JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۹: ۹-۱

تشخیص مولکولی *لپتوسپیرا*های بیماری زا با استفاده از روش PCR بر اساس ژن *lipL32*

فاطمه رحیمی زارچی[۱]، پژواک خاکی*[۲]، سهیلا مرادی بیدهندی[۲]

۱- کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران.

۲- دانشیار، بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۳

چکیده

لپتوسپیروز یکی از بیماری های مهم قابل انتقال از حیوان به انسان است. *LipL32* یکی از مهمترین پروتئین های غشای خارجی *لپتوسپیرا* است که تنها در سروارهای بیماری زا وجود دارد و فاکتور مناسبی جهت شناسایی *لپتوسپیراهای* بیماری زا می باشد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش، تشخیص مولکولی *لپتوسپیراهای* بیماری زا بر اساس ژن *lipL32* می باشد. در این بررسی از سروارهای بیماری زا و غیر بیماری زای استاندارد *لپتوسپیرا* استفاده شد. باکتری ها در محیط کشت اختصاصیEMJH کشت داده شدند و DNA ژنومیک آن ها با روش استاندارد فنول کلروفرم ایزوآمیل الکل تخلیص گردید. پرایمر اختصاصی جهت تکثیر ژن *lipL32* طراحی شد. دمای اتصال (Annealing) برای این پرایمر ۶۱ درجه سانتی گراد، غلظت مناسب پرایمر ۱۰ پیکومول ، میزان حساسیت 4-10 pg/µl و همچنین تعیین ویژگی آن در PCR مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به داده های PCR تایید شد که این ژن فقط در سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* حضور دارد و قطعه 272 bp حاصل که نشان دهنده تکثیر ژن *lip L32* می باشد، در سروار غیر بیماری زا مشاهده نگردید. شناسایی روش های سریع تشخیص *لپتوسپیراهای* بیماری زا پیش از ورود به فاز حاد بیماری بسیار حائز اهمیت می باشد. بنابراین جهت تشخیص *لپتوسپیراهای* بیماری زا، روش های مولکولی مبتنی بر PCR با استفاده از ژن *lipL32*که در کوتاه ترین زمان ممکم پاسخی دقیق و قابل اعتماد ارائه می دهند، پیشنهاد می گردد.

کلمات کلیدی: PCR، *لپتوسپیرا*، ژن *lipL32*

*نویسنده مسئول: دکتر پژواک خاکی

آدرس: بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۳۸۹۴۹۸۶

پست الکترونیک: p.khaki@rvsri.ac.ir

مقدمه

لپتوسپیروز بیماری مشترک بین انسان و دام می باشد که توسط اسپیروکتی به نام *لپتوسپیرا* ایجاد می‌گردد (۵و۱۱و۲۹). این بیماری گونه‌های متعددی از جمله جانوران اهلی و وحشی را آلوده می‌کند. *لپتوسپیروزیس* در سال های اخیر در سطح جهان به عنوان شایع ترین بیماری زئونوز محسوب می شود. به دلیل افزایش شیوع *لپتوسپیروزیس* در جوامع پیشرفته و در حال توسعه است که این بیماری به عنوان یک مشکل جهانی مطرح شده است(۱۴و۱۹). این بیماری عموما توسط جوندگان و همچنین حیوانات مزرعه به عنوان مخازن بیماری، به کشاورزان و افرادی که در تماس نزدیک با پستانداران اهلی هستند، منتقل می شود(۱۶).

لپتوسپیروز یک بیماری حاد تب دار (۲۰) و یکی از علل اصلی مرگ و میر در سطح جهان با حدود ۱ میلیون مورد ابتلا می باشد (۹) که در صورت عدم درمان می تواند عوارض جدی و یا حتی تا ۴۰ درصد مرگ و میر مبتلایان را به دنبال داشته باشد(۱۰و ۱۷و۲۷).

معمولاً علائم بالینی *لپتوسپیروزیس* با سایر بیماری های عفونی دیگر اشتباه می شود. بطوری که در انسان بیماری از فرم خفیف تا فرم حاد کشنده بروز می کند و می تواند در مراحل اولیه بیماری به شکل شبه آنفلوانزا و در صورت تاخیر در درمان، تا اشکال شدید خونریزی دهنده ظاهر شود و اندام های حیاتی مانند کبد، کلیه و ریه را درگیر سازد و مرگ را در پی داشته باشد(۱۲و۲۵).

لپتوسپیروز حاد انسانی اگر زود تشخیص داده شود؛ به خوبی به درمان آنتی بیوتیکی پاسخ می دهد بنابراین تشخیص آزمایشگاهی سریع و صحیح این بیماری از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از روش های متفاوتی در تشخیص *لپتوسپیروز* استفاده می گردد مانند بررسی با میکروسکوپ زمینه تاریک (DFM)، کشت، روش های سرولوژیکی مانند میکروآگلوتیناسیون (MAT) و روش الایزا (ELISA) و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)(۲و۳و۱۸). مشاهده‌ی باکتری به وسیله‌ی میکروسکوپ زمینه تاریک شرایط تشخیص سریع را فراهم میکند. اما جهت تشخیص میکروسکوپی به کارشناسان مجرب نیاز است چرا که فیبرین و یا پروتئین ها که دارای حرکات براوونی می باشند ممکن است به اشتباه، باکتری تفسیر شوند. بنابراین، مشاهده‌ی میکروسکوپی روش تشخیص مناسبی نمی باشد. همچنین باکتری *لپتوسپیرا* باکتری کند رشدی بوده و جداسازی آن از نمونه های بالینی به روش کشت بسیار وقت گیر است و حساسیت آن نسبتا پایین می باشد (۲۰).

روش الایزا نیز با اینکه روش آسان و مقرون به صرفه ای می باشد، ولی به دلیل حساسیت پایین، به خصوص در هفته اول بیماری و همچنین ناتوانی در تشخیص سروارهای *لپتوسپیرا*، روش مناسبی جهت تشخیص سریع و دقیق این بیماری نیست(۲۴).

علی رغم اینکه روش سرولوژیک MAT به عنوان روش مرجع در تشخیص *لپتوسپیرا* کاربرد دارد ولی با توجه به اینکه در این روش از باکتری زنده جهت تشخیص استفاده می شود، لذا این روش سرولوژیک نیز با توجه به خطرات کار مستقیم با باکتری زنده برای کارشناس، روش مناسبی جهت تشخیص نمی باشد. علاوه بر این، از آنجایی که تکنیک های سرولوژیکی قادر به شناسایی مخازن و یا ناقلین نیستند، تشخیص مولکولی نمونه های بالینی روش های مناسبی جهت

تشخیص از یک طرف و همچنین شناسایی مخازن و یا ناقلین از طرف دیگر می باشد(۶و۲۲).

روش PCR با ارائه نتایج سریع و دقیق و با حساسیت بالا، نسبت به روش های زمان بری مانند کشت و MAT ارجحیت دارد(۶و۷و۲۳و ۳۰).

در سال ۱۹۸۹ روشPCR توسط ون آیز و همکارانش برای تشخیص *لپتوسپیروز*، بر روی ادرار گاو مورد بررسی قرار گرفت (۴).

LipL32 لیپوپروتئین غشاء خارجی *لپتوسپیرا* می باشد که در سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* بیان می شود. ژن کد کننده این پروتئین در میان سروارهای مختلف بیماری زا کاملا ثابت و حفاظت شده می باشد(۲۸).

LipL32 که توسط *لپتوسپیراهای* بیماری زا تولید می شود در تمام مراحل چرخه زندگی واکنش ایمنی موثر در انسان و حیوانات را افزایش می دهد. این پروتئین در طول عفونت یک آنتی ژن غالبا ایمونوژنیک است و تولید آنتی بادی ها تقریبا در همه موارد دیده می شود. آنتی بادی های ضد *LipL32* در سرم بیماران مبتلا به لپتوسپیروز در تمام مراحل بیماری شناسایی می شوند (۲۸و۳۲و۳۱و۱۵و۱۳و۲).

بنابراین هدف از اجرای این تحقیق، تشخیص مولکولی *لپتوسپیرا*های بیماری زا بر اساس ژن *lipL32* می باشد.

مواد و روش کار

سروارهای *لپتوسپیرا* مورد استفاده در این تحقیق

در این تحقیق از سروارهای بیماری زای

L.Grippotyphosa RTCC2808، *L.Ballum* RTCC2838 ،

RTCC2825 *L.Grippotyphosa*،

L.Serjoe hardjo RTCC2821،

L.Pomona RTCC2822 ،

L.Canicola RTCC2836،

L.Canicola RTCC2805،

L.Icterohaemorrhagiae RTCC2837،

L.Australis RTCC2840،

L.Serjoe hardjobovis RTCC2843

و سروار غیربیماری زای *L.Semaranga RTCC2828* موجود در کلکسیون میکروبی آزمایشگاه رفرانس *لپتوسپیرا* واقع در موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج استفاده گردید.

کشت و استخراجDNA

باکتری های *لپتوسپیرا* در محیط کشت اختصاصی EMJH (Difco,USA) همراه با ۱۰٪ سرم خرگوش و مکمل های غذایی در شرایط هوازی و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شدند و بعد از ۱۰-۷ روز رشد آن ها با میکروسکوپ زمینه تاریک مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه ها جهت رسوب گیری در ۱۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. جهت تخلیص DNA ژنومیک از روش استاندارد فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل استفاده شد(۳۱). کیفیت و کمیت DNA تخلیص یافته توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمایش PCR

در این تحقیق جهت تکثیر ژن *lipL32* با سایز ۲۷۲ جفت باز پرایمرهای اختصاصی با توالی زیر طراحی گردید.

LipL32 F: 5’ GAATCAAGATCCCAATCCTC 3’
LipL32 R: 5’ TTACTTAGTCGCGTCAGAAGC 3’

واکنش PCR در حجم ۱۶ میکرولیتر انجام شد. برای دناتوراسیون اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس دناتوراسیون به مدت ۱دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، الحاق پرایمرها به DNA هدف در ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱دقیقه و تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت

۱ دقیقه طی ۳۵ سیکل تکرار شد و در نهایت ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت. محصول PCR در تمامی نمونه ها توسط ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت.

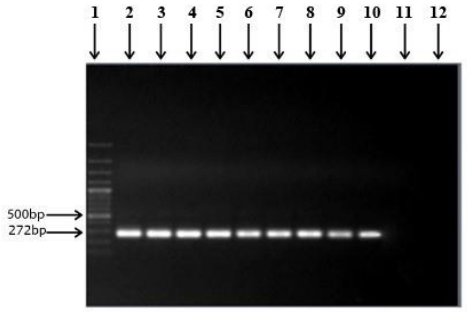
جهت تعیین دمای اتصال بهینه در پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، از سروار بیماری زای *لپتوسپیرا L.Grippotyphosa* RTCC2808 استفاده و گرادیانت دمایی از ۵۰ تا ۶۲ درجه سانتی گراد گذاشته شد. همچنین جهت تعیین غلظت بهینه پرایمر ها در واکنش PCR، غلظت های۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ پیکومول از هر پرایمر مورد سنجش قرار گرفت.

برای به دست آوردن غلظت بهینه DNA برای واکنش PCR با پرایمرهای طراحی شده مذکور، در مرحله اول از DNA باکتری*L.Grippotyphosa* RTCC2808 با غلظتی معادل ۱۰۰ ng/ µl استفاده گردید. در مرحله بعد جهت بررسی کمترین غلظت DNA موجود در نمونه، DNA از غلظت ۱۰۰ ng / µl تا 10^{-5} pg / µl رقیق شد. در هر میکروتیوپ ۱µl از هر رقت ریخته شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب دامنه غلظت بر اساس تعداد پارتیکل باکتری در ۱ µl در نظر گرفته شد.

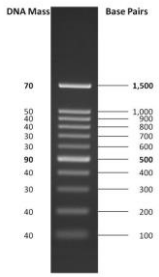
برای تعیین اختصاصی بودن پرایمر*Lipl32* برای لپتوسپیراهای بیماری زا انجام تست تعیین ویژگی ضروری است. برای انجام این عمل بر روی DNA استخراج شده از سروارهای بیماری زا و غیر بیماری زای *لپتوسپیرا* و باکتری *Salmonella enteritidis* ATCC13076 به عنوان کنترل منفی با پرایمر *LipL32* تست PCR انجام گردید. همچنین به منظور بررسی صحت نتایج*L.Canicola* RTCC2805 جهت تعیین توالی ژنوم مورد نظر به شرکت کروموژن کشور کره فرستاده شد.

نتایج

تکثیر ژن *lipL32* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام و نتیجه محصول ژن *lipL32*، باند۲۷۲ جفت باز بود که با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و مارکر۱۰۰ جفت بازی مورد تایید قرار گرفت. با توجه به یافته ها، بهترین دما جهت اتصال پرایمرها (Annealing) برای این واکنش، دمای ۶۱ درجه سیلسیوس در نظر گرفته شد. در طی آزمایش PCR جهت تعیین غلظت مناسب پرایمرها نیز میزان بهینه ی غلظت پرایمرها ۱۰ پیکومول به دست آمد. همچنین یافته ها جهت تعیین میزان حساسیت پرایمرها حاکی از آن بود که پرایمر مورد استفاده در تحقیق حاضر از حساسیت جهت تشخیص سروارهای بیماری زا بر خوردار می باشد. میزان حساسیت پرایمر *LipL32* در حد 10^{-4} pg / µl بود. این میزان پس از معادل سازی نشانگر این بود که در این PCR، توانایی شناسایی یک پارتیکل باکتری در ۱ µl نمونه وجود دارد. تحلیل نتایج آزمایش تعیین ویژگی PCR نشان داد که ژن *lipL32 کاملا* اختصاصی برای لپتوسپیراهای بیماری زا بوده و فقط در سروارهای بیماری زا وجود دارد و در سروار غیربیماری زای مورد مطالعه و همچنین باکتری سالمونلا باند ۲۷۲ جفت باز معرف ژن *lipL32* مشاهده نشد(شکل۱).



شکل ۱



مارکر مرجع

شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی*LipL 32* جهت شناسایی سروواراهای بیماریزا از غیر بیماری زا بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

ستون اول مارکر 100bp،ستون دوم کنترل مثبت *L.Grippotyphosa* RTCC2808، ستون سوم *L.Ballum* RTCC2838، ستون چهارم *L.Grippotyphosa* RTCC2825، ستون پنجم *L.Serjoe hardjo* RTCC2821، ستون ششم *L.Pomona* RTCC2822، ستون هفتم*L.Canicola* RTCC2836، ستون هشتم *L.Canicola* RTCC2805، ستون نهم *L.Icterohaemorrhagiae* RTCC2837، ستون دهم *L.Australis* RTCC2840، ستون یازدهم *L.Semaranga* RTCC2828، ستون دوازدهم کنترل منفی *Salmonella enteritidis* ATCC13076

جهت اطمینان از صحت نتایج به دست آمده، نتایج تعیین توالی نوکلئوتیدی سروار *L.Canicola* RTCC2805 با یافته های ثبت شده در بانک ژنی مقایسه و تایید شد.

بحث و نتیجه گیری

لپتوسپیروز یک بیماری مشترک بین انسان و دام می باشد که با توجه به شباهت علائم بالینی این بیماری با سایر بیماری ها مانند آنفلوانزا تشخیص دقیق و زودهنگام بیماری در مراحل اولیه عفونت جهت درمان، از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۲۶و۱۲).

امروزه به منظور تشخیص باکتری های کند رشدی مانند *لپتوسپیرا*، روش های مبتنی بر PCR نسبت به سایر روش های تشخیص، کاربرد بیشتری دارند. یکی از ویژگی های مهم PCR جهت تشخیص *لپتوسپیروز* توانایی بالای آن در شناسایی *لپتوسپیرا* در مراحل اولیه بیماری می باشد. همچنین روش PCR دارای چندین مزیت کلیدی نسبت به تکنیک های استاندارد تشخیصی مانند کشت و روش MAT می باشد. از جمله این مزیت ها می توان به سرعت در تشخیص، آلودگی کمتر و حساسیت و ویژگی بالا اشاره کرد(۲۶).

یکی از مهم ترین پروتئین های غشای خارجی *لپتوسپیرا*های بیماری زا، LipL32 می باشد. از آنجایی که ژن کد کننده این پروتئین یک ژن ثابت و حفاظت شده می باشد، یکی از کاندیداهای مناسب جهت تشخیص مولکولی سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* می باشد(۲۵). بنابراین هدف از اجرای این تحقیق تشخیص مولکولی *لپتوسپیرا*های بیماری زا در روش PCRبر مبنای ژن *lipL32* می باشد.

در بررسی کنونی مشخص شد که ژن *lipL32* با سایز ۲۷۲ جفت باز در سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* وجود دارد در حالی که درسروار غیربیماری زای *L.Semaranga*RTCC2828 حضور نداشت. در سایر بررسی های انجام شده توسط دیگر پژوهشگران، حضور ژن *lipL32* در میان سروارهای پاتوژن *لپتوسپیرا* مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است (۸و۲). تفاوت نتایج تحقیق حاضر با سایر تحقیقات در سایز قطعه ژنومی و همچنین نوع نمونه ها بود.

Levett و همکاران در سال ۲۰۰۵ برای تشخیص *لپتوسپیراهای* بیماری زا از ژن *lipL32* در روش Real-time PCR استفاده کردند که نتیجه حاصل این بود که این ژن تنها در سروارهای بیماری زای لپتوسپیرا حضور دارد (۲۰).

در سال ۲۰۰۶ نیز Ahmed و همکاران با طراحی پرایمری برای ژن *lipL32* به طول ۴۷۴ جفت باز سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* را شناسایی کردند. این پرایمر تنها در سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* دارای پاسخ مثبت بود(۱). نتایج تحقیق آن ها کاملا با تحقیق حاضر مشابه بود وتایید گردید که این ژن فقط در سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* حضور دارد. وجه تمایز نتایج مطالعات Ahmed و همکاران با تحقیق حاضر، کوتاه تر بودن طول قطعه ژنومی *lipL32* (۲۷۲ جفت باز) مورد استفاده در تحقیق حاضر *و در نتیجه حساسیت بالاتر بود.*

Cheema و همکاران در سال ۲۰۰۷ جهت تشخیص *لپتوسپیرا*های بیماری زا در حیوانات بر مبنای ژن *lipL32* و با استفاده از پرایمری با طول ۷۵۶ جفت باز آزمایش PCR انجام دادند. تایید گردید که ژن *lipL32* در تشخیص سروارهای بیماریزای لپتوسپیرا بسیار کارآمد می باشد (۸).

در سال ۲۰۱۳ Khodaverdi Darian و همکاران با استفاده از پرایمر *LipL32* با طول ۸۳۵ جفت باز موفق به شناسایی سه سروار واکسینال *لپتوسپیرا* شدند. در طراحی پرایمر این تحقیق، کل ژن *lipL32* مد نظر قرار گرفته است که گفته شده میتوان در گام بعدی از این ژن در کلونینگ و بیان یک آنتی ژن نوترکیب استفاده کرد که از این آنتی ژن هم می توان در تهیه یک واکسن نوترکیب موثر و کارآمد و هم در کیت های تشخیصی سرولوژیکی مانند الایزا استفاده نمود(۱۷).

Alizadeh و همکاران در سال ۲۰۱۴ از تکنیک الایزا و ترکیب پروتئین های *LipL32* و *Lsa63* استفاده کردند. در این آزمایش این آنتی ژن جدید، برای شناسایی آنتی بادی های خاصی در *لپتوسپیراهای* بیماری زای موجود در سرم انسان استفاده شد که در تشخیص *لپتوسپیروزیس* مفید می باشد. وجه تمایز مطالعات Alizadeh و همکاران با تحقیق حاضر در این بود که در تحقیق ما جهت تشخیص *لپتوسپیراهای* بیماری زا از ژن *lipL32* در تکنیک PCR، استفاده شد(۳).

در سال ۲۰۱۷ Latifah و همکاران با استفاده از پرایمر*LipL32* به طول ۷۸۶ جفت باز توانستند سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* را در نمونه های ادرار موش ها شناسایی کنند. تمامی نمونه های پاتوژن مورد مطالعه در این تحقیق با استفاده از پرایمر*LipL32* مانند تحقیق حاضر دارای پاسخ مثبت بودند(۱۸). تفاوت مطالعه انجام شده توسط Latifah و همکاران با تحقیق حاضر در سایز قطعه ژنومی و همچنین انتخاب نمونه ها بود.

در تحقیق حاضر با استفاده از پرایمر اختصاصی *LipL32* با قطعه ژنومی به طول ۲۷۲جفت باز سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* تشخیص داده شد. با توجه به تطابق کامل نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به دست آمده از تحقیقات فوق الذکر، مشخص شد که می توان از ژن *lipL32* جهت تشخیص سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* استفاده کرد. همچنین قطعه ژنی مورد بررسی در تحقیق حاضر با سایز ۲۷۲ جفت باز به دلیل کوچک بودن قطعه ژنومی نسبت به قطعات مورد مطالعه در سایر تحقیقات ذکر شده، از حساسیت بالاتری برای تشخیص سروارهای بیماری زا برخوردار بود. بنابراین پیشنهاد می گردد که از روش مولکولی

PCR بر مبنای ژن *lipL32* جهت تشخیص سریع و دقیق باکتری *لپتوسپیرا* در مراحل اولیه بیماری استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و همه کارکنان آزمایشگاه مرجع *لپتوسپیرا* بخش میکروب شناسی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج سپاس گزاری می نمایند.

منابع

1. Ahmed, N., Devim S.M., Valverde Mde, L., Vijayachari, P., Machang'u, R.S, Ellis, W.A., Hartskeerl, R.A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **23**: 5-28.
2. Ahmed, S.A., Sandai, D.A., Musa, S., Hoe, C.H., Riadzi, M., Lau, K.L., Tang TH. (2012). Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, **19:** 9–16.
3. Alizadeh, S.A., Abdolahpour, G., Pourmand, M.R., Naserpour, T., Najafipour, R., Eshraghi, S.S. (2014). Evaluation of New ELISA based on rLsa63 - rLipL32 antigens for serodiagnosis of Human Leptospirosis. *Iranian Journal of Microbiology*, **6:** 184-9.
4. Bomfim, M.R., Barbosa-Stancioli, E.F., Koury, MC. (2008). Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Veterinary journal*, **178:**251-256.
5. Bourhy, Y.P., Zinini, F., Giry, C., Picardeau, M. (2011). Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic Leptospira spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal Clinical Microbiology*, **49:**2154-60.
6. Cabral Pires, B., Berzin Grapiglia, J., Moreira, L., Jaeger, L.H., Carvalho-Costa, F.A, Lilenbaum, W. (2018). Occurrence of uterine carriers for Leptospira interrogans on slaughtered cows. *Microbial Pathogenesis.* **114:**163-165.
7. Cerqueira, GM., Picardeau, M. (2009). A century of Leptospira strain typing. *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, **9:**760-8.
8. Cheema, P.S., Srivastava, S.K., Amutha, R., Singh, S., Singh, H., Sandey, M. (2007). Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on *lipL21* and *lipL32* genes. *Indian Journal of Experimental Biology*, **45:** 568-73.
9. Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., MartinezSilveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B., Ko, A.I. (2015). Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **9:** 9.
10. Dittrich, S., Rattanavong, S., Lee, S.J., Panyanivong, P., Craig, S,B., Tulsiani, S.M., Blacksell, S,D., Dance, D.A., Dubot-Pérès, A., Sengduangphachanh, A., Phoumin, P., Paris, DH., Newton, PN. (2015). Orientia, rickettsia, and leptospira pathogens as causes of CNS infections in Laos: a prospective study. *Lancet Global Health*, **3:** 104-12.
11. Haake D.A and Matsunaga, J. (2010). Leptospira: A Spirochete with a Hybrid Outer Membrane. *Molecular Microbiology*,**11:** 805-814.
12. Gebriel, A.M., Subramaniam, G., Sekaran, S.D. (2016). The detection and characterization of pathogenic Leptospira and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. *Tropical biomedicine*, **23:** 194-207.
13. Gollop, J., Katz, R., Rudoy, C and Sasaki M. (1993). Rat-bite leptospirosis. Western journal of medicine, **159:** 76–77

14. Haake, D.A, Chao, G., Zuerner, R.L, Barnett, J.K., Barnett, D., Maze, M., Matsunaga, J., Levett, P.N., Bolin, C.A. (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and Immunity*, **68:**2276-85.
15. Haukl, P., Rodrigues Guzzo, C., Roman Ramos, H., Lee Ho, P, and Shaker Farah, C. (2009). Structure and Calcium Binding Activity of LipL32, the Major Surface Antigen of Pathogenic Leptospira sp. *Journal of Molecular Biology*, **390:** 722–736.
16. Hery, G., Letheulle, J., Flecher, E., Quentin, C., Piau, C., Le Tulzo, Y. (2015). Massive intra-alveolar hemorrhage caused by Leptospira serovar Djasiman in a traveler returning from Laos. *Journal Travel Medicine*, **22:**212-4.
17. Khodaverdi Darian, E., Forghanifard, M.M., Moradi Bidhendi, S., Chang, Y.F., Yahaghi, E., Esmaelizad, M., Khaleghizadeh, M., Khaki, P. (2013). Cloning and Sequence Analysis of LipL32, a Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic Leptospira Spp. *Iranian Red Crescent medical journal*, **15:**e8793.
18. Latifah, I., Abdul Halim, A., Rahmat, M.S., Nadia ,M.F., Ubil, Z.E., Asmah, H., Shafariatul Akmar, I., Picardeau, M., Siti Haslina, O., Nasir, M.A. (2017). Isolation by culture and PCR identification of LipL32 gene of pathogenic Leptospira spp. in wild rats of Kuala Lumpur. *Malaysian Journal of Pathology*, **39:** 161-166.
19. Levett, P.N., (2001).Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews***,** **14:**296-326.
20. Levett, P.N., Morey, R.E., Galloway, R.L., Turner, D.E., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W. (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, **54:**45-9.
21. Lilenbaum, W., Kremer, F., Ristow, P., Dellagostin, O., Bourhy, P., Hartskeerl, R., and Vasconcellos, S. (2014). Molecular characterization of the first leptospires isolated from goats in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **45:** 1527–1530.
22. Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samplesM. *Journal of Clinical Microbiology*, **30:**2219- 24.
23. Niloofa, R., Fernando, N., de Silva, LN., Karunanayake, L., Wickramasinghe, H., Dikmadugoda, N., et al. (2015). Diagnosis of leptospirosis: comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunechromatography test. *plos one journal*, **10:**e0129236.
24. Plank, R., Dean, D. (2010). Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of Leptospira spp. in humans, *Microbes and infection*, **2:**1265-76.
25. Smythe, L.D., Smith, I.L., Smith, G.A., Dohnt, M.F., Symonds, M.L., Barnett, L.J. (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic Leptospira spp. *BioMed Central infectious diseases*, **2:** 1–7.
26. Taylor, A.J., Paris, D.H., Newton, P.N. (2015). A systematic review of the mortality from untreated leptospirosis. *PLoS neglected tropical diseases*, **9:** e0003866.
27. Vaganova, A.N., Stoianova, N.A., Tokarevich, N.K. (2011). Development of PCR test system based on colA gene for detection of leptospirae in clinical material. *Journal of microbiology, epidemiology, and immunobiology*, **5:** 67-71.
28. Wagenaar, J.F., de Vries, P.J., Hartskeerl, R.A. (2004). Leptospirosis with pulmonary hemorrhage, caused by a new strain of serovar Lai: Langkawi. *Journal of travel medicine*, **11:**379-81.
29. Waggoner, J.J., Balassiano, I., Abeynayake, J., Sahoo, MK., Mohamed-Hadley, M.A., Liu, Y.(2014) .Sensitive real-time PCR detection of pathogenic Leptospira

spp. and a comparison of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of leptospirosis. *Public Library of Science one*, **9:**e112356.

30. Woodward, M.J., Redstone, J.S. (1993). Differentiation of leptospira serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment Length polymorphism. *The Veterinary record*, **132:** 325-6.
31. Yang, C.W., Wu, M.S., Pan, M.J., Hsoeh, W.J., Vandewalle, A., Huang, C.C. (2002). The Leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, **13:** 2037–2045.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 2, 2019

Molecular detection of pathogenic Leptospires based on *lipL32* gene

Fatemeh Rahimi Zarchi[1], Pejvak Khaki[*2], Soheila Moradi Bidhendi[2]

1- Department of Biology, School of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 24 July 2018 *Accepted: 12 February 2019*

Abstract

Leptospirosis is one of the most important diseases Transferable from animal to human. LipL32 is one of the most important outer membrane proteins that exist only in pathogenic Leptospira spp., which is a suitable factor for the detection of pathogenic Leptospira. Therefore, the aim of this study is the molecular detection of pathogenic Leptospira based on lipL32 gene. Saprophytic and pathogenic Leptospira serovars 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 lipL32 gene were designed. In terms of annealing temperature was 61°C, suitable concentration 10 pmol, sensitivity was $۱۰^{-۴}$ pg/ µl and its characterization in PCR were investigated. According to PCR data, it was confirmed this gene was present only in pathogenic Leptospira serovars and 272 bp fragment indicating the replication of the lipL32 gene and was not observed in non-pathogenic species. Identify methods for rapid detection of pathogenic leptospires before entering the acute phase of the disease is very important. The results showed that PCR using lipL32 gene was high specificity and sensitivity. So for the detection of pathogenic Leptospires, molecular methods based on PCR using lipL32 gene in the shortest possible time offer accurate and reliable response is recommended.

Keywords: PCR, Leptospira, lipL32 gene

**Corresponding author: Dr Pejvak Khaki*

Address: Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Tel:09123894986

Email: P.khaki@rvsri.ac.ir