

تحقیقی

جداسازی لپتوسپیراهای بیماری‌زا از خون بیماران و تشخیص و تایپینگ آنها به روش PCR-RFLP

دکتر حمیدرضا هنرمند*^۱، لیلا خیاط^۲، دکتر فریبرز منصور قناعتی^۳، دکتر مرتضی رهبر طارم‌سری^۴

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارشی و کبد. ۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۳- استادیار گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارشی و کبد. ۴- استادیار گروه پزشکی قانونی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، بیمارستان رازی.

چکیده

زمینه و هدف: لپتوسپیروز یک بیماری مشترک انسان - حیوان شایع در سراسر جهان به ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری از جمله در ناحیه جلگه‌ای استان گیلان است که توسط گونه‌های بیماری‌زای لپتوسپیراها به وجود می‌آید. تعیین هویت لپتوسپیراها با سروتایپینگ توسط روش MAT پرهزینه، وقت‌گیر و پیچیده است و روش‌های ملکولی می‌توانند؛ جایگزین شوند. این مطالعه به منظور جداسازی لپتوسپیراهای بیماری‌زا از خون بیماران و تشخیص و تایپینگ آنها به روش PCR-RFLP در استان گیلان انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، بیماران بستری شده در بخش‌های اورژانس، داخلی و عفونی بیمارستان رازی رشت که تشخیص بالینی لپتوسپیروز داشتند؛ از ابتدای اردیبهشت تا پایان مرداد ۱۳۸۷ بررسی شدند. کشت‌های مثبت با روش فنل-کلروفرم مورد استخراج DNA قرار گرفتند. PCR با استفاده از دو جفت پرایمر G1 و G2 و B64-I و B64-II انجام شد. محصول PCR حاصل از پرایمرهای G1 و G2 با آنزیم DdeI و محصول PCR حاصل از پرایمرهای B64-I و B64-II با آنزیم *hinf I* برش داده شدند و الکتروفورز گردیدند و الگوی بانندی آنها با الگوهای مربوط به سویه‌های استاندارد مقایسه و تعیین هویت شد.

یافته‌ها: ۶۵ مورد از مجموع ۱۰۷ نمونه کشت داده شده؛ مثبت گردیدند. ۵۶ نمونه با پرایمرهای G1 و G2 جواب دادند که به گونه‌های اینتروگانس و بورگ پترسنی متعلق بودند و ۹ مورد نیز با پرایمرهای B64-I و B64-II پاسخ دادند که همگی به گونه کیرشتری متعلق بودند. نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که اکثریت لپتوسپیراها در این منطقه از گونه‌های اینتروگانس و بورگ پترسنی می‌باشند. با توجه به مشکلات متعدد در سروتایپینگ لپتوسپیراها، روش PCR-RFLP برای تعیین هویت و مطالعه ساختارهای یک جمعیت داخل گونه‌ای مفید می‌باشد و استفاده مستقیم از آن برای نمونه‌های بالینی و تشخیص سریع و تعیین هویت، کاربرد دارد.

کلید واژه‌ها: لپتوسپیرو، تشخیص ملکولی، تایپینگ ملکولی

* نویسنده مسؤول: دکتر حمیدرضا هنرمند، پست الکترونیکی: honarmand_36@yahoo.com

نشانی: لاهیجان، صندوق پستی ۴۴۱۴۵۱۵۳۳، تلفن: ۶۶۹۰۰۰۷ (۰۱۳۱)، شماره: ۵۲۳۳۱۷۱ (۰۱۴۲)

وصول مقاله: ۸۷/۱۲/۱۰، اصلاح نهایی: ۸۸/۷/۲۰، پذیرش مقاله: ۸۸/۸/۴

مقدمه

لپتوسپیروز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و حیوان در جهان است که در مناطق گرمسیری، نیمه‌گرمسیری و معتدل شیوع زیادتری دارد. باکتری‌ها از راه خراش‌های جلدی، ملتحمه، مخاط و دستگاه تنفسی فوقانی وارد بدن میزبان دیگر (حیوان و یا انسان) می‌گردند و بیماری به وجود می‌آورند (۷-۱). در منطقه جلگه‌ای استان گیلان شرایط بسیار مناسبی برای اشاعه این بیماری وجود دارد و همه‌ساله موارد بسیار زیادی از لپتوسپیروز انسانی، در فصل‌های بهار و تابستان و اوایل پاییز، در مناطق روستایی و در شالیکاران بروز می‌کند (۸-۱۰). لپتوسپیروهای بیماری‌زا بسیار متنوع هستند و تاکنون حدود ۲۵۰ سرووار از آنها شناخته شده‌اند که در ۲۳ سروگروپ، متعلق به ۷ گونه، دسته‌بندی شده‌اند (۱۱ و ۱۲). گونه اینتروگانس شامل بیشترین سرووارهای بیماری‌زا است و در اغلب مناطق جهان بیشترین پراکندگی را دارد (۱۳ و ۱۴). موارد شدید این بیماری، با زردی همراه است و سندرم ویل نامیده می‌شود که مرگ و میربالایی دارد (۱۵). لپتوسپیروز حاد انسانی اگر زود تشخیص داده شود؛ به خوبی به درمان آنتی‌بیوتیکی پاسخ می‌دهد (۱۶)؛ ولی تاخیر در درمان، موجب تشدید علائم و پیشرفت بیماری به سمت نارسایی حاد کلیوی و حتی کبدی شده و مرگ را به دنبال خواهد داشت (۱۷ و ۱۸ و ۱۹ و ۲۰).

لپتوسپیروهای بیماری‌زا باکتری‌های سخت‌گیر و کندرشد هستند و جداسازی آنها از نمونه‌های بالینی به روش کشت، بسیار مشکل و وقت‌گیر است و معمولاً زودتر از ۲ ماه جواب نمی‌دهد (۱۶). به علاوه موارد منفی کاذب بالایی دارد. مشاهده مستقیم لپتوسپیرا در نمونه‌های بالینی (رسوب ادرار، خون، مایع مغزی نخاعی) حساسیت بسیار پایین و موارد منفی کاذب زیادی دارد (۱۹). روش‌های سرولوژیکی از رایج‌ترین روش‌های تشخیص آزمایشگاهی لپتوسپیروز هستند؛ ولی چون آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد آن، پس از پایان هفته اول در خون پدیدار می‌گردند؛ لذا تشخیص سریع بیماری در هفته اول تظاهر آن که بسیار مهم است؛ با روش‌های سرولوژیکی تقریباً غیرممکن است (۱۶). بدین ترتیب روش‌های مولکولی تنها راه تشخیص زودرس این بیماری می‌باشند و روش‌های

مبتنی بر PCR متداول‌ترند (۱۶ و ۱۹). با توجه به بروز سالیانه این بیماری در منطقه جلگه‌ای استان گیلان و به دلیل آن که شایع‌ترین بیماری عفونی آن‌دمیک منطقه است؛ غیر از تشخیص سریع بیماری، شناسایی عوامل سبب‌ساز شایع، در حد گونه و زیرگونه که به شناسایی مخزن و یا مخازن اصلی بیماری کمک شایانی می‌نماید؛ از اهمیت بهداشتی بالایی برخوردار است (۸). به دلیل متعدد بودن گونه‌ها و زیرگونه‌های بیماری‌زا، روش ساده‌ای برای شناسایی و تفکیک آنها وجود ندارد. تاکنون روش‌های سرولوژیکی مبتنی بر آزمون میکروآگلوتیناسیون (MAT) (Micro Agglutination Test)، رایج‌ترین روش تایپینگ لپتوسپیروهای بیماری‌زا بوده است؛ ولی تنها در آزمایشگاه مرجع اجرا می‌شود؛ زیرا اجرای آن به نگهداری دائمی تعداد متنوعی از سرووارهای بیماری‌زا و پاساژ دوره‌ای آنها نیاز دارد و همچنین به داشتن پانل وسیعی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و یا پلی‌کلونال ضد هر سرووار اختصاصی نیازمند است. بنابراین اجرای آن در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی غیراختصاصی (غیرمرجع) امکان‌پذیر نیست (۲۰ و ۲۱). همچنین تفسیر آن مشکل بوده و بالاخره نتایج ضد و نقیض هم در بسیاری از موارد پیش می‌آید (۲۲ و ۲۳ و ۲۴).

با توجه به دلایل ذکر شده لزوم دستیابی به یک روش تایپینگ ساده‌تر، ارزان‌تر و قابل اعتماد حس می‌شود. در سال‌های اخیر با پیشرفت روش‌های تشخیص مولکولی، استفاده از آنها برای تشخیص و تایپینگ مولکولی لپتوسپیروها توسط محققان مختلف در برخی نقاط دنیا آزموده و پایه‌ریزی شده است (۲۴). مجموع این روش‌ها به سه گروه روش‌های مبتنی بر هیبریدسازی، روش‌های مبتنی بر آمپلی‌فیکاسیون و روش‌های مبتنی بر تعیین توالی دسته‌بندی می‌شوند (۲۶-۲۲). این مطالعه به منظور شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌های لپتوسپیروهای بومی جداشده از نمونه‌های بالینی در استان گیلان با استفاده از روش PCR-RFLP انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی، بیماران بستری در بخش‌های اورژانس، داخلی و عفونی بیمارستان رازی شهرستان رشت

برنامه PCR در نهایت به صورت زیر تنظیم گردید:

Initial Denaturation	94°C	6 min	1 cycle
Denaturation	94°C	1 min	
Annealing	60°C	1 min	35 cycle
Extension	72°C	2 min	
Final Extension	72°C	15 min	1 cycle

برای تعیین دقت تشخیصی PCR از یک کشت مثبت جوان و خوب رشد کرده به کمک PBS، تعدادی رقت‌های سریال ۱۰ برابر آن تهیه گردید و با افزودن فرمالین با نسبت ۱:۲۰ (غلظت نهایی نیم درصد) لپتوسپیراها را بی حرکت نمودیم تا قابل شمارش گردند و سپس با میکروسکوپ زمینه تاریک و با استفاده از لام نئوبال جدید (improved neobal slide) شمارش میکروبی انجام شد. از رقت‌های بالا شروع نمودیم و رقتی که جمعیت میکروبی کم و قابل شمارش داشت، انتخاب گردید و تعداد باکتری‌ها در یک میلی‌لیتر محاسبه شد. سپس مقدار یک میلی‌لیتر از آن که جمعیت میکروبی معلوم داشت (۱۰^۶ در میلی‌لیتر) مورد استخراج DNA قرار گرفت. غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفومتر UV visible و طبق فرمول ذکر شده در بالا محاسبه شد. سپس از آن رقت‌های متوالی دوبرابر تهیه گردید و برای حجم مساوی از همه رقت‌ها (۱۰ میکرولیتر) با روش راه‌اندازی شده؛ PCR انجام شد. پس از انجام الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد، کمترین رقتی که باند مشهود تشکیل داده بود؛ دقت تشخیصی PCR راه‌اندازی شده در نظر گرفته شد. در این مورد نیز از سویه استاندارد لای به عنوان کنترل مثبت و از آب به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

برای تعیین ویژگی تشخیصی PCR راه‌اندازی شده از چندین باکتری مختلف گرم مثبت و گرم منفی از جمله اش‌ریشیاکولی، استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیس، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه، میکروکوک روزئوس، پروتئوس میرابیلیس، انتروباکتر آئروژنز و سیتروباکتر فروندی استفاده شد و برای همگی آنها PCR راه‌اندازی شده اجرا گردید که با هیچ کدام باند اختصاصی تشکیل نداد. محصول PCR نمونه‌هایی که در PCR باند اختصاصی تشکیل دادند؛ با استفاده از دو آنزیم اندونوکلاز hinf I و DdelI (محصول PCR حاصل از تکثیر با پرایمرهای

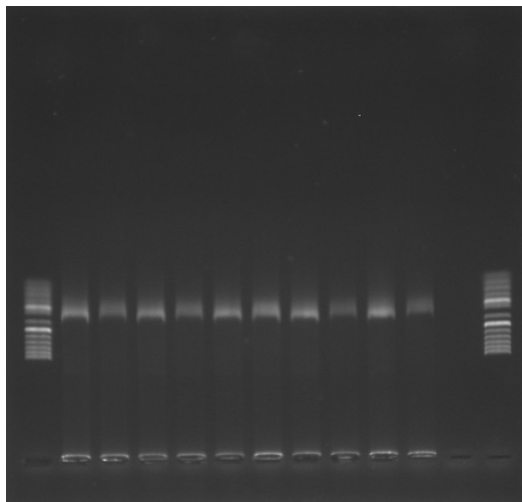
که تشخیص بالینی لپتوسپیروز داشتند؛ از ابتدای اردیبهشت تا پایان مرداد ۱۳۸۷ که با دوره شیوع فصلی لپتوسپیروز در ناحیه جلگه‌ای استان گیلان هم‌زمان است؛ مطالعه شدند. از بیماران نمونه خون به طور روتین گرفته شده و برای انجام آزمایش‌های روتین و سرولوژیکی به آزمایشگاه بیمارستان فرستاده می‌شود. از این نمونه حدود ۵ قطره به یک لوله فالکون ۱۵ ml حاوی ۱۰ ml محیط کشت مایع کورتوف دارای $200 \mu\text{ml}$ از ۵-فلورواوراسیل، انتقال داده شد. کشت‌ها هر دو هفته یک بار و تا دو ماه با میکروسکوپ زمینه تاریک بررسی شدند. نمونه‌های مثبت برای تهیه کشت انبوه به محیط کشت تازه و فاقد آنتی‌بیوتیک انتقال داده شدند و پس از رسیدن به جمعیت باکتریایی مطلوب، با روش فنل-کلروفرم مورد استخراج DNA قرار گرفتند. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفوتومتری و با استفاده از فرمول زیر تعیین شد:

$\text{OD} (260 \text{ nm}) \times \text{ضریب رقت} \times \text{DNA} = 50 \mu\text{g/ml}$
 PCR با استفاده از دو جفت پرایمر (G1، G2، B64-I و B64-II) قبلاً طراحی شده از روی ژن 16srRNA که تمام سرووارها را فرا می‌گرفت؛ انجام گردید. شایان ذکر است که ۶ گونه بیماری‌زا با تمام سرووارهای مربوطه با جفت پرایمر G1، G2 تریاز می‌یابند و جفت پرایمر B64-I و B64-II تنها برای گونه کیرشنری با سرووارهای مربوطه طراحی شده است. جفت پرایمر G1، G2 قطعات ۲۸۵ (تقریباً ۳۰۰) و جفت پرایمر B64-I و B64-II قطعات ۵۶۳ (تقریباً ۶۰۰) جفت بازی تولید می‌کنند.

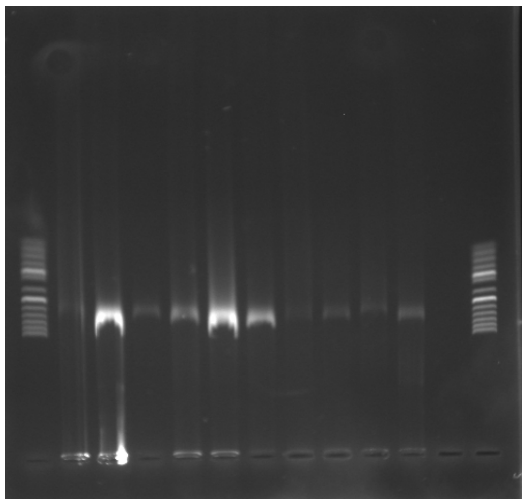
G1: 5-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3
 G2: 5- GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG-3
 B64-I: 5- CTG AAT TCT CAT CTC AAC TC-3
 B64-II: 5-GCA GAA ATC AGA TGG ACG AT-3
 مخلوط PCR با فرمول زیر تهیه شد:

PCR buffer lox coralload (with 25 Mmol MGCL2)	6μl
MgCl 2 (25M mol)	2μl
Q soloutsion	5μl
dNTPS (10 Mmol)	0.5μl
Primer G1 (20 pmol)	2μl
Primer G2 (20 pmol)	2μl
Primer B64I (20 pmol)	2μl
Primer B64II (20 pmol)	2μl
DNA Taq polymerase 5u/ml	0.2μl
DEPC water	24μl
DNA template	10μl
Total	50μl

زیرگونه‌های ایکترو هموراژی، پومونا، کانیکولا و اوسترالیس به ترتیب بیشترین فراوانی را داشتند.



شکل ۱: نمای باندهای اختصاصی حاصل از انجام PCR با پرایمرهای G1, G2 روی لپتوسپیراهای جدا شده از خون بیماران. ردیف ۱ و ۱۳: Ladder 50bp؛ ردیف ۲: کنترل مثبت (سرووار استاندارد لای، سروگروپ ایکتر و هموراژی، گونه اینتروگانس)؛ ردیف ۳-۱۱: باندهای اختصاصی حدود ۳۰۰ bp؛ ردیف ۱۲: کنترل منفی (آب)



شکل ۲: نمای باندهای اختصاصی حاصل از انجام PCR با پرایمرهای B64-I و B64-II. ردیف ۱ و ۱۳: Ladder 50bp؛ ردیف‌های ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۹ و ۱۰ و ۱۱: باندهای اختصاصی حدود ۶۰۰ bp

G1 و G2 با آنزیم DdeI و محصول PCR حاصل از تکثیر با پرایمرهای B64-I و B64-II با آنزیم Hinf I و طبق دستور کارخانه سازنده آنزیم با فرمول زیر برش داده شد:

PCR Product	10 µl
ddH2O	10 µl
Buffer 10 x	2 µl
NdeI or HinfI	2 µl

سپس روی ژل آگارز ۴ درصد با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شدند و از الگوی باندهای حاصله، عکسبرداری به عمل آمد و با الگوهای مربوط به سویه‌های استاندارد که در مطالعه Brown در سال ۱۹۹۷ تعیین و استاندارد شده بود؛ مقایسه و تفسیر شد. بدین ترتیب تعلق گونه‌ای و زیرگونه‌ای آنها تعیین شد. شایان ذکر است که مکان برش آنزیم اندونوکلئاز Hinf I در توالی‌های ANTC-3* 5-G و G-5* 3-CTNA بود.

مکان برش آنزیم اندونوکلئاز DdeI در توالی‌های TNAG-3* 5-C و GANT-3* 3 بود.

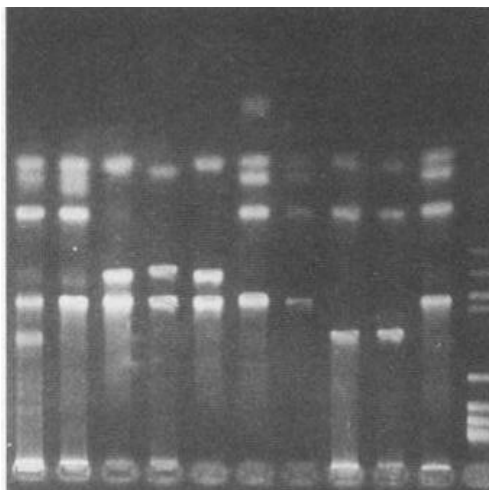
توصیف داده‌ها با استفاده از جداول و نمودار انجام شد.

یافته‌ها

از ۱۰۷ نمونه خون کشت داده شده؛ تعداد ۶۵ نمونه مثبت شدند که استخراج DNA برای تمام آنها انجام شد. با ایجاد کمی تغییرات در غلظت MGCL2، غلظت پرایمر و نیز در دمای Annealing، موارد تشکیل اسمیر و دایمر پرایمر به حداقل رسانده شد و باندهای اختصاصی مشهود گردید (شکل‌های ۱ و ۲).

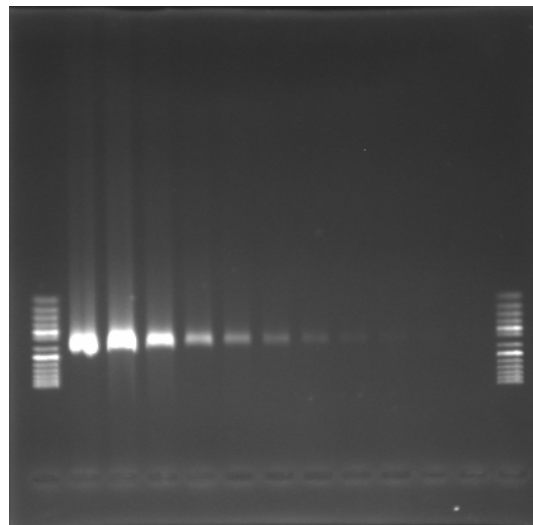
۵۶ نمونه با پرایمرهای G1 و G2 جواب دادند که به گونه‌های اینتروگانس (۳۸ مورد) و بورگ پترسنی (۱۸ مورد) متعلق بودند و ۹ مورد نیز با پرایمرهای B64-I و B64-II پاسخ دادند که همگی به گونه کیرشنری متعلق بودند (جدول ۱).

در این تلاش دقت تشخیصی آزمون PCR برابر ۴۶ باکتری در محیط کشت و تقریباً معادل پنج نانوگرم به دست آمد (شکل ۳). ویژگی تشخیصی آن ۱۰۰ درصد بود (شکل ۴). در تفسیر الگوی باندهای حاصل از RFLP (شکل‌های ۵ و ۶) تعلق گونه‌ای و زیرگونه‌ای ایزوله‌ها مشخص گردید. در این مطالعه گونه‌های اینتروگانس، بورگ پترسنی و کیرشنری و



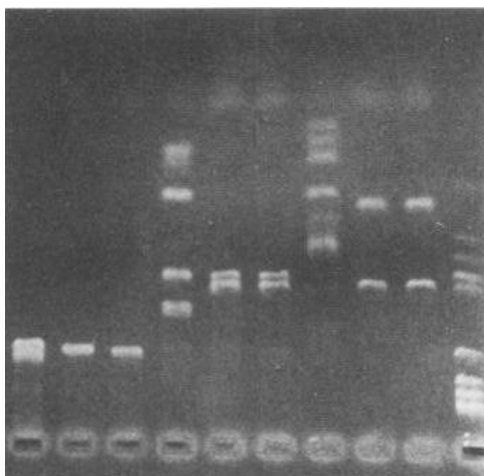
۱۰ ۹ ۸ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱ *L100 bp*

شکل ۵: نمای الگوی باندهای RFLP محصول PCR مربوط به ۱۰ ایزوله تکثیر یافته با پرایمرهای *G1*، *G2*
 ردیف ۱: گونه بورگ پترسنی، زیرگونه هارجو بوویس
 ردیف‌های ۲ و ۳: گونه اینتروگانس، زیرگونه هارجو پراجیتنو
 ردیف ۴: گونه بورگ پترسنی، زیرگونه هارجو بوویس
 ردیف ۵: نامشخص
 ردیف‌های ۶ و ۷ و ۸: گونه بورگ پترسنی، زیرگونه تاراسوو
 ردیف‌های ۹ و ۱۰: گونه اینتروگانس، زیرگونه سجرونه



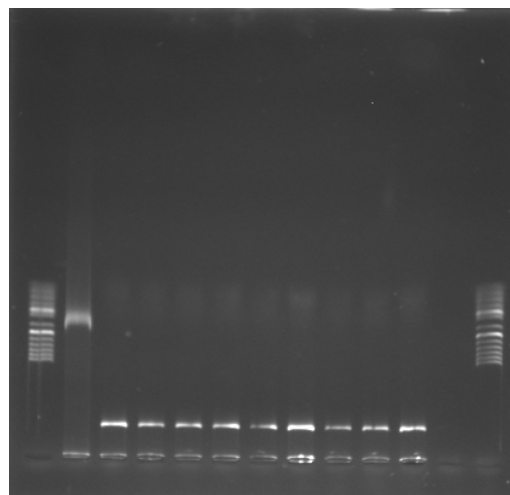
۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳

شکل ۳: نمای باندهای حاصل از الکتروفورز محصول رقت‌های سریال ژنوم سویه استاندارد لای PCR
 ردیف ۱ و ۱۳: *Ladder 50bp*؛ ردیف ۲: باند اختصاصی محصول رقت‌های سریال ژنوم سویه استاندارد لای PCR استخراج شده از نمونه حاوی ۳۰۰۰ باکتری، معادل ۳۰۰ نانوگرم از ملکول DNA
 ردیف ۱۱-۲: باندهای اختصاصی محصول PCR از رقت‌های سریال (دو برابر) استخراج شده از همان نمونه اول باند ردیف شماره ۸ معادل ۴۶ باکتری (برابر با تقریباً ۵ نانوگرم DNA است)
 ردیف ۱۲: کنترل منفی (آب)



۹ ۸ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱ *L100 bp*

شکل ۶: نمای الگوی باندهای RFLP محصول PCR مربوط به ۹ ایزوله تکثیر یافته با پرایمرهای *B64-I*، *B64-II*
 ردیف‌های ۱ و ۲: گونه کیرشنری، زیرگونه سینوپتری
 ردیف ۳: گونه کیرشنری، زیرگونه بیم
 ردیف ۴ و ۵: گونه کیرشنری، زیرگونه گریپو تیفوزا
 ردیف ۶: گونه کیرشنری، زیرگونه موزداک
 ردیف‌های ۷ و ۸ و ۹: گونه کیرشنری، زیرگونه اوتومالیس



۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳

شکل ۴: نمای نتایج تعیین ویژگی PCR راه‌اندازی شده
 ردیف ۱: *Ladder 50bp*؛ ردیف ۲: کنترل مثبت (سرووار استاندارد لای، سروگروپ ایکتره همورازی، گونه اینتروگانس)؛
 ردیف ۳: اشرفیشیاکولی؛ ردیف ۴: استافیلوکوک اورنوس؛
 ردیف ۵: استافیلوکوک اپیدرمیس؛ ردیف ۶: سودوموناس آنروموناس؛ ردیف ۷: کلیسیلا پنومونیه؛ ردیف ۸: میکروکوک روزنوس؛ ردیف ۹: پروتنوس میرابیلیس؛ ردیف ۱۰: انتروباکتر آنروژنز؛ ردیف ۱۱: سیتروباکتر فرونیدی؛ ردیف ۱۲: کنترل منفی (آب)

جدول ۱: ویژگی‌های الگوهای باندهای PCR-RFLP ایزوله‌ها و تعلق گونه‌ای و زیرگونه‌ای آنها

تعداد ایزوله‌ها	تعداد باندهای فرعی (Bp)	اندازه باندهای فرعی (Bp)	تعداد کل باندها	آنزیم استفاده شده	پرایمر استفاده شده	ویژگی‌ها زیرگونه	گونه
۱۲	۵	<۵۰	۵	<i>DdeI</i>	G1, G2	ایکترو همورازی	
۴	۳ ۱	<۵۰ ۲۰۰	۴	<i>DdeI</i>	G1, G2	اوسترالیس	
۹	۲ ۱	<۵۰ ۱۰۰-۵۰ ۲۰۰-۱۰۰	۵	<i>DdeI</i>	G1, G2	پومونا	
۱	۳ ۱	<۵۰ >۱۰۰	۴	<i>DdeI</i>	G1, G2	براتیسلاوا	ایتروگانس
۷	۵ ۱	<۵۰ >۱۰۰	۶	<i>DdeI</i>	G1, G2	کانیکولا	
۲	۲ ۱	<۵۰ >۲۰۰	۳	<i>DdeI</i>	G1, G2	هارجو پراجیتنو	
۳	۳ ۲	<۵۰ ≈۱۵۰	۵	<i>DdeI</i>	G1, G2	سجروئه	
۳	۲ ۲	<۵۰ ۵۰-۱۵۰	۴	<i>DdeI</i>	G1, G2	بورگ پترسنی	
۳	۲ ۱	۱۰۰ ۱۰۰-۱۵۰	۳	<i>DdeI</i>	G1, G2	تاراسوو	بورگ پترسنی
۱۲	۳ ۱	<۵۰ ۱۵۰-۲۰۰	۴	<i>DdeI</i>	G1, G2	هاجو بوویس	
۲	۲	≈۳۰۰	۲	<i>Hinf I</i>	B64-I B64-II	گریپو تیغوزا	
۳	۲ ۲	۱۰۰ <۳۰۰	۴	<i>Hinf I</i>	B64-I B64-II	اوتومالیس	
۲	۱ ۱	≈۱۰۰ ≈۲۰۰	۲	<i>Hinf I</i>	B64-I B64-II	سینوپتری	کیرشنری
۱	۴ ۱	<۱۰۰ ≈۲۰۰	۵	<i>Hinf I</i>	B64-I B64-II	بیم	
۱	۱	۶۰۰	۱	<i>Hinf I</i>	B64-I B64-II II	موز داک	

بحث

هیبریداسیون در سال‌های قبل نیز برای تعیین سروتیپ و خویشاوندی سروتیپ‌ها، به کار می‌رفت (۳۰ و ۳۱). Ramadass در مطالعه‌ای با یک پروب ژنومی، سرووارهای هارجو بوویس و هارجو پراجیتنو که هر دو به گونه ایتروگانس تعلق دارند را توانست تفکیک نماید و در تحقیقی دیگر روش هیبریداسیون اسلات بلات را آزمود (۳۱ و ۳۲).

در یک روش تایپینگ ملکولی، ژنوم کامل لپتوسپیرا توسط یک یا چند آنزیم اندونوکلیئاز برش داده شده و سپس محصول برش آنزیمی ژنوم، روی ژل آگارز دارای غلظت زیاد و با ولتاژ بالا الکتروفورز می‌شود و الگوی باندهای

تاکنون چندین روش برای تایپینگ ملکولی لپتوسپیرا آزموده شده است. Terpestra روش هیبریداسیون دات بلات (Dot blot hybridization) را توسط پروب‌های نشان‌دار شده با P32 و بیوتین، برای اولین بار برای تشخیص لپتوسپیراها به کار برد (۲۷). Miller همین روش را برای ردیابی و شناسایی لپتوسپیراها، به طور مستقیم از نمونه‌های بالینی، استفاده نمود (۲۸). Terpestra روش هیبریداسیون درجا (In situ hybridization) با استفاده از پروب DNA نشان‌دار شده با بیوتین را استفاده نمود (۲۹). روش‌های

برای هر سرووار، استانداردسازی و مشخص می‌گردد. این روش که به اختصار REA (Restriction Endonuclease Analysis) نام دارد توسط Marshal استفاده شد و سرووارهای ایکتره‌موراژی و هیدومادیس تفکیک داده شدند (۳۳). Thierman با روش REA سرووارهای مختلف متعلق به سروگروپ پومونا را دسته‌بندی نمود (۳۴). Elis با این روش تعداد ۳۰۰ ایزوله را شناسایی و دسته‌بندی نمود و در مطالعه دیگری با استفاده از ۲۰ آنزیم اندونوکلاز، روش REA را تکامل داد و اطلاعات پایه‌ای جامعی را مدون نمود (۳۵ و ۳۶).

عیب این روش آن است که فقط تعداد کمی از آنزیم‌های اندونوکلاز می‌توانند؛ الگوهای بانندی مشخص و قابل تفکیک برای سرووارهای مختلف لپتوسپیراها به وجود آورند و اشکال دیگر این روش آن است که فقط باندهای بزرگ‌تر که اندازه و وزن بالاتری دارند؛ از هم قابل تفکیک خواهند بود و در این تفکیک، تعداد زیاد باندهای کوچک و گاهی هم‌اندازه و یا با اندازه‌های نزدیک به هم به وجود می‌آیند که به صورت یک طیف در آمده و اسمیر به وجود می‌آورند (۲۴ و ۲۶ و ۳۵ و ۳۷).

پالسدیلدژل الکتروفورز (PFGE) یک روش تشخیص و تایپینگ با قدرت تمایز بالا است که در سال‌های اخیر بسیار متداول شده است. بدین ترتیب یک الگوی بانندی مشخص به دست می‌آید (۲). Hermann تعداد ۷۲ سویه استاندارد را با این روش و توسط آنزیم NotI انگشت‌نگاری کرد و سپس با همکاری Saint Girons این روش را برای دسته‌بندی ۳۰۰ سرووار لپتوسپیراهای ایزوله شده خود به کار برد (۳۸). Taylor نیز روش PFGE را برای آنالیز DNA تعدادی از سرووارهای استاندارد استفاده نمود (۳۹). روش PFGE هم به تجهیزات اختصاصی نیاز دارد؛ ولی روش‌های مبتنی بر PCR که در سال‌های اخیر مقبولیت بیشتری یافته‌اند؛ ارزان‌تر و راحت‌تر هستند. در روش AP-PCR یک پرایمر منفرد، با توالی اختیاری استفاده می‌شود و PCR با آن انجام می‌شود. این پرایمر چون با نقاط متعددی از ژنوم یک باکتری قابل جفت شدن است؛ قطعات مختلف به اندازه‌های متفاوت ایجاد می‌کند که الگوی بانندی خاصی را پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز، به وجود می‌آورند (۴۰). Perolat با این روش

توانست؛ ناهمگونی ژنومی سویه‌های متعلق به هارجوبوویس را مشخص کند (۴۰). Brown نیز این روش را برای تعیین و تفکیک سرووارهای لپتوسپیراها به کار برد؛ ولی دریافت که با این روش نمی‌توان برخی از سرووارها را تفکیک نمود (۴۱). در روش RAPD-PCR نیز یک یا چند پرایمر با توالی غیراختصاصی و اختیاری استفاده می‌شود و تصویر بانندی حاصله، یک الگوی انگشت‌نگاری خاصی به وجود می‌آورد. این روش توسط Corney برای دسته‌بندی ۲۶ لپتوسپیراهای جدا شده استفاده شد (۳۷). Gerriston این روش را برای شناسایی و دسته‌بندی سرووارهای متعلق به سروگروپ هارجوو بوویس به کار برد (۴۲). مطالعه Ramadass نیز نشان داد که با این روش هر سرووارها از لپتوسپیرا یک مدل انگشت‌نگاری خاص خود را ایجاد می‌کند (۴۳) و در گزارش همین تحقیق در سال ۲۰۰۲ مطالعه ژنوتایپینگ به کمک AP-PCR را منتشر نمود (۴۴). در این روش نیز به جداسازی و کشت خالص باکتری نیاز است.

گرچه PCR-RFLP یک روش غیرمستقیم تعیین پلی‌مرفیسم DAN است و تعیین توالی یک روش قطعی و استاندارد طلایی تعیین پلی‌مرفیسم است؛ ولی روش PCR-RFLP در مقایسه با تعیین توالی دو مزیت مشخص دارد؛ به زمان کوتاه‌تری نیاز دارد و کم‌هزینه‌تر است و به طور کلی در یک روز کاری کامل، قابل اجرا می‌باشد (۲۴ و ۲۶).

Woo با استفاده از آنزیم DdeI، محصول PCR حاصل از پرایمرهای G2, G1 را برش داد و الگوی بانندی الکتروفورزی آنها را مشخص کرد (۴۵). در این مطالعه، اغلب سرووارهای لپتوسپیراهای متعلق به گونه اینترگاناس، ۴ باندها (یک باند بزرگ‌تر و سه باند کوچک‌تر) تشکیل دادند و بدین ترتیب این محققان، اطلاعات پایه‌ای از آنها فراهم کردند که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت و به عنوان معیار شناسایی ایزوله‌ها، در حد گونه و زیرگونه استفاده شد. در این روش اگر محصول PCR تزیاید یافته از ژن‌های RNA ریبوزومی استفاده شود؛ ریبوتایپینگ نام دارد که معمولاً الگوهای بانندی پایدار و تکرارپذیر به وجود می‌آورند؛ ولی تنوع زیادی برای تمایز دادن سرووارها نخواهد داشت. مگر آن که با تعیین توالی (PCR-Sequencing) همراه گردد (۴۶ و ۴۷). Gravekamp در

تشخیص نیز مورد تأیید قرار خواهد گرفت (۲۶ و ۵۱-۴۹). در سال‌های اخیر همه‌گیری‌های زیادی از بیماری لپتوسپیروز در چین، تایلند، فیلیپین، هندوستان و نواحی کارائیب اتفاق افتاده است (۱۳). در ضمن این بیماری در مناطق آندمیک سراسر دنیا حضور دائمی داشته و اغلب به صورت فصلی و در مشاغل خاص بروز بیشتری پیدا می‌کند (۷ و ۱۳). تشخیص سرووارهای بیماری‌زا در مناطق جلگه‌ای استان گیلان یک معضل بهداشتی مهم و اساسی است. با توجه به نتایج حاصله از مطالعه ما که از مطالعات مشابه انجام شده الگوبرداری شد و به نتایج هماهنگ و مشابه آنها رسید؛ می‌توان به کنترل این مشکل بهداشتی کمک نموده و به گره‌گشایی ناشناخته‌های آن کمک نمود. هر چند مطالعه ما روی کشت‌های مثبت یعنی روی ایزوله‌ها انجام گردید؛ ولی چون دقت تشخیصی و ویژگی تشخیصی آن به اندازه کافی بالاست؛ آن را برای نمونه‌های بالینی و به‌طور مستقیم نیز می‌توان به کار برد. در اینجا پیشنهاد می‌شود از روش‌های استخراج DNA کارآمدتر استفاده شود و در این موارد کیت‌های تجاری با کارایی بالاتر وجود دارند که کمک‌کننده هستند. بنابراین با توجه به کارایی بالای روش PCR-RFLP به‌نظر می‌رسد که آن را برای نمونه‌های بالینی به‌طور مستقیم می‌توان به کار برد و تشخیص سریع و تعیین هویت را یک‌جا به انجام رساند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که اکثریت لپتوسپیراها در این منطقه از گونه‌های اینتروگانس و بورگ پترسنی می‌باشند. با توجه به مشکلات متعدد در سروتایپینگ لپتوسپیراها، روش PCR-RFLP برای تعیین هویت و مطالعه ساختارهای یک جمعیت داخل گونه‌ای مفید می‌باشد و استفاده مستقیم از آن برای نمونه‌های بالینی و تشخیص سریع و تعیین هویت، کاربرد دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه برای اخذ کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی خانم لیلایا از دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان بود.

مطالعه‌ای PCR حاصل از پرایمرهای G2, G1 سرووارهای مختلف لپتوسپیراها را توسط دو آنزیم DdeI و NdeII و محصول PCR حاصل از پرایمرهای B64II, B64-I را با آنزیم HinfI برش دادند و مدل انگشت‌نگاری الگوی بانندی آنها را مشخص نمود (۴۸). در مطالعه Brown نیز PCR-RFLP برای شناسایی و تمایز زیرگونه‌های لپتوسپیراها استفاده شد (۴۱) و مشخص گردید که با این روش، تشخیص و تفکیک سویه‌ها، در حد گونه و سرگروپ امکان‌پذیر است و فقط دو سرگروپ ایکتره‌موراژی و کانیکولا که هر دو به گونه اینتروگانس متعلق هستند را نمی‌توان تمایز داد و نیز دریافت که در مدل‌های انگشت‌نگاری الگوهای بانندی حاصله از پرایمرهای G2, G1، هماهنگی بیشتر و قابل قبول‌تری به چشم می‌خورد. این یافته‌ها در هر دو مطالعه Brown طی سال‌های ۱۹۹۳ و ۱۹۹۷ (۴۱) و نیز در مطالعه Savio تایید شد (۴۹). در مطالعه Perolat که از ریوتایپینگ استفاده گردید (۴۶) و در مطالعه Theirman با روش REA (۳۴) و نیز در مورد مطالعه Ellis (۳۵) که از PCR-RFLP استفاده شد؛ شباهت و خویشاوندی نزدیک سرووارهای کانیکولا و ایکتره‌موراژی تایید شد. اصولاً هرچه شباهت مرفولوژی DNA-DNA بیشتر باشد؛ الگوی PCR-RFLP سویه مجهول و استاندارد، به‌هم شبیه‌تر خواهند بود و هرگونه تفاوت در الگوی بانندی را به تفاوت در بین زیرگونه‌ها؛ می‌توان نسبت داد (۴۶ و ۴۷ و ۵۲-۵۰). تعیین هویت به روش مولکولی مبتنی بر PCR، برای تشخیص و تفکیک لپتوسپیراها ایزوله شده مطلوب‌تر است و در مقایسه با REA کل ژنوم، مطمئن‌تر بوده و از هیبریداسیون، DNA-DNA آسان‌تر و کم‌خرج‌تر می‌باشد (۲۴ و ۲۶) اصولاً الگوهای حاصله از PCR-RFLP، در مقایسه با DNA-REA بسیار ساده‌تر است و به الکتروفورز در سیستم ژل آگارز پرتماز نیاز ندارد و اگر از پرایمرهای طراحی شده و از مناطق حفاظت شده ژنوم استفاده شود؛ نتایج حاصله، مطمئن‌تر و تکرارپذیرتر خواهند بود. مزیت مهم این روش در این است که می‌توان آن را مستقیماً برای نمونه‌های بالینی به کار برد و بلافاصله پس از انجام PCR از نمونه بالینی و مشاهده باند اختصاصی، عملیات RFLP را اجرا نمود. بدین ترتیب

References

- Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect*. 2000 Aug;2(10):1265-1276.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):296-326.
- Fains. Guidance for the Diagnosis, Surveillance and Control of Human Leptospirosis. WHO offset publication Geneva. World Health Organization. 2003; pp:17-20.
- Vinetz JM. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2001;14:527-538.
- Vinetz JM. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 1997;10:357-361.
- van Crevel R, Speelman P, Gravekamp C, Terpstra WJ. Leptospirosis in travelers. *Clin Infect Dis*. 1994 Jul;19(1):132-134.
- Levett PN. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? *J Med Microbiol*. 1999 May;48(5):417-418.
- Mansour Ghanaei F, Honarmand H. [Leptospirosis and prevalence of the disease in guilan province, iran]. 1st. Rasht: Guilan University of Medical Sciences Research office publishing center. 2005; pp: 89-99 [Persian]
- Honarmand HR, Mansour-Ghanaee F, Eshraghi S, Khorramzade MR, Abollahpour GR. [The epidemiology of leptospirosis in Guilan province-2003] *J Gorgan Uni Med Sci*. 2005; 7(2): 52-56. [Article in Persian]
- Honarmand HR, Eshraghi S, Khorami Zadeh MR, Mansour Ghanaei F, Fallah MS, Rezvani M, et al. Survey spread of positive Leptospirosis by ELISA in Guilan province. *Journal of Medical Faculty Guilan University of Medical Sciences*. 2005;54(14):59-65. [Article in Persian]
- Kmety E, Dikken H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. Groningen, The Netherlands: University Press; 1993.
- Johnson RC, Faine S. *Leptospira*. In: Keieg NR, Nolt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd. Baltimore USA: Williams &Wilkins. 1984; pp: 62-67.
- Smythe L. Leptospirosis worldwide. *Wkly Epidemiol Rec*. 1999; 74:237-242.
- Honarmand HR, Mansou Ghanaei F, Heidarzadeh A, Asmar M. [Isolation and Serotyping of endemic leptospires of eastern part of flat area of Guilan province, Iran] *J Gorgan Uni Med Sci*. 2009; vol 11(3): 53-59. [Article in Persian]
- Arean VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Am J Pathol*. 1962 Apr;40:393-423.
- Hartskeerl RA, Smits H, Goris M, Korver H, Terpstra WJ. Manual for diagnosis of Leptospirosis. KIT Biomedical Research publication. Netherland. 2004; pp:34-60.
- Coursin DB, Updike SJ, Maki DG. Massive rhabdomyolysis and multiple organ dysfunction syndrome caused by leptospirosis. *Intensive Care Med*. 2000 Jun;26(6):808-812.
- Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*. 2000 Jul;146 (Pt 7):1491-1504.
- Ahmad SN, Shah S, Ahmad FM. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad Med*. 2005 Jul-Sep;51(3):195-200.
- Bolin CA, Zuerner RL, Trueba G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. *Am J Vet Res*. 1989 Jul;50(7):1001-1003.
- Turner LH. Leptospirosis II Serology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1968;62(6):880-899.
- Alexander AD. Serological diagnosis of Leptospirosis. In: Rose WR, Firdman H, Fathey JI (Ed). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 32th. American Society of Microbiology (ASM). Washington DC: ASM. 1968; pp: 435-439.
- Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis*. 1995 Jul;172(1):281-285.
- Vijayachari P, Sehgal SC. Recent advances in the laboratory diagnosis of leptospirosis and characterisation of leptospires. *Indian J Med Microbiol*. 2006 Oct;24(4):320-322.
- Cole JR Jr, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol*. 1973 Jun;25(6):976-80.
- O'Keefe JS. A brief review on the laboratory diagnosis of leptospirosis. *N Z Vet J*. 2002 Feb;50(1):9-13.
- Terpstra WJ, Schoone GJ, Lighthart GS, ter Schegget J. Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by in situ hybridization using biotin-labelled DNA probes. *J Gen Microbiol*. 1987 Apr;133(4):911-914.
- Millar BD, Chappel RJ, Adler B. Detection of leptospires in biological fluids using DNA hybridisation. *Vet Microbiol*. 1987 Oct;15(1-2):71-78.
- Terpstra WJ, Schoone GJ, ter Schegget J. Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridisation with 32P- and biotin-labelled probes. *J Med Microbiol*. 1986 Aug;22(1):23-28.
- Brendle JJ, Rogul M, Alexander AD. Deoxyribonucleic Acid Hybridization Among Selected Leptospiral Serotypes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1974 Apr; 24(2): 205-214.
- Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *Int J Syst Bacteriol*. 1987;37:407-415.
- Ramadass P, Jarvis BD, Corner RJ, Cinco M, Marshall RB. DNA relatedness among strains of *Leptospira biflexa*. *Int J Syst Bacteriol*. 1990 Jul;40(3):231-235.
- Marshall RB, Winter PJ, Yanagawa R. Restriction endonuclease DNA analysis of *Leptospira interrogans* serovars icterohaemorrhagiae and hebdomadis. *J Clin Microbiol*. 1984 Oct;20(4):808-810.

34. Thiermann AB, Handsaker AL, Moseley SL, Kingscote B. New method for classification of leptospiral isolates belonging to serogroup pomona by restriction endonuclease analysis: serovar kennewicki. *J Clin Microbiol.* 1985 Apr;21(4):585-587.
35. Ellis WA, Songer JG, Montgomery J, Cassells JA. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Vet Rec.* 1986 Jan 4;118(1):11-13.
36. Ellis WA, Montgomery JM, Thiermann AB. Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of *Leptospira interrogans*. *J Clin Microbiol.* 1991 May;29(5):957-961.
37. Corney BG, Colley J, Djordjevic SP, Whittington R, Graham GC. Rapid identification of some *Leptospira* isolates from cattle by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1993 Nov;31(11):2927-2932.
38. Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *J Clin Microbiol.* 1992 Jul;30(7):1696-1702.
39. Taylor KA, Barbour AG, Thomas DD. Pulsed-field gel electrophoretic analysis of leptospiral DNA. *Infect Immun.* 1991 Jan;59(1):323-329.
40. Perolat P, Merien F, Ellis WA, Baranton G. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 1994 Aug;32(8):1949-1957.
41. Brown PD, Levett PN. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *J Med Microbiol.* 1997 Feb;46(2):173-181.
42. Gerritsen MA, Smits MA, Olyhoek T. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting for rapid identification of leptospiras of serogroup Sejroe. *J Med Microbiol.* 1995 May;42(5):336-339.
43. Ramadass P, MeeFarani S, Senthil Kumar A, Venkatesha MD, Nachimuthu K. Rapid diagnosis of leptospirosis by polymerase chain reaction. *Indian Veterinary Journal.* 1997; 74(6): 457-460.
44. Ramadass P, Latha D, Senthilkumar A, Srinivasan P, Saranya N. Arbitrarily primed PCR- A rapid and simple method for typing of leptospiral serovars. *Indian J Med Microbiol.* 2002 Jan-Mar;20(1):25-28.
45. Woo TH, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF, Patel BKC. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23s ribosomal DNA. *FEMS Microbiology.* 1997;150:9-18.
46. Pérolat P, Grimont F, Regnault B, Grimont PA, Fournié E, Thevenet H, et al. rRNA gene restriction patterns of *Leptospira*: a molecular typing system. *Res Microbiol.* 1990 Feb;141(2):159-171.
47. Perolat P, Lecuyer I, Postic D, Baranton G. Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignation. *Res Microbiol.* 1993 Jan;144(1):5-15.
48. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol.* 1993 Aug;139(8):1691-1700.
49. Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S, Pacciarini ML. Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Clin Microbiol.* 1994 Apr;32(4):935-941.
50. Herrmann JL. Genomic techniques for identification of *Leptospira* strains. *Pathol Biol (Paris).* 1993 Dec;41(10):943-950.
51. Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZM, Vasconcelos SA, et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol.* 2000 May 11;73(4):261-267.
52. Shukla J, Tuteja U, Batra HV. Use of restriction endonucleases for differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. *Indian J Med Res.* 2002 Nov;116:192-200.