مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۶ شماره ۹ ، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۵۱- ۴۵

افتراق سروارهای بیماریزا از غیر بیماریزای لپتوسپیرا به روش PCR بر مبنای ژن *ompL1* و طراحی یک کنترل مثبت جهت بهینه سازی این تست تشخیصی

مهرانگیز دژبرد[۱] ، پژواک خاکی[*] ، مجید اسمعیلی زاد[۳] ، بهزاد صالحی[۱] ، سهیلا مرادی بیدهندی[۲] ، ابراهیم خداوردی داریان[۲]کی[۱و۲] ، ناهید سلطانی مجد [۲] ، فریبا فتوحی[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج- ایران.[۲] آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا، بخش میکروبشناسی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج-ایران [۳]بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج – ایران
نویسنده مسئول : پژواک خاکی . آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا، بخش میکروبشناسی ، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی ،کرج - ایران (P.khaki@rvsri.ir)

چکیده

زمینه و هدف : لپتوسپیروزیس، شایع ترین بیماری مشترک بین انسان و حیوان در سراسر جهان است .تشخیص صحیح و به موقع این بیماری حائز اهمیت می باشد. به علت کند رشد بودن لپتوسپیرا و شرایط خاص نگه داری و عدم دسترسی همگان به سوش های رفرانس استفاده از یک تست سریع و دقیق مولکولی مانند PCR به همراه یک کنترل مثبت به منظور تایید صحت آن ضروری می باشد. ژن *ompL1* فقط در لپتوسپیراهای پاتوژن وجود دارد و در میان آنها شدیدا حفظ شده است بنابراین می توان از آن در تست های تشخیصی مولکولی مانند PCR استفاده کرد.در تست PCR جهت اطمینان از دست یابی به نتیجه صحیح نیازمند یک کنترل مثبت هستیم. هدف این تحقیق بهره گیری از خصوصیات ژن*ompL1* به منظور افتراق سروارهای بیماریزای لپتوسپیرا از غیر بیماریزا با استفاده از PCR و طراحی یک کنترل مثبت جهت بهینه سازی این تست می باشد .

روش بررسی : در این تحقیق از پنج سروار بیماری زای لپتوسپیرا و یک سروار غیر بیماریزا استفاده گردید.باکتری ها در محیط کشت اختصاصی کشت داده شدند و DNA ژنومیک آنها تخلیص گردید. پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن *ompL1* طراحی و حساسیت و ویژگی آن درPCR بررسی شد. جهت تهیه کنترل مثبت با استفاده از تکنیک کلونینگ ، محصول PCR یکی از سروارهای پاتوژن به انتخاب خالص سازی شده و در وکتور pJET1.2/ blunt الحاق گردید و در باکتری (Top10) *E.coli* کلون گردید. تخلیص DNA نوترکیب توسط کیت انجام گرفت. پلاسمید حاوی ژن مورد نظر تعیین ترادف شد.

یافته ها : با اتکا به داده های PCR مشخص شد که این ژن فقط در سروارهای گونه پاتوژن حضور دارد و قطعه ۹۶۳ bp حاصل که که نشان دهنده تکثیر ژن *ompL1* می باشد در گونه غیر بیماری زای بایفلکسا مشاهده نگردید.نتایج حاصل از تعیین ترادف محصول PCR کلون شده ، حضور ژن مورد نظر را تایید کرد. واکنش PCR برای DNA نمونه به همراه کنترل مثبت در دو تیوب جداگانه انجام شد. محصول PCR مربوط به نمونه و کنترل مثبت با ژل الکتروفورز و سایز مارکر مقایسه و مورد تائید قرار گرفت.

نتیجه گیری: می توان از ژن *ompL1* جهت تفریق سرووارهای بیماری زا از غیر بیماری زای لپتوسپیرا بهره برد هم چنین می توان از ژن کلون شده در این تحقیق به عنوان کنترل مثبت در تست PCR جهت تشخیص مولکولی لپتوسپیرا استفاده کرد.

کلید واژه ها : لپتوسپیرا اینتروگانس ، PCR ، *ompL1* ، کنترل مثبت

مقدمه

لپتوسپیروزیس یک بیماری زئونوز می باشد که توسط باکتری لپتوسپیرا ایجاد می گردد. این جنس به گونه های مختلف پاتوژن و ساپروفیت تقسیم بندی گردیده و بر اساس ساختار آنتی ژنی به سرووارهای مختلف گروه بندی می شود (۱،۲) . لپتوسپیروزیس، شایع ترین بیماری مشترک بین انسان و حیوان در سراسر جهان است که در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل و مرطوب که دارای بارندگی زیاد می باشند بیشتر رخ می دهد (۳،٤) . علائم بالینی این عفونت در ۹۰ درصد موارد مشابه آنفلوانزا بوده و در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع، بیماری وارد فاز حاد شده و صدمات جدی و طولانی مدت ایجاد میکند (۵). وقوع لپتوسپیروزیس حاد با میزان مرگ و میر بالا در سال های مختلف گزارش شده است(٦) و این بیماری در تمام نقاط دنیا در سنین و فصول مختلف بروز می کند (۷) . مطالعات سرواپیدمیولوژیکی و باکتریولوژیکی پیرامون میزان شیوع آن نشان دهنده افزایش ابتلا به این بیماری درسطح کشور می باشد (۹ ، ۱۰) بنابراین تشخیص صحیح و به موقع این بیماری حائز اهمیت است. از روش های تشخیصی قدیمی باکتری لپتوسپیرا کشت می باشد که این روش به دلیل شرایط خاص نگهداری باکتری ، نیازمندی های غذایی بالا ، کند رشد بودن ، احتمال آلودگی کشت و همچنین خطرزایی برای پرسنل آزمایشگاه دشوار می باشد (۲). از طرفی تست های تشخیصی سرولوژیکی مانندMAT به دلیل نیاز به کشت این باکتری با مشکلاتی مواجه است. بنابراین روش های مولکولی مانند PCR در تشخیص این بیماری اهمیت ویژه دارند. یکی از مهمترین ژن های بیماری زای لپتوسپیرا ژن *ompL1* شناسایی شده که به دلیل حضور آن در لپتوسپیرا های پاتوژن می تواند برای تشخیص مولکولی بیماری استفاده گردد (۱۲،۱۱). بنابراین در تحقیق حاضر از آن به عنوان ژن هدف جهت افتراق سرووارهای بیماری زا از غیر بیماری زای لپتوسپیرا در تستPCR بهره گیری شد. با توجه به عدم دسترسی همگان به این باکتری استفاده از آن به منظور کنترل مثبت در تستهای تشخیصی مولکولی مانند PCR دشوار است ؛ بنابراین طراحی یک کنترل مثبت بر اساس یک ژن پایدار و ثابت در سرووارهای بیماری زای این باکتری امری ضروری به نظر می رسد. هدف دیگر این تحقیق طراحی یک کنترل مثبت جهت بهینه سازی تست PCR تشخیصی لپتوسپیروزیس می باشد.

روش کار

در این تحقیق از پنج سرووار بیماری زای لپتوسپیرا *L.*Grippotyphosa *L.* Canicola(RTCC2805) ,*L.*Pomona(RTCC 2815) , (RTCC 2808) *L.* Icterohaemorhagiae (RTCC 2823) و یک سرووار غیر بیماریزا (RTCC 2819) L.*biflexa*استفاده گردید.

کشت و تخلیص DNA:

باکتری ها در محیط کشت اختصاصی همراه با سرم خرگوش و مکمل های غذایی در شرایط هوازی و دمای ۲۸°C کشت داده شدند و بعد از ۱۰-۷ روز رشد آنها توسط میکروسکوپ دارک فیلد مورد بررسی قرار گرفت.سپس نمونه ها جهت رسوب گیری در ۱۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند.جهت تخلیص DNA ژنومیک از روش فنل کلروفرم ایزوامیل الکل استفاده شد (۱۵) کیفیت و کمیت DNA تخلیص یافته به ترتیب توسط الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

PCR:

پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن *ompL1* طراحی و ویژگی و حساسیت تست PCR بررسی شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر(مقدار ۱۰۰نانوگرم DNA، ۱واحد آنزیم *PFu DNA Polymerase* ،۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۰/۲ میلی مولار dNTP mix ، 10x pfu buffer به همراه ۲ میلی مولار MgSO4) طبق برنامه زیر انجام شد.

برای دناتوراسیون اولیه ، DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹٤°C قرار داده شد و بعد از آن دناتوراسیون در ۹٤°C

به مدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمر ها به DNA هدف در ۵۲°C به مدت ۱ دقیقه وتکثیر پرایمرها در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه در ۳۰ چرخه تکرار شد و سرانجام ۷ دقیقه جهت تکثیر نهایی در ۷۲°C قرار گرفت. محصول PCR تمام نمونه ها توسط ژل الکتروفورز ارزیابی گردید .

کلونینگ و تخلیص پلاسمید نوترکیب:

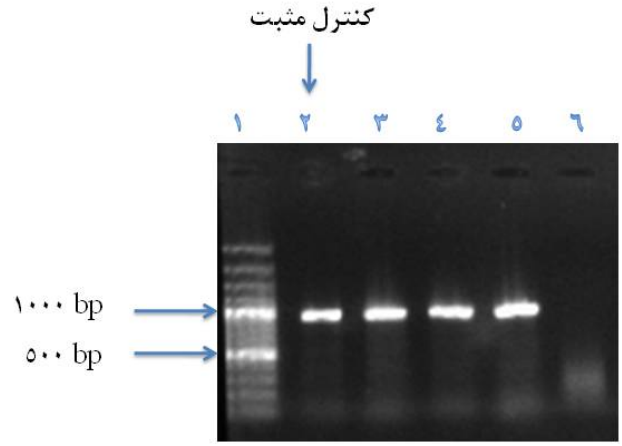
محصول PCR ژن *ompL1* لپتوسپیرا اینتروگانس سروار سرجو هاردجو به کمک کیت (شرکت Fermentas) خالص سازی شده در وکتور pJET1.2/ blunt الحاق گردید و به باکتری(Top10) *E.coli* انتقال داده شد. پس از قرار دادن سلول و وکتور به مدت یک ساعت روی یخ ، سلول ها در دمای ۴۲°C به مدت یک ونیم دقیقه در بن ماری تحت تاثیر شوک گرمایی قرار گرفته و بلافاصله مجددا به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. نهایتا سلول ها روی پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین در ۳۷°C به مدت یک شبانه روز انکوبه گردیدند. سپس حضور ژن *ompL1* در کلنی های نوترکیب توسط PCR تائید گردید.

تعیین توالی:

کلنی های نوترکیب در محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین رشد کرده وتخلیص پلاسمید از سلول ها توسط کیت (شرکت سیناژن) انجام شد. پلاسمید حاوی ژن مورد نظر جهت تعیین ترادف به شرکت SeqLab آلمان فرستاده شد.

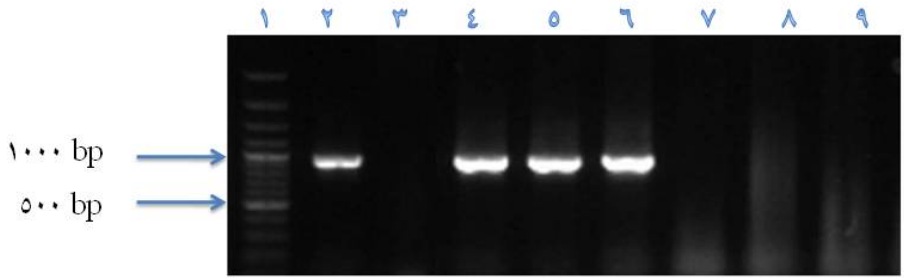
یافته ها

محصول PCR به دست آمده یک قطعه ۹۶۳ bp را نشان می داد که نشان دهنده تکثیر ژن *ompL1* بود که سپس توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ و با استفاده از سایز مارکر مورد تایید قرار گرفت. با توجه به داده های PCR مشخص شد که این ژن فقط در سروارهای پاتوژن حضور داشته در حالی که در سروار ساپروفیت بایفلکسا وجود ندارد (شکل ۱) . ژن *ompL1* تکثیر یافته لپتوسپیرا اینتروگانس سروار سرجو هاردجو در وکتور pJET1.2/ blunt الحاق گردید و به باکتری(Top10) *E.coli* انتقال داده شد. تایید حضور *ompL1* در کلنی های نوترکیب با برداشت از کلنی های رشد یافته روی پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین و انجام PCR و تکثیر ژن مورد نظر انجام شد (شکل۲). نتایج تعیین ترادف ، ژن تکثیر یافته *ompL1* را تایید کرد (نتایج آورده نشده است) .



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بر اساس ژن *ompL1* به همراه کنترل مثبت جهت شناسایی سروارهای پاتوژن از غیر پاتوژن بر روی ژل آگارز ۱٪ به کمک مارکر ۱۰۰ bp

شماره ۱(سایز مارکر) ، **شماره ۲ (کنترل مثبت طراحی شده)** ، شماره ۳ (*L.*Serjoe hardjo) شماره ٤ (*L.*Grippotyphosa) ، شماره ۵ (*L.*Canicola) ، شماره ٦ (L.*biflexa* serovar Semaranga) ، شماره ۷ (کنترل منفی)



شکل ۲-بررسی ژن کلون شده *ompL1* در باکتری *E.coli* (Top10) توسط کلنی PCR
شماره ۱ (سایز مارکر bp ۱۰۰) ، شماره ۲ (کنترل مثبت) ، شماره ۳ (کنترل منفی) ، شماره های٤-٥-٦
(کلنی های PCR مثبت)، شماره های ۷-۸-۹ (کلنی های PCR منفی)

بحث

لپتوسپیروزیس یک بیماری زئونوز با انتشار جهانی می باشد و بر اساس گزارشات بدست آمده از نقاط مختلف کشور در خصوص افزایش وقوع بیماری و با توجه به اهمیت جنبه های بهداشتی و اقتصادی ناشی از لپتوسپیروزیس (۹ ، ۱۰)، بررسی و مطالعه روش های سریع تشخیص این بیماری امری مهم تلقی می گردد.

روش تشخیصی کشت در مورد این باکتری به دلیل کند رشد بودن و نیازمندی غذایی بالا ، نیاز به انکوباسیون طولانی مدت و احتمال آلودگی کشت و ایجاد خطر برای کارکنان آزمایشگاه با موانع زیادی همراه است. تست آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) که رایج ترین تست تشخیصی لپتوسپیروز می باشد به دلیل نیاز به کشت لپتوسپیرا و کار با باکتری زنده با مشکلاتی مواجه است. ضمنا تست MAT در مرحله حاد بیماری و زمان دفع باکتری از ادرار ، قادر به شناسایی تیتر آنتی بادی نمی باشد. (۱۷).

بنابراین PCR به عنوان یک روش سریع ، حساس و اختصاصی برای تشخیص عفونت های لپتوسپیرایی خصوصا در اوایل بیماری بسیار حائز اهمیت است (۱۸) و انجام آن بر مبنای ژن *ompL1* که در میان سرووارهای بیماری زا ثابت است برای شناسایی لپتوسپیراهای پاتوژن در نمونه های کلینیکی بسیار مفید می باشد.

درآزمایش PCR وجود کنترل مثبت در کنار نمونه های مورد آزمایش به منظور تایید نتایج ضروری است. در اکثر واکنش های PCR به علت استفاده نکردن از یک کنترل مثبت در کنار نمونه ها ، هنگام عدم مشاهده باند در نمونه های مورد آزمایش، قضاوت قطعی در مورد منفی بودن نتیجه واکنش همواره با تردید همراه است. خصوصا در مورد باکتری لپتوسپیرا که به علت شرایط خاص نگهداری ، دسترسی همگان به سوش های استاندارد محدود می باشد.

بنابر این هدف از اجرای این پروژه افتراق سرووارهای بیماریزا از غیر بیماریزای لپتوسپیرا در تست PCR و طراحی یک کنترل مثبت بر اساس ژن *ompL1* می باشد که برای اولین بار در در ایران انجام گردیده است.

از سال ۱۹۹۰ تا به حال چندین پروتکل PCR جهت تشخیص DNA لپتوسپیرا در نمونه های کلینیکی به کار گرفته شده است که اکثر آنها حساسیت بالایی را نشان دادند (۱۹ ، ۲۰) . بنابراین می توان از روش PCR برای تشخیص سریع و دقیق این باکتری بهره جست.

در تحقیق حاضر مشخص شد که ژن *ompL1* در سویه های پاتوژن لپتوسپیرا وجود دارد در حالی که در سویه های غیر بیماری زا حضور ندارد.

در تحقیقات مختلف انجام شده در سطح دنیا توسط دیگر محققین ، حضور ژن *ompL1* در میان سویه های پاتوژن

لپتوسپیرا مورد بررسی وتایید قرارگرفته است (۱۶-۲۰-۲۱-۲۲).

در سال ۲۰۰۵ Natarajaseenivasan و همکاران به کمک تست PCR میزان ثبات ژن های *ompL1* و *lipL41* را در ایزوله های لپتوسپیرا و همین طور در سویه های رفرانس مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این دو ژن در میان لپتوسپیراهای بیماریزا پایدار و حفظ شده می باشد و بنابراین می توان از آنها به منظور استفاده در تشخیص لپتوسپیروزیس بهره برد (۲۱) .

در همین سال ZHANG و همکاران به کمک کلونینگ و تعیین توالی ژن های کدکننده پروتئین های LipL21 ، LipL32و OmpL1 لپتوسپیرا اینتروگانس مشخص کردند که این ۳ ژن در میان سرووارهای پاتوژن و اپیدمیک شدیدا پایدار و ثابت هستند (۲۲) .

همچنین در سال ۲۰۰۸ Haiyan Dong و همکاران با به کارگیری تست PCR بر روی ۱۵سویه استاندارد و ۱۶۳ نمونه کلینیکی پاتوژن نشان دادند که ژن *ompL1* در تمامی آنها حضور دارد(۱۶) .

نتیجه گیری

با توجه به دستیابی به نتایج مشابه با مطالعات سایر محققین در نقاط مختلف دنیا در خصوص حضور ژن *ompL1* در سرووارهای بیماری زای لپتوسپیرا می توان از این ژن برای تفکیک لپتوسپیراهای پاتوژن بهره گیری کرد.

یکی از مزایای تحقیق حاضر مربوط به طراحی پرایمر در مور ژن کد کننده پروتئین سطحی OmpL1 می باشد که در این طراحی ، کل ژن مد نظر قرار گرفته است بنابراین قطعه تکثیر یافته و کلون شده می تواند به عنوان یک کنترل مثبت برای تمام پرایمرهایی با طراحی کل ژنوم یا به صورت پارشیال مناسب باشد.

با توجه به مطالب ذکر شده می توان از ژن کلون شده در این تحقیق که در آزمایشگاه تشخیصی لپتوسپیرا آماده شده است ، به عنوان کنترل مثبت در تست PCR در تمام آزمایشگاه ها بهره گیری کرد.

فهرست مراجع

لپتوسپیروزیز در استان گیلان به روش الیزا مجله دانشکده پزشکی گیلان -59.دوره چهاردهم، شماره 54، ص65

6.Johnson, R. and N. Gary, Nutrition of Leptospira Pomona II.(Fatty Acid Requirements). Journal of bacteriology, 1963. 85(5): p. 976

7.Smibert, R., The Spirochaetales. CRC handbook of microbiology, 1977. 1: p. 195–228.

8.Gollop, J., et al., Rat-bite leptospirosis. Western journal of medicine, 1993. 159(1): p. 76.

۹.جلیل وندیوسفی ، سهیلا مرادی بیدهندی ، مسعود عاملی - ۱۳۷۵- بررسی لیپتوسپیروزیس گاو و گوسفند و شناسایی کانون های آلوده به بیماری در

1.Brenner, D., et al., Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. International journal of systematic bacteriology, 1999. 49(2): p. 839.

2.Bharti, A., et al., Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet infectious diseases, 2003. 3(12): p. 757-771.

3.Levett PN. Leotospirosis. Clin Microbiol Rev 2001;14:296-326

4.Jena AB, Mohanty KC, Devadasan N. An outbreak of Leotospirosis in Orissa, India: the importance of surueillance. Trop Med Int Health 2004;9:1016-21.

۵.هنرمند ح م، اشراقی س، خرمی زاده م ر، منصور قناعی ف، فلاح م ص، بررسی انتشار موارد مثبت

میکروب شناسی،بهار ۱۳۸۹: سال دوم،شماره ٦،صفحه ۱۲-۷

16.Dong, H., et al., Characterization of the ompL1 gene of pathogenic Leptospira species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC microbiology*, 2008. 8(1): p. 223.

17.Faine, S., et al., Leptospira and Leptospirosis. Melbourne: *MediSci*, 1999. 272p. Links, 1999.

18.Briwn P.D, Levett P.N, Differentiation of leptospira species and serovars by PCRrestriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low string ency PCR. 1995. *J.Med.microbiol*,46,173-181 .

18.Brown, P., et al., Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of medical microbiology*, 1995. 43:(2)p. 110.

19.Merien, F., G. Baranton, and P. Perolat, Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *The Journal of infectious diseases*, 1995. 172(1): p. 281-285.

20.Natarajaseenivasan, K., P. Vijayachari, et al. "Phenotypic & genotypic conservation of ompL1 & lipL41 among leptospiral isolates of Andaman Islands." *Indian Journal of Medical Research*, 2005. 122(4): 343

21.Zhang, X.Y., et al., Expression and comparative analysis of genes encodingouter membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires. *Acta biochimica et biophysica Sinica* , 2005. 37(10): p. 649.

مناطق مشکوک ایران- گزارش نهایی طرح-موسسه رازی

۱۰.یدا...اسدپور ، سهیلا مرادی بیدهندی ، ابراهیم پور میربلوک جلالی-۱۳۸٤- بررسی میزان شیوع بیماری لپتوسپیرا در دام های گیلان و تعیین سروتیپ های آن- گزارش نهایی طرح- موسسه رازی

11.Shang, E., et al., The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic Leptospira species is a heat-modifiable porin. *Infection and immunity*, 1995. 63(8):p. 3174.0

12.Flannery B, Costa D,(2001). Evaluation of recombinant leptospiral antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis .*J Clin Microbiol*,39, 3303-3310

13.Tappero Jordan W, Ashford David A, Perkins Bradely A, Leptispira Species (Leptospirosis), Mandel Gorald, Bennett John,Dolin Laphau,Principle and Practice Of infectious disease, fifth edition churchil Livingstone, 2000 : 2495-2501

14.Rathinam SR, Namperumalsamy P, leptospirosis, *Ocul Immunol Inflamm*, 1999 Jun; 7(2):. Saltogly. Leptospirosis: twelve Turkish patients with the weils syndrom, Acta Med Okayam, 1997 Dec; 51(6)

۱۵.مرادی بیدهندی سهیلا،عاشورزاده رها،خاکی پژواک.بررسی کارایی سه بافر لیزکننده مختلف جهت تخلیص DNA باکتری لپتوسپیرا.فصلنامه دانش