کلونینگ و آنالیز تعیین توالی ژن کد کننده لیپوپروتئین سطحی LipL32 در باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس سروار واکسینال کانیکولا

ابراهیم خداوردی داریان[1]، ناهید سلطانی مجد[2] ، سهیلا مرادی بیدهندی[3] ، عماد یاحقی[4] ، میثم سرشار[5] و پژواک خاکی[6]*

1. کارشناس ارشد میکروبیولوژی بخش میکروب شناسی مرکز تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج
2. کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
3. دانشیار باکتری شناسی بخش میکروب شناسی مرکز تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج
4. کارشناس ارشد میکروبیولوژی گروه میکروبیولوژی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان
5. کارشناس ارشد میکروبیولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...
6. باکتری شناس، استادیار بخش میکروب شناسی مرکز تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی،کرج

*** نشانی برای مکاتبه:** کرج - حصارک - مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش میکروب شناسی. تلفن: 02634570038
Pejvak@rvsri.com،

دریافت مقاله: اردیبهشت نود و یک پذیرش برای چاپ: تیر نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *پروتئین سطحی LipL32 یکی از مهم ترین لیپوپروتئین های غشاء خارجی لپتوسپیرا می باشد که در طی عفونت های لپتوسپیرایی بیان می شود و مشخص شده است که به عنوان یک آنتی ژن سطحی در لپتوسپیرا های بیماریزا می تواند هم برای تشخیص سرولوژیک بیماری و همچنین به دلیل ایمنی زایی بالا، بعنوان یک کاندیدای مناسب در تهیه واکسن های نوترکیب استفاده گردد. هدف از این مطالعه که برای اولین بار بر روی این باکتری در ایران انجام شده است، کلونینگ و آنالیز توالی ژن بیان کننده پروتئین سطحی LipL32 باکتری لپتوسپیرا انتروگانس سروار واکسینال کانیکولا می باشد.*

روش کار: *باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس سروار واکسینال کانیکولا (RTCC2805) در محیط کشت اختصاصی EMJH همراه با سرم خرگوش و مکمل های غذایی کشت داده شد و پس از تخلیص DNA ژنومیک، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، ویژگی و حساسیت تست PCR ارزیابی گردید. محصول PCR درون وکتور الحاق و به باکتری(Top10) E.coli انتقال داده شد. پلاسمید نوترکیب جهت تعیین توالی ارسال گردید..*

یافته ها: *مقایسه آنالیز توالی ژن lipl32 سروار واکسینال کانیکولا (LC- RTCC2805) با سرووارهای مختلف لپتوسپیرا کانیکولا ثبت شده در بانک ژنی(GenBank) مشخص نمود که بیشترین همخوانی با سروار کلون شده در تحقیق حاضر مربوط به لپتوسپیرا اینتروگانس سرووارهای کانیکولا (DQ092412 , AB094434) که جدایه هایی از کشور های هند و ژاپن با 99/6% تشابه می باشد و کمترین همخوانی با لپتوسپیرا اینتروگانس سروار کانیکولا (AY763509) که جدایه ای از کشور چین با 99/4% تشابه است. نتایج این مطالعه نشان داد که این ژن یک ژن حفاظت شده حتی در سروار واکسینال بومی می باشد و بالای 99/4% تشابه را با سرووارهای مشابه در بانک ژنی در دیگر کشورها نشان می دهد.*

نتیجه گیری: lipl32 یک ژن پایدار می باشد که در سرووارهای مختلف بیماریزا از درجه بالایی از حفاظت شدگی برخوردار است و می توان در گام بعدی از این ژن (lipl32) در کلونینگ و بیان یک آنتی ژن نوترکیب استفاده نمود 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 .

واژه های کلیدی: *لپتوسپیرا، MAT ، استان زنجان*

مقدمه

لپتوسپیروزیس یک بیماری عفونی مشترک بین انسان و حیوانات (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 سروارهای 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،۴). علائم بالینی این عفونت در نود 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. بنابراین تشخیص صحیح و به موقع این بیماری حائز اهمیت می باشد(3). وقوع لپتوسپیروزیس حاد با میزان مرگ و میر بالا در دوره های مختلف گزارش شده است(5) و این بیماری در تمام نقاط دنیا در سنین و فصول مختلف بروز می کند (6). مطالعات سرواپیدمیولوژیکی و باکتریولوژیکی پیرامون میزان شیوع آن نشان دهنده افزایش ابتلا به این بیماری درسطح کشور می باشد(9-7).
یکی از رویکردهای مهم تحقیقات مربوط به لپتوسپیروزیس ، شناسایی پروتئین های غشای خارجی این باکتری می باشد که در طی عفونت در میزبان بیان می شوند(10). پروتئین های غشایی باکتری ها پایه و اساس ارتباط بین باکتری بیماری زا و میزبان می باشد و از آنجایی که این پروتئین ها اولین ترکیبات باکتریال هستند که با سلول های میزبان واکنش می دهند بنابراین به منظور تشخیص بیماری و تهیه واکسن های نوترکیب حائز اهمیت می باشند(11).
یکی از مهمترین پروتئین های غشایی لپتوسپیرا LipL32 شناسایی شده(۱۲،۱۳) این لیپو پروتئین در میان گونه های بیماری زای لپتوسپیرا مشاهده می شود ولی در گونه های غیر بیماری زای لپتوسپیرا دیده نمی شود (۱۴،۱۵). این پروتئین هم در شرایط کشت و هم در شرایط داخل بدن هنگام عفونت به مقدار زیادی بیان می شود و این نشانگر آن است که این آنتی ژن یک آنتی ژن ایمونوژنیک می باشد. LipL32 مشخص شده که به عنوان یک آنتی ژن سطحی در لپتوسپیرا های پاتوژن می تواند هم برای تشخیص سرولوژیک بیماری و همچنین به دلیل تحریک سیستم ایمنی و ایمنی زایی بالای این آنتی ژن بعنوان یک کاندیدای مناسب در تهیه واکسن های نوترکیب استفاده گردید. البته پروتئین های غشایی دیگری نیز در لپتوسپیراها وجود دارد، مانندOmpL1 ، LipL36 ،LipL41, (با ایمنی زایی کمتری)، که انها نیز نقش ایمنی زایی دارند. در بین این پروتئین ها پروتئین غشایی OmpL1 در بین گونه های لپتوسپیراهای بیماری زا از نظر آنتی ژنتیکی هتروژنسیت بالاتری دارد ولی LipL41،LipL32 از نظر ساختمانی پایدارتر و تغیرات خیلی کمتری دارند(16). تشخیص لپتوسپیروز با اتکا به علائم بالینی،به دلیل تشابه آن با اغلب عفونت های حاد مشکل است بنابراین آزمون های سرولوژیکی و مولکولی در تشخیص لپتوسپیروز جایگاه مهمی دارند.(۱۷،۱۸).
بنابراین هدف از این تحقیق کلونینگ و آنالیز تعیین توالی ژن کد کننده لیپوپروتئین سطحی LipL32 در باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس سروار واکسینال کانیکولا می باشد که در آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا بخش میکروب شناسی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج انجام گرفته است.

روش کار

در این تحقیق یک سروار واکسینال لپتوسپیرا L. Canicola (RTCC 2805) و سه سروار پاتوژن L.Pomona , Grippotyphosa, L. Icterohaemorhagiae و یک سروار غیر بیماری زای L.biflexa از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا بخش میکروب شناسی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج استفاده گردید. باکتری ها در محیط کشت اختصاصی EMJH همراه با سرم خرگوش و مکمل های غذایی در شرایط هوازی و دمای 28 درجه سانتی گراد کشت داده شدند و بعد از 10-7 روز رشد آنها توسط میکروسکوپ دارک فیلد مورد بررسی قرار گرفت.سپس نمونه ها جهت رسوب گیری در دور g 15000 به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ گردید.جهت تخلیص DNA ژنومیک از روش فنل کلروفرم ایزوامیل الکل استفاده شد.
پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن lipl32 ، با توالی زیر، طراحی و ویژگی و حساسیت تست PCR بررسی شد.

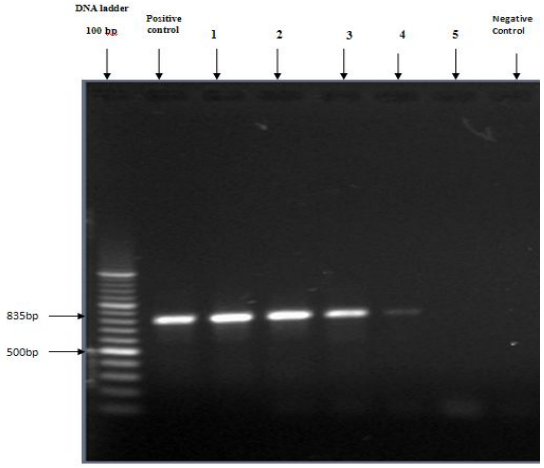
lipL32F: 5´ CCTAACTAAGGAGAGTCTATG 3´
lipL32R: 5´ TTACTTAGTCGCGTCAGAAGC 3´

واکنش PCR در حجم 50 میکرولیتر(مقدار 100نانوگرم DNA، 1واحد آنزیم DNA Polymerase PFu ،10 پیکومول از هر کدام از پرایمرها، 0/2 میلی مولار dNTP mix ، 10x pfu buffer به همراه 2 میلی مولار MgSO4) تهیه گردید. برای دناتوراسیون اولیه ، DNA به مدت 3 دقیقه در دمای 93 درجه سانتی گراد قرار داده شد و بعد از آن دناتوراسیون در 93 درجه به مدت 1 دقیقه، الحاق پرایمر ها به DNA هدف 52 درجه به مدت 1 دقیقه وتکثیر پرایمرها در 72 درجه به مدت 1 دقیقه در 35 چرخه تکرار شد و سرانجام 10 دقیقه مخلوط مواد PCR در 72 درجه قرار گرفت. محصول PCR تمام نمونه ها توسط ژل الکتروفورز ارزیابی و تائید گردید .
محصول PCR ژن لپتوسپیرا اینتروگانس سروار کانیکولا به کمک کیت (Roche) خالص سازی شده در وکتور pJET1.2/ blunt الحاق گردید و به باکتری(E.coli (Top10 انتقال داده شد. پس از قرار دادن سلول و وکتور به مدت یک ساعت روی یخ ، سلول ها در دمای 42 درجه سلسیوس به مدت یک ونیم دقیقه در بن ماری تحت تاثیر شوک گرمایی قرار گرفته و بلافاصله مجددا به مدت 5 دقیقه روی یخ قرار داده شدند. نهایتا سلول ها روی پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین در $37\ ^{o}C$ به مدت یک شبانه روز انکوبه گردیدند. سپس حضور ژن lipl32 در کلنی های نوترکیب توسط PCR تائید گردید. کلنی های نوترکیب در محیط LB حاوی آمپی سیلین رشد کرده وتخلیص پلاسمید از سلول ها توسط کیت Roche انجام شد.پلاسمید نوترکیب جهت تعین توالی ژنوم مورد نظر به شرکت Millegen فرانسه فرستاده شد.

یافته ها

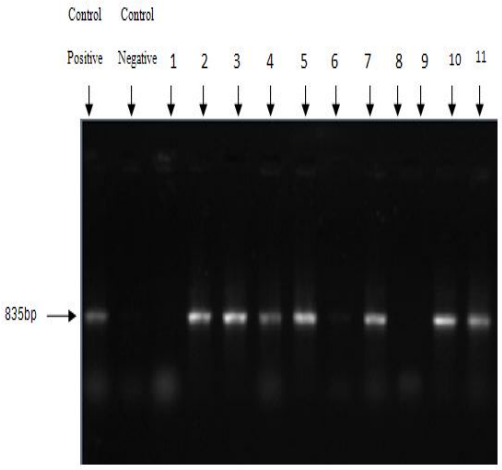
محصول PCR بدست آمده 835 bp بود که نشان دهنده تکثیر ژن lipl32می باشد که با الکتروز آگاروز 1% و سایز مارکر مورد تائید قرار گرفت. نتایج PCR نشان داد که در چهار سروار بیماری زای لپتوسپیرا ژن کد کننده پروتئین سطحی LipL32 وجود دارد در حالی که این ژن در لپتوسپیرا غیربیماری زا سروار ساپروفیت بایفلکسا مشاهده نگردید(شکل1). برای لپتوسپیرا اینتروگانس سروار کانیکولا ژن تکثیر یافته در وکتور pJET1.2/ blunt الحاق گردید و به باکتری(Top10) E.coli انتقال داده شد. تایید 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 (شکل2).

مقایسه آنالیز توالی ژن lipl32 سروار واکسینال کانیکولا (LC-RTCC2805)با سروارهای مختلف لپتوسپیرا کانیکولا ثبت شده در بانک ژنی (GenBank) مشخص نمود که بیشترین هم خوانی با سروار کلون شده در تحقیق حاضر مربوط به لپتوسپیرا اینتروگانس سروارهای کانیکولا (AB094434 , DQ092412) که جدایه هایی از کشور های هند و ژاپن با 99/6% تشابه می باشد و کمترین هم خوانی با لپتوسپیرا اینتروگانس سروار کانیکولا (AY763509) که جدایه ای از کشور چین با 99/4% دارد(شکل3، جدول 2). نتایج نشان داد که این ژن یک ژن حفاظت شده حتی در سروار واکسینال بومی می باشد و بالای 99/4% تشابه را با سروارهای مشابه در بانک ژنی در دیگر کشورها نشان می دهد. جدول 1 اطلاعات ژن lipl32 در بانک ژنی برای سروارهای مختلف کانیکولا را نشان می دهد.

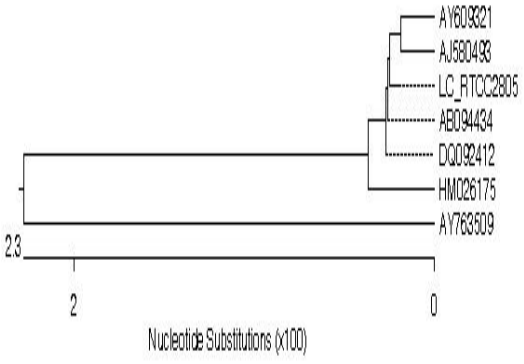


شکل 1: الکتروفورز محصول PCR با استفاده از از پرایمرهای اختصاصی بر اساس ژن lipl32 جهت شناسایی سروارهای بیماریزا از غیر بیماریزا بر روی ژل آگاروز 1% به کمک مارکر 100bp

1: L.Grippotyphosa , 2: L. Icterohaemorhagiae , 3: L.Canicola , 4: ,L.Pomona
5- L.biflexa



شکل 2 : ژن کلون شده lipl32 در باکتری E.coli (Top10)
شماره های 2-3-4-5-6- 7-10-11کلنی های PCR مثبت و شماره های 1--8-9 کلنی های PCR منفی



شکل 3:درخت فیلوژنی بر اساس آنالیز توالی ژن lipl32 برای سروار کانیکولا

جدول 2:درصد تشابه و واگرایی توالی ژن lipl32 در مقایسه با سروواریهای لپتوسپیرا کانیکولا ثبت شده در GenBank

Percent Identity

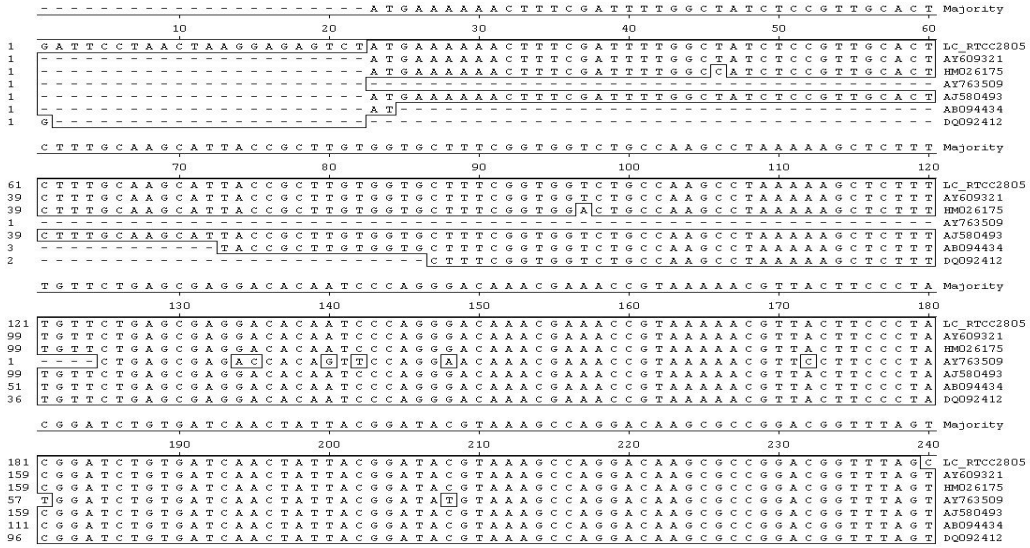
	1	2	3	4	5	6	7		
1		99.6	99.4	95.4	99.8	99.9	99.9	1	LC_RTCC2805
2	0.4		99.3	95.3	99.6	99.7	99.7	2	AY609321
3	0.6	0.7		95.3	99.4	99.6	99.6	3	HM026175
4	4.4	4.6	4.6		95.4	94.9	95.6	4	AY763509
5	0.2	0.4	0.6	4.4		99.9	99.9	5	AJ580493
6	0.1	0.3	0.4	4.3	0.1		97.9	6	AB094434
7	0.1	0.3	0.4	4.2	0.1	0.0		7	DQ092412
	1	2	3	4	5	6	7		

Divergence

جدول 1: اطلاعات ژن lipl32 در GenBank برای سروواریهای مختلف کانیکولا

Organism	Serovar	Strain	Accession No.	Country
L. interrogans	**Canicola**	**Lin**	**AY763509**	**China**
L. interrogans	**Canicola**	**Lin**	**AY609321**	**China**
L. interrogans	**Canicola**	**-**	**HM026175**	**India**
L. interrogans	**Canicola**	**-**	**DQ092412**	**India**
L. interrogans	**Canicola**	**Hond Utrecht IV**	**AJ580493**	**India**
L. interrogans	**Canicola**	**Hond Utrecht IV**	**AB094434**	**Japan**

آنالیز توالی نوکلئوتید ژن lipl32 باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس سروار واکسینال کانیکولا با سروواریهای کانیکولا بانک ژنی:



بحث

لپتوسپیروز یکی از شایع ترین بیماری های مشترک بین انسان و حیوان در جهان است(22-19). تشخیص لپتوسپیروز با اتکا به علائم بالینی مشکل است زیرا تابلوی بالینی آن با اغلب عفونت های باکتریایی یا ویروسی حاد تشابه دارد به همین د لیل اتکا به آزمایشگاه الزامی است(۲۱،۲۲). لپتوسپیروز یک بیماری قابل درمان می باشد اما تشخیص زودرس آن بسیار اهمیت دارد زیرا تاخیر در تشخیص درست و درمان به تشدید بیماری و بروز عوارض متعدد و حتی مرگ می انجامد(23). به گونه ایی که میزان مرگ و میر به صورت معنی داری به تأخیر و تردید در تشخیص و بیماری زایی بالای لپتوسپیرا بستگی دارد(24). مشاهده مستقیم باکتری در نمونه های کلینیکی توسط میکروسوپ دارگ فیلد بسیار مشکل و دارای حساسیت و ویژگی کمی می باشد و از طرف د یگر حساسیت و جدا کردن باکتری نیز از نمونه های کلینیکی با ر وش کشت، بعلت داشتن نتیاج منفی کاذب زیاد، بسیار مشکل، وقت گیر(تا شش هفته) و طولانی بوده و اغلب ناموفق است و روش مناسب و حساسی بر ای تشخیص لپتوسپیروز نیست. بدین منظورآزمون میکروآگلوتیناسیون (MAT) برای تشخیص این بیماری روش استاندارد محسوب می شود ولی انجام این آزمون به داشتن و نگه داری دائمی تعداد کافی از سویه های استاندارد و پاساژ دائمی آنها نیاز دارد که پرهزینه بوده و قابل اجرا در آزمایشگاه های تشخیص طبی نیست.(۲۱،۲۲،۲۵).

آزمون های سرولوژیکی برای تشخیص لپتوسپیروز حائز اهمیت می باشند.(26)،الیزا یکی از متداول ترین تست ها ی تشخیص سرولوژیکی است و برای تشخیص بیماری های عفونی بسیار رایج شده است و با توجه به حساسیت و و یژگی قابل توجهی که در اغلب مطالعات نشان داده است جانشین مناسبی بر ای آزمون میکرو آگلوتیناسیون (MAT) می باشد(28-26). در یک مطالعه که به منظور بررسی تشخیص لپتوسپیروزیس در گاوها بر اساس الایزا بر پایه LIPL32 انجام گردید در مقایسه بین آزمون میکروآگلوتیناسیون (MAT) و الایزا rLipL32) (IgG ELISA نتایج نشان داد الایزا بر پایه آنتی ژن نوترکیب rLipL32 دارای اختصاصیت و حساسیت بیشتر نسبت به آزمون میکرو آگلوتیناسیون (MAT) می باشد و می تواند جایگزینی برای آزمون میکروآگلوتیناسیون MAT در تشخیص عفونت لپتوسپیرا در گاوها گردد(29). در مطالعه دیگری که به منظور بررسی آنتی ژن نوترکیب LipL41 لپتوسپیرا اینتروگانس سرووار کانیکولا در الایزا برای تشخیص لپتوسپیروزیس در گاوها انجام گردید نتایج این مطالعه مشخص نمود که پروتئین نوترکیب rLipL41 می تواند به عنوان کاندیدای در تشخیص سرولوژیکی عفونت لپتوسپیروزیس در گاوها مورد قبول قرار گیرد(30).

در تحقیقی که توسط Amutha و همکاران جهت کلونینگ و آنالیز توالی ژن lipl32 لپتوسپیرااینتروگانس سرووار سجرو انجام گرفت سرووار مورد مطالعه با بانک ژنی (GenBank) مقایسه شد. نتایج این مطالعه مشخص نمود که کلون این ژن (lipl32) می تواند در آینده برای بیان یک پروتئین نوترکیب برای تشخیص سرمی بیماری لپتوسپیروزیس استفاده گردد(31). نتایج حاصل تحقیق ما با نتایج مطالعات سایر محققین حاکی از این می باشد که این ژن (lipl32) یک ژن پایدار است که حداقل 90% به بالا در سروارهای مختلف بیماری زا شباهت دارد و از درجه بالایی از حفاظت شدگی برخوردار می باشد و این ژن (lipl32) در بیماری زایی این باکتری در سروارهای بیماری زا نقش دارد(14، 34-32).

لازم به ذکر می باشد که ساختار نامناسب توالی بخش '5 این ژن (lipl32)، طراحی یک پرایمر مناسب به منظور تکثیر کل ژن lipl32را مشکل نموده است. یکی از ویژگی های تحقیق حاضر، در خصوص طراحی پرایمر در مورد ژن کد کننده پروتئین سطحیLipl32 می باشد، که در طراحی پرایمر کل ژن مد نظر قرار گرفته است که می تواند در گام بعدی از این ژن (lipl32) در کلونینگ و بیان یک آنتی ژن نوترکیب استفاده نمود 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 .

REFERENCES

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.

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

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

7. .Abdollahpou, Gh. Moghadam, Gh.A .2007. Seroprevalence of leptospiral infection in dairy herds in Tabriz – Iran .Pajouhesh and Sazandegi No 74 pp: 67-77(Full Tex Persion)

8. Magami Gh. 1981. Investigation the role of Leptospirosis in abortion of female cattle farmer around .Tehran. Veterinary Organization Publication 20: 50-60. (Full Tex Persion).

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

10. Zhao, W., et al., Molecular characterization of the pL40 protein in Leptospira interrogans. Canadian journal of microbiology, 2009. 55(6): p. 739-749

11. Haake, D., et al., Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic Leptospira spp. Journal of bacteriology, 1993. 175(13): p. 4225

12. Principles and Practice of Infectious Diseases: Set by Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin 6th edition (October 22, 2004)

13. 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. J. Mol. Biol. 390, 722–736

14. Haake D.A, Chao G, Zuerner R.L, Barnett J.K, Barnett D, Mazel M. (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect. Immun. 68, 2276–2285.

15. Picardeau M, Bulach D.M, Bouchier C, Zuerner R.L, Zidane N, Wilson P.J. (2008). Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. 1:3:1607

16. 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

17. 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

18. 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)

19. Vinet JM. Leptospirosis. tropical and travel associated disease. Micobiol Rev 2001; 14: 527-538.

20. Plank R, and Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of Leptospira SPP in humans. Microbes Infec 2000; 2: 1265-1276.

21. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2000; 14: 296-326

22. Fain S. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization Publishing 2003; p:1-23.

23. Smyth CD. Leotospirosis Worldwide 1999. Wkly Epidemiol Rec 2001;76:109-16.

24. Bharti AR. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance, Lanect infect dis, Dec, 2003, 3(12):

25. Hartskeerl R.A. Manual for Diagnosis of Leptospirosis. KIT Biomedical Research. Netherland. 2004; 34-60.

26. Adler B, Murphy AM, Locamini SA, Fain S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1980; 11: 452-457.

27. Vinetz JM. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 2001;14: 527-538.

28. Terpstra WJ, Lighthare GS, and Schoone GJ. ELISA for detection of specific IgM and IgG in human Leptospirosis. J Gen Microbiol 1985; 131: 377-385.

29. Quaresma Bomfim,M.R, Ko, A, Cota Koury, M. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. Veterinary Microbiology 109 (2005) 89–94

30. Mariya, R. Pallab Chaudhary, A.A. Kumar, E. Thangapandian, R. Amutha, S.K. Srivastava.Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of Leptospira interrogans serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine Leptospirosis Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 29 (2006) 269–277

31. Amutha, R.; Chaudhury, P.; Amar, P.G.; Vasan, P.; Cheema, P. S. and Srivastava, S. K. 2007.Cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL32 of Leptospira interrogans Serovar Sejroe. Veterinary Research Communications, 31 (2007) 513–519

32. Haake, D.A; Suchard, M.A; Kelley, M.M; Dundoo, M; Alt, D.P and Zuerner, R.L (2004). Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. Journal of Bacteriology, 186, 2818–2828)

33. Wu, W; Bao, L; Wu, Q; Li, S; Huang ,W; Wan, B; Zhang, M; et al. (1996). 16S rRNA gene PCR-SSCP analysis of the reference strains from 15 serovars (14 serogroups) of pathogenic leptospires in China, 27: 17−20

34. Guerreiro, H; Croda, J; Flannery, B; Mazel ,M; Matsunaga, J; Reis, MG; Levett, PN; et al.(2001) Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect Immun, 69: 4958−4968