

## استفاده از روش‌های مولکولار جهت تشخیص لپتوسپیرا

• صدیقه سادات صفویه

مربی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج

• خسرو آقایی‌پور

عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج

E-mail: s.safavieh@rvsri.com

### چکیده

تشخیص سریع لپتوسپیرا یکی از ضروریات در درمان این بیماری زئونوز می‌باشد. عدم توانایی روش‌های سرولولوژیک در تشخیص سریع این باکتری (این روش برای تشخیص و ایجاد پادتن دارند) موجب گردیده است که روش PCR به دلیل حساسیت و دقت بالای آن به عنوان کاندیدای مناسبی بدین منظور مطرح شد. در ایران نیز با توجه به شیوع فرم حاد و مزمن این بیماری باید درمان و یا کنترل آن برنامه‌ریزی گردد و تشخیص عامل بیماری اولین گام بدین منظور می‌باشد. در این تحقیق جهت تشخیص سریع این بیماری از تکنیک PCR استفاده گردید. که از سه سروواربته غالب شناخته شده در ایران *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *L. sejroe hardjo* مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور به عنوان هدف دو نقطه ژنی اختصاصی برای لپتوسپیراهای پاتوژن انتخاب گردید. پرایمرهای G1/G2 با شناسایی قطعه اول محصول PCR به طول ۲۸۵bp ایجاد نمودند و پرایمرهای DIR1/590REV2 با ۵۹۰bp هدف قرار دادن قسمتی از یک ناحیه جدید تکرار شونده ژنوم محصول PCR به طول ۱۵۷۱bp ایجاد نمودند. برای تأیید محصول PCR از آنزیم‌های محدودگر استفاده گردید که از آنزیم AluI برای محصول ۵۷۱bp و آنزیم MboI برای محصول ۲۸۵bp بکار رفت.

کلمات کلیدی: Leptospira - PCR، واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمریزه - لپتوسپیرا

Pajouhesh &amp; Sazandegi no 74 pp: 182-188

**Molecular methods for detection of Leptospira**

By: S. Sadat Safavieh, and Kh. Aghaiypour

Biotechnology Department Razi Vaccine and Serum Research Institute Karaj- Iran

Rapid detection of Leptospira is one of necessities in treatment of this zoonotic disease. The inability of serologic methods for detection of these bacteria in initial steps of infection (these methods needs to progress of infection and development of antibody) has candidated molecular methods based on PCR, as an important goal for rapid detection of Leptospirosis. Because of the existance of this disease in Iran, it seems a necessity to program for control and treatment of it. For this purpose, the first step is the detection of this bacteria. In this research we developed two PCR methods for detection of the bacteria. Three identified dominant serovars of Leptospira in Iran *L. canicola*, *L. sejroe hardjo*, *L. grippityphosa* were used in development of PCR. The first one was targeted to a non coding locus producing 285bp with G1/G2 set of primers and the second was part of a novel repetitive sequence producing a 571 bp product with primers 590DIR1/590REV2 .

Confirmation of PCR product was done with RFLP. AluI and MboI were used for 571 and 285 bp products, repectively.

**Keywords:** Leptospira-ONA Extraction-PCR**مقدمه**

لپتوسپیروز بیماری عفونی خطرناک، حاد سیستمیک و سپتی سمیک می‌باشد. این بیماری مشترک بین انسان و دام حاصل از نوعی اسپروکت به نام لپتوسپیرا است که انسان و گونه‌های متعددی از جانوران اهلی و وحشی را آلوده می‌کند، که خطری بالقوه برای بهداشت عمومی، توسعه اقتصادی، تجارب و صنعت است. پس تشخیص صحیح لپتوسپیرا اهمیت زیادی در جهت سلامت جامعه و جلوگیری از عوارض گسترده آن دارد و با توجه به روند بیماری تشخیص زود رس آن مهمترین مسئله در درمان آن می‌باشد (۳، ۶، ۷، ۱۵، ۱۹، ۲۱، ۲۴). مطالعه سرواپیدمیولوژیک و باکتریولوژیک که در مؤسسه تحقیقاتی رازی در ایران انجام پذیرفته و افزایش ابتلا به این بیماری بر اساس گزارش‌های بدست آمده از سطح کشور لزوم توجه به این بیماری و روشن نمودن وضعیت آن را در سطح کشور بیش از پیش آشکار می‌سازد (۲۰). در سالیان اخیر مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی با انجام تحقیقات گسترده به صورت مرکز تشخیص و تحقیق بر روی لپتوسپیرا و بیماری لپتوسپیروز در آمده است. در حال حاضر علاوه بر تولید واکسن بر علیه این بیماری وظیفه تشخیص نمونه‌های سرمی مشکوک به لپتوسپیروز ارسالی از مناطق مختلف کشور به روش سرولوژی را نیز عهده دار می‌باشد. بنابراین ضروری بود تا تحقیقات لازم جهت توسعه و راه اندازی روش‌های مولکولی در تشخیص لپتوسپیرا پاتوزن شروع گردد. این تحقیق بدین منظور صورت پذیرفت تا اولین گام در این راستا در کشور برداشته شود.

امروزه در دنیا جهت تشخیص لپتوسپیرا از روش‌های کشت و جداسازی عوامل، روش‌های سرولوژیک، ELISA، IFA، MAT و نیز روش‌های مولکولی بر پایه PCR استفاده می‌نمایند. البته تشخیص سرولوژیکی لپتوسپیروز معمولاً با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی MAT صورت می‌گیرد. لازم به ذکر است که استفاده از روش‌های سرولوژیک منوط به گذشت حداقل ۱ تا ۲ هفته و ایجاد پاسخ همورال در بیمار می‌باشد و در مورد کشت هم این زمان به چند هفته افزایش می‌یابد (۴، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۹، ۲۱، ۲۴). با توجه به اهمیت تشخیص زودرس عامل بیماری به نظر می‌آید تنها سرعت و حساسیت بالای روش PCR برای مسئله فوق کارساز باشد بنابراین در این تحقیق سعی گردید با راه اندازی و طراحی تکنیک PCR جهت تشخیص لپتوسپیرا امکان تشخیص زودرس لپتوسپیرا فراهم آید.

## مواد و روش

در این مطالعه از سوش‌های لپتوسپیرو *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *L. sejroe hardjo* از بانک میکروبی مؤسسه رازی تهیه و استفاده شد. جهت بررسی کیفیت و سرعت عمل در روش استخراج DNA برای PCR از سه روش Boiling، کلروفورم-فنل - ایزوآمیل الکل به همراه پروتئیناز K و کیت استخراج DNA شرکت Roche استفاده گردید (۸، ۱۱، ۲۰، ۲۹). و با بررسی بانک‌های اطلاعاتی از بین توالی‌ها و پرایمرهای مطرح شده برای شناسایی گونه‌های لپتوسپیرو پاتوژن دو جفت پرایمر انتخاب گردید، از این دو جفت پرایمر یکی به نام‌های G1/G2 ایجاد یک قطعه ۲۸۵ جفت بازی و دیگری پرایمر DIR1/590REV2 محصولی به طول ۵۷۱ جفت باز ایجاد نمود. در مرحله بعد بهینه سازی PCR جهت بدست آوردن بهترین شرایط انجام واکنش PCR بررسی گردید (۹، ۱۶، ۱۷، ۱۹، ۲۵).

**تائید اختصاصی بودن PCR برای لپتوسپیرو:** جهت بررسی عدم تشخیص دیگر گونه‌های نزدیک از نظر همولوژی DNA تعدادی از باکتری‌های دیگر ( بر اساس مقایسه و Blast انجام شده در GeneBank) انتخاب و با انجام PCR در حضور کنترل داخلی (Internal Control)، عدم تشخیص تمامی باکتری‌های مشابه *Staph.aureus*, *Bacillus subtilis*، *Listeria monocytogenes*, *E. coli* توسط این روش PCR نشان داده شد و اختصاصی بودن PCR برای لپتوسپیرو تائید گردید.

**تائید محصول PCR:** جهت تائید صحت محصول PCR از هضم بوسيله اندونوکلازهای محدود کننده استفاده گردید. بدین منظور از آنزیم AluI جهت تائید محصول ۵۷۱bp و آنزیم MboI جهت تائید محصول ۲۸۵bp استفاده شد. در این روش محصول PCR بعد از خالص سازی در حضور ۲ واحد آنزیم‌های فوق به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا هضم آنزیمی کامل صورت پذیرد. امکان هضم آنزیمی محصول PCR خالص نشده هم بررسی گردید. الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز صورت پذیرفت و نمونه‌های حاصل از هضم آنزیمی نیز بر روی ژل آگارز بررسی گردید. جهت مشاهده باند از روش رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید جهت ژل‌های آگارز استفاده شد (۵، ۱۶، ۲۷، ۲۸).

## نتایج

جهت انتخاب پرایمر اولین خصوصیت پرایمر، سکانس صحیح آن جهت مکان مورد نظر برای تکثیر است. پرایمر G1/G2 جفت نواحی غیر کد کننده اختصاصی لپتوسپیرو انتخاب گردید. جهت افزایش حساسیت روش پرایمرهای DIR1/590REV2 برای نواحی تکرار شونده ژنوم انتخاب، تا حساسیت بالاتری در تشخیص بدست آید (شکل ۱).

هر دو روش PCR قدرت تحمل خوبی در برابر غلظت‌های مختلف  $Mg^{+2}$  داشت و کیفیت محصول PCR از غلظت‌های ۰/۵ تا ۳/۵ میلی مول تغییر چندانی نمی‌نمود. مزیت این مسئله در امکان سنجش DNA هدف در غلظت‌های پائین تا بسیار بالا بدون اختلال در PCR و بدون نیاز به رقیق سازی می‌باشد (شکل ۴).

مجموع بررسی‌های فوق نشان دهنده تکرار پذیری در شرایط مختلف این دو روش PCR می‌باشد که جهت ارائه بصورت تست آزمایشی تشخیص لپتوسپیرو پاتوژن در سطح آزمایشگاه‌های مناطق درگیر می‌توان استفاده نمود. همچنین مشخص گردید که پرایمرهای DIR1/590REV2

حساسیت بالاتری از خود نشان دادند ولی در عین حال میزان رنگ زمینه (اسمیر) حاصله از آنها هم بیشتر است (شکل‌های ۲ و ۳). بررسی اختصاصی بودن این روش با استفاده از Blast در GeneBank و بررسی تمامی باکتری محتمل برای PCR مثبت با این پرایمرها در آزمایشگاه صورت پذیرفت، سویه‌های متعددی از باکتری‌ها از جمله *Staph.aureus*, *Bacillus subtilis* و *Listeria monocytogenes*, *E.coli* بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت که هیچکدام PCR مثبت ایجاد نمودند (شکل ۵).

تائید محصول PCR با RFLP صورت پذیرفت، دو آنزیم AluI و MboI بدین منظور انتخاب که AluI با هضم قطعه ۵۷۱bp در دو نقطه ایجاد سه قطعه ۹۲ و ۷۶ و ۴۰۳ نوکلئوتیدی باید بنماید که بر روی ژل آگارز قابل مشاهده است. و MboI محصول ۲۸۵ نوکلئوتیدی را در جایگاه ۱۹۸ بریده و ایجاد دو قطعه ۱۹۸ و ۸۷ نوکلئوتیدی می‌نماید (شکل ۶). جهت هضم آنزیمی ابتدا محصول PCR خالص گردیده و سپس هضم آنزیمی صورت پذیرفت. این دو آنزیم طوری انتخاب گردیده بود که شرایط عمل آن نزدیک به آنزیم Taq پلیمرز باشد تا جهت سهولت و سرعت عمل بیشتر بررسی امکان هضم آنزیمی مستقیم محصول PCR با افزودن آنزیم به تیوب PCR هم میسر باشد، موفقیت هضم آنزیمی مستقیم محصول PCR صحت و درستی انتخاب فوق را تائید نمود.

## بحث

PCR برای شناسایی تعداد وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله آنهایی که از لحاظ کلینیکی حائز اهمیت هستند استفاده



شکل ۱: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و ۲- پرایمر ۳، G1/G2 و ۴- DIR1/590REV2

طبق نتایج بدست آمده می‌توان گفت این روش PCR روشی سریع و دقیق جهت شناسایی *L. interrogans* می‌باشد طوری که وجود گونه‌های پاتوژن با این روش به سرعت قابل ردیابی است. آزمایش PCR می‌تواند در مورد سایر نمونه‌ها چون خون و ادرار، علاوه بر سرم به کار رود. در این روش امکان اینکه در عین واحد تعداد زیادی از نمونه‌ها را بتوان آزمایش کرد وجود دارد (۲۰، ۲۶) توانایی PCR در تمایز بین گونه‌های لپتوسپیروسی پاتوژنیک و غیر پاتوژنیک، آزمایش نمونه‌های محیطی با منبع احتمالی بیماری انسانی را تسهیل می‌کند (۱۹).

نتایج نشان داد که بهترین کیفیت DNA در استخراج با فنل، کلروفرم، ایزوآمیل الکل بدست آمد. این DNA در الکتروفورز بر روی ژل آگارز حداقل اسمیر را داشت و به صورت باند قوی بر روی ژل ظاهر می‌گردد. ظاهراً روش جذب DNA بر روی فیبرهای شیشه به دلیل ماهیت جذبی آن از طریق اتصالات الکترواستاتیک با جذب قطعات کوچک و بزرگ DNA بالاترین راندمان استخراج را دارد منتها میزان اسمیر آن به دلیل وجود قطعات کوچک بیشتر می‌باشد. در حالیکه به دلیل عدم امکان رسوب قطعات کوچک در روش فنل، کلروفرم، ایزوآمیل الکل DNA استخراج شده دارای راندمان کمتر ولی کیفیت و یکنواختی بیشتر است. در این تحقیق غلظت‌های مختلفی از یون منیزیم در محلول PCR بکار گرفته شد. غلظت مناسب  $Mg^{2+}$ ، ۱/۵ mm بدست آمد. در غلظت‌های بالاتر منیزیم قدرت اتصال پرایمرها افزایش، در نتیجه اتصال پرایمرها به



شکل ۲: تعیین غلظت مناسب از پرایمر G1/G2 در واکنش PCR

۱ - ۱۰۰nM و ۲ - ۲۰۰nM و ۳ - ۳۰۰nM و ۴ - ۴۰۰nM و ۵ - ۵۰۰nM و ۶ - ۶۰۰nM و ۷ - ۷۰۰nM و ۸ - ۸۰۰nM و ۹ - ۹۰۰nM و ۱۰ - ۱۰۰۰nM  
ردیف وسط ۱۰۰ bp DNA Ladder می‌باشد

می‌گردد. حساسیت تست PCR طوری می‌باشد که دیگر نیاز به جداسازی و کشت ارگانسیم نمی‌باشد در نتیجه این روش، روش ایده آل برای شناسایی سریع ارگانسیم‌های درگیر در عفونت‌های حاد می‌باشد (۱۵).

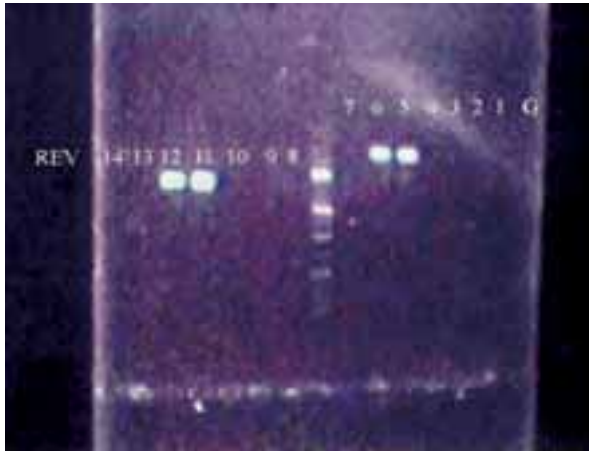
ارزش عملی PCR برای تشخیص لپتوسپیروسیس به علت توان آن در شناسایی باکتری لپتوسپیروسیس در مراحل اولیه در افراد بیمار می‌باشد. لپتوسپیروسیس یک بیماری حاد بوده و به سرعت گسترش می‌یابد. بنابراین تشخیص زودرس و سریع آن اهمیت بسیاری در درمان آن دارد. روش‌های کنونی برای تشخیص بر مبنای روش‌های سرولوژیک MAT، IFA، ELISA و کشت و PCR می‌باشد (۱۸، ۱۹).

لازم به ذکر است که استفاده از روش‌های سرولوژیک نیاز به گذشت دوره زمانی بیماری و پاسخ ایمنی مناسب در بدن دارد از طرف دیگر روش‌های سرولوژیک موجود، وجود پادتن بر علیه لپتوسپیروسیس را نشان داده و وجود لپتوسپیروسیس را نمی‌توانند نشان دهند در حالی که PCR می‌تواند وجود لپتوسپیروسیس را حتی در روزهای اول آلودگی نشان دهد (۱۹، ۲۳). اولین گزارش موجود بدین منظور در سال ۱۹۸۹ توسط Van Eys انجام پذیرفت. در مطالعه‌ای که Brown در سال ۱۹۹۵ انجام داد نتیجه گرفت PCR می‌تواند لپتوسپیروسیس را در مراحل حاد عفونت لپتوسپیروسیس نشان دهد و روش با ارزشی جهت تشخیص لپتوسپیروسیس در مراحل اولیه می‌باشد. در این تحقیق سعی گردید با راه اندازی و طراحی PCR جهت تشخیص لپتوسپیروسیس پاتوژن امکان تشخیص زودرس لپتوسپیروسیس فراهم آید.



شکل ۳: تعیین غلظت مناسب از پرایمر DIR1/REV2 در واکنش PCR

۱ - ۱۰۰nM و ۲ - ۲۰۰nM و ۳ - ۳۰۰nM و ۴ - ۴۰۰nM و ۵ - ۵۰۰nM و ۶ - ۶۰۰nM و ۷ - ۷۰۰nM و ۸ - ۸۰۰nM و ۹ - ۹۰۰nM و ۱۰ - ۱۰۰۰nM  
ردیف وسط ۱۰۰ bp DNA Ladder می‌باشد



شکل ۵: نتایج باکتریهای مورد استفاده در PCR  
 ۱) Staph - ۲) Bacillus - ۳) Listeria - ۴) Grippytyphosa - ۵) E.coli - ۶) Control positive - ۷) Control negative



شکل ۴: تعیین بهترین غلظتی از MgCl<sub>2</sub> برای هر دو جفت پرایمر G1/G2 و REV/DIR1/590  
 ۱-۰.۵mm، ۲-۱mm، ۳-۱.۲۵mm، ۴-۱.۵mm، ۵-۱.۷۵mm، ۶-۲mm، ۷-۲.۵mm، ۸-۳mm

سکانس هدف و اتصال غیر اختصاصی نیز افزایش می‌یابد و پرایمردایمر نیز ایجاد می‌گردد که باعث می‌شود تا پرایمرها با خودشان به صورت دوتایی اتصال یابند. در غلظت‌های کم (۰/۵ mm) مورد استفاده هیچ باند و محصول PCR ای ایجاد نگردید وجود یون منیزیم برای فعالیت آنزیم Taq DNA Polymerase نیز ضروری است (۱۶).

در سال ۱۹۹۴ Savio و همکارانش غلظت‌هایی از  $Mg^{2+}$  (۰/۵ تا ۳ mm) را مورد بررسی قرار دادند و بهترین غلظتی که انتخاب شد، ۱/۵ mm بود. همچنین Veloso و همکاران در سال ۲۰۰۰ غلظتی از منیزیم که جهت PCR استفاده نمودند ۲ mm بود. یون منیزیم یکی از فاکتورهای مهم جهت ورود صحیح و جایگزین شدن نوکلئوتیدها در زنجیره DNA است زیرا یون منیزیم با نوکلئوتیدها ترکیب و کمپلکس محلولی را تولید می‌تواند که یک نیاز اساسی جهت ورود و جایگزین شدن آنها در زنجیره DNA است (۲۲).

توالی DNA انتخاب شده اختصاصی لیتوسپیرا بود. با توجه به اینکه شانس وجود داشتن اتفاقی یک توالی در مولکول DNA از رابطه  $n^4$  محاسبه می‌گردد (n = تعداد نوکلئوتیدها) و پرایمرهای مورد استفاده در اینجا ۲۰ mer بوده‌اند این شانس معادل ۱ در ۱۱۰ Gbp می‌باشد. کل ژنوم لیتوسپیرا حدود ۵ Mbp می‌باشد. احتمال تکرار تصادفی این توالی تقریباً معادل صفر می‌باشد (۱۳، ۱۱). جهت بررسی شباهت این پرایمر با توالی باکتری‌های دیگر، به صورت عملی با برنامه BLAST بانک ژن نیز بررسی گردید. به طور کلی هیچ ژنومی غیر از لیتوسپیرا پاتوزن با این پرایمرها همولوژی کامل نداشتند ولی تعدادی از باکتری‌ها که دارای همولوژی نسبی بودند انتخاب گردید. باکتری‌ها شامل *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* بود که از بانک میکروبی موسسه رازی تهیه و سپس با کشت و استخراج DNA از آنها PCR صورت گرفت که هیچکدام با این روش PCR قابل تشخیص نبودند. پرایمرهای G1 و G2 به ترتیب از انتهای ۵' و انتهای ۳' توالی پلاسمید



شکل ۶: تائید محصول PCR با RFLP  
 ۱- MboI، و ۲- کنترل، و ۳- AluI، و ۴- کنترل

J.E.Madigan, and N.H.Willits.2000; Detection of *Leptosira* spp. In the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J. Clin. Microbiol.* 38:2731-2733.

7- Faine,S.1994. *Leptosira* and leptospirosis. CRC Press, Boca Raton, Fla. Fine,S.1988; Leptospirosis p.344-352. In A.Balows, W.J.Hausler, M.Ohashi, and A.Turano (ed.), *Laboratory diagnosis of infections diseases: principles and practice*, vol.1. Springer-Verlag, New York, N.Y.Faine, S.,B.Adler, C.Bolin, and P.Perolat.1999. *Leptosira* and leptospirosis, 2 nd ed. MedSci, Melbourne, Australia.

8- Gravekamp,C., H.van de Kemp, D.Carrington, G. J. J. M. van Eys, C.O.R.Everard, and W.J.Terpstra.1991; Detection of leptospiral DNA by PCR in serum from patients with copenhageni infections, p.151-164. In. Y. Kobayashi (ed.). *Leptospirosis. proceedings of the Leptospirosis Research conference 1990*.University of Tokyo press, Tokyo. Japan.

9- Gravekamp,C., H.van de Kemp, M.Franzen, D.Carrington, G.J.Schoone, G.J.J.M.van Eys, C.O.R.Everard, R.A.Hartskeerl, and W.Jterpstra.1993; Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* 139:1691-1700.

10- Guidugli,F., A.A.Castro, and A.N.Atallah.2000; Antibiotics for preventing leptospirosis (Cochrane Review), *Cochrane Library*, issue 4. Update Software. oxford, U.K.

11- Kee,S.H., I.K.Kim, M.S.Choi, and W.H.Chang.1994; Detection of leptospiral DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1035-1039.

12- Kelley,P.W.1998; Leptospirosis, P.1580-1587. In S.L.Gorbach, J.G.Bartlett, and N.R.Blacklow (ed.), *Infectious diseases*. 2 nd ed.W.B.Saunders, Philadelphia, Pa.

13- Masri,S.A., P.T.Nguyen, S.P.Gale, C.J.Howard, and S.C.Jung.1997; A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptosira* spp.in bovine semen. *Can. J. Vet. Res.* 61:15-20.

14- Merien, F., G.Baranton, and P.Perolat.1995; Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J. Infect. Dis.* 172:281-285.

15- Levett. Paul N.2001; Leptospirosis. *Clin. Microbiology. Reviews*. P: 296-326.

16- Sambrook. Joseph, Russel. David W. 2001; *Molecular cloning a laboratory manual*.

17- Savio,M.L., C.Rossi P.Fusi, S.Tagliabue, and M.L.Pacciarini.1994; Detection and identification of *Leptosira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J. Clin. Microbiol.*

نوترکیب PLIPSP۶۰ طراحی گردیده است. این پلاسמיד حاوی قطعه‌ای از DNA اختصاصی لپتوسپیرا می‌باشد. مطالعات دو رگه سازی نشان داده است که این قطعه DNA اختصاصی برای گونه‌های متعددی لپتوسپیرای پاتوژن بوده و به کمک PCRهای طراحی شده برای آن حداقل ۶ گونه لپتوسپیرا قابل شناسایی می‌باشد (*L.interrogans, L.weilii, L.borgpetersenii*), پرایمرهای (A) (*L.noguchii, L.santarosai, L.meyeri*) و ۵۹۰ DIR REV۲ برای گسترش فرگمنت اختصاص داده شدند که متشکل از یک توالی تکراری بوده و این توالی تنها در سرووارهای لپتوسپیرا پاتوژن قابل مشاهده می‌باشد. این پرایمرها بر اساس یک توالی گزارش شده از *L. interrogans serovar hardjo type hardjoprajitno* است (۱۷).

تکنیک آنالیز آنزیمی محدود کننده (REA)، روشی روتین جهت شناسایی و تایید محصول PCR است. در این تکنیک با استفاده از PCR می‌توان بخش مورد نظر از DNA را تکثیر و سپس هضم آنزیمی (Restriction Analysis) را بر روی محصول انجام داد. مشخصاً هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم‌های محدود کننده، تائیدی بر حضور محصول صحیح تکثیر شده می‌باشد. قطعات تکثیر شده در PCR را می‌توان از طریق HPLC خالص نمود ولی به دلیل پیچیدگی و گرانیقیمت بودن، روشی متداول به خصوص جهت تعداد زیادی از نمونه‌ها نمی‌باشد (۱۷، ۲۷، ۲۹).

در این تحقیق تائید محصول PCR با RFLP صورت پذیرفت، دو آنزیم *AluI* و *MboI* بدین منظور انتخاب شدند. آنزیم *AluI* با هضم قطعه ۵۷۱ bp در دو نقطه ایجاد سه قطعه ۹۲، ۷۶ و ۴۰۳ نوکلئوتیدی نمود که بر روی ژل آگارز ۲/۵ یا ۳ درصد قابل مشاهده است. و آنزیم *MboI* محصول ۲۸۵ نوکلئوتیدی را در جایگاه ۱۹۸ بریده و ایجاد دو قطعه ۱۹۸ و ۸۷ نوکلئوتیدی می‌نماید. نتایج حاصل درستی آزمایش فوق را تائید می‌نماید.

### منابع مورد استفاده

۱ - وندیوسفی جلیل، ۱۳۷۳؛ یافته‌های تازه پیرامون لپتوسپیروز در مؤسسه رازی، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۲۵، صفحه ۷۲ الی ۷۵.

۲ - وندیوسفی جلیل، ۱۳۷۸؛ تهیه واکسن سه ظرفیتی لپتوسپیرا، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی جهاد سازندگی.

3- Brown,C.A., A.W.Roberts,M.A.Miller,D.A.David, S.A.Brown, C.A.Bolin,J.Jarecki-Black, C.E.Greene, and D.Miller-Liebl.1996; *Leptosira interrogans* serovar grippotyphosa infection in dogs. *J. Am.Vet. Med. Assoc.* 209:1265-1267.

4- Brown,P.D., C.Gravekamp, D.G.Carrington, H.Van de Kemp, R.A.Hartskeerl, C.N.Edwards, C.O.R.Everard, W.J.Terpstra, and P.N.Levett. 1995; Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis *J. Med. Microbiol.*43:110-114.

5- Brown,P.D., and P.N.Levett.1997; Differentiation of *Leptosira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *J. Med. Microbiol.* 46:173-181.

6- Faber,N.A., M.Crawford, R.B.Lefever, N.C.Buyukmihci,

32:935-941.

18- Smythe, L., M. Dohnt, M. Symonds, L. Barnett, M. Moore, D. Brookes, and Vallanjon. 2000; Review of leptospirosis notification in Queensland and Australia: January 1998-June 1999. *Commun. Dis. Intell.* 24:153-157.

19- Smythe, L., Ina L. Smith, Greg A. Smith, Michael F. Oohnt, Meegan L. Symonds Leonie J. Barnett and Oavid B. mckaj. .2000; A quantitative PCR (Taq Man) assay for pathogenic *Leptospira* sp. WHO/FAO/OIE collaborating center for Reference and Research on *Leptospira*, Brisbane, Australia. P:1-22.

20- Veloso, I.M. Lopes, C. Salas, and E. Moreira. 2000; A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95:339-343.

21- Wagenaar, J., R.L. Zuerner, D. Alt, and C.A. Bolin. 2000; Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 61:316-20.

22- Woo, T.H.S., B.K.C. Patel, L.D. Smythe, M.A.N. Norris, M.L. Symonds, and M.F. Dohnt 1997; Comparison of two PCR methods for rapid identification of *Leptospira* genospecies *interrogans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 155:169-177

23- World Health Organization. 2000; Leptospirosis, India: Report of the investigation of a post-cyclone outbreak in Orissa, November 1999. *Wkly. Epidemiol. Rec. WHO* 75:217-223.

24- World Health Organization. 1999. Leptospirosis worldwide, 1999; *wkly. Epidemiol. Rec.* 74:237-242.

25- Yersin, C., P. Bovet, H.L. Smits, and P. Perolat. 1999; Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles. *Trop. Med. Int. Health* 4:38-45.

26- Zuerner, R.L., and C.A. Bolin. 1997; Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by Is 1500 hybridization and PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 35:2612-2617.

27- Zuerner, R.L., and C.A. Bolin. 1990; Nucleic acid probe characterizes *Leptospira interrogans* serovars by restriction fragment length polymorphisms. *Vet. Microbiol.* 24:355-366.

28- Zuerner, R.L., W.A. Ellis, C.A. Bolin, and J.M. Montgomery. 1993; Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. *J. Clin. Microbiol.* 31:578-583.

29- Zuerner, R.L., J.L. Herrman, and I. Saint Girons. 1993; Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. *L. Bacteriol.* 175:5445-5451.

