیرا و آلودگی به این بیماری وجود دارد. تحقیق حاضر اولین بار است که در این استان توسط آزمایشگاه رفرانس واکسن وسرم سازی رازی کرج انجام پذیرفته است.

اولین مطالعه در ایران در مورد لپتوسپیروز در سال ۱۳۳۶ توسط مقامی و همکارانش در موسسه واکسن و سرم سازی انجام پذیرفت که ۳۰۰ رأس گاو و گوسفند از لحاظ سرولوژیکی مورد مطالعه قرار گرفتند ،نتایج این مطالعه مشخص نمود ۳۱٪ گاوها و ۱۷ ٪ گوسفندان به سروتیپ های مختلف لپتوسپیرا آلوده بودند(۱۳) .همچنین در مطالعه ای دیگری که در سال ۱۳۵۶ توسط همین محقق بر روی ۲۰۹۷ نمونه از سرم گاو در اطراف تهران صورت گرفت ،۲۴/۶٪ گاوها ی تحت بررسی آلوده بودند(۱۰) .

در مطالعه ی حاضر مشخص گردید که از کل نمونه ها در کشتارگاه صنعتی زنجان ۴۴/۴ ٪ گاو ها از نظر سرولوژیکی واکنش مثبت داشتند. مطالعات مشابهی که توسط دیگر محققین در سایر مناطق کشور انجام گرفته است، نشانگر آلودگی نسبتاً بالای گاوها می باشد. در مطالعه ی که در کشتارگاه صنعتی رشت سال ۱۳۸۹ انجام گرفت، از ۹۸ نمونه سرمی اخذ شده ۳۷/۸٪ مثبت بود(۱۱) . میزان آلودگی گاوها در استان آذربایجان شرقی در سال۱۳۷۳ برابر (۴۸/۵٪) بوده است(۱۴) .

بررسی های مختلف که در دیگر شهرهای ایران صورت گرفته است نشان دهنده آلودگی سرمی لپتوسپیرا می باشد به گونه ایی که فراوانی آلودگی در گاوداری های استان تهران در سال ۱۳۸۰ برابر با (۴۶/۸٪) و در همین سال در بررسی ۵۳۵ نمونه سرمی از گاو در شیراز برابر (۲۴/۳٪) و در تبریز در سالهای ۱۳۸۲- ۱۳۸۱ ۵۵برابر با (۲۴٪) و در مشهد در سال ۱۳۸۹ در مورد ۳۸۹ نمونه سرم گاو برابر با (۲۳/۹٪) و در اهواز در سال ۱۳۸۱-۱۳۸۰ در مورد ۶۴۵ رأس از گاو برابربا (۵۳/۷۵٪) بود(۱،۱۰،۱۳،۱۵،۱۶). در کشورهای مختلف جهان مطالعات سرولوژیکی متعدد در مورد بیماری لپتوسپیروزیس انجام گرفت که اکثراً نشان دهنده درصد بالای در دام ها می باشد(۱۹-۱۷).

فراوانی آلودگی گاوها زنجان(۴۴/۴٪) در مقایسه با مطالعات بالا زیاد بوده و بعد از اهواز با آلودگی (۵۳/۷۹٪) دارای بالاترین میزان آلودگی است (۲۰،۲۱). استان زنجان از لحاظ آب و هوایی و میزان بارندگی دارای شرا یط مناسب برای رشد ، بقاء و انتقال این باکتری می باشد.

نتایج این بررسی نشان داد که سروتیپ های غالب در منطقه شامل سرجو هارجو ۲۹/۲۷ ٪، کانیکولا ۱۷/۸۹٪، آتومنالیس۱۶/۲۶٪ می باشد که در مورد شیوع سروتیپ هاردجو در جمعیت گاوی ایران و جهان گزارشات فراوانی وجود دارد (۱۷،۲۲،۲۳) .

در اولین مطالعه ایی که توسط مقامی و همکارانش در سال ۱۳۳۶ انجام گرفت سروتیپ های غالب به ترتیب گریپو تایفوزا، پومونا، ایکتروهموراژیه بودند(۱۰). در مطالعه که در سال ۱۳۷۱ توسط محرمی و همکارانش در اطراف تهران توسط موسسه واکسن وسرم سازی رازی کرج انجام گرفت شایع ترین سروار آلوده کننده مربوط به هارجو با ۶۷/۷٪ و کمترین میزان آلودگی با سروار ایکترو هموراژیه با ۰/۸٪بود (۲۴) .شایع ترین سروار آلوده کننده در کشتارگاه صنعتی رشت مربوط به سروار پومونا (۴۹٪) بود (۲۰). در مطالعات مشابهی که در گاوداری های مشهد انجام گرفت سروتیپ های غالب ایکترو هموراژیه با ۳۳/۸۵ ٪ و گریپوتایفوزا ۲۵/۹۸٪ بودند(۱۵). در اهواز در یک بررسی انجام شده بر روی گاوها شایعترین سروار گریپوتایفوزا با فراوانی ۳۰/۷٪ معرفی گردید و سروار هاردجو ۱۴/۳۵ ٪ پومونا ۱۸/۳۳٪ کانیکولا ۵۳/۱۵٪ ا یکتروهموراژیه ۱۱/۵٪ و بالوم ۱۰/۱۶٪ در رده های بعدی قرار داشتند(۲۵). در مطالعه جعفری و همکارانش در سال ۱۳۷۵ سروتیپ گریپوتایفوزا به عنوان شایعترین سروتیپ در منطقه شناخته شد(۲۶) و همچنین در مطالعه اسد پور در سال ۱۳۸۱ در موسسه واکسن وسرم سازی رازی کرج انجام شد نیز بیشترین آلودگی مربوط به گریپوتایفوزا ۴۸/۳۸٪ و کمترین مربوط به هارجو ۳/۲٪ بوده است(۲۷).

گزارشات زیادی از فراوانی این سروتیپ ها و سروتیپ های دیگر در سایر نقاط جهان وجود دارد(۱۱). مقایسه این نتایج با تحقیق حاضر نشان می دهد نه تنها میزان فراوانی آلودگی بلکه از نظر فراوانی سروتیپ های مختلف نیز در هر منطقه تفاوت های نیز مشاهده می شود که این نشان دهنده گردش سروارهای مختلف لپتوسپیرا است. شایان ذکر است میزان فراوانی آلودگی و نوع سروتیپ نه تنها در بین مناطق مختلف بلکه در یک منطقه هم ممکن است بین سالهای مختلف متفاوت باشد و بر همین اساس هر چند سال یکبار به مطالعه جدید در هر منطقه می باشد(۲۵). تعداد دام های موجود در گله در میزان آلودگی تاثیر دارد به گونه ایی که هر چه تعداد بیشتر باشد احتمال وقوع آلودگی هم بالاتر است(۱۲،۲۸) .

در تحقیق حاضر تعداد ۶۰ نمونه با یک سروتیپ (۶۶/۷۴٪) ، ۲۲ نمونه با دو سروتیپ (۲۴/۴٪) و ۸ نمونه با سه سروتیپ(۸/۹٪) واکنش مثبت داشتند. این مطلب در مطالعات دیگر محققین هم مشاهده می شود که تعدادی از نمونه ها با بیش از یک سروار واکنش مثبت نشان داده اند (۹،۲۳،۲۵). همچنین در تبریز سال ۱۳۸۱(۷۰/۹٪) نمونه ها سرمی با یک سروتیپ،(۲۰٪) با دو سروتیپ ،(۹/۱٪) با سه سروتیپ واکنش مثبت دادند(۱۳). و در اهواز سال ۱۳۸۴ (۶۴/۸۴٪) با یک سروتیپ،(۲۶/۸۰ ٪) با دو سروتیپ ،(۷/۴۹ ٪)با سه سروتیپ، (۰/۵۸ ٪) با چهار سروتیپ ،(۰/۲۹ ٪)با ۵ سروتیپ واکنش مثبت دادند(۲۵) .

در مطالعه دیگر محققین نیز، نتایج مشابهی با نتایج فوق گزارش گردیده است (۱۲،۲۹) . در مطالعه حاضر عیار سرمی ۱/۲۰۰ برابر (۵۴/۶۷٪) و ۱/۴۰۰ برابر (۲۷/۶۴٪) می باشد(جدول ۱). همچنین عیار سرمی ۱/۲۰۰-۱/۴۰۰ در بیشتر مطالعات انجام گرفته بیشتر از سایر تیترها می باشد مثلا در مطالعه اسد اله پور عیار سرمی ۱/۲۰۰-۱/۴۰۰ به ترتیب برابر ۴۸/۳۸ ٪- ۴۸/۳۸٪ بوده است(۲۹) .

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه و با توجه به فراوانی بالای آلودگی سرولوژیکی به لپتوسپیرا و بالا بودن عیار سرمی در گاوهای کشتارگاه های استان زنجان حضور اندمیک عفونت لپتوسپیرا در این استان قابل توجه است و لازم است اقدامات بهداشتی برای پیشگیری از آن انجام گردد.

REFERENCES

1. Levett, P. N. 1999. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? J. Med. Microbiol. 48:417–418.

2. Wong, M. L., S. Kaplan, L. M. Dunkle, B. W. Stechenberg, and R. D. Feigin..1977. Leptospirosis: a childhood disease. J. Pediatr. 90:532–537.

3. Vinetz JM .Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 1997; 10:357-361

4. Levett, P. N., and C. U. Whittington. 1998. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. J. Clin. Microbiol.36:11–14.

5. Word Health Organization, Haman Leptospirosis: Guidance for Diagno sis, Sureilance, and control .Geuva; WHO, 2003.

6. Levett, P.N., Branch, S. L. and C. N. Edwards. 2000. Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados. Am. J. Trop.Med. Hyg. 62:112–114.

7. Goval S.M, Mech L.D.1992. prevalence of antibody titers of leptospira in sheep. Vet. bult Obst. No 1575. (Persian).

8. Faine, S., B. Adler, C. Bolin, and P. Perolat. 1999. Leptospira and leptospirosis,2nd ed. MedSci, Melbourne, Australia

9. Abdollahpou, Gh. Moghadam, Gh.A .2007. Seroprevalence of leptospiral infection in dairy herds in Tabriz – Iran .Pajouhesh and Sazandegi No 74 pp: 67-77

10. Magami Gh. 1981. Investigation the role of Leptospirosis in abortion of female cattle farmer around .Tehran. Veterinary Organization Publication 20: 50-60. (Persian).

11. Shafighi, T. Abdollahpour ,G. Zahraei Salehi ,T. And Tadjbakhsh, H. 2010, Serological and bacteriological study of leptospirosis in slaughtered cattle in north of Iran (Rasht). African Journal of Microbiology Research Vol. 4(20) pp. 2118-2121.

12. Babamahmoodi F, Moatamedi N, Mahdavi MR, Nikkhah F and Gavibonieh KH. 2004. Epidemiology of Leptospirosis in rural areas of Qaemshahr, Mazandaran-Iran in September and October. Journal of Medical Science of Mazandaran University 16: 51-56.

13. Levett, P. N., Branch S. L., Whittington, C. U., Edwards, C. N and H.Paxton. 2001. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis.Clin. Diagn. Lab. Immune. 8:349–351.

14. Shoaei S. 1995. Seroepidemiology of leptospiral infected in cows of East Azarbaijan Province. Veterinary Medicine. PhD thesis Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Tabriz., Thesis No 20. (Persian).

15. Talebkhan Garoussi, M. Vandeussefi, j. 2003. The Seroepidmiological survay of caine Leptospirosis in shepherd of dairy cattle herds in mashhad suburb of Iran .J.fac. Vet. Med. Univ. Thran .58, 2:177-179. (Persian).

16. Rafyi A, Magami GH .1968. Leptospirose Ovine ET Caprine. Arch. Inst.Razi. 20: 25-38.

17. Helio, L., De Souza, L. C., Da Silva, A.V., Luvizotto, M.C.R., Paes, A. C. and Lucheis, S. B., 1999, Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. Preventive Veterinary Medicine, 40: 271-275.

18. Alonso-Andicoberry, C., Garcia-Pena, F. J., Pereira-Bueno, J.,Costas E. and Ortega-Mora, L. M.. 2001. Herd-level risk factors associated with Leptospira spp. Seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. Preventive Veterinary medicine. 52: 109-117.

19. Guitian, F.J., Garcia-Pena, F.J., Oliviera, J., Sanjuan, M. L.and Yus, E., 2001, Serological study of the frequency of leptospira infection among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. Veterinary Microbiology, 80: 275-284.

20. Durham, P.J.K and pain, GD.1997. Serological surgery for antibodies infections agent in beef cattle in northern south Australia Austro Iian – Veterinary –Journal .75(2):134-140.

21. King, S .1991. The prevalence of Leptospirosis in cattle herds in the westen Division of new south Wales –a serological survey .Australian veterinary Journal. 68(9):307-308.

22. Arthure, G.H., Noakes , D. E., Pearson, H. and Parkinson, T. J., 2001, Veterinary reproduction and obstetrics. 8th edition, Bailliere Tindall, London. 474, 484-487.

23. Radostitis, O. M. and Blood, D. C., 2000, Veterinary medicine. 9th edition, Bailliere Tindall, PP: 971-985.

24. Moharami M. 1990. Seroepidemiological study of livestock leptospirosis in tehran, Iran .Kongere Zeonoz Amol,; P 52. (Persian).

25. Hajikolaei, M.R., Ghorbanpour Najafabadi, M. and Abdollahpour, G.R.2005. Serological study of leptospirosis in cattle in Ahvaz .J. Fac .Vet .Med.Univ.Tehran.60:7-14. (Persian).

26. Jafari, S, M .Vanduosfi, j. 1998. Leptospirosis in uromie province of Iran: Assesment of the clinical presentation of 74 cases. Med Sci Monit; 34: 120-122. (Persian).

27. Asadpor Honarmand H, Mansour Ghanaei F. 2005. Leptospirosis in Guilan province. Ilia publisher, Iran. (Persian).

28. Rad, MA. Zeinali., yousefi, Jv .and Tabatabai AM .2001. Seroepidemiological study of canine leptospirosis in Tehran ,Iran .

29. Vande-yousefi J, Moradi Bid Hendi S, Aarabi A, Adeli M, Charkhkar S. 1997. Serological study of Leptospirosis in humans and livestock. Third National congress of diseases transmitted between humans and animals. Mashhad. P. 59-60.