دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۴، صفحه ۵۵۹ – ۵۵۰ (مهر و آبان ۱۳۹۳)

ISMJ 2014; 17(4): 550-559

شناسایی مولکولی لپتوسپیراهای بیماری‌زا به‌روش واکنش زنجیره پلیمراز بر مبنای ژن *ligB*

فریبا فتوحی [۱]، مهرانگیز دژبرد [۲]، پژواک خاکی [۱و۲*]، رضا پیله‌چیان لنگرودی [۳]، بهزاد صالحی [۱]، سهیلا مرادی بیدهندی [۲]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، ایران
[۲] بخش میکروب‌شناسی، مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
[۳] بخش بی‌هوازی، مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

(دریافت مقاله: ۹۱/۵/۲۰- پذیرش مقاله: ۹۱/۶/۱۵)

چکیده

زمینه: لپتوسپیروز بیماری عفونی می‌باشد که به‌عنوان مهم‌ترین بیماری زئونوز شایع در جهان مطرح شده است. **LigB** یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های غشاء خارجی لپتوسپیرا می‌باشد، ایمونوژن می‌باشد و تنها در لپتوسپیراهای بیماری‌زا وجود دارد. هدف این پژوهش تشخیص مولکولی لپتوسپیراهای بیماری‌زا به‌روش **PCR** بر مبنای ژن ***ligB*** می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی از پنج سروار بیماری‌زای لپتوسپیرا و یک سروار غیر بیماری‌زا استفاده گردید. باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی کشت داده شدند و **DNA** ژنومیک آن‌ها تخلیص گردید. پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن ***ligB*** طراحی و حساسیت و ویژگی آن در **PCR** بررسی شد.

یافته‌ها: با توجه به داده‌های **PCR** مشخص شد که این ژن فقط در سروارهای گونه بیماری‌زا حضور دارد و قطعه **bp** ۱۰۴۱ حاصل که نشان‌دهنده تکثیر ژن ***ligB*** می‌باشد، در گونه غیربیماری‌زای *بایفلکسا* مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: بیماری لپتوسپیروز در مناطق معتدل و مرطوب که دارای بارندگی زیاد بوده دارای شیوع بیشتری است و به‌علت کند رشد بودن این باکتری، جداسازی آن از نمونه‌های بالینی به‌روش کشت بسیار مشکل و زمان‌بر است. بنابراین یک آزمایش تشخیصی مولکولی مناسب با ویژگی و حساسیت بالا مانند **PCR** برای تشخیص درست، به‌موقع و سریع این بیماری دارای اهمیت می‌باشد.

واژگان کلیدی: لپتوسپیروزیس، *لپتوسپیرا انتروگانس*، **PCR**، ژن ***ligB***

* کرج، بخش میکروب‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج
E-mail: p.khaki@rvsri.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

لپتوسپیروز بیماری باکتریایی مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی می‌باشد که توسط نوعی اسپیروکت از خانواده اسپیروکتاسه به نام لپتوسپیرا ایجاد می‌شود (۱).

لپتوسپیرا باکتری گرم منفی می‌باشد که همراه با دو جنس *Tuneria* و *Leptonema* در خانواده لپتوسپیرا قرار دارد. باکتری‌های مارپیچی و متحرک می‌باشند که طول آن‌ها با هم دیگر متفاوت است زیرا سلول‌ها مداوم رشد می‌کنند تا به دو برابر طول خود برسند وسپس هر سلول به دو سلول کوچک تر تقسیم می‌شود (۲ و ۴۲).

بر اساس منابع و بررسی‌های انجام شده در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی این بیماری در نقاط مختلف کشور در ۱۳ استان وجود دارد مانند استان‌های گیلان و مازندران, خراسان, قم, استان چهارمحال بختیاری و تهران گزارش شده است (۱۴ و ۲۶) و در کشورهای نیکارگوئه (۹)، برزیل، هند (۱۰ و ۱۱)، کشورهای اروپایی، آلمان (۱۲)، کشورهای جنوب شرق آسیا و ایالات متحده نیز گزارش شده است (۷ و ۱۵).

سازمان بهداشت جهانی (WHO) این بیماری را به‌عنوان دومین بیماری قابل انتقال از دام به انسان گزارش کرده است و از آن به‌عنوان یک بیماری باز پدید نام برده شده است (۱۶ و ۱۷). لپتوسپیراها به دو گونه لپتوسپیرای بیماری‌زا (*L.interrogans*) و غیربیماری‌زا (*L.biflexa*) طبقه‌بندی می‌شوند و هر کدام از این دو گونه دارای شمار زیادی سروگروپ مختلف می‌باشد (۱۸، ۱۹ و ۴۰).

لپتوسپیراها باکتری‌هایی هستند که گستره وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی و همچنین انسان را آلوده می‌کنند (۶ و ۲۰). این بیماری دارای انتشار جهانی بوده ولی در مناطق معتدل و مرطوب که دارای بارندگی زیاد بوده دارای شیوع بیشتری می‌باشد (۲۱ و ۲۲). انتقال آن از راه تماس افراد با آب یا خاک آلوده به ادرار پستانداران صورت می‌گیرد (۲۳ و ۲۴).

مطالعات باکتری‌شناسی که انجام گرفته است مبنی بر افزایش ابتلا به این بیماری در سطح کشور می‌باشد (۲۵ و ۲۶). عوامل بیماری‌زایی لپتوسپیرا در سطح مولکولی قابل بحث هستند. لیپوپلی ساکارید (LPS) لپتوسپیرا شامل یکی از اصلی‌ترین اجزا لپتوسپیرا و هدفی برای آگلوتیناسیون و اپسونیزاسیون آنتی‌بادی می‌باشد. همچنین در این باکتری پروتئین‌های ساختاری و اصلی به‌صورت بخشی از غشاء خارجی در آمده‌اند (۵، ۱۳ و ۲۷).

پروتئین‌های غشایی باکتری‌ها پایه و اساس ارتباط بین باکتری بیماری‌زا و میزبان می‌باشد. به‌همین دلیل مطالعات زیادی در مورد شناسایی ویژگی های اجزای پروتئین‌های غشایی لپتوسپیرایی انجام شده است. پروتئین‌های شبه ایمونوگلوبولین (Lig)، پروتئین‌های غشاء خارجی هستند که از توالی‌های متوالی ۹۰ آمینو اسیدی دومین‌های شبه ایمونوگلوبولین باکتریایی تشکیل شده‌اند، که LigB به‌عنوان یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های غشای لپتوسپیرا شناسایی شده است. این پروتئین‌ها در میان سروارهای بیماری‌زای لپتوسپیرا مشاهده می‌گردد ولی در سروارهای غیربیماری‌زا دیده نمی‌شود (۲۸).

LigB پروتئینی باند شونده به فیبرونکتین در گونه‌های پاتوژن لپتوسپیراست و نقش مؤثری در میان کنش با میزبان، در مراحل نخستین لپتوسپیروز دارد. توالی‌های تکرار شونده در LigB به انتهای آمینوی فیبرین میان کنش می‌دهند و عمل اتصال پاتوژن‌های میکروبی را

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

میانجی‌گری می‌کنند. به گونه‌ای دقیق‌تر، اتصال LigB به لیگاندهای گوناگون موجود در بافت‌های مختلف در مراحل نخستین کلونیزاسیون و نیز در انتشار بیماری لپتوسپیروز نقش دارد. LigB به فیبرونکتین باند می‌شوند و بیان آن در اسملاریته فیزیولوژیک، افزایش می یابد (۲۹). البته پروتئین‌های غشایی دیگری نیز در لپتوسپیراها وجود دارد مانند LipL۳۲، Lip۱۲۱، Lip۱۳۶، Omp۱، Lip۱۴۱ و غیره که آن‌ها نیز نقش ایمنی‌زایی دارند (۳۰). یکی از این لیپوپروتئین‌ها Lip۱۳۶ می‌باشد که در عفونت تولید نمی‌شود ولی این نتایج از وقوع نقش این پروتئین در دیگر حالت‌های فرآیند عفونت جلوگیری نمی‌نماید و هم چنین ایمنی‌زایی کمتری نسبت به دیگر لیپوپروتئین‌ها را دارا می‌باشد (۳۱).

تشخیص لپتوسپیروز با علائم بالینی، به‌دلیل تشابه آن با بیشتر عفونت‌های حاد مشکل است. علائم بالینی این عفونت در ۹۰ درصد موارد مشابه آنفلوانزا بوده و در صورت عدم تشخیص و درمان به‌موقع، بیماری وارد فاز حاد شده و صدمات جدی و طولانی مدت ایجاد می‌کند. بنابراین تشخیص صحیح و به‌موقع این بیماری ارزشمند می‌باشد (۸ و ۳۲).

بنابراین آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی در تشخیص لپتوسپیروز جایگاه مهمی دارند. از سویی آزمایش‌های تشخیصی سرولوژیکی مانند MAT به‌دلیل نیاز به کشت این باکتری با مشکلاتی مواجه است (۱۴).

روش‌های مولکولی جهت درمان به‌موقع و کنترل عفونت و تشخیص سریع و دقیق لپتوسپیروز مناسب می‌باشد. روش‌های متداول شناسایی لپتوسپیرا، هر یک دارای کاستی‌هایی هستند. به‌طور نمونه کشت بسیار کند و محیط کشت بسیار حساس به انواع آلوده‌کننده‌ها، همچنین آزمایش با میکروسکوپ زمینه تاریک نیز حساسیت لازم را ندارد. روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) نیاز به تولید آنتی‌بادی دارد تا بتواند عامل بیماری را تشخیص دهد که برای استفاده از این روش تعداد زیادی نمونه لازم است. بنابراین از آنجایی که حضور آنتی‌بادی در سرم فقط بعد از دوره اصلی بیماری قابل تعیین است تکنیک‌های سرولوژیک در تشخیص این بیماری کمک زیادی نمی‌کند. از این روی هم اکنون بررسی‌ها جهت راه‌اندازی روشی آلترناتیو و تشخیص و تعیین هویت باکتری‌های جدا شده روی تکنیک‌های مبتنی بر DNA متمرکز شده است (۳۲).

روش‌های مولکولی مانند PCR در تشخیص این بیماری اهمیت ویژه دارند. یکی از مهم‌ترین ژن‌های بیماری‌زای لپتوسپیرا ژن *ligB* شناسایی شده که به‌دلیل حضور آن در لپتوسپیراهای پاتوژن می‌تواند برای تشخیص مولکولی بیماری لپتوسپیروز استفاده گردد (۲۸). در بررسی پیش رو از آن به‌عنوان ژن هدف جهت تشخیص مولکولی لپتوسپیراهای بیماری‌زا بهره‌گیری شد. بنابراین هدف از تحقیق حاضر شناسایی مولکولی لپتوسپیراهای بیماری‌زا به روش واکنش زنجیره پلیمراز بر مبنای ژن ligB می‌باشد..

مواد و روش‌ها

در این بررسی که از اردیبهشت سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه مرجع لپتوسپیرا بخش میکروب‌شناسی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج انجام گردید از پنج سوش بیماری‌زای لپتوسپیرا:

L.Canicola (LC-RTCC2805)

L.Grippotyphosa (LG-RTCC2808)

L.Pomona (LPo-RTCC2815)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

L.Icterohaemorhagiae(*LIct-RTCC2812*)
L.Serjoe hardjo (*LSH-RTCC2821*)
و یک سوش غیربیماری‌زای استاندارد *L.biflexa* که از مجموعه میکروبی آزمایشگاه مرجع لپتوسپیرا از نمونه‌های ادرار گاو رسوب‌گیری شد، استفاده گردید.

کشت و استخراج DNA

باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی EMJH (Difco,USA) همراه با سرم خرگوش و مکمل‌های غذایی در شرایط هوازی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و بعد از ۱۰-۷ روز رشد آن‌ها با میکروسکوپ زمینه تیره (Dark Field) مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه‌ها جهت رسوب‌گیری در دور ۱۵۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. جهت تخلیص DNA ژنومیک از روش فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل استفاده شد (۳۳).

واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR)

پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن *ligB* طراحی گردید (جدول ۱).

جدول ۱) ویژگی پرایمرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس ژن *ligB*

نام پرایمر	توالی الیگونوکلئوتیدی	اندازه قطعه	دمای چسبیدن°	محتوای GC	چگالی بهینه
F	5'AATCATATGGTTACTCCAGCAGCCTTAGTT 3'	۳۰نوکلئوتید	۵۸/۸	٪۴۰	۱۵
R	5'CACATTAATGGATATTTCACTCGATCCTGG3'	۳۰نوکلئوتید	۶۰/۳	٪۵۵	۱۵

تعیین ویژگی پرایمر

جهت تعیین اختصاصی بودن پرایمر *ligB* برای سویه‌های بیماری‌زا لپتوسپیرا بر روی DNA استخراج شده، پنج سروار بیماری‌زای لپتوسپیرا به نام‌های L.Canicola، L.Grippotyphosa، L.Pomona، L.Icterohaemorhagiae و L.Serjoe hardjo و یک نمونه غیربیماری‌زا استاندارد به‌نام *L.biflexa serovar Semaranga* به‌همراه پرایمر اختصاصی *ligB* آزمایش PCR انجام شد.

تعیین حساسیت پرایمر

برای به‌دست آوردن کمترین حد از مقدار DNA که واکنش PCR با پرایمرهای طراحی شده مذکور می‌توانند آنرا تشخیص داده و تکثیر کنند، از یک نمونه DNA تخلیص شده با غلظت مشخص استفاده گردید. در ابتدا DNA تخلیص شده سروار کانیکولا از غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر (معادل ۱۰-۱ میکروگرم در میکرولیتر) تا ۰/۱ پیکوگرم در میکرولیتر (معادل۷-۱۰ پیکوگرم در میکرولیتر) رقیق شد. در هر میکروتیوب ۱ میکرولیتر ازهر رقت ریخته شد و PCR انجام گرفت. ویژگی و حساسیت آزمایش PCR انجام گردید. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر مقدار ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (Fermentase ،Germany)، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها (Sigma ،Germany)، ۰/۲ میلی مولار dNTP mix (CinnaGen ،Iran)، ۱/۵ میلی‌مولار Mgc۱۲ (Fermentase ،Germany) تهیه گردید.

روش استاندارد طلایی (Gold standard) که در کنار آزمایش مولکولی خود انجام داده و یافته‌ها با آن مقایسه شد. آزمایش آگلوتیناسیون میکروبی (MAT) بود که بر روی نمونه‌های ادرار گاو گذاشته شد که

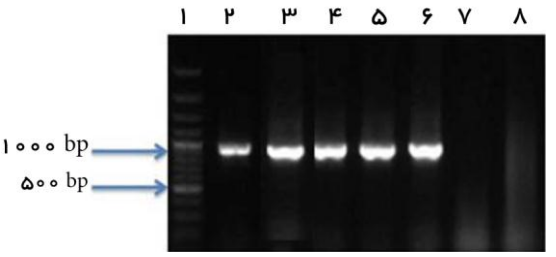
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

دارای نتایج دقیق نبود و واکنش متقاطع نشان داد و همزمان آزمایش PCR که بر روی این نمونه‌ها انجام شد نشان داد که PCR روش سریعی می‌باشد که با حساسیت و ویژگی بالا قادر به جداسازی دقیق گونه‌های بیماری‌زا از غیربیماری‌زا است.

شرایط واکنش PCR شامل: برای دناتوراسیون اولیه، DNA به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C قرار داده شد و بعد از آن دناتورایسون در ۹۴°C به‌مدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمرها به DNA هدف ۵۸ °C به‌مدت ۱ دقیقه و توسعه پرایمرها در ۷۲ درجه به‌مدت ۱ دقیقه در ۳۵ چرخه تکرار شد و سرانجام ۷ دقیقه واکنش در ۷۲ درجه قرار گرفت (۴۱).

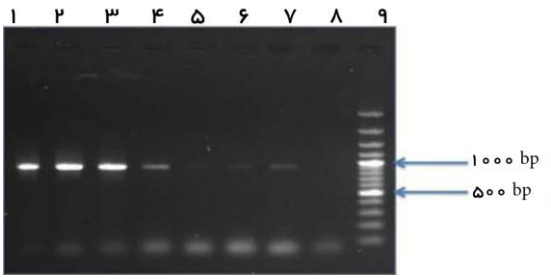
یافته‌ها

تکثیر ژن *ligB* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده انجام گردید و نتیجه محصول ژن *ligB*، باند ۱۰۴۱ bp بود که با الکتروفورز آگاروز ۱ درصد و مارکر ۱۰۰bp (Fermentase ،Germany) مورد تأئید قرار گرفت. یافته‌های آزمایش تعیین ویژگی PCR نشان داد که در پنج سوش بیماری‌زای لپتوسپیرا ژن کد کننده پروتئین سطحی *LigB* وجود دارد اما این ژن در لپتوسپیرا غیربیماری‌زای استاندارد *L.biflexa* مشاهده نگردید (شکل ۱).



شکل ۱) آزمایش تعیین ویژگی محصولات PCR نمونه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا بر روی ژل آگارز ۱ درصد
(۱): سایز مارکر (۲): *L*.Icterohaemorrhagiae (۳): *L*.Pomon (۴): *L*.Serjoe hardjo serovar (۵): *L*.Grippotyphosa (۶): *L*.Canicola (۷): *L.biflexa* Semaranga (۸): بلانک

در مورد آزمایش تعیین حساسیت PCR با پرایمرهای اختصاصی (*ligB*) باید اشاره گردد که هرچه قطعات پرایمر طراحی شده کوچک‌تر باشد با ویژگی و حساسیت بیشتری به ناحیه هدف متصل می‌گردد. از ویژگی بررسی کنونی طراحی یک قطعه ۱۰۴۱bp می‌باشد که آزمایش تعیین حساسیت PCR با پرایمرهای اختصاصی (*ligB*) برای این قطعه برابر با $۱۰^{-۶}$ یا ۱ ۱ پیکوگرم بود (شکل ۲).



شکل ۲) آزمایش تعیین حساسیت برای رقت‌های مختلف DNA تخلیص شده سروار L.Canicola
(۱): ۱۰ng (۲): ۱ ng (۳): ۱۰۰ pg (۴): ۱۰ pg (۵): ۵ pg (۶): ۲/۵ pg (۷): ۱ pg (۸): ۰/۱ (۹): سایز مارکر

بحث

لپتوسپیروز از جمله مهم‌ترین بیماری‌های قابل انتقال از دام به انسان است و بر اساس گزارش‌های به‌دست آمده از نقاط مختلف کشور در خصوص افزایش وقوع بیماری و با توجه به اهمیت جنبه‌های بهداشتی و اقتصادی ناشی از لپتوسپیروزیس (۲۸)، بررسی و مطالعه روش‌های سریع تشخیص این بیماری امری مهم قلمداد می‌گردد. تشخیص سریع و دقیق بیماری و نیز جداسازی گونه‌های بیماری‌زا از غیربیماری‌زا از مهم‌ترین اقداماتی است که باید جهت پیشگیری، کنترل و درمان صحیح بیماری صورت گیرد. از آنجائی‌که روش‌های سرولوژیکی دارای محدودیت‌هایی هستند، مثلاً استفاده از آن‌ها نیازمند به گذشت ۲-۱ هفته از شروع بیماری و ایجاد پاسخ هومورال است، از جهتی دیگر این روش‌ها نیاز به

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

کشت باکتری لپتوسپیرا دارند که رشد آن در محیط کشت بسیار کند بوده و احتمال آلودگی کشت‌ها بالاست، بنابراین از روش‌های مولکولی برای تشخیص لپتوسپیروز استفاده شد. روش‌های مولکولی سریع و قابل اعتماد می‌باشند که برای گروه گسترده‌ای از ایزوله‌های میکروبی به‌کار می‌رود و جایگزین کشت شده‌اند. با استفاده از این روش بیماری در همان مراحل اولیه تشخیص داده می‌شود. روش PCR که DNA موجود در ژنوم باکتریال را تکثیر می‌کند، جهت تعیین ویژگی‌ها و تمیز دادن گونه‌های لپتوسپیرا مورد استفاده قرار گرفته است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌دلیل حساسیت و ویژگی بالا کاربرد بسیار زیادی در تشخیص لپتوسپیروز پیدا کرده است (۳۴). این روش توانایی تایپینگ سریع گونه‌های لپتوسپیرا را در حد سروگروپ دارد و در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۵ و ۳۶).

انجام PCR بر مبنای ژن *ligB* که در میان سروارهای بیماری‌زا ثابت و حفظ شده است برای شناسایی لپتوسپیروز در نمونه‌های بالینی بسیار مفید می‌باشد. بنابراین هدف از اجرای این پروژه تشخیص مولکولی لپتوسپیراهای بیماری‌زا در روش PCR بر مبنای ژن *ligB* می‌باشد که نخستین بار در ایران انجام گردیده است.

از سال ۱۹۹۰ تا به حال چندین پروتکل PCR جهت تشخیص DNA لپتوسپیرا در نمونه‌های بالینی به‌کار گرفته شده است که بیشتر آن‌ها حساسیت بالایی را نشان دادند (۳۷ و ۳۸).

بنابراین می‌توان از روش PCR برای تشخیص سریع و دقیق این باکتری بهره جست. در بررسی کنونی مشخص شد که ژن *ligB* در سویه‌های بیماری‌زای لپتوسپیرا وجود دارد در حالی که در سویه استاندارد غیربیماری‌زا *L.biflexa* حضور ندارد. در بررسی‌های گوناگون انجام شده در دنیا توسط دیگر پژوهشگران، حضور ژن *ligB* در میان سویه‌های پاتوژن لپتوسپیرا مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است (۴۰).

در مطالعه‌ای که توسط سانکر (Sankar) و همکاران با عنوان کلونینگ و تعیین توالی ژن *ligB* باکتری لپتوسپیرا انتروگانس سروار کانیکولا انجام گرفت نشان داده شد که ژن *ligB*، ژنی با درجه حفاظت شدگی بالا در سروارهای بیماری‌زا می‌باشد و از پروتئین شبه ایمونوگلوبولین LigB می‌توان به‌عنوان ابزاری مفید در تشخیص لپتوسپیروزیس حیوانی استفاده نمود (۳۹).

در بررسی دیگری که توسط سرکایرا (Cerqueira) و همکاران انجام گرفت مشخص گردید که پروتئین‌های Lig به‌عنوان نشانه‌هایی برای تشخیص لپتوسپیرا شناخته شده‌اند و به‌عنوان واکسنی قوی قلمداد می‌شوند (۴۱). یافته‌های این بررسی ماهیت حضور پروتئین LigB را در همه سروارهای بیماری‌زا لپتوسپیرا و اینکه LigA و LigC در تمام گونه‌ها حاضر نیستند را تأئید می‌کند. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که *ligB* نشانگری مولکولی است که توان تمایز سروارها بیماری‌زا از غیربیماری‌زا را داراست و در واقع *ligA* از *ligB* طی یک رویداد همانندسازی ناقص به‌وجود می‌آید (۴۱).

در بررسی که توسط یان (Yan) و همکاران بر روی ایمنی‌زایی پروتئین شبه ایمونوگلوبولین LigB انجام گرفت، مشخص گردید که علیه هر دو پروتئین LigB و LigA آنتی‌بادی تولید می‌شود. بنابراین از این پروتئین‌ها می‌توان در تهیه واکسن لپتوسپیروزیس بهره جست. فعال شدن ایمنی سلولی به کمک قطعات LigB ریکامبیننت (rLigB) با مشاهده تقسیم لنفوسیت‌ها مشخص گردید که این امر نشان دهنده

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

این است که واکسن پروتئینی rLigB می‌تواند با تولید آنتی‌بادی ایمنی ایجاد نماید (۴۰).

با توجه به دستیابی به نتایج مشابه با بررسی‌های دیگر در جهان در خصوص حضور ژن *ligB* در سروارهای بیماری‌زای لپتوسپیرا می‌توان از این ژن برای تفکیک لپتوسپیراهای پاتوژن بهره‌گیری کرد. تست MAT در مرحله حاد بیماری و زمان دفع باکتری از ادرار، قادر به شناسایی تیتر آنتی‌بادی نمی‌باشد (۱۷). بنابراین PCR به عنوان یک روش سریع، حساس و اختصاصی برای تشخیص عفونت‌های لپتوسپیرایی خصوصاً در اوایل بیماری بسیار حائز اهمیت است (۱۸) نتایج به‌دست آمده نشان داد که استفاده از *ligB* می‌تواند در تشخیص ملکولی لپتوسپیراهای بیماری‌زا به‌کار رود و از ویژگی و حساسیت بالایی برخوردار است.

سپاس و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج جهت حمایت‌های مالی که برای انجام این طرح اختصاص داده‌اند و همچنین گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و همه کارکنان آزمایشگاه مرجع لپتوسپیرا (بخش میکروب‌شناسی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج) سپاس‌گزاری می‌نمایند.

Reference:

1.Gomp FS, Velez A. Leptospirosis. N Eng J Med 2008; 23: 44-8.
2.Levett PN, Morey RE, Galloway RL, et al. Leptospira broomii sp. nov., isolated from humans with Leptospirosis. Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56: 671-3.
3.Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, et al. Human Leptospirosis caused by a new, antigenically uniqe leptospira associated with a Rattus species reservoir in the Peruvian Amazon. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2: e213.
4.Ellis WA, Hovind-Hougen K, Moller S, et al. Morphological Changes Upon Subculturing of freshly Isolated Strains of Leptospira Inteerogans Serovar Hardjo. Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene 1 Abt Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie=International journal of microbiology and hygiene A, Medical microbiology, infectiousdiseases, parasitology 1983; 225: 323-35.
5.Slak A, Kalambaheti T, Symonds M, et al. Leptospira wolfli sp.Nov, isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol 2008; 58: 2305-8.
6.Alexander AD, Rule PL. Penicillins, Cephalosporins, and Tetracyclines in Treatment of Hamsters with Fatal Leptospirosis. Antimicrobe Agents chemoter 1986; 30: 835-9.
7.Gsell O. The History of Leptospirosis: 100 years. Zetraial bakteriol Microbial hyg (A) 1984; 257: 437-8.
8.Levett PN. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? J Med Microbiol 1999; 48: 417-8.
9.Brandao AP, Camargo ED, da Silva D, et al. Macroscopic Agglutination Test for rapid Diagnosis of Human Leptospirosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 3138-42.
10.Thompson JC, Manktelow BW. Pathogensis and Red Blood Cell Destruction in Haemoglobinaemic Leptospirosis. J Copm Pathol 1986; 96: 529-40.
11.Jansen A, Frank C, Koch J, et al. Surveillance of vector-borne diseases in Germany: trends and challenges in the view of disease emergence and climate change. Parasitol Res 2008; 103: S11-7.
12.Miller DA. Survey to Estimate the Prevalence of Leptospira Interrogans Infection in Cattle in United State of America. J Vet Res 1991; 52: 761-5.
13.Maghami GH, Hooshmand R, Farhang A, et al. Leptospirosis in Small Mammals of Iran, II: Isolation of Leptospira Grippotyphosa from Mus Muscultus. J Wildlife Dis 1977; 13: 286-9.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

14.Beers M, Mark H, Berkow R. Infection Disease Caused by Spirocheats. In: Beers M, Mark H, Berkow R, editors. The Merk Manual of Diagnosis and Therapy. 17th ed. Whitehouse Station, NJ: Merk Research Laboratories; 2004.
15.Korver H, editor. Microscopic Agglutination Test (MAT) for the Diagnosis of Leptospirosis and Serotyping of Leptospirosis. Leptospira in the African continent. RCUB. (Accessed in Apr 24, 2013 at http://tesla.rcub.bg.ac.rs/~lepto/lab/mat.html).
16.Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, et al. Leptospirosis in "eco-challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. Emerg Infect Dis 2003; 9: 702-7.
17.Lin YP, Chang YF. The C-terminal variable domain of LigB from Leptospira mediates binding to fibronectin. J Vet Sic 2008; 9: 133-44.
18.McBride AJ, Cerqueira GM, Suchard MA, et al. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic Leptospira spp. Infect Genet Evol 2009; 9: 196-205.
19.Flannery B, Costa D. Evaluation of recombinant leptospiral antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 2001; 39: 3303-10.
20.Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, et al. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic Leptospira based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. FEMS Microbiol Lett 2005; 243: 437-45.
21.Cheema PS, Srivastava SK, Amutha R, et al. Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipl21 and lipl32 genes. Indian J Exp Biol 2007; 45: 568-73.
22.Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO Offset Publ 1982: 67: 1-171.
23.World Health Organization (WHO). Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO; 2003.
24.Vandyousefi J, Moradi BS, Erabi I, et al. Developing and triple vaccine for leptospirosis in cattle and sheep. Razi Institute; 2000.
25.Asadpour Y, Moradi BS, Abadi R, et al. Final report. Survey on prevalence of Leptospirosis in Guilan's and serotype determination. Razi Institute; 2005.
26.Shpilberg O, Shaked Y, Maier MK, et al. Long-term follow-up after leptospirosis. South Med J 1990; 83: 405-6.
27.Lin YP, Chang YF. A domain of the Leptospira LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. Biochem Biophys Res Commun 2007; 362: 443-8.
28.Choy HA, Kelley MM, Chen TL, et al. Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. Infect Immun 2007; 75: 2441-50.
29.Levett PN. Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. Proceedings of the 2nd Meeting of the International Leptospirosis Society. 1999 Aug. 22-25, Marysville, Victoria, Australia.
30.Woodward MJ, Redston JS. Differentition of leptospira serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment Length polymorphism. Vet Rec 1993; 132: 325-6.
31.Aghaiypour K, Safavieh S. Molecular detection of pathogenic Leptospira in Iran. Razi Institute 2008; 62: 191-7.
32.Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, et al. Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. Clin infect Dis 1997; 25: 720- 4.
33.Woodward MJ, Redstone JS. Difrenteation of leptospira serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment Length polymorphism. Vet Rec 1993; 132: 325-6.
34.Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol 1995; 43: 110-4.
35.Merien F, Baranton B, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J Infect Dis 1995; 172: 281-5.
36.Vahdat K, Nabipour I, Motamedi M, et al. A sero-epidemiological survey on leptospirosis in the livestock breeders during the outbreak of haemorrhagic fever in domestic animals of the Helleh River area in 2004. ISMJ 2005; 8:53-9
37.Holt JG, editor. Bergey's manual of systematic bacteriology. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984; p. 62-7.
38.Croda J, Figueria CP, Wunder EA Jr, et al. Targeted mutagenesis in pathogenic Leptospira species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. Infect Immun 2008; 76: 5826-33.
39.Sankar S, Harshan HM, Thankapandian E, et

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

al. Cloning and sequencing of LigB gene of Leptospira interrogans serovar Canicola. J Immunol Immunopathol 2008; 10: 113-5.

40.Yan W, Faisal SM, McDonough SP, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant Leptospira immunoglobulin-like protein B(rLigB) in a hamster challenge model. Microbes Infect 2009; 11: 230-7.

41.Cerqueira GM, McBride AJ, Picardeau M, et al. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic Leptospira species and application of ligB to typing leptospiral isolates. J Med Microbil 2009; 58: 1173-81.

42.Amirinejad R, Vahdat K, Nabipour I, et al. Diagnosis of Leptospirosis in haemorrhagic fever in domestic animals of the Helleh River area in 2004 by polymerase chain reaction (PCR) molecular technique. ISMJ 2007; 10: 9-18.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]

ISMJ 2014; 17(4): 550-559

Original article

Detection of pathogenic Leptospira spp. By polymerase chain reaction reaction (PCR) targeting ligB gene

F. Fotohi [1], M. Dezhbord [2], P. Khaki [1, 2*], R. Pilehchian Langrodi [3], B. Salehi [1], S. Moradi Bidhendi [2]

[1]Department of Microbiology, School of Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, IRAN
[2]Department of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, IRAN
[3] Department of Anaerobic, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, IRAN

(Received 10 Aug, 2012 Accepted 5 Sep, 2012)

Abstract

Background: Leptospirosis is an emerging infectious disease and is considered to be the most widespread zoonotic disease in the world. LigB is an immunogenic outer membrane protein. The *leptospiral ligB* gene expressed only in pathogenic Leptospira spp. The aim of this study was molecular diagnosis of pathogen Leptospires by PCR based on *ligB* gene.

Materials and Methods: Five pathogenic Leptospires: *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. serjoe hardjo* and *saprophytic L*. biflexa were used in this study. The bacteria were inoculated into the selective culture medium and extraction of the genomic DNA was performed by standard Phenol-Chlorophorm method. The specific primers for proliferation of *ligB* gene were designed. The specificity and sensitivity of PCR method was evaluated.

Results: PCR product was 1041bp which indicated proliferation of *ligB* gene which was supported using electrophoresis. The PCR based on *ligB* gene detected all pathogenic reference serovars of Leptospira spp. tested. No PCR products were amplified from the non-pathogenic *L. biflexa.*

Conclusion: Considering the spread of Leptosperosis in moderate and hot areas which have high rate of fall, a proper molecular diagnostic test with high specificity and sensitivity such as PCR is essential. PCR assay with high specificity and sensitivity may prove to be a rapid method for diagnosing acute leptospirosis. The results suggested that the PCR based on *ligB* gene can be used for detection of pathogenic leptospires.

Keywords: Leptospirosis, Leptospira interrogans, PCR, *ligB*

***Address for correspondence*: Department of Microbiology, School of Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, IRAN; E-mail: p.khaki@rvsri.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29]