



ISMJ 2014; 17(4): 550-559

دوماهنامه طب 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)

شناسایی مولکولی لپتوسپیراهای بیماری‌زا به روش واکنش

زنجره پلیمرز بر مبنای ژن *ligB*

فریبا فتوحی^۱، مهرانگیز دژبرد^۲، پژواک خاکی^{۱*}، رضا پیله‌چیان لنگرودی^۳

بهزاد صالحی^۱، سهیلا مرادی بیده‌ندی^۲

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، ایران

^۲ بخش میکروبی‌شناسی، 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 ژئونوز 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 به روش PCR بر مبنای ژن *ligB* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی از پنج سرووار بیماری‌زای لپتوسپیرا و یک سرووار 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 سرووارهای 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 به روش 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 میکروبی‌شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج

مقدمه

لپتوسپیروز بیماری باکتریایی مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی می‌باشد که توسط نوعی اسپروکت از خانواده اسپروکتاسه 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 ماریچی و متحرک می‌باشند که طول آن‌ها با هم دیگر متفاوت است زیرا سلول‌ها مداوم رشد می‌کنند تا به دو برابر طول خود برسند و سپس 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. لیپولی 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 ویژگی‌های اجزای پروتئین‌های غشایی لپتوسپیرای 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 سرووارهای بیماری‌زای لپتوسپیرا مشاهده می‌گردد ولی در سرووارهای غیربیماری‌زا دیده نمی‌شود (۲۸).

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

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 اسمالارپه فیزیولوژیک، افزایش می‌یابد (۲۹). البته پروتئین‌های غشایی دیگری نیز در لپتوسپیراها وجود دارد مانند LipL۳۲، Lip۱۲۱، Lip۱۳۶، Omp۱ و 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، به دلیل تشابه آن با بیشتر عفونت‌های حاد مشکل است. علائم بالینی این عفونت در ۹۰ درصد موارد مشابه آنفلوآنزا بوده و در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع، بیماری وارد فاز حاد شده و صدمات جدی و طولانی مدت ایجاد می‌کند. بنابراین تشخیص صحیح و به موقع 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 به دلیل نیاز به کشت این باکتری با مشکلاتی مواجه است (۱۴).

روش‌های مولکولی جهت درمان به موقع و کنترل عفونت و تشخیص سریع و دقیق لپتوسپیروز مناسب می‌باشد. روش‌های متداول شناسایی لپتوسپیراها، هر یک دارای کاستی‌هایی هستند. به طور 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 لپتوسپیراها ژن *ligB* شناسایی شده که به دلیل حضور آن در لپتوسپیراها می‌تواند برای تشخیص مولکولی بیماری لپتوسپیروز استفاده گردد (۲۸). در بررسی پیش رو از آن به عنوان ژن هدف جهت تشخیص مولکولی لپتوسپیراها بیماری‌زا بهره‌گیری شد. بنابراین هدف از تحقیق حاضر شناسایی مولکولی لپتوسپیراها بیماری‌زا به روش واکنش زنجیره پلیمرز بر مبنای ژن *ligB* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

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

L. Canicola (LC-RTCC2805)

L. Grippotyphosa (LG-RTCC2808)

L. Pomona (LPo-RTCC2815)

میکروسکوپ زمینه تیره (Dark Field) مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه‌ها جهت رسوب‌گیری در دور ۱۵۰۰۰ به مدت 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).

L.Icterohaemorrhagiae (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 ۷-۱۰ روز رشد آن‌ها با

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

نام پرایمر	توالی الیگونوکلوئیدی	اندازه قطعه	دمای چسبیدن	محتوای GC	چگالی بهینه
F	5'AATCATATGGTTACTCCAGCAGCCTTAGTT 3'	۳۰ نوکلئوتید	۵۸/۸	٪۴۰	۱۵
R	5'CACATTAATGGATATTTCACGATCGATCCTGG3'	۳۰ نوکلئوتید	۶۰/۳	٪۵۵	۱۵

از غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر (معادل ۱-۱۰ میکروگرم در میکرولیتر) تا ۰/۱ پیکوگرم در میکرولیتر (معادل ۷-۱۰ پیکوگرم در میکرولیتر) رقیق شد. در هر میکروتیوب ۱ میکرولیتر از هر 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 Polymerase (Fermentase, Germany)، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها (Sigma, Germany)، ۰/۲ میلی مولار dNTP mix (CinnaGen Iran)، ۱/۵ میلی مولار Mg^{۲+} (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

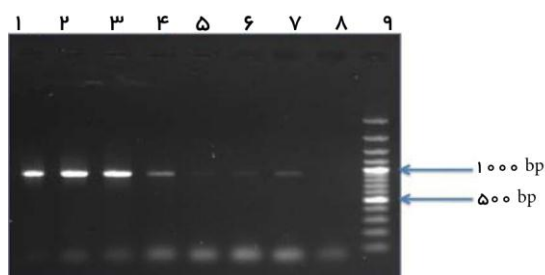
تعیین ویژگی پرایمر

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

تعیین حساسیت پرایمر

برای به دست 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 سرووار کانیکولا

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 10^{-6} یا ۱۱ پیکوگرم بود (شکل ۲).



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

بحث

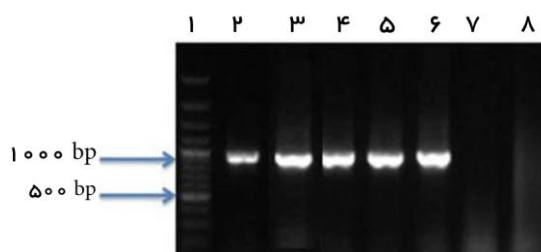
لپتوسپیروز از جمله مهم‌ترین بیماری‌های قابل انتقال از دام به انسان است و بر اساس گزارش‌های به‌دست آمده از نقاط مختلف کشور در خصوص افزایش وقوع بیماری و با توجه به اهمیت جنبه‌های بهداشتی و اقتصادی ناشی از لپتوسپیروزیس (۲۸)، بررسی و مطالعه روش‌های سریع تشخیص این بیماری امری مهم قلمداد می‌گردد. تشخیص سریع 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 آنجائی که روش‌های سرولوژیکی دارای محدودیت‌هایی هستند، مثلاً استفاده از آن‌ها نیازمند به گذشت ۱-۲ هفته از شروع بیماری و ایجاد پاسخ همورال است، از جهتی دیگر این روش‌ها نیاز به

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 به مدت ۵ دقیقه در دمای 94°C قرار داده شد و بعد از آن دناتوراسیون در 94°C به مدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمرها به DNA هدف 58°C به مدت ۱ دقیقه و توسعه پرایمرها در 72°C به مدت ۱ دقیقه در ۳۵ چرخه تکرار شد و سرانجام ۷ دقیقه واکنش در 72°C 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 تأیید قرار گرفت. یافته‌های آزمایش تعیین ویژگی PCR نشان داد که در پنج سوش بیماری‌زای لپتوسپیرو ژن کد کننده پروتئین سطحی *LigB* وجود دارد اما این ژن در لپتوسپیرو غیربیماری‌زای استاندارد *L. biflexa* مشاهده نگردید (شکل ۱).



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

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 سرووار کانیکولا انجام گرفت نشان داده شد که ژن *ligB*، ژنی با درجه حفاظت شدگی بالا در سرووارهای بیماری‌زا می‌باشد و از پروتئین شبه ایمونوگلوبولین *LigB* می‌توان به عنوان ابزاری مفید در تشخیص لپتوسپیروزیس حیوانی استفاده نمود (۳۹).

در بررسی دیگری که توسط سرکاریا (Cerqueira) و همکاران انجام گرفت مشخص گردید که پروتئین‌های *Lig* به عنوان نشانه‌هایی برای تشخیص لپتوسپیرا شناخته شده‌اند و به عنوان واکسنی قوی قلمداد می‌شوند (۴۱). یافته‌های این بررسی ماهیت حضور پروتئین *LigB* را در همه سرووارهای بیماری‌زا لپتوسپیرا و اینکه *LigA* و *LigC* در تمام گونه‌ها حاضر نیستند را تأیید می‌کند. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که *ligB* نشانگری مولکولی است که توان تمایز سرووارها بیماری‌زا از غیربیماری‌زا را داراست و در واقع *ligA* از *ligB* طی یک رویداد همانندسازی ناقص به وجود 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* ریکامیننت (*rLigB*) با مشاهده تقسیم لنفوسیت‌ها مشخص گردید که این امر نشان دهنده

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 به کار 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 پلیمرز به دلیل حساسیت و ویژگی بالا کاربرد بسیار زیادی در تشخیص لپتوسپیروز پیدا کرده است (۳۴). این روش توانایی تایینگ 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 سرووارهای 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 به کار 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

ملکولی لپتوسپیروهای بیماری‌زا به کار 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 لپتوسپیرو (بخش میکروبی‌شناسی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج) سپاس‌گزاری می‌نمایند.

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 سروواریهای بیماری‌زای لپتوسپیرو می‌توان از این ژن برای تفکیک لپتوسپیروهای پاتوژن بهره‌گیری کرد. تست MAT در مرحله حاد بیماری و زمان دفع باکتری از ادرار، قادر به شناسایی تیتراژ آنتی‌بادی نمی‌باشد (۱۷). بنابراین PCR به عنوان یک روش سریع، حساس و اختصاصی برای تشخیص عفونت‌های لپتوسپیرویی خصوصاً در اوایل بیماری بسیار حائز اهمیت است (۱۸) نتایج به‌دست آمده نشان داد که استفاده از *ligB* می‌تواند در تشخیص

Reference:

- Gomp FS, Velez A. Leptospirosis. N Eng J Med 2008; 23: 44-8.
- 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.
- Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, et al. Human Leptospirosis caused by a new, antigenically unique leptospira associated with a Rattus species reservoir in the Peruvian Amazon. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2: e213.
- Ellis WA, Hovind-Hougen K, Moller S, et al. Morphological Changes Upon Subculturing of freshly Isolated Strains of *Leptospira interrogans* 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, infectious diseases, parasitology 1983; 225: 323-35.
- Slak A, Kalambaheti T, Symonds M, et al. *Leptospira wolflii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol 2008; 58: 2305-8.
- Alexander AD, Rule PL. Penicillins, Cephalosporins, and Tetracyclines in Treatment of Hamsters with Fatal Leptospirosis. Antimicrobe Agents chemoter 1986; 30: 835-9.
- Gsell O. The History of Leptospirosis: 100 years. Zetral bakteriol Microbial hyg (A) 1984; 257: 437-8.
- Levett PN. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? J Med Microbiol 1999; 48: 417-8.
- 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.
- Thompson JC, Manktelow BW. Pathogenesis and Red Blood Cell Destruction in Haemoglobinaemic Leptospirosis. J Copm Pathol 1986; 96: 529-40.
- 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.
- 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.
- 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.

14. Beers M, Mark H, Berkow R. Infection Disease Caused by Spirocheates. 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 Sci* 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. Differentiation 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. Differentiation 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, Figuieria 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

- 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.

Original article

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

**F. Fotohi¹, M. Dezhbord², P. Khaki^{1, 2*}, R. Pilehchian Langrodi³,
B. Salehi¹, S. Moradi Bidhendi²**

¹Department of Microbiology, School of Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, IRAN

²Department of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, IRAN

³Department 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 *Leptospira* by PCR based on *ligB* gene.

Materials and Methods: Five pathogenic *Leptospira* spp.: *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *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 Leptospirosis 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 *leptospira*.

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