

کلونینگ و تعیین توالی ژن کد کننده لیپوپروتئین سطحی LipL41 در باکتری لپتوسپیروا اینتروگانس سرووار گریپوتیفوزا

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

چکیده

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 لپتوسپیروا، بخش میکروپزشناسی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
^۳ دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

زمینه و هدف: لپتوسپیروزیس یک بیماری عفونی می‌باشد که توسط سرووارهای بیماریزای لپتوسپیروا ایجاد می‌شود. افزایش ارتقای کیفی روش‌های کاربردی و معتبر در تشخیص این بیماری و همچنین تولید واکسن نو ترکیب، نیاز به آنتی‌ژن‌های اختصاصی دارد که در بین سرووارهای بیماریزای لپتوسپیروا یکسان و مشابه است. پروتئین‌های غشای خارجی لپتوسپیروا (OMPs)، آنتی‌ژن‌های مؤثری می‌باشند که قادر به تحریک پاسخ ایمنی مشخص در دوره عفونت می‌باشند.

در بین این آنتی‌ژن‌ها، LipL41 یک لیپو پروتئین ایمونوژنیک است که تنها در سرووارهای 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 لپتوسپیروا اینتروگانس سرووار واکسینال و بومی گریپوتیفوزا کلون و تعیین توالی گردید.

مواد و روش‌ها: لپتوسپیروا اینتروگانس سرووار واکسینال و بومی گریپوتیفوزا جهت تلقیح در محیط کشت انتخابی (EMJH) مورد استفاده قرار گرفت و استخراج DNA ژنومی به روش استاندارد فتل 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 نو ترکیب 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 ۱۰۶۵ جفت بازی بود. که این قطعه در سرووار غیر بیماریزا *L. biflexa* مشاهده نگردید. بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که قرابت نوکلئوتیدی ژن *lipL41* بین سرووار واکسینال (RTCC2808) و سرووار بومی بیماریزای (RTCC2825) گریپوتیفوزا ۱۰۰٪ بود.

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

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

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

مقدمه

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

لپتوسپیروزیس یک بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی می‌باشد که توسط اسپروکت بیماریزایی متعلق به جنس لپتوسپیروا ایجاد می‌شود.^{۳-۱} این جنس براساس بیان لیپوپلی ساکارید به سرووارهای مختلف بیماریزا و غیر بیماریزا تقسیم‌بندی می‌گردد.^۴ این بیماری نه تنها در کشورهای جهان سوم بلکه در کشورهای

می‌باشد.^{۱۰،۱۴}

این پروتئین به عنوان یک آنتی‌ژن اختصاصی در سرووارهای بیماریزای لپتوسپیروا، می‌تواند هم جهت تشخیص سرولوژیک بیماری و به دلیل ایمنی زایی بالا، به عنوان یک کاندیدای مناسب در تهیه واکسن نو ترکیب 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 لپتوسپیروا اینتروگانس سرووار واکسینال و بومی گریپوتیفوزا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سرووارهای لپتوسپیروا، کشت و تخلیص DNA

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

باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی EMJH (شرکت Difco) همراه با سرم خرگوش و مکمل‌های غذایی در شرایط هواز و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شدند و بعد از ۷-۱۰ روز رشد آن‌ها توسط میکروسکوپ زمینه سیاه مورد بررسی قرار گرفت. پس از رشد، نمونه‌ها جهت رسوب گیری در دور ۱۵۰۰۰ g 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 و همکاران گزارش شده بود استفاده گردید.^{۱۴} واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر (مقدار ۱۰۰ نانوگرم DNA،

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 آنفلوآنزا 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 لپتوسپیروا که در دوره عفونت بیان می‌شوند به منظور تشخیص بیماری و تهیه واکسن‌های نو ترکیب حائز اهمیت می‌باشند.^{۹-۱۱}

پروتئین‌های غشایی مختلفی مانند LipL32، LipL41، OmpL1، در بین LipL41 در لپتوسپیروا وجود دارد، که نقش ایمنی زایی دارند. در بین این پروتئین‌ها پروتئین غشایی OmpL1 در بین گونه‌های لپتوسپیروای بیماریزا از نظر آنتی‌ژنیکی هتروژنسته بالاتری دارد ولی LipL41 و LipL32 از نظر ساختمانی پایدارتر و تغییرات خیلی کمتری دارند.^{۱۱-۱۳}

LipL41 یکی از مهمترین پروتئین‌های ایمونوژنیک غشای خارجی لپتوسپیروا می‌باشد که در میان سرووارهای بیماریزای لپتوسپیروا مشاهده می‌شود ولی در سرووارهای غیر بیماریزای لپتوسپیروا 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

نوترکیب در محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین رشد کرده و تخلیص 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* سرووار مورد آزمایش، توالی‌های نوکلئوتیدی مورد نظر به کمک برنامه BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژنی که قبلاً گزارش شده اند مقایسه گردید (جدول ۱).

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 (جدول ۲) و به منظور بررسی ارتباطات فیلوژنتیکی سویه‌های مختلف لپتوسپیروا بر مبنای ژن *lipL41*، درخت فیلوژنتیکی و جدول تشابه و واگرایی توالی‌ها (جدول ۲) با استفاده از این نرم‌افزار رسم شد.

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 و تکثیر 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* لپتوسپیروا اینتروگانس سرووار 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 و نیم 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 آمپی سیلین در ۳۷ °C به مدت یک شبانه روز انکوبه گردیدند. سپس حضور ژن *lipL41* در کلنی‌های نوترکیب توسط PCR تایید گردید. کلنی‌های

جدول ۱: سرووارهای لپتوسپیروا بر اساس ژن

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

جدول ۲: درصد تشابه و واگرایی توالی ژن *lipL41* سرووارهای گریپوتیفوزای مورد مطالعه در این تحقیق و مقایسه آن‌ها با سایر سرووارهای ثبت شده در Genbank

Percent Identity													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Divergence	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

ژنتیکی را با توالی ثبت شده به شماره (JQ690557) که مربوط به لپتوسپیرا اینتروگانس سرووار گریپوتیفوزا که جدایه ای از کشور هند است با ۹۹/۶٪ تشابه نشان می‌دهد در حالی که در مقایسه با سرووارهای گریپوتیفوزای ثبت شده در بانک ژنی کمترین قرابت ژنتیکی را با لپتوسپیرا اینتروگانس سرووار گریپوتیفوزا (AY622681) که جدایه ای از کشور چین است با ۹۶/۳٪ تشابه دارد و در مقایسه با سایر سرووارهای موجود در بانک ژنی کمترین قرابت ژنتیکی را با سرووار ایکتره‌موراژیه (GQ502197) که جدایه ای از کشور هند است با ۹۵/۹٪ تشابه نشان می‌دهد و با سرووار گریپوتیفوزای *L. kirschneri* (L46794) که جدایه ای از کشور آمریکا است ۹۹٪ تشابه دارد (شکل ۲ و جدول ۲).

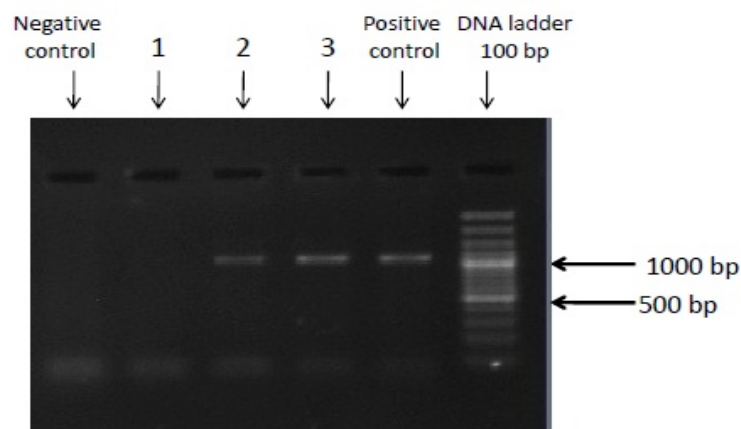
همچنین سرووارگریپوتیفوزا واکسینال و بومی مورد استفاده در این مطالعه کمترین قرابت ژنتیکی را با سرووار ایکتره‌موراژیه (GQ502197) کشور هند دارند.

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

محصول PCR به دست آمده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ مشاهده و اندازه آن که یک قطعه ۱۰۶۵ bp بود، با استفاده از ساینز مارکر مولکولی استاندارد تأیید شد. همچنین نتایج نشان داد که این ژن در سرووار واکسینال و بومی گریپوتیفوزا حضور داشته در حالی که در سرووار غیر بیمارزای 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 نو ترکیب با برداشت از کلنی‌های رشد یافته روی پلیت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین و انجام PCR و تکثیر ژن مورد نظر انجام شد.

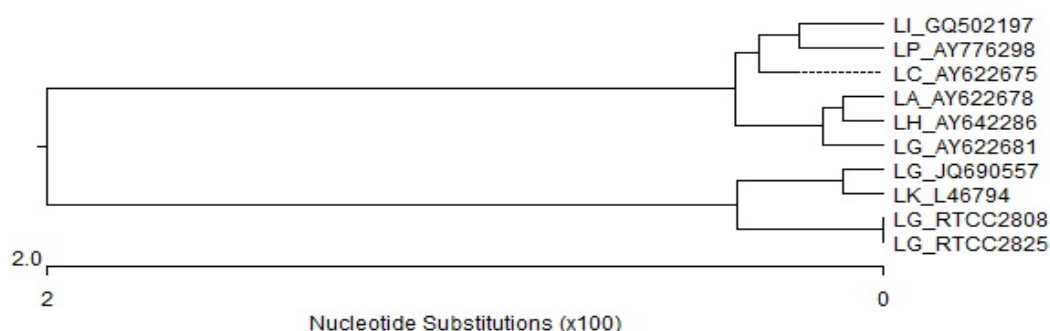
آنالیز توالی ژن *lipL41* در مورد سرووارهای واکسینال و بومی گریپوتیفوزا (RTCC2808,2825) و مقایسه آن‌ها با دیگر سرووارهای بیمارزای ثبت شده در GenBank انجام گردید (شکل ۲ و جدول ۲).

نتایج نشان داد که سویه های واکسینال و بومی گریپوتیفوزا ۱۰۰٪ تشابه را با همدیگر دارند و این دو سویه بیشترین قرابت



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR با استفاده از از پرایمرهای اختصاصی بر اساس ژن *lipL41* جهت شناسایی سرووارهای بیمارها از غیر بیمارها 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، سایر مارکر 100 bp



شکل ۲: درخت فیلوژنی بر اساس آنالیز توالی ژن *lipL41* برای سرووارهای گریپوتیفوزای مورد مطالعه و مقایسه آن‌ها با سایر سرووارهای 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

منطقه، ایمنی ایجاد شده ناقص است. بنابراین طراحی و ساخت واکسن نو ترکیب مؤثر و کارآمد بر علیه بیماری حائز اهمیت است.^{۲۴-۲۶}

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

مطالعات سرواید میولوژیکی 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 لپتوسپیروزیس پاسخ حفاظتی ایجاد می‌کنند. این واکسن‌ها حاوی سرووارهای شایع در منطقه می‌باشند ولی به علت متغیر بودن سرووارهای موجود در

وجود ندارد. این نتیجه نشانگر اهمیت این ژن در سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا می باشد، این نتایج با یافته های سایر محققین نیز مطابقت دارد.

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

Theodoridis و Natarajaseenivasan در دو مطالعه مختلف عنوان کردند که آزمایش ELISA بر اساس آنتی ژن نوترکیب LipL41 حساسیت و اختصاص قابل قبولی را نشان می دهد.^{۳۴،۳۷}

در مطالعه دیگری که به منظور بررسی آنتی ژن نوترکیب LipL41 لپتوسپیرا اینتروگانس سرووار کائیکولا در الایزا برای تشخیص لپتوسپیروزیس در گاوها انجام شد مشخص گردید که پروتئین نوترکیب rLipL41 می تواند 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 آنتی ژن نوترکیب LipL41 استفاده شد که حساسیت و اختصاص بالایی را نشان می دهد و به عنوان روشی سریع و اقتصادی برای غربالگری در مقیاس بالا در مناطق اندمیکی که تجهیزات پیشرفته ای ندارند مطرح می باشد.^{۳۸}

نتیجه حاصل از تحقیق ما با نتایج مطالعات سایر محققین حاکی از این می باشد که ژن *lipL41* یک ژن پایدار است که می توان 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 می شود که این ژن به عنوان یک ژن با ثبات بالا در کلونینگ و بیان یک آنتی ژن نوترکیب برای استفاده در تهیه واکسن نوترکیب مؤثر و همچنین در کیت های 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.

lipL41 سرووارهای مختلف لپتوسپیرا بررسی شد و نتایج بیانگر تشابه بسیار بالای این ژن در میان سرووارهای مختلف می باشد که نتایج حاصل از مطالعات گذشته نیز با نتایج این تحقیق مطابقت دارند.^{۱۲،۱۴،۳۷} لذا با توجه به ثبات این ژن در بین سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا، آنتی ژن نوترکیب حاصل از آن می تواند در بهبود تولید واکسن نوترکیب نقش مهمی داشته باشد.

از سوی دیگر با توجه به این که تابلوی بالینی لپتوسپیروزیس با اغلب عفونت های 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 می رسد.^{۲۹}

در آزمایش های سرولوژیکی مانند ELISA که امکان تشخیص بیماری در مراحل اولیه وجود دارد، نیاز به آنتی ژنی که در میان تمام سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا ثابت باشد وجود دارد.^{۳۰،۳۱} از آن جایی که پروتئین های غشای خارجی لپتوسپیرا به میزان بالایی در سطح سلول باکتری ثابت مانده اند و تغییر نمی کنند و همچنین طی عفونت در بدن میزبان بیان می شوند بنابراین می توان از پروتئین های نوترکیب لپتوسپیرا به عنوان آنتی ژن در آزمایش های سرولوژی بهره جست.^{۳۴-۱۵،۳۲} همچنین در تشخیص مولکولی این بیماری به وسیله PCR، نیاز به یک ژن ثابت در میان تمام لپتوسپیراهای بیماریزا می باشد. بنابراین می توان از ژن های کد کننده پروتئین های غشای خارجی نیز به عنوان ژن هدف در تشخیص مولکولی بهره جست.^{۱۶،۱۷،۳۵،۳۶}

در این بین لیپوپروتئین LipL41 یکی از مهمترین پروتئین های غشای خارجی لپتوسپیرا می باشد که گزارش شده که به طور اختصاصی فقط در سرووارهای بیماریزا وجود دارد،^{۱۰،۱۱،۱۷} بنابراین آنالیز مولکولی این ژن در بین سرووارهای بیماریزای لپتوسپیرا ضروری به نظر می رسد. بنابراین هدف از انجام این تحقیق، آنالیز مولکولی ژن کد کننده آنتی ژن لیپوپروتئین سطحی LipL41 در لپتوسپیرای سرووار گریپوتیفوزا می باشد. مطالعه حاضر نشان داد که این ژن در سرووارهای بیماریزای واکسینال و بومی گریپوتیفوزا وجود دارد در صورتی که در سرووار غیر بیماریزای *L. biflexa*

References

- Adler B, A. dIPM. *Leptospira* and leptospirosis. In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Iowa, USA: Blackwell; 2010.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases* 2003;3:757-71.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001;14:296-326.
- Adler B, A. dIPM. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 2010;140:287-96.
- WHO. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control (Geneva: World Health Organization); 2003.
- Levett P, Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. *Leptospira*. Manual of clinical microbiology: Volume 1; 2006:963-70.
- Vijayachari P, Sugunan A P, N SA. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of biosciences* 2008;33:557-69.
- Cachay ER, Vinetz JM. A global research agenda for leptospirosis. *J Postgrad Med* 2005;51:174-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ambily R, M. Mini, Siju Joseph, Krishna SV. lipL41 gene specific PCR for the detection. *JIVA* 2012;10:5-7.
- Sambrook J, DW R. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor ,NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- 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.
- Honarmand H, Eshraghi S. Detection of Leptospire serogroups, Which Are Common Causes of Human Acute Leptospirosis in Guilan, Northern Iran. *Iran J Public Health* 2011;40:107-14.
- Mohammad Tooloei, Golamreza Abdollahpour, 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.
- 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]
- 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.
- 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.
- Zuerner R, Haake D, Adler B, R S. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;2:455-62.
- Wang Z, Jin L, Węgrzyn A. Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories* 2007;6:39.
- 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.
- 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.
- 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.

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.