نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هجدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۱،
پیاپی ۴۵ : ۳۰-۱۹

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی ژن فلاژلین *flaB2* در سرووارهای بیماریزای *لپتوسپیرا*

سپیده حق نظری[۱]، پژواک خاکی[۲*]، سهیلا مرادی بیدهندی[۲]، مجید اسمعیلی زاد[۳]، مجید تبیانیان[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲- بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳- بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۴- بخش ایمنی شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹

چکیده

لپتوسپیروزیس یک بیماری عفونی مشترک بین انسان و حیوانات می باشد که توسط *لپتوسپیراهای* بیماریزا ایجاد می گردد. FLaB2 پروتئین تاژک پری پلاسمی می باشد که در طی عفونت در میزبان بیان می شوند. این پروتئین در بین تمام سرووارهای بیماریزای *لپتوسپیرا* حفظ شده است. هدف از این تحقیق بررسی مولکولی ژن کد کننده فلاژلین *flaB2* به روش PCR در سرووارهای بیماریزای *لپتوسپیرا* در ایران می باشد. در این تحقیق ۲۰ سروار بیماریزا و دو سروار غیر بیماریزای *لپتوسپیرا* استفاده گردید. ۲۲ سروار فوق در محیط کشت اختصاصی EMJHکشت داده شدند و DNA ژنومیک با استفاده از روش استاندارد فنل کلروفرم تخلیص گردید. جهت تکثیر ژن *flaB2* پرایمرهای اختصاصی طراحی و حساسیت و ویژگی آن در PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج PCR روی ژن *flaB2* با تولید قطعه ای به طول ۱۰۵۰ جفت باز نشان داد که در همه ۲۰ سروار بیماری زای *لپتوسپیرا* ژن *flaB2* وجود دارد، این ژن در *لپتوسپیراهای* غیربیماریزای *L. biflexa* مشاهده نگردید. یافته ها نشان می دهد که ژن کدکننده *flaB2* فقط در سرووارهای بیماری زا وجود دارد. بنابراین شناسایی مولکولی ژن *flaB2* برای تشخیص سرووارهای بیماری زا از غیربیماری زا *لپتوسپیرا* از اهمیت بالایی برخوردار است.

کلمات کلیدی: لپتوسپیروزیس، *لپتوسپیرا* ، سروار، *flaB2* ، PCR

*نویسنده مسئول: پژواک خاکی
آدرس: بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
پست الکترونیک: khakipejvak53@gmail.com

مقدمه

لپتوسپیروزیس یک بیماری عفونی مشترک بین انسان و حیوانات (زئونوز) با انتشار جهانی می باشد که توسط باکتری *لپتوسپیرا اینتروگانس* ایجاد می گردد(۴، ۳ و ۱۳). مهمترین منبع آلودگی، ادرار دام مبتلا می باشد که باکتری *لپتوسپیرا* را از راه ادرار دفع می کند، انسان بیشتر در نتیجه آلودگی با ادرار و یا محتویات رحم دام مبتلا، بیمار می شود. بیماری در مناطق باران خیز و معتدل اشاعه بیشتری داشته و در خاک دارای pH خنثی یا نیمه قلیایی بیشتر از سایر نقاط رخ می دهد (۶، ۷، ۱۷و ۱۸).

لپتوسپیرا در اغلب مناطق جهان بیشترین پراکندگی را دارد و برای انسان و دام بیماری زا است. با توجه به اهمیت جنبه های بهداشتی و اقتصادی ناشی از لپتوسپیروزیس، بررسی و مطالعه روش های سریع تشخیص این بیماری امری مهم تلقی می گردد. یکی از رویکردهای مهم تحقیقات مربوط به لپتوسپیروزیس، شناسایی پروتئین های غشای خارجی، لیپوپروتئین ها، فاکتورهای ویرولانس، ادهسین ها و فاکتور فلاژلین این باکتری شد که در طی عفونت در میزبان بیان می شوند(۱۳، ۲۰ و ۲۳).

پروتئین های غشایی باکتری ها پایه و اساس ارتباط بین باکتری بیماری زا و میزبان بوده و از آنجایی که این پروتئین ها اولین ترکیبات باکتریایی هستند که با سلول های میزبان واکنش می دهند بنابراین به منظور تشخیص بیماری و تهیه واکسن های نوترکیب حائز اهمیت می باشند(۱ و ۱۴، ۲۵). لیپوپروتئین های LipL45، LipL32،LipL21، LipL41، LipL46 ، ompL1، فاکتورهای ویرولانس Loa22، Hsp58، SphH، ChpK، ادهسین های Lsa44,45، Lsa19, Lsa20, Lsa21 Lsa46,47،Lsa26 ، LenA و فاکتور فلاژلین پروتئین FlaB می توانند کاندیدهای خوبی برای تهیه واکسن های نوترکیب باکتری *لپتوسپیرا* باشند(۱، ۸،۱۱، ۱۲ و ۳۲).

تحرک لپتوسپیرال توسط دو تاژک پری پلاسمی شامل شامل دو پروتئین مجزا، FlaA و FlaB که به ترتیب غلاف و مرکز فلاژل را تشکیل می دهند، همچنین نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده آن است که موتانت و جهش FlaB، اندوفلاژل ناقص دارد و فاقد تحرک می باشد. در کل باکتری *لپتوسپیرا* بدون حرکت مرده محسوب می شوند و حرکت در نتیجه چرخش فلاژل می باشد(۹، ۱۰، ۱۹و ۲۷).

ژن *flaA* دارای دو زیر واحد (*flaA1* و *flaA2*) و ژن *flaB* دارای چهار زیر واحد (*flaB4*, *flaB2*, *flaB1* *flaB3*,) می باشد. نتایج به دست آمده نشان می دهد که *flaB2* در بالادست ژن بیان می شود و احتمال داده می شود که *flaB1* و *flaB2* به طور جداگانه رونویسی شده اند و توسط یک اپرون رونویسی که به وسیله یک پروموتور کنترل می شود تشکیل نمی شوند. همچنین ژن کد کننده فلاژلین *flaB2* نقش مهمی در بیماریزایی *لپتوسپیراهای* بیماری زا ایفا می کند(۲، ۱۶، ۲۲، ۲۳ و ۲۹).

هدف از این تحقیق تشخیص مولکولی ژن کد کننده فلاژلین *flaB2* به روش PCR در سرووارهای بیماری زای باکتری *لپتوسپیرا* در ایران می باشد.

مواد و روش ها:

سرووارهای مورد استفاده:

در این تحقیق از بیست سروار بیماری زای *لپتوسپیرا* و دو سروار غیربیماریزا موجود در آزمایشگاه رفرانس *لپتوسپیرا* در بخش میکروب شناسی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج استفاده گردید(جدول ۱)

جدول ۱: سرووارهای مورد استفاده در این تحقیق

شماره	نام سویه	RTCC*	شماره	نام سویه	RTCC*
1	*Autumnalis L.*	2802	12	*L. Canicola*	2824
2	*L.Canicola*	2805	13	*L. Grippotyphosa*	2825
3	*L. Grippotyphosa*	2808	14	*L. Semanerga*	2828
4	*L. Serjoe hardjo*	2810	15	*L. Pomona*	2829
5	*L. Icterohaemorrhagiae*	2812	16	*Autumnalis L.*	2830
6	*L. Pomona*	2815	17	*L. Pyrogenes*	2835
7	*L. Serjoe Serjoe*	2817	18	*L. Canicola*	2836
8	*L. Semanerga*	2819	19	*Icterohaemorrhagiae L.*	2837
9	*L. Serjoe hardjo*	2821	20	*L. Australis*	2840
10	*L. Pomona*	2822	21	*L. Laitype lanylokowii*	2841
11	*L. Icterohaemorrhagiae*	2823	22	*L. Serjoe hardjo bovis*	2843

RTCC*:Razi Type CultureCollection

کشت:

باکتری ها در محیط کشت اختصاصی EMJH (USA,Difco)همراه با سرم خرگوش و مکمل های غذایی در شرایط هوازی و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد کشت داده شدند و بعد از ۱۱-۷ روز رشد آن ها توسط میکروسکوپ زمینه سیاه (Dark Field) مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه ها جهت رسوب گیری در ۱۷۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردیدند.

استخراج DNA:

جهت استخراج DNA ژنومیک از روش استاندارد فنل کلروفرم ایزوامیل الکل استفاده شد. کیفیت و کمیت DNAاستخراج شده به ترتیب توسط الکتروفورز ژل آگارز و جهت ارزیابی غلظت DNA از دستگاه

نانودراپ در طول موج nm ۲۶۰ استفاده گردید. به منظور تعیین میزان خلوص DNA، نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ مورد بررسی قرار گرفت و لازم به ذکر است که میزان ۲-۱/۸ بیانگر خلوص DNA تخلیص شده می باشد.

طراحی پرایمر:

پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در این مطالعه جهت تکثیر ژن *flaB2* با نرم افزار Oligo 7 طراحی گردید. توالی این جفت پرایمر به صورت زیر می باشد:

جدول (۲): پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه جهت تکثیر ژن *flaB2*

Primers	Sequence (5' → 3')	Fragment Length (bp)	Tm (°C)	GC%
Forward primer	tgg tct gaa tac tgt cca tc	1050	55.25	45
Reverse primer	ctt tat cta cct tcc ctc ctg		57.87	47.62

تعیین حساسیت پرایمر:

جهت بدست آوردن کم ترین حد از مقدار DNA که واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده مورد نظر می توانند آن را تشخیص دهند، و تکثیر صورت گیرد، از *لپتوسپیرا L. Canicola* استفاده گردید. به این منظور نمونه DNA مورد نظر از غلظت ۱۰۰ ng/µl تا ۰/۰۰۰۱ pg/µl تهیه و رقیق شد. در نهایت درون هر میکروتیوب ۱ لاندا از هر رقت ریخته و آزمایش PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت.

تعیین غلظت پرایمر:

برای بدست آوردن بهترین غلظت از پرایمر جهت انجام واکنش های PCR، مقادیر مختلف پرایمرها که در جدول ۳ به آنها اشاره شده است، آزمایش شد.

جدول(۳): غلظت مناسب پرایمر جهت بهینه سازی PCR

غلظت پرایمر	حجم µl			
10 pmol	0/5	1	1/5	2

تعیین ویژگی پرایمر:

از آنجایی که ژن *flaB2* تنها در *لپتوسپیراهای* بیماریزا حضور دارد، پس در نتیجه تعیین اختصاصی بودن پرایمر ژن *flaB2* برای نمونه های بیماریزای این باکتری، بسیار ضروری و حائز اهمیت می باشد. برای انجام این عمل بر روی DNA استخراج شده یک سروار بیماریزای *لپتوسپیرا L. interrogans Canicola* به عنوان کنترل مثبت و همچنین باکتری های *Pasteurella multusida*، *E. coli*، *Salmonella enteritidis*، *Klebsiella*، واکنش PCR به همراه پرایمرهای اختصاصی مورد نظر انجام شد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز:

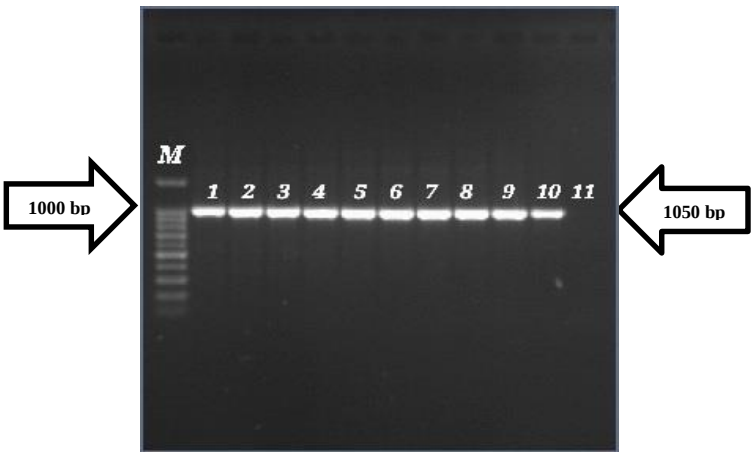
واکنش PCR در حجم ۱۶ ماکرولیتر به ازای هر نمونه، ۱ میکرولیتر پرایمر پیش رو، ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس (با غلظت ۱۰پیکو مولار از هر کدام) و ۶ میکرولیتر Ampliqon A/S) Master Mix ساخت کشور دانمارک) که شامل میزان مشخصی از dNTPs و MgCl2 و Taq DNA polymerase است و غلظت آن ۲x می باشد در یک میکروتیوپ استریل مخلوط شده و سپس ۱ میکرولیتر DNA با غلظت ۳۰۰ نانو گرم به آن افزوده شد.

برای دناتوراسیون اولیه، DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد و بعد از آن دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمرها به DNA هدف در ۵۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر پرایمرها در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت۱ دقیقه در ۳۵ چرخه تکرار شد و سرانجام ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. محصولPCR تمام نمونه ها توسط ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز ارزیابی و تأیید گردید.

یافته ها:

تعیین دمای اتصال پرایمرها:

در این مرحله بر روی سروار *L. canicola* با دماهای اتصال ۵۲°C الی ۶۴°C واکنش PCR انجام شد، که در نهایت دمای اتصال مناسب ۶۲°C در نظر گرفته شد(شکل ۱).



(شکل ۱)نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR در دماهای مختلف بر روی ژل آگارز ۱%
(M): سایز مارکر bp ۱۰۰، (۱): ۵۱/۹°C، (۲): °C ۵۲\۲، (۳): ۵۴°C، (۴): ۵۵\۴°C، (۵): ۵۶\۹°C، (۶): ۵۸\۵°C، (۷): ۶۰\۱°C، (۸): ۶۲\۷°C، (۹): ۶۳/۶°C ، (۱۰): ۶۴°C ، (۱۱): کنترل منفی

تست حساسیت:

به جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت، DNA تخلیص شده *L. canicola* از غلظت ng ۱۰۰ تا pg ۰/۰۰۰۱ رقیق شد و سپس واکنش PCR انجام گرفت. همانطور که در شکل ۱-۱ ملاحظه می شود، حساسیت PCR با پرایمرهای انتخابی تا رقت ۱۰ پیکوگرم نتایج مثبت مشاهده شد که این نتایج نشانگر آن است که اگر

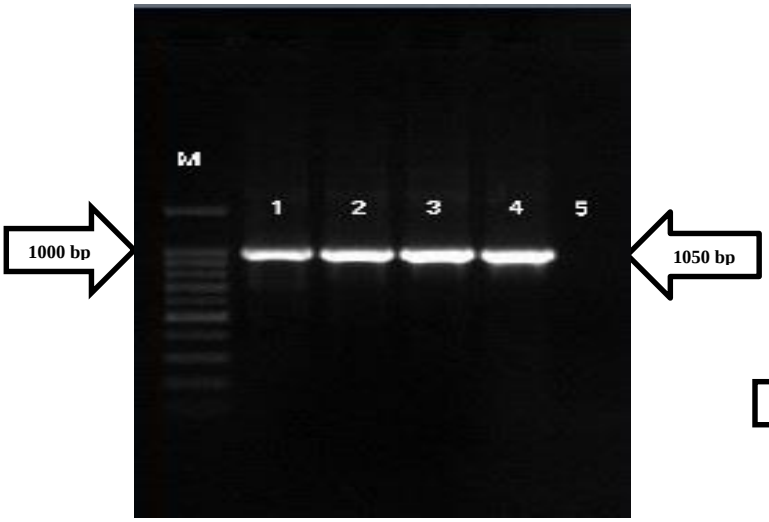
DNAرا تا ۱۰ پیکوگرم رقیق کنیم این تست به همراه پرایمرهای اختصاصی قادر به شناسایی و تکثیر آن می باشد.

شکل(۱-۱) نتایج حاصل از الکتروفورز جهت تعیین حساسیت برای رقت های مختلف DNA

(M): سایز مارکر bp ۱۰۰، (۱) ng۱۰۰، (۲) ng۱۰، (۳) ng۱، (۴) pg۱۰۰، (۵) pg۱۰، (۶) pg۱، (۷) pg۰/۱، (۸) pg۰/۰۱، (۹) pg۰/۰۰۱، (۱۰) pg۰/۰۰۰۱، (۱۱) کنترل منفی

تعیین غلظت:

غلظت های متفاوت از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۱-۲ نشان داده شده است. در نهایت با مقایسه بین باندهای ایجاد شده حاصل از غلظت های مختلف پرایمرها، مقدار pmol ۱۰ و حجم µl ۱ به عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شد.

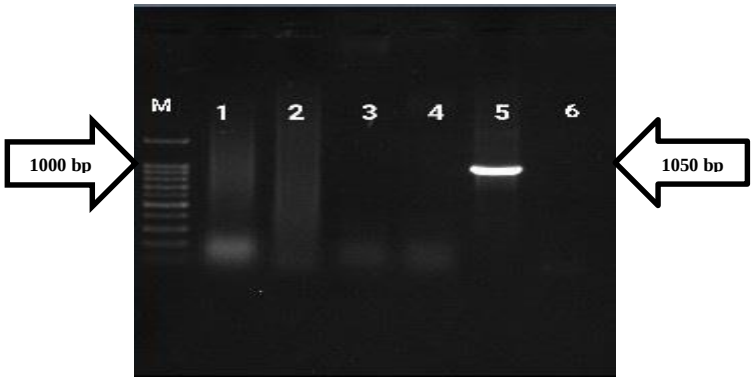


شکل(۱-۲) نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCRبا غلظت های مختلف پرایمرها

(M): سایز مارکر bp ۱۰۰، (۱) µl ۰/۵، (۲) µl۱، (۳) µl ۱/۵، (۴) µl ۲، (۵) کنترل منفی

تعیین ویژگی:

همانطور که در شکل ۱-۳ ملاحظه می شود، در سروارهای بیماری زای *لپتوسپیرا* ژن کد کننده پروتئین FlaB2 وجود داشته ولی در چهار باکتری دیگر مشاهده نگردید.

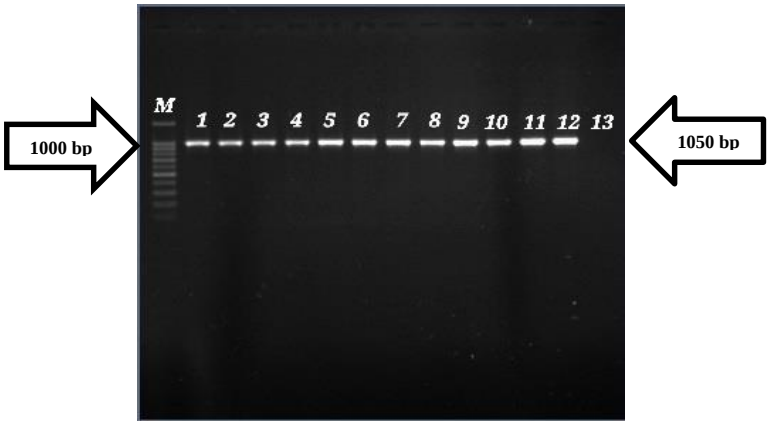


شـکـل(۱-۳) نتـایج الکتروفورز محصـولات PCR سـرووارهای بیماری زا و باکتری های مختلف بر روی ژل آگارز ۱٪

(M): سـایـز مـارکـر bp ۱۰۰، (۱) *Pasteurella multusida*، (۲) *E. coli*، (۳) *Salmonella enteritidis*، (۴) *Klebsiella*، (۵) *L. canicola* (کنترل مثبت)، (۶) کنترل منفی

بررسـی حضور ژن *flaB2* در سرووارهای مورد مطالعه:

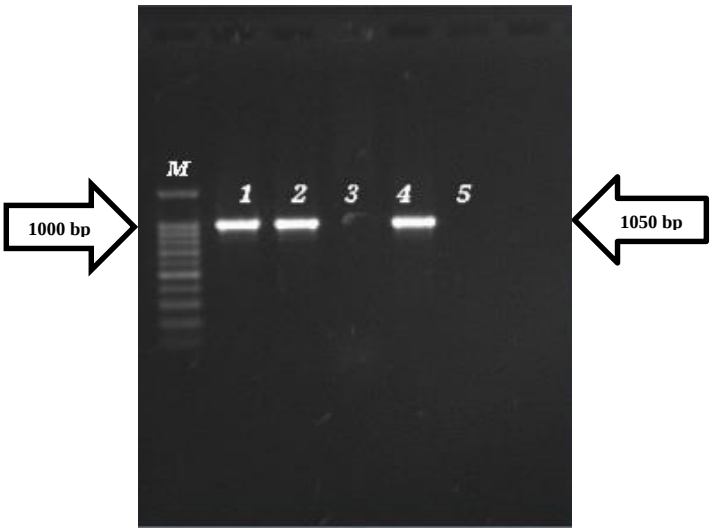
محصول PCR به دست آمده یک قطعه ۱۰۵۰جفت باز را نشـان می داد که نشان دهنده تکثیر ژن بود که سپس توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از سـایز مارکر bp ۱۰۰ (Germany BioRon)، مورد تأیید قرار گرفت و نشـان داد که ژن کد کننده فلاژلین *flaB2* در سرووارهای بیماری زا حضور داشته (شکل۱-۴) در حالی که در سروار غیربیماریزای *بایفلکسا* وجود نـدارد(شـکـل ۱-۵). ژن کد کننده فلاژلین *flaB2* در سـرووارهای بیماری زا برخلاف غیر بیماریزا حضـور دارد(P<0/05).



شـکل (۱-۴): نتایج الکتروفورز محصـولات PCR ،۱۲ نمونه بیماریزای *لپتوسپیرای* مورد مطالعه

(M): سـایز مارکر bp ۱۰۰،

(۱ تا ۱۲): سروارهای بیماریزای *لپتوسپیرا*، (۱۳): کنترل منفی



شـکـل(۱-۵)نـتـایج الکتروفورز محصـولات PCR سـرووارهای بیماریزا و غیر بیماریزای *لپتوسـپیرا* بر روی ژل آگارز ۱٪

(M): سـایز مـارکر bp ۱۰۰، (۱): *L. interrogans* serovar *Serjoe hardjo*، (۲): *L. interrogans* serovar Autumnalis،

(۳): *L.biflexa* (RTCC 2819)، (۴): کنترل مثبت: *L. interrogans* serovar *Canicola*، (۵): کنترل منفی

بحث:

لپتوسپیروز یکی از بیماری های عفونی مسری و از بیماری های مشترک بین انسان و حیوانات است. این بیماری بیش از نیم قرن پیش در کشور ما شناسایی شده و تا کنون گزارشات مختلفی از وقوع آن در انواع حیوانات اهلی منتشر شده است. در برخی منابع از لپتوسپیروزیس به عنوان یک بیماری بازپدید یاد شده است. در ایران مطالعات متعددی که در دهه اخیر انجام شده، بیانگر افزایش شیوع این بیماری در برخی نقاط کشور و افزایش تنوع سروارهای های موجود است. با توجه به اهمیت جنبه های بهداشتی و اقتصادی ناشی از لپتوسپیروزیس، بررسی و مطالعه روش های سریع تشخیص این بیماری امری مهم تلقی می گردد(۷،۹ و ۱۳).

لپتوسپیروزیس یک بیماری حاد بوده و به سرعت گسترش می یابد، بنابراین تشخیص زودرس و سریع آن اهمیت بسیاری در درمان آن د ارد. روش های مولکولی برای تشخیص لپتوسپیروزیس در مراحل اولیه سریع و قابل اعتماد می باشند. واکنش زنجیره ای پلیمراز به دلیل حساسیت و ویژگی بالا کاربرد بسیار زیادی در تشخیص لپتوسپیروز پیدا کرده است این روش توانایی تایپینگ سریع گونه های *لپتوسپیرا* را در حد سروگروپ دارد و در بررسی های اپیدمیولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرد(۷ و ۱۰). با توجه به آنکه FlaB یک فاکتور بیماری زای *لپتوسپیرا* می باشد، همچنین در طی عفونت بیان شده و توسط سرم بیماران قابل تشخیص می باشد، در نتیجه این ژن می تواند کاندیدای مناسبی به منظور تولید واکسن بر ضد عفونت ناشی از *لپتوسپیراهای* بیماری زا باشد(۲۹). پروتئین FlaB2 همچنین می تواند به عنوان یک کاندید جدید برای شناسایی مولکولی سروارهای *لپتوسپیرا* برای محافظت در برابر عفونت باشد. با این حال، تحقیقات بیشتری برای تأیید بیماری زایی و هم چنین فعالیت حفاظتی پروتئین FlaB2 مورد نیاز می باشد. با توجه به اینکه پروتئین FlaB2 در گونه های بیماری زای *لپتوسپیرا* شناسایی شده اما در گونه های غیربیماری زا وجود ندارد آزمایش PCR روی ژن *flaB2* برای تشخیص گونه های بیماری زای *لپتوسپیرا* در اقدامات بالینی بسیار مفید می باشد(۲۷).

در کشور ایران در طی سالهای اخیر تحقیقات متنوع سرولوژیکی و مولکولی بر روی *لپتوسپیرا* صورت گرفته است. باکتری *لپتوسپیرا اینتروگانس* که در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج بر روی ژن های متعددی از *لپتوسپیراهای* بیماریزا مورد مطالعه قرار گرفته است از جمله ژن هایی مانند: *loa22*، *lipl21*، *Lipl41*(۱، ۶، ۷، ۱۳، ۲۲ و ۳۱). با توجه به اینکه که هیچ مطالعه ای مبنی بر بیان ژن *flaB2* درسروارهای واکسینال و بومی *لپتوسپیرا* در ایران تاکنون انجام نشده است. بررسی، شناسایی، توالی یابی، بیان و بررسی ایمنی زایی این آنتی ژن و روش های سرولوژیکی مانند ELISA ضرورت دارد(۲۱، ۲۹، ۳۲).

هدف از این تحقیق تشخیص مولکولی ژن کد کننده فلاژلین *flaB2* به روش PCR در سروارهای باکتری *لپتوسپیرا اینتروگانس* در ایران می باشد.

در پژوهش حاضر پرایمرهای ژن *flaB2* برای شناسایی سروارهای بیماری زا از سروارهای غیربیماری زا به صورت اختصاصی طراحی شده است. پرایمر مورد استفاده برای ژن کد کننده پروتئین FlaB2 قادر به تولید قطعه bp ۱۰۵۰ بود، بر اساس نتایج PCR در این مطالعه، قطعه bp ۱۰۵۰ در ۲۰ سروار بیماری زا مشاهده اما در سروارهای ساپروفیت مشاهده نگردید. این نتایج نشان

می دهد که این ژن تنها در سرووارهای بیماری زا مورد مطالعه شده بیان می شود.

در سال ۲۰۱۲، C. D. Gamage و همکاران مطالعه با هدف تعیین وضعیت سرووارهای های بیماری زای *لپتوسپیرا* در گاوها در سریلانکا مطالعه فوق را انجام دادند. برای تشخیص، ژن *لپتوسپیرا flaB* استخراج و با روش PCR انجام شد. پرایمرهای خاص *flaB* همه جدایه های پاتوژن را شناسایی و این نشانگر حضور ژن *flaB* تنها در میان *لپتوسپیراهای* بیماری زا بود. نتایج نشان داد که بخش بالایی از نمونه های *لپتوسپیرا* از سرووارهای بیماری زاست، که می تواند به عنوان مخزن مهم برای بیماری های انسانی عمل کند(۵).

در سال ۲۰۱۰، Kalimuthusamy Natarajaseenivasan و همکاران شناسایی ژن FlaB مبتنی بر PCR در *لپتوسپیراهای* بیماریزا را انجام دادند. PCRبا مجموعه پرایمرهای اختصاصی برای گونه های *لپتوسپیرای* بیماری زا انجام شد. هیچ یک از سرووارهای ساپروفیت با این مجموعه های پرایمر محصولاتی به همراه نداشتند. پرایمرهای خاص *flaB* همه جدایه های پاتوژن را شناسایی و این نشانگر حضور ژن *flaB* تنها در میان *لپتوسپیراهای* بیماری زا بود. نتایج نشان داد که این روشی مفید برای تمایز بین *لپتوسپیراهای* بیماری زا و ساپروفیت است. کارایی اجرای این تکنیک ها مبتنی بر PCR، برای شناسایی سویه های *لپتوسپیرای* بیماری زا و ساپروفیت را تأیید می کند(۱۰).

نتایج PCR ما با یافته های سایر محققین در مورد حضور ژن *flaB2* در *لپتوسپیراهای* بیماری زا و عدم وجود آن در سرووارهای غیربیماری زا مطابقت داشت، که نشان دهنده نقش احتمالی این ژن در پاتوژنز *لپتوسپیرا* می باشد.

از آن جایی که پروتئین FlaB2 در میان *لپتوسپیراهای* بیماریزا شناسایی شده است ولی در *لپتوسپیراهای* غیربیماری زا حضور ندارد بنابراین آزمایش PCR بر مبنای ژن *flaB2* برای تشخیص *لپتوسپیراهای* بیماری زا در نمونه های کلینیکی بسیار مفید است. این مطلب بیانگر آن است که این ژن فقط در سرووارهای بیماری زای مورد مطالعه وجود دارد و تنها در این سرووارها بیان می شود.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان به این نتیجه رسید که ژن *flaB2* را می توان به عنوان تشخیص مولکولی برای تمایز بین سرووارهای بیماری زا و غیر بیماری زا*لپتوسپیرا* با استفاده از تکنیک PCR به کار گرفت(۵، ۷،۱۰، ۱۳، ۱۹،۲۲، ۲۷ و ۳۱).

تشکر و قدردانی

نگارندگان از حمایت مالی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، همه کارکنان آزمایشگاه مرجع *لپتوسپیرا* (بخش میکروبشناسی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج) و همچنین گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال سپاسگزاری می نمایند.

این تحقیق بر اساس پروژه تحقیقاتی با کد(۹۶۱۰۲۳-۹۶۰۴۵-۱۰۶-۱۸-۱۸-۱۲) در مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج انجام شده است.

منابع

1. Adler, Ben, and Alejandro de la Peña Moctezuma. *Leptospira* and *leptospirosis*. (2010). *In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Veterinary Microbiology*, **27:**287-96.

2. A Lambert, Picardeau M, Haake DA, Sermswan RW, Srikram A, Adler B, Murray GA. FlaA Proteins in *Leptospira interrogans* Are Essential for Motility and Virulence but Are Not Required for Formation of the Flagellum Sheath**.** (2012). *Infection and Immunity*, **80:**2019 – 2025.

3. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. (2003). *The Lancet infectious diseases*, **3:**757-771.

4. Beer, J. (1983). Infectious illnesses of the domestic animals, **I** and **II**.Editorial Acribia.

5. C. D. Gamage, N. Koizumi, A. K. C. Perera, M. Muto, C. Nwafor-Okoli, S. Ranasinghe, S. A. M. Kularatne, R. P. V. J. Rajapakse, K. Kanda, R. B. Lee, Y. Obayashi, M. Ohnishi and H. Tamashiro, Carrier Status of Leptospirosis Among Cattle in Sri Lanka: A Zoonotic Threat to Public Health. (2012). *Transboundary and Emerging Diseases*, *Short Communication*, **61:** 1-6.

6. Darian EK, Forghanifard MM, Bidhendi SM, Chang YF, Yahaghi E, Esmaelizad M, Khaleghizadeh M, Khaki P. Cloning and sequence analysis of LipL32, a surface–exposed lipoprotein of pathogenic Leptospira spp. (2013). *Iranian Red Crescent Medical Journal*, **15:** e8793.

7. Dezhbord M, Esmaelizad M, Khaki P, Fotohi F, Moghaddam AZ. Molecular identification of the *ompL1* gene within *Leptospira interrogans* standard serovars. (2014). *The Journal of Infection in Developing Countries*, **11:** 688-93.

8. Diament D, Brunialti MKC, Romero EC, Kallas EG, Salomao R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. (2002). *Infection Immunity*, **70:** 1677-83.

9. Min Lin, Nasreen Bughio and OM Surujballi. Expression in Escherichia coli of *flaB*, the gene c- oding for a periplasmic flagellin of *Leptospira interrogans* serovar *Pomona*. (1999). *Journal Midical Microbiology, The Pathological Society of Great Britain and Ireland*, **48:** 977-982.

10. Kalimuthusamy Natarajaseenivasana, Paluru Vijayacharib, Sameer Sharmab, Attayoor Purushothaman Sugana, et al; FlaB PCR-based Identification of Pathogenic Leptospiral Isolates. (2010). *Journal of Microbiology, Immunology and Infection, Elsevier*, **43:**62–69.

11. Flannery B, Costa D. Evaluation of recombinant leptospiral antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis. (2001). *Journal Clinical Microbioly*, **39:** 3303-3310.

12. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, et al. *Leptospiral* proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. (2001). *Infection Immunity*, **69:** 4958-68.

13. Hoseinpur. R, Khaki. P, Noofeli, M & Moradi Bidhendi. S. Molecular detection of pathogenic leptospiral serovars by PCR, based on *lipL21* gene. (2015). *Archives of Razi Institute*, **70:** 223-227.

14. Haukl P, Rodrigues Guzzo C, Roman Ramos H, Lee Ho P and Shaker Farah C. Structure and Calcium Binding Activity of LipL32, the Major Surface Antigen of Pathogenic *Leptospira* sp. (2009). *Journal Molecular Biology*, **390:** 722–736.

15. Honarmand H. A decade, the incidence of *leptospirosis* in Guilan. (2009). *Iranian Journal of Infectious Diseases*, **47:** 47-53.

16. Kimberley H Gibson, Felipe Trajtenberg, Elsio A Wunder, Megan R Brady ,et al., An asymmetric sheath controls flagellar supercoiling and motility in the leptospira spirochete. (2020). *Elifescience*, **9:**e53672.

17. Levett PN. Leotospirosis. (2001). *Clinical Microbiolgy*, **14:**296-326.

18. Luks, A. M., Lakshminarayanan, S., & Hirschmann, J. V. Leptospirosis presenting as diffuse alveolar hemorrhage. (2003). *Journal of chest*, **123:** 639-43.

19. Monica L. Vieira, Luis G. Fernandes, Renan F. Domingos, Rosane Oliveira, Gabriela H. Siqueira, Natalie M. Souza, Aline R.F. Teixeira, Marina V. Atzingen & Ana L.T.O. Nascimento, Minireview, *Leptospiral* extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen–host interactions. (2014). *FEMS Microbiol Lett*, **352:** 129–139.

20. Liu Y, Zheng W, Li L, Mao Y, Yan J. Pathogenesis of *leptospirosis*: interaction of *Leptospira* interrogans with in vitro cultured mammalian cells. (2007). *Medical Microbiolg Immunolgy*, **196:**233-9.

21. Yeganeh Malek Mohammadi , Pejvak Khaki, Soheila Moradi Bidhendi, Mojtaba Nofeli. Evaluation of the Presence of Gene Encoding *Loa22* in Pathogenic. (2022). *Iranian Journal of Medical Microbiology*, **16:** 392-398.

22. Min Lin, Hanhong Dan, Yijing Li. Identification of a Second Flagellin Gene and Functional Characterization of a 70-like Promoter Upstream of a *Leptospira* borgpetersenii *flaB* gene. (2004). *Current Microbiology*, **48:** 145–152.

23. Narges Golab, Pejvak Khaki, Naser Harzandi, Majid Esmaelizad and Majid Tebianian, Expression and purification of the Lipl41, a surface-exposed lipoprotein, antigen of pathogenic *Leptospira* spp. (2020). *Veterinarski Arhive*, **90:** 297-305.

24. Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MD, Oliveira MC, Menck CF. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. (2004). *Bacteriol*, **186:** 2164-72.

25. Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin, Principles and Practice of Infectious Diseases. (2004). **6th** edition.

26. Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SS, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, Barr SC, Divers TJ, Simpson KW, McDonough PL, Mohammed HO. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. (2002). *Infection Immunity*, **70:** 5924-30.

27. Veerapandian Raja and Kalimuthusamy Natarajaseenivasan. Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of *leptospiral* outer membrane proteins (OMPs). (2015). *Critical reviews in microbiology, informa healthcare*, **41 :**1-17.

28. Sitprija V, Pipatanagul V, Mertowidjojo K. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis. (1980). *Clinical and experimental studies. Kidney International*, **17:** 827-36.

29. Shuichi Nakamura. Spirochete Flagella and Motility. (2020). *Biomolecules*, **10:** 550.

30. Safar Ali Alizadeh, Seyyed Saeed Eshraghi; Mohammad Reza Pourmand, Taghi Naserpour, Gholamreza Abdollahpour, Abbas Rahimiforoshani, Reza Najafipour. Diagnostic Efficacy of Lsa63 Antigen for Human Leptospirosis. (2014). *Iran Red Crescent Medical Journal*. **16:** e14753.

31. Maryam Soltani, Pejvak Khaki, Soheila Moradi Bidhendi¨ Molecular characterization of the *lipL41* gene of Leptospira interrogans vaccinal serovars in Iran. (2015). *Archives of Razi Institute*, **70:**145-150.

32. Uraiwan Kositanont, Waraporn Wanna, Galayanee Duangchawee and Chanwit Tribuddharat, Uraiwan Kositanont, Characterization of Recombinant Flagellin B Protein From *Leptospira Interrogans*. (2014) *Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Wang Lang Road, Bangkok 10700, Thailand*, **45:**1080-1089.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 18, Issue 2, Autumn & Winter 2023

Molecular evaluation of flagellin *flaB2* gene in pathogenic *Leptospira serovars*

Sepideh Haghnazari[1], Pejvak khaki[2*], Soheila Moradi Bidhendi[2], Majid Esmaelizad[3], Majid Tebianian[4]

1. *PhD Student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
2. *Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran*
3. *Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran*
4. *Department of Immunology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran*

Received: 18 December 2022 *Accepted: 19 June 2023*

Abstract

Leptospirosis is a common zoonotic infectious disease, that cause by pathogenic Leptospires. FlaB2 is a periplasmic flagellum protein that is expressed during infection in the host. This protein is conserved among all pathogenic Leptospiral serovars. The aims of this study was molecular evalution of the gene encoding FlaB2 protein by PCR method in pathogenic Leptospira serovars in Iran. In this study, 20 pathogenic Leptospira serovars and two non-pathogenic Leptospira serovars were used. All 22 Leptospira serovars were cultured into the selective medium EMJH and genomic DNA was purified using standard phenol-chloroform method. Specific primers were designed for amplification of flaB2 gene and its sensitivity and specificity were evaluated by PCR. The results of PCR product of flaB2 gene was 1050 bp and it was observed that all 20 pathogenic leptospira serovars contained the flaB2 gene. This gene was not amplified from two non-pathogenic L. biflexa. The results of this study showed that the gene flaB2 gene was present only in pathogenic serovars. Therefore, molecular characterization of flaB2 gene is important for detection of pathogenic serovars from non-pathogenic Leptospira serovars.

Keywords: Leptospirosis, Leptospira, Serovar, PCR, flaB2 gene

[*]Corresponding author: Pejvak khaki
Address: Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
E. mail: khakipejvak53@gmail.com