نشریه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز، دوره ۳، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۳- صفحات ۲۲۸-۲۲۱

کلونینگ و تعیین توالی ژن کد کننده لیپوپروتئین سطحی LipL41 در باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس سروار گریپوتیفوزا

مریم سادات سلطانی[۱]، پژواک خاکی*[۲]، سهیلا مرادی بیدهندی[۲]، محمدحسن شاه حسینی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
[۲] استادیار، آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا، بخش میکروب‌شناسی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
[۳] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: استادیار، آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا، بخش میکروب‌شناسی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۰۹۱۲-۳۸۹۴۹۸۶
E-mail: p.khaki@rvsri.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۷

چکیده

زمینه و هدف: لپتوسپیروزیس یک بیماری عفونی می‌باشد که توسط سروارهای بیماریزای لپتوسپیرا ایجاد می‌شود. افزایش ارتقای کیفی روش‌های کاربردی و معتبر در تشخیص این بیماری و همچنین تولید واکسن نوترکیب ، نیاز به آنتی‌ژن‌های اختصاصی دارد که در بین سروارهای بیماریزای لپتوسپیرا یکسان و مشابه است. پروتئین‌های غشای خارجی لپتوسپیرا (OMPs)، آنتی‌ژن‌های مؤثری می‌باشند که قادر به تحریک پاسخ ایمنی مشخص در دوره عفونت می‌باشند.
در بین این آنتی‌ژن ها، LipL41 یک لیپو پروتئین ایمونوژنیک است که تنها در سروارهای بیماریزا وجود دارد بنابراین می‌توان آن را به عنوان کاندیدای مناسبی در تهیه واکسن مؤثر و کارآمد و همچنین در روش‌های تشخیصی در نظر گرفت. به منظور تعیین میزان حفاظت شدگی ژن *lipL41*، این ژن در لپتوسپیرا اینتروگانس سروار واکسینال و بومی گریپوتیفوزا کلون و تعیین توالی گردید.

مواد و روش‌ها: لپتوسپیرا اینتروگانس سروار واکسینال و بومی گریپوتیفوزا جهت تلقیح در محیط کشت انتخابی(EMJH) مورد استفاده قرار گرفت و استخراج DNA ژنومی به روش استاندارد فنل کلروفرم انجام گردید.
ژن *lipL41* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و در وکتور pTZ57R/T کلون گردید و به سلول‌های مستعد شده *E. coli* سویه (Top10) انتقال داده شد. سپس پلاسمید نوترکیب استخراج و تعیین توالی گردید. سکانس‌های مرتبط به منظور آنالیز همولوژی با سکانس‌های ثبت شده در بانک ژنی مقایسه شدند.

یافته‌ها: محصول PCR ژن *lipL41* یک قطعه ۱۰۶۵جفت بازی بود. که این قطعه در سروار غیر بیماریزا *L. biflexa* مشاهده نگردید. بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که قرابت نوکلئوتیدی ژن *lipL41* بین سروار واکسینال (RTCC2808) و سروار بومی بیماریزای (RTCC2825) گریپوتیفوزا ۱۰۰٪ بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *lipL41* با ۹۵/۹٪ تشابه یک ژن حفاظت شده در سروارهای مختلف بیماریزا می‌باشد. از این رو ژن کلون شده در تحقیق حاضر را می‌توان با هدف بیان پروتئین نو ترکیب در تهیه واکسن نوترکیب مؤثر و کارآمد و در روش‌های تشخیصی لپتوسپیروزیس مورد هدف قرار داد.

کلمات کلیدی: لپتوسپیروزیس، لپتوسپیرا اینتروگانس، ژن *lipL41* ، کلونینگ، تعیین توالی

Archive of SID

مقدمه

لپتوسپیروزیس یک بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی می‌باشد که توسط اسپیروکت بیماریزایی متعلق به جنس لپتوسپیرا ایجاد می‌شود.[۱-۳] این جنس براساس بیان لیپوپلی ساکارید به سروارهای مختلف بیماریزا و غیر بیماریزا تقسیم‌بندی می‌گردد.[۴] این بیماری نه تنها در کشورهای جهان سوم بلکه در کشورهای پیشرفته نیز به عنوان یکی از مشکلات بهداشت عمومی مطرح می‌باشد.[۵] لپتوسپیروزیس در مناطقی که دارای آب و هوای گرم و مرطوب و بارندگی شدید هستند شیوع بیشتری دارد و در اغلب این مناطق اندمیک است و باعث خسارت‌های اقتصادی با از بین بردن دام و مرگ و میر حدود ۱۰ درصد در انسان می‌شود.[۶]

www.SID.ir

این بیماری در انسان از طریق تماس مستقیم با حیوانات آلوده و یا تماس غیر مستقیم با آب و خاک آلوده به ادرار حیوانات مبتلا به عفونت مزمن نظیر جوندگان، سگ و حیوانات اهلی صورت می‌گیرد.[۳،۷]

معمولاً علائم بالینی لپتوسپیروزیس با سایر بیماری‌های عفونی دیگر اشتباه می‌شود. بطوری که در انسان بیماری از فرم خفیف تا فرم حاد کشنده بروز می‌کند و می‌تواند به شکل شبه آنفلوانزا تا اشکال شدید خونریزی دهنده ظاهر شود و اندام‌های حیاتی مانند کبد، کلیه و ریه را درگیر سازد.[۸]

این بیماری برخلاف بسیاری از بیماری‌های عفونی با علائم مشابه مثل تب دانگ، در صورتی که سریع و بموقع تشخیص داده شود به آسانی با آنتی بیوتیک قابل درمان است. در غیر این صورت احتمال پیشرفت بیماری به سمت نارسایی کلیوی و حتی مرگ وجود خواهد داشت، بنابراین تشخیص صحیح و بموقع این بیماری حائز اهمیت می‌باشد.[۵]

پروتئین‌های غشای خارجی نقش مهمی در ارتباط بین باکتری و میزبان دارند. بدین منظور یکی از رویکردهای مهم تحقیقات مربوط به لپتوسپیروزیس، شناسایی این پروتئین‌ها می‌باشد که در طی عفونت بیان می‌شوند و نقش تعیین کننده ای در بیماریزایی دارند. بنابراین تعیین آنتی‌ژن‌های لپتوسپیرا که در دوره عفونت بیان می‌شوند به منظور تشخیص بیماری و تهیه واکسن‌های نوترکیب حائز اهمیت می‌باشند.[۹-۱۱]

پروتئین‌های غشایی مختلفی مانند LipL32 ،OmpL1 ، LipL41در لپتوسپیراها وجود دارد، که نقش ایمنی زایی دارند. در بین این پروتئین‌ها پروتئین غشایی OmpL1 در بین گونه‌های لپتوسپیراهای بیماریزا از نظر آنتی‌ژنیکی هتروژنسیته بالاتری دارد ولی LipL41 وLipL32 از نظر ساختمانی پایدارتر و تغییرات خیلی کمتری دارند.[۱۱-۱۳]

LipL41 یکی از مهمترین پروتئین‌های ایمونوژنیک غشای خارجی لپتوسپیرا می‌باشد که در میان سروارهای بیماریزای لپتوسپیرا مشاهده می‌شود ولی در سروارهای غیر بیماریزای لپتوسپیرا دیده نمی‌شود. این پروتئین هم در شرایط کشت و هم در شرایط داخل بدن هنگام عفونت به مقدار زیادی بیان می‌شود و این نشانگر آن است که این آنتی‌ژن، یک آنتی‌ژن ایمونوژنیک می‌باشد.[۱۰،۱۴]

این پروتئین به عنوان یک آنتی‌ژن اختصاصی در سروارهای بیماریزای لپتوسپیرا، می‌تواند هم جهت تشخیص سرولوژیک بیماری و به دلیل ایمنی زایی بالا، به عنوان یک کاندیدای مناسب در تهیه واکسن نوترکیب لپتوسپیروزیس به کار گرفته شود [۱۴،۱۵]. همچنین به دلیل ثبات ژن *lipL41* می‌توان از آن در تشخیص مولکولی به روش PCR نیز استفاده نمود.[۱۱،۱۶،۱۷]

بنابراین هدف از این تحقیق، کلونینگ و آنالیز تعیین توالی ژن کد کننده لیپوپروتئین سطحی LipL41 در باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس سروار واکسینال و بومی گریپوتیفوزا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سروارهای لپتوسپیرا، کشت و تخلیص DNA

در این تحقیق از یک سروار واکسینال لپتوسپیرا *L. interrogans* Grippotyphosa(RTCC2808) و یک سروار بیماریزای بومی *L. interrogans* Grippotyphosa(RTCC2825) و یک سروار غیر بیماریزا *L.biflexa* از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا بخش میکروب شناسی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج استفاده گردید.

باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی EMJH (شرکتDifco) همراه با سرم خرگوش و مکمل‌های غذایی در شرایط هوازی و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شدند و بعد از ۱۰-۷ روز رشد آن‌ها توسط میکروسکوپ زمینه سیاه مورد بررسی قرار گرفت. پس از رشد، نمونه‌ها جهت رسوب گیری در دور g ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. جهت تخلیص DNA ژنومیک از روش استاندارد فنل کلروفرم ایزوامیل الکل استفاده شد [۱۸]. کیفیت و کمیت DNA تخلیص یافته توسط الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

PCR

در این تحقیق به منظور تکثیر و دستیابی به مقادیر بالایی از این ژن، از پرایمرهای اختصاصی ژن *lipL41* که توسط Haake وهمکاران گزارش شده بود استفاده گردید.[۱۴]

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر (مقدار ۱۰۰نانوگرم DNA،

Archive of SID
www.SID.ir

۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۲۵µl Master) Mix 2x (شرکت Ampliqon) طبق برنامه زیر انجام شد:

برای دناتوراسیون اولیه ، DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ °C قرار داده شد و بعد از آن دناتوراسیون در ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها به DNA هدف در ۵۷ °C به مدت ۱ دقیقه وتکثیر پرایمرها در ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه در ۳۰ چرخه تکرار شد و سرانجام ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی در ۷۲ °C قرار گرفت. محصول PCR تمام نمونه‌ها توسط ژل الکتروفورز ارزیابی و تایید گردید.

کلونینگ و تخلیص پلاسمید نوترکیب

محصول PCR ژن *lipL41* لپتوسپیرا انتروگانس سروار گریپوتیفوزا به کمک کیت تخلیص محصول PCR(شرکت Fermentas) خالص سازی شده در وکتور pTZ57R/T الحاق گردید و به باکتری *E. coli* (Top10) انتقال داده شد. پس از قرار دادن سلول و وکتور به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ ، سلول‌ها در دمای ۴۲ °C به مدت یک ونیم دقیقه در بن ماری تحت تاثیر شوک گرمایی قرار گرفته و بلافاصله مجدداً به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. نهایتاً سلول‌ها روی پلیت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین در ۳۷ °C به مدت یک شبانه روز انکوبه گردیدند. سپس حضور ژن *lipL41* در کلنی‌های نوترکیب توسط PCR تائید گردید.کلنی‌های نوترکیب در محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین رشد کرده وتخلیص پلاسمید از سلول‌ها توسط کیت تجاری(شرکت Roche) انجام شد.[۱۸]

تعیین توالی

پلاسمید حاوی ژن مورد نظر جهت تعیین توالی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شد.

پس از به دست آمدن توالی ژن *lipL41* سروار مورد آزمایش، توالی‌های نوکلئوتیدی مورد نظر به کمک برنامه BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژنی که قبلا گزارش شده اند مقایسه گردید (جدول۱).

جهت آنالیز داده‌های تعیین توالی، ابتدا توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار BioEdit به فرمت FASTA تبدیل شدند تا مورد شناسایی نرم افزار آنالیز کننده توالی قرار گیرند. در مرحله بعدی توالی‌های به دست آمده از تحقیق حاضر و توالی‌های به دست آمده مشابه آن‌ها از بانک ژنی، با استفاده از برنامه MegAlign نرم افزار DNASTAR مورد مقایسه قرار گرفتند(جدول۲) و به منظور بررسی ارتباطات فیلوژنتیکی سویه‌های مختلف لپتوسپیرا بر مبنای ژن*lipL41* ، درخت فیلوژنتیکی و جدول تشابه و واگرایی توالی‌ها (جدول۲) با استفاده از این نرم‌افزار رسم شد.

جدول ۱: سروارهای لپتوسپیرا بر اساس ژن

ارگانیسم	Serovar	Accession No.	کشور
L. interrogans	Autumnalis	AY622678	چین
L. interrogans	Canicola	AY622675	چین
L. interrogans	Hardjo	AY642286	هند
L. interrogans	Icterohaemorrhagiae	GQ502197	هند
L. interrogans	Pomona	AY776298	هند
L. interrogans	Grippotyphosa	JQ690557	هند
L. interrogans	Grippotyphosa	AY622681	چین
L. kirschneri	Grippotyphosa	L46794	آمریکا

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲: درصد تشابه و واگرایی توالی ژن *lipL41* سروارهای گریپوتیفوزای مورد مطالعه در این تحقیق و مقایسه آن‌ها با سایر سروارهای ثبت شده در Genbank

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1		99.3	99.6	96.1	99.8	99.1	96.3	99.3	96.1	96.1	1	LA(AY622678)
2	0.7		99.5	96.2	99.5	99.5	96.3	99.6	96.2	96.2	2	LC(AY622675)
3	0.4	0.5		96.3	99.8	99.3	96.4	99.3	96.3	96.3	3	LG(AY622681)
4	4.1	4.0	3.9		96.3	95.9	99.8	96.0	99.6	99.6	4	LG(JQ690557)
5	0.2	0.5	0.2	3.9		99.3	96.4	99.3	96.3	96.3	5	LH(AY642286)
6	0.8	0.4	0.7	4.2	0.7		96.1	99.6	95.9	95.9	6	LI(GQ502197)
7	3.9	3.8	3.7	0.2	3.7	4.0		96.0	99.0	99.0	7	LK(L46794)
8	0.7	0.4	0.7	4.1	0.7	0.4	4.1		96.0	96.0	8	LP(AY776298)
9	4.1	4.0	3.9	0.4	3.9	4.2	1.0	4.1		100.0	9	LG_RTCC2808
10	4.1	4.0	3.9	0.4	3.9	4.2	1.0	4.1	0.0		10	LG_RTCC2825
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

یافته‌ها

محصول PCR به دست آمده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ مشاهده و اندازه آن که یک قطعه bp ۱۰۶۵ بود، با استفاده از سایز مارکر مولکولی استاندارد تأیید شد. همچنین نتایج نشان داد که این ژن در سروار واکسینال و بومی گریپوتیفوزا حضور داشته در حالی که در سروار غیر بیماریزای بایفلکسا وجود نداشت (شکل ۱). ژن *lipL41* تکثیر یافته لپتوسپیرا اینتروگانس در وکتور pTZ57R/T با موفقیت الحاق گردید و به باکتری *E. coli* (Top10) انتقال داده شد. تأیید حضور *lipL41* در کلنی‌های نوترکیب با برداشت از کلنی‌های رشد یافته روی پلیت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین و انجام PCR و تکثیر ژن مورد نظر انجام شد.

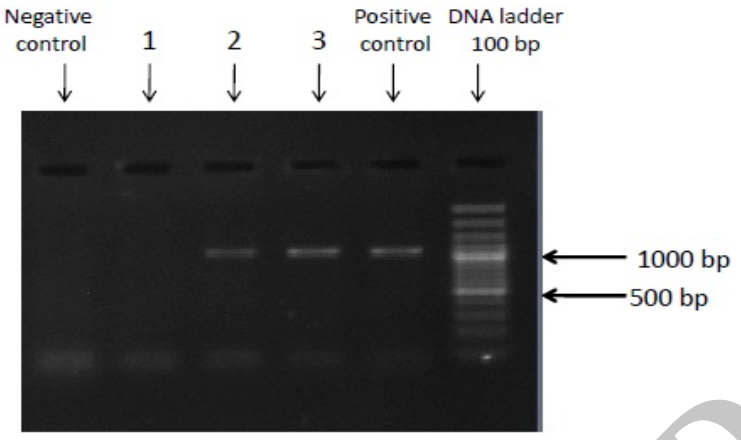
آنالیز توالی ژن *lipL41* در مورد سروارهای واکسینال و بومی گریپوتیفوزا (RTCC2808,2825) و مقایسه آن‌ها با دیگر سروارهای بیماریزای ثبت شده در GenBank انجام گردید (شکل ۲و جدول۲).

نتایج نشان داد که سویه های واکسینال و بومی گریپوتیفوزا ۱۰۰٪ تشابه را با همدیگر دارند و این دو سویه بیشترین قرابت ژنتیکی را با توالی ثبت شده به شماره (JQ690557) که مربوط به لپتوسپیرا اینتروگانس سروار گریپوتیفوزا که جدایه ای از کشور هند است با ۹۹/۶٪ تشابه نشان می‌دهد در حالی که در مقایسه با سروارهای گریپوتیفوزای ثبت شده در بانک ژنی کمترین قرابت ژنتیکی را با لپتوسپیرا اینتروگانس سروار گریپوتیفوزا (AY622681) که جدایه‌ای از کشور چین است با ۹۶/۳٪ تشابه دارد و در مقایسه با سایر سروارهای موجود در بانک ژنی کمترین قرابت ژنتیکی را با سروار ایکتروهموراژیه(GQ502197) که جدایه ای از کشور هند است با ۹۵/۹٪ تشابه نشان می‌دهد و با سروار گریپوتیفوزای *L. kirschneri* (L46794) که جدایه ای از کشور آمریکا است ۹۹٪ تشابه دارد (شکل۲ و جدول ۲).

همچنین سروارگریپوتیفوزا واکسینال و بومی مورد استفاده در این مطالعه کمترین قرابت ژنتیکی را با سروار ایکتروهموراژیه (GQ502197) کشور هند دارند.

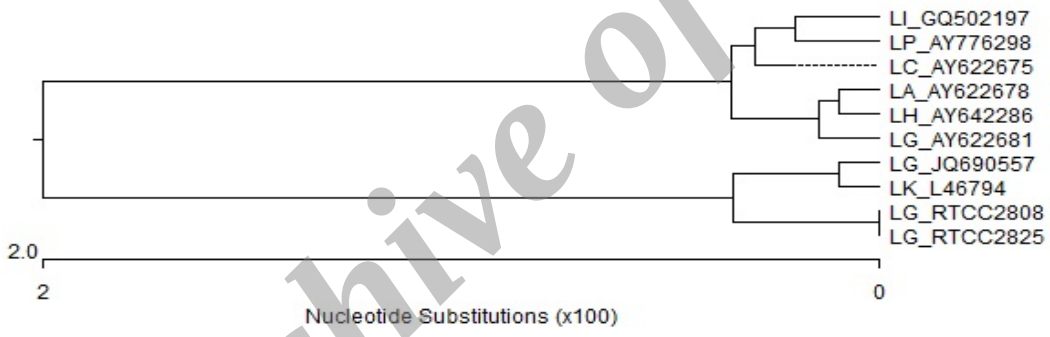
نتایج نشان داد که این ژن، یک ژن حفاظت شده در دو سروار واکسینال و بومی می‌باشد و بالای ۹۵/۹٪ تشابه را با سروارهای مشابه در بانک ژنی در دیگر کشورها نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱: الکتروفورز محصول PCR با استفاده از از پرایمرهای اختصاصی بر اساس ژن *lipL41* جهت شناسایی سروارهای بیماریزا از غیر بیماریزا بر روی ژل آگاروز 1 % به کمک مارکر 100 bp (شرکت Fermentas)

کنترل منفی، (۱) *L. biflexa* (۲) *L.* Grippotyphosa(RTCC2808) (۳) *L.* Grippotyphosa(RTCC2825) ، کنترل مثبت، سایز مارکر 100 bp



شکل۲: درخت فیلوژنی بر اساس آنالیز توالی ژن *lipL41* برای سروارهای گریپوتیفوزای مورد مطالعه و مقایسه آن‌ها با سایر سروارهای ثبت شده در Genbank

LI: *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, LP: *L. interrogans* serovar Pomona,
LC: *L. interrogans* serovar Canicola, LA: *L. interrogans* serovar Autumnalis, LH: *L. interrogans* serovar hardjo, LG: *L. interrogans* serovar Grippotyphosa, *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa

بحث

مطالعات سرواپیدمیولوژیکی و باکتریولوژیکی افزایش شیوع لپتوسپیروزیس را در کشور نشان می‌دهند.[۱۹-۲۳] بنابراین داشتن یک واکسن مؤثر بر علیه این بیماری ضروری می‌باشد. اکثر واکسن‌های رایج با تولید آنتی بادی بر علیه لیپو پلی ساکارید لپتوسپیرایی پاسخ حفاظتی ایجاد می‌کنند. این واکسن‌ها حاوی سروارهای شایع در منطقه می‌باشند ولی به علت متغیر بودن سروارهای موجود در منطقه، ایمنی ایجاد شده ناقص است. بنابراین طراحی و ساخت واکسن نوترکیب مؤثر و کارآمد بر علیه بیماری حائز اهمیت است.[۲۴-۲۶]

بر اساس مطالعات سایر محققین لیپوپروتئین LipL41 به عنوان یکی از کاندیداهای واکسن نوترکیب مطرح است [۱۰،۱۱،۲۷] و از آن جایی که ثبات ژنتیکی ژن *lipL41* به قابلیت استفاده از این ژن برای تهیه واکسن نوترکیب اشاره می‌کند،[۱۲،۲۷] در این مطالعه توالی ژن

Archive of SID
www.SID.ir

lipL41 سروواریهای مختلف لپتوسپیرا بررسی شد و نتایج بیانگر تشابه بسیار بالای این ژن در میان سروواریهای مختلف می‌باشد که نتایج حاصل از مطالعات گذشته نیز با نتایج این تحقیق مطابقت دارند.[۱۲،۱۴،۲۷] لذا با توجه به ثبات این ژن در بین سروواریهای بیماریزای لپتوسپیرا، آنتی‌ژن نوترکیب حاصل از آن می‌تواند در بهبود تولید واکسن نوترکیب نقش مهمی داشته باشد.

از سوی دیگر با توجه به این که تابلوی بالینی لپتوسپیروزیس با اغلب عفونت‌های باکتریایی یا ویروسی حاد تشابه داشته بنابراین تشخیص این بیماری با اتکا به علائم بالینی مشکل و در اغلب موارد غیرممکن است.[۲۸]

با توجه به اهمیت تشخیص صحیح و زود هنگام این بیماری وجود یک تست آزمایشگاهی مناسب با حساسیت و ویژگی بالا برای تشخیص این بیماری ضروری به نظر می‌رسد.[۲۹]

در آزمایش‌های سرولوژیکی مانند ELISA که امکان تشخیص بیماری در مراحل اولیه وجود دارد، نیاز به آنتی‌ژنی که در میان تمام سروواریهای بیماریزای لپتوسپیرا ثابت باشد وجود دارد.[۳۰،۳۱] از آن جایی که پروتئین‌های غشای خارجی لپتوسپیرا به میزان بالایی در سطح سلول باکتری ثابت مانده اند و تغییر نمی کنند و همچنین در طی عفونت در بدن میزبان بیان می‌شوند بنابراین می‌توان از پروتئین‌های نوترکیب لپتوسپیرا به عنوان آنتی‌ژن در آزمایش‌های سرولوژی بهره جست.[۱۵،۳۲-۳۴] همچنین در تشخیص مولکولی این بیماری به وسیله PCR، نیاز به یک ژن ثابت در میان تمام لپتوسپیراهای بیماریزا می‌باشد. بنابراین می‌توان از ژن‌های کد کننده پروتئین‌های غشای خارجی نیز به عنوان ژن هدف در تشخیص مولکولی بهره جست.[۱۶،۱۷،۳۵،۳۶]

در این بین لیپوپروتئین LipL41 یکی از مهمترین پروتئین‌های غشای خارجی لپتوسپیرا می‌باشد که گزارش شده که به طور اختصاصی فقط در سروواریهای بیماریزا وجود دارد،[۱۰،۱۱،۱۷] بنابراین آنالیز مولکولی این ژن در بین سروواریهای بیماریزای لپتوسپیرا ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از انجام این تحقیق، آنالیز مولکولی ژن کد کننده آنتی‌ژن لیپوپروتئین سطحی LipL41 در لپتوسپیرای سروار گریپوتیفوزا می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که این ژن در سروواریهای بیماریزای واکسینال و بومی گریپوتیفوزا وجود دارد در صورتی که در سروار غیر بیماریزای *L.biflexa* وجود ندارد. این نتیجه نشانگر اهمیت این ژن در سروواریهای بیماریزای لپتوسپیرا می‌باشد، این نتایج با یافته‌های سایر محققین نیز مطابقت دارد.

نتایج به دست آمده در تحقیق ما نشان داد که ژن *lipL41* دارای ثبات ژنتیکی بالایی بین دو سروار واکسینال و بومی گریپوتیفوزا (شباهت ۱۰۰٪) و سایر سروواریهای بیماریزای ثبت شده در Genbank (با بیش از ۹۵/۹٪ شباهت) می‌باشد.

Natarajaseenivasan و Theodoridis در دو مطالعه مختلف عنوان کردند که آزمایش ELISA بر اساس آنتی‌ژن نوترکیب LipL41 حساسیت و اختصاص قابل قبولی را نشان می‌دهد.[۳۴،۳۷]

در مطالعه دیگری که به منظور بررسی آنتی‌ژن نوترکیب LipL41 لپتوسپیرا اینتروگانس سروار کانیکولا در الایزا برای تشخیص لپتوسپیروزیس در گاوها انجام شد مشخص گردید که پروتئین نوترکیب rLipL41 می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب در تشخیص سرولوژیکی عفونت لپتوسپیروزیس در گاو مورد استفاده قرار گیرد.[۳۳]

همچنین در روش تشخیص سرولوژی دیگری Latex agglutination test(LAT) از آنتی‌ژن نوترکیب LipL41 استفاده شد که حساسیت و اختصاص بالایی را نشان می‌دهد و به عنوان روشی سریع و اقتصادی برای غربالگری در مقیاس بالا در مناطق اندمیکی که تجهیزات پیشرفته ای ندارند مطرح می‌باشد.[۳۸]

نتیجه حاصل از تحقیق ما با نتایج مطالعات سایر محققین حاکی از این می‌باشد که ژن *lipL41* یک ژن پایدار است که می‌توان از این ژن، به عنوان یک ژن هدف در تشخیص مولکولی لپتوسپیروزیس به روش PCR استفاده نمود.[۱۶،۱۷] همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق پیشنهاد می‌شود که این ژن به عنوان یک ژن با ثبات بالا در کلونینگ و بیان یک آنتی‌ژن نوترکیب برای استفاده در تهیه واکسن نوترکیب مؤثر و همچنین در کیت‌های تشخیصی سرولوژیکی مانند الایزا استفاده شود.

سپاس و قدردانی

نویسندگان این مقاله، مراتب تشکر و قدر دانی خویش را از تمامی کارکنان بخش میکروب شناسی موسسه واکسن و سرم سازی رازی به خاطر همکاری بی دریغشان اعلام می دارند.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Adler B, A. dlPM. Leptospira and leptospirosis. In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Iowa, USA: Blackwell; 2010.
2. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet infectious diseases 2003;3:757-71.
3. Levett PN. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews 2001;14:296-326.
4. Adler B, A. dlPM. Leptospira and leptospirosis. Veterinary Microbiology 2010;140:287-96.
5. WHO. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control (Geneva: World Health Organization); 2003.
6. Levett P, Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. Leptospira. Manual of clinical microbiology: Volume 1; 2006:963-70.
7. Vijayachari P, Sugunan A P, N SA. Leptospirosis: an emerging global public health problem. Journal of biosciences 2008;33:557-69.
8. Cachay ER, Vinetz JM. A global research agenda for leptospirosis. J Postgrad Med 2005;51:174-8.
9. Gamberini M, Gamez RM, Atzingen MV, et al. Whole-genome analysis of Leptospira interrogans to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. FEMS microbiology letters 2005;244:305-13.
10. Shang E, Theresa A, Haake D. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding LipL41, a Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic Leptospira Species. Infection and immunity 1996;64:2322-30.
11. Vedhagiri K, Natarajaseenivasan K, Chellapandi P, et al. Evolutionary Implication of Outer Membrane Lipoprotein-Encoding Genes ompL1, lipL32 and lipL41 of Pathogenic Leptospira Species. Genomics, Proteomics & Bioinformatics 2009;7:96-106.
12. Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL. Molecular Evolution and Mosaicism of Leptospiral Outer Membrane Proteins Involves Horizontal DNA Transfer. Journal of bacteriology 2004;186:2818-28.
13. Darian. EK, Forghanifard. MM, Bidhendi. SM, et al. Cloning and Sequence Analysis of LipL32, a Surface–Exposed Lipoprotein of Pathogenic Leptospira Spp. Iran Red Cres Med J 2013;15:e8793.
14. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, et al. Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 Exhibit Synergistic Immunoprotection. Infection and immunity 1999;67:6572-82.
15. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Sehgal SC. Phenotypic & genotypic conservation of ompL1 & lipL41 among leptospiral isolates of Andaman Islands. Indian J Med Res 2005;122:343-7.
16. Chandan S, Umesha S, Bhure SK, Haraprasad N, Chandrashekar S. Development of PCR assay for targeting partial lipL21 and lipL41 gene of leptospira. Nepal Journal of Biotechnology 2011;1:22-30.
17. Ambily R, M. Mini , Siju Joseph , Krishna SV. lipL41 gene specific PCR for the detection. JIVA 2012;10:5-7.
18. Sambrook J, DW R. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor ,NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
19. Khaki P, Moradibidhendi S, Vand e Yousefi J. Prevalence Of Leptospirosis In Iran In: 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society. Thailand; 2005:179.
20. Honarmand H, Eshraghi S. Detection of Leptospires serogroups, Which Are Common Causes of Human Acute Leptospirosis in Guilan, Northern Iran. Iran J Public Health 2011;40:107-14.
21. Mohammad Tooloei , Golamreza Abdollapour , Hamid Karimi , Hasanpor A. Prevalence of Serum Antibodies Against Six Leptospira Serovars in Sheep in Tabriz, Northwestern Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances 2008;7:450-5.
22. Haji Hajikolaei MR, Ghorbanpour M, Keshavarzi-Yangabadi M, Abdollahpour GR. Seroprevalence of Leptospiral infection in goats of Ahvaz. JVetRes 2007;62:93-6.[In Persian]
23. Hassanpour A, Asgarloo M, Imandar M, Mahsayekhi M, Abdollahpour GR, Safarmashaei. Seroepidemiologic study of goats leptospirosis in Khoy-Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances 2011;11:229-33.
24. Luo D, Xue F, Ojcius DM, et al. Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic Leptospira spp. and characterization of their immunogenicity. Vaccine 2009;28:243-55.
25. Zuerner R, Haake D, Adler B, R S. Technological advances in the molecular biology of Leptospira. J Mol Microbiol Biotechnol 2000;2:455-62.
26. Wang Z, Jin L, Węgrzyn A. Leptospirosis vaccines. Microbial Cell Factories 2007;6:39.
27. Feng CY, Li QT, Zhang XY, Dong K, Hu BY, Guo XK. Immune strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32-41-OmpL1 vaccines against leptospira. Braz J Med Biol Res 2009;42:796-803.
28. Shah I, Katira B. Clinical and laboratory profile of dengue, leptospirosis and malaria in children: a study from Mumbai. Arch Dis Child 2007;92:561.
29. Mulla S, Chakraborty T, Patel M, Pandya HP, Dadhaniya V, Vaghela G. Diagnosis of leptospirosis and comparison of ELISA and MAT techniques. Indian J Pathol Microbiol 2006;49:468-70.

Archive of SID

www.SID.ir

30. Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, Kalambaheti T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. Trans R Soc Trop Med Hyg 2011;105:289-97.

31. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, et al. Evaluation of Recombinant Leptospira Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Serodiagnosis of Leptospirosis. Journal of clinical microbiology 2001;39:3303-10.

32. Bomfim MRQ, Ko A, Koury MC. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. Veterinary Microbiology 2005;109:89-94.

33. Mariya R, Chaudhary P, Kumar AA, Thangapandian E, Amutha R, Srivastava SK. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of Leptospira interrogans serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine Leptospirosis. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2006;29:269-77.

34. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Selvin J, SC S. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of Leptospira interrogans serovar autumnalis. Ann Trop Med Parasitol. 2008;102:699-708.

35. Cheema PS, Srivastava SK, Amutha R, Singh S, Singh H, Sandey M. Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. Indian Journal of Experimental Biology 2007;45:568-73.

36. Gebriel AM, Subramaniam G, Sekaran SD. The detection and characterization of pathogenic Leptospira and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. Trop Biomed. 2006;23:194-207.

37. Theodoridis D, Böhmer J, Homuth M, K S-M. Development of a novel ELISA for serodiagnosis of Leptospirosis and additional detection of pathogenic Leptospira by polymerase chain reaction for veterinary routine diagnostics. Rev Cubana Med Trop. 2005;57:49-50.

38. Senthilkumar TM, Subathra M, Ramadass P, Ramaswamy V. Serodiagnosis of bovine leptospirosis by IgG-enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination test. Trop Anim Health Prod. 2010;42:217-22.

Archive of SID

www.SID.ir