Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.109218

طبقه‌بندی مولکولی و تجزیه و تحلیل شجره‌ای ژنوتایپ‌های LPS1-8 جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* طیوری در ایران با استفاده از روش LPS- PCR typing

• **زهرا یزدان پور**
دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی پزشکی، موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی
• **احمدرضا جباری (نویسنده مسئول)**
آزمایشگاه ملی تحقیقات پاستورلا، موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **مجید اسمعیلی زاد**
بخش آزمایشگاه مرکزی و تجهیزات دقیق، موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **رقیه مصری**
کارشناس ارشد ژنتیک، گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران – ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۹۵ تاریخ پذیرش: تیر۹۵

Email: ahmadjb@yahoo.com

چکیده

پاستورلا مولتوسیدا یک پاتوژن گرم منفی و مهم در دامپزشکی می‌باشدکه براساس آنتی‌ژن پلی ساکاریدی به ۱۶ سروتایپ با استفاده از روش ژل دیفیوژن تقسیم می‌شود. در این مطالعه روش**LPS PCR typing** برای تایپینگ مولکولی وآنالیز فیلوژنیک ژنوتایپ‌های **LPS1 - 8** جدایه‌های ***پاستورلا مولتوسیدا*** از طیور ایران به کار گرفته شد. در این مطالعه ۳۰ جدایه طیوری ***پاستورلا مولتوسیدا*** در محیط کشت اختصاصی **(BHI)** کشت داده شده و **DNA** ژنومی آن‌ها به روش جوشاندن استخراج گردید. شناسایی به روش بیوشیمیایی و مولکولی انجام گردید. ژنوتایپینگ لیپوپلی ساکاریدی به روش **LPS-PCR**و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. محصولات **PCR** از هر یک از ژنوتایپ‌ها تعیین سکانس شده و ارتباط آن‌ها با توالی‌های موجود در **Gen bank** مقایسه گردید. تمام ایزوله‌های مورد بررسی با روش **LPS -PCR** قابل تیپ‌بندی بودند. از بین جدایه‌ها، ۱۸جدایه دارای ژنوتیپ L۱ (۶۰ درصد) و۴جدایه دارای ژنوتیپ L۲ (۱۳/۳۳ درصد) و ۵ جدایه دارای ژنوتیپ L۳ (۱۶/۶۶ درصد) و۲جدایه دارای هرسه ژنوتیپ L۱,L۲,L۳ (۶/۶۶ درصد) و ۱جدایه دارای دو ژنوتیپ L۲,L۳ (۳/۳۳ درصد) بودند. هیچکدام ایزوله‌ای با ژنوتیپ‌های دیگر شناسایی نشدند ژنوتیپ‌های L۴-L۸ در بین جدایه‌های مطالعه شده شناسایی نشدند. در مقایسه نتایج توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های بومی ایران با جدایه‌های موجود در **Genbank** اختلافات قابل توجه وجود داشت.روش **LPS PCR typing** نشان داد که سه ژنوتیپ L۱, L۲ و L۳ ***پاستورلا مولتوسیدا*** در جدایه‌های بومی ایران حضور دارند. این تحقیق نشان داد که روش **LPS- PCR** یک سیستم تایپینگ مناسب برای افتراق بین جدایه‌های ***پاستورلا مولتوسیدا*** می‌باشد.

کلمات کلیدی: ***پاستورلا مولتوسیدا***، طیور، ژنوتایپینگ، **LPS- PCR**

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 10-17

Molecular typing and phylogenic analysis of the LPS1-8 genotypes of Pasteurella multocida isolates from poultry by LPS- PCR typing method

By: Yazdanpour, Z., MSC Student, Department of Medical Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran. Jabbari, A. R., (Corresponding Author) Pasteurella Research National Lab Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran. Esmaeili Zad. M., Section Central Lab and Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran. Mesri. R., MSC Student Jenetic, Group Molcular and Cellular, Bio Science Faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Received:2016-06-19 Accepted: 2016-07-16

Email: a.jabbari@rvsri.ac.ir

Pasteurella multocida is a gram-negative bacteria of veterinary importance which has divided into 16 somatic or lipopolysaccharide (LPS) serovars using an agar gel diffusion precipitation test. In this study LPS PCR typing method was used for molecular typing and phylogenic analysis of the LPS1-8 genotypes of *P. multocida* isolates from poultry in Iran.In this study 30 isolates *P. multocida* were cultured on BHI medium, genomic DNA was extracted by boiling method, strains were identified by biochemical and molecular methods. LPS genotyping were typed using the LPS -PCR and Specific Primers, products were sequenced and compared with the GenBank sequences. All of the isolates were typed using the LPS PCR typing . 60% of isolates contained LPS1, 13.4% LPS2, 16.6% LPS3, 6/66% L1, L2, L3, 3/33% L2, L3. None of the other genotypes (L4-L8) were detected among the isolates. There were found considerable differences of nucleotide LPS genes of Iranian isolates and the related sequences in the GenBank. LPS- PCR typing showed that three LPS genotypes of L1, L2 and L3 were present among Iranian *P. multocida* isolates. This study showed that LPS- PCR typing was a suitable typing method for differentiating among avian *P. multocida* isolates based on LPS genotypes.

Key words: *Pasteurella multocida, Poultry, Genotyping, LPS- PCR*

مقدمه

پاستورلا مولتوسیدا یک، باکتری گرم منفی کوکوباسیل، غیرمتحرک، با اندازه ۱/۰-۰/۳ میکرومتر تا ۱-۲ میکرومتر می‌باشد که سبب بیماری‌های مختلفی در انسان و حیوانات می‌شود(۳-۲). از نظر اقتصادی پاتوژن مهم دامپزشکی محسوب می‌شود عامل اصلی وبای مرغان، سپتی سمی هموراژیک درگاو، رینیت آتروفیک در کبوتر و عفونت در انسان از طریق نیش سگ و گربه ایجاد می‌شود(۶-۳). عامل وبای مرغان *پاستورلا مولتوسیدا* است. لویی پاستور در اوایل دهه ۱۸۸۰ توانست اولین واکسن باکتریایی را علیه این بیماری تهیه وبا موفقیت استفاده کند. این بیماری به سه شکل فوق حاد، حاد و مزمن بروز می‌کند.

در بین پرندگان، اردک، غاز و بوقلمون حساس‌تر از مرغ و خروس هستند و پرندگان مسن بیشتر از جوجه‌ها درگیر می‌شوند. در شکل فوق حاد تلفات بالا و ناگهانی تنها علامت مشخص است و درکالبدگشایی، پرخونی لاشه و پتشی متعدد در احشا مشاهده می‌شود. درحالت حاد، تب بالا، بی‌اشتهائی، بی‌حالی و اسهال دیده شده، مرگ در عرض چند ساعت فرا می‌رسد. در کالبدگشایی خیز ریوی، پنومونی و پری هپاتیت بارز است. در حالت مزمن، تورم ملتحمه چشم، تورم و سفتی تاج و ریش، لنگش و تنگی نفس مشاهده می‌شودکه در کالبدگشایی تورم مفصل پنیری در مفاصل پا و اکسودای پنیری در گوش میانی جلب‌نظر می‌نماید (۱۵).

پاستورلا مولتوسیدا دارای چندین فاکتور ویرولانس شامل: کپسول،

www.SID.ir

Archive of SID

لیپوپلی‌ساکارید، ادهزین‌ها، پروتئین‌های غشای خارجی، توکسین‌ها و مدیاتورهای تنظیم‌کننده آهن می‌باشد. فاکتورهای ویرولانس کلیدی این باکتری کپسول ولیپوپلی ساکارید می‌باشد که کپسول مانع فاگوسیتوز باکتری و مقاومت به سیستم کمپلمان می‌شود (۹). پاستورلا بر اساس آنتی‌ژن کپسولی به ۵ زیر گروه A,B,D,E,F تقسیم بندی می‌شود (۶ و ۲) لیپوپلی ساکارید نقش مهمی در بیماری‌زایی و تحریک سیستم ایمنی دارد و یک آنتی‌ژن اصلی مسئول در ایمنی حفاظتی میزبان محسوب می‌شود سویه‌های پاستورلا بر اساس آنتی‌ژن پلی ساکاریدی با استفاده از روش ژل دیفیوژن به ۱۶ سروار تقسیم می‌شوند (۱۴). ایزوله‌های *پاستورلا مولتوسیدا* به یک ساختار لیپو پلی ساکارید به منظور همانندسازی داخل بدن و ایجاد بیماری نیاز دارند (۸). اندوتوکسین *پاستورلا مولتوسیدا* دارای لیپید A و هسته پلی ساکاریدی می‌باشدکه هسته شامل هسته داخلی پایدار و هسته خارجی بسیار متغیر می‌باشد و هراسترین ساختار LPS متفاوتی را بیان می‌کند (۱۳, ۱۲, ۱۰). اندوتوکسین پاستورلا فاقد آنتی ژن O می‌باشد و به عنوان یک آنتی‌ژن تیپ خشن (Rough) مطرح می‌شود (۱۶). روشی که استرین‌های *پاستورلا مولتوسیدا* را بر اساس لیپوپلی ساکارید طبقه بندی می‌کند روش سرولوژیکی هدلستون (Heddleson) می‌باشد. امروزه روش‌های طبقه‌بندی مولکولی مبتنی بر PCR سریع و دقیق بوده و PCR–LPS تایپینگ نیز روش مناسب‌تری نسبت به روش هدلستون می‌باشد روش جدیدی بر پایه مولتی پلکس PCR بجای روش هدلستون در تیپ‌بندی *پاستورلا مولتوسیدا* برای تعیین ژنوتیپ لیپوپلی ساکارید توسط Harper و همکاران در سال ۲۰۱۴ بکار گرفته شده است که این روش سریع و مناسب بوده و به جای تیپ‌بندی سرولوژیکی به کار می‌رود. مطالعه هارپر نشان داد که تاپ استرین‌های ۱۶ سروتیپ هدلستون تنها دارای ۸ ناحیه ژنی بیوسنتز هسته خارجی لیپوپلی ساکاریدی می‌باشند پس ۸ ژنوتیپ لیپوپلی ساکاریدی را می‌توان در نمونه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* شناسایی نمود(۱۱). ژن‌های تشکیل دهنده هسته داخلی LPS شامل: (KdTA gcTB ,gcTA ,hpTD ,hpTc ,hpTB ,hpTA ,KdKA) (۱۱) هر ژنوتیپ دارای تنوع در ساختار لیپوپلی ساکارید خود به دلیل موتاسیون نقطه‌ای یا حذف در ناحیه ژن‌های سنتزکننده هسته لیپو پلی ساکارید می‌باشدکه باعث تغییرات در عملکرد لیپوپلی ساکارید باکتری می‌شود (۱۲).

هدف از انجام این مطالعه، تایپینگ مولکولی سویه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* طیوری موجود در ایران با استفاده از روش LPS PCR typing بود

مواد و روش کار

کشت و شناسایی بیوشیمیایی سویه‌ها

در این مطالعه از تعداد ۳۰ جدایه *پاستورلا مولتوسیدا* جداشده از پاستورلوز پرندگان که بیشتر متعلق به استان‌های شمالی کشور یعنی گیلان، مازندران، تهران و زنجان بوده و در موسسه رازی به صورت لیوفیلیزه نگهداری می‌شدند، استفاده گردید. پس از باز کردن آمپول، کشت اولیه در محیط BHI و با انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. تست‌های بیوشیمیایی به روش کلاسیک بر روی جدایه‌ها انجام گرفت. پس از رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی، تست‌های اکسیداز و کاتالاز انجام گرفت. سپس رشد نمونه‌ها در محیط‌های Blood Agar، MacConky Agar،KIA ،BHI،MR/VP، Ornithin Decarboxilas، SIM، Urease بررسی گردید. برای اطمینان از وجود باکتری پ*استورلا مولتوسیدا* از روش (KMT۱ PM-PCR) استفاده شد. و در نهایت سروتایپ و ژنوتایپ ۳۰ جدایه در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA

برای استخراج DNA به روش جوشاندن یک لوپ از کشت خالص باکتری بر روی محیط جامد برداشته و در ۱۰۰µl آب مقطر استریل در میکروتیوپ حل گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۶ درجه سانتی گراد حرارت داده داده شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰، مایع رویی جدا و از آن به عنوان DNA الگو جهت انجام PCR استفاده گردید. همچنین برای تعیین غلظت و خلوص DNA، از دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. برای انجام روش:LPS typing نمونه‌های DNA متعلق به جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا مختلف با استفاده از پرایمرهای موجود در جدول(۱) تکثیر داده شدند. آزمایش PCR با استفاده از ترموسایکلر اپندورف و در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۰/۲۵ میلی‌مولار از هر dNTP ،۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها، MgCl۲ با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۱ واحد آنزیم پلیمراز Taq (شرکت سیناژن)، ۵۰ نانوگرم DNA الگو و۲ میکرولیتر بافر X۱۰ بود. پس از بهینه‌سازی آزمایش، شرایط دمایی واکنش به شرح ذیل مناسب تشخیص داده شد: واسرشتگی اولیه (Denaturation) در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل تکرار از ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت s۳۰ و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و نهایتا مرحله‌ی گسترش نهایی(Extention final) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به منظور شناسایی محصولات PCR، نمونه به همراه بافر لود کننده بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم برماید به همراه مارکر مولکولی bp۱۰۰ (Sinagen) در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شده و با دستگاه UV وجود یا عدم وجود باند مشاهده و در نهایت ایزوله‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور ژن‌های هسته خارجی LPS گروه‌بندی شدند.

توالی‌یابی وآنالیز فیلوژنیک: برای تایید کار انجام شده، نمونه‌های مثبت برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد، برای مشاهده توالی و تحلیل نتایج بدست آمده از نرم‌افزارهای تخصصی رایج در مولکولار بیولوژی استفاده گردید. دراین مطالعه، از برنامه Edit sequence، Chromas استفاده شد، نتایج بدست آمده از آن وارد برنامه MegAlign (برای همترازی) شده و در پایان نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل این توالی‌ها با توالی سویه‌های استاندارد پاستورلا مولتوسیدا موجود در بانک ژن مقایسه شد.

نتایج

نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی بر روی ۳۰ سویه انجام شده به این صورت بودکه همه نمونه‌ها کاتالاز واکسیداز مثبت،H۲S منفی، SIM مثبت، M منفی،MR منفی،VP منفی، مک‌کانکی و آوره آز منفی، اما اورنیتین دکربوکسیلاز همه نمونه‌ها بجز دو نمونه APM۱۴ و APM۱ مثبت بودند. از پرایمر KMT۱ بعنوان پرایمر اختصاصی در آزمایش PM-PCR برای تایید مولکولی شناسایی پاستورلا مولتوسیدا استفاده گردید. تمام جدایه‌ها با استفاده از آزمایش مولکولی مورد تایید قرار گرفتند (تکثیر

www.SID.ir

Archive of SID

باند ۴۶۰ bp).

طبق (شکل ۲) در پایان ۳ ژن LPS با استفاده از برنامه گفته شده در بالا با موفقیت تکثیر شدند، نتایج تکثیر ۳ ژن LPS در شکل ۱ نشان داده شده، درصد و فراوانی ژنوتایپ‌های LPS حاصل از جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا نیز در شکل ۳ مشخص شده است. و به این صورت بوده در بین ۳۰ جدایه پاستورلا ۱۸جدایه دارای ژنوتیپ L1(۶۰ درصد)، ۴ ایزوله دارای ژنوتیپ L2 (۱۳/۳۳ درصد)، ۵ ایزوله دارای ژنوتیپ L3 (۱۶/۶۶ درصد)، ۲ ایزوله دارای هر سه ژنوتیپ L1,L2,L3 (۶/۶۶ درصد)، ۱ ایزوله دارای دو ژنوتیپ L2,L3 (۳/۳۳ درصد) می‌باشد. و هیچ ایزوله‌ای با ژنوتیپ‌های دیگر شناسایی نشدند.

نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های بدست آمده با نرم‌افزارهای ذکر شده در قسمت مواد و روش با توالی سویه‌های موجود در Gene bank نیز در شکل ۴ نشان داده شده است. در مقایسه سکانس و توالی این جدایه‌ها با جدایه‌های Genbank اختلافات زیادی وجود داشت.

بحث

طبقه‌بندی Heddleston (۱۹۷۲) براساس آنتی ژن لیپوپلی ساکاریدی بوده که با روش پرسی پیتاسیون ژل دیفیوژن پاستورلاها را به ۱۶ سروتیپ تقسیم می‌کند(۱۴). هدلستون یکی از معمول‌ترین روش‌هایی بوده که برای اختلاف سویه‌های پاستورلا استفاده می‌شود، انجام این روش با مشکلاتی از جمله آنکه تولید آنتی‌بادی اختصاصی و استاندارد عملا با دشواری همراه بوده و آزمایشگاه‌های خاص این آنتی‌بادی را در حجم محدود تولید می‌کنند، انجام آزمایش زمان‌بر بوده و این روش قادر به تعیین تیپ همه سویه‌های جدا شده نمی‌باشد. امروزه روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR یک روش مناسب‌تری نسبت به روش هدلستون می‌باشد(۱۷). روش‌های مهم تعیین ژنوتیپ عبارتند از آنالیز آندونوکلئاز محدودگر REA

جدول ۱- توالی و جایگاه ژنتیکی پرایمر های مورد استفاده در تعیین ژنوتیپ لیپوپلی ساکاریدی ۳۰ جدایه پاستورلا مولتوسیدای طیوری به روش LPS PCR typing

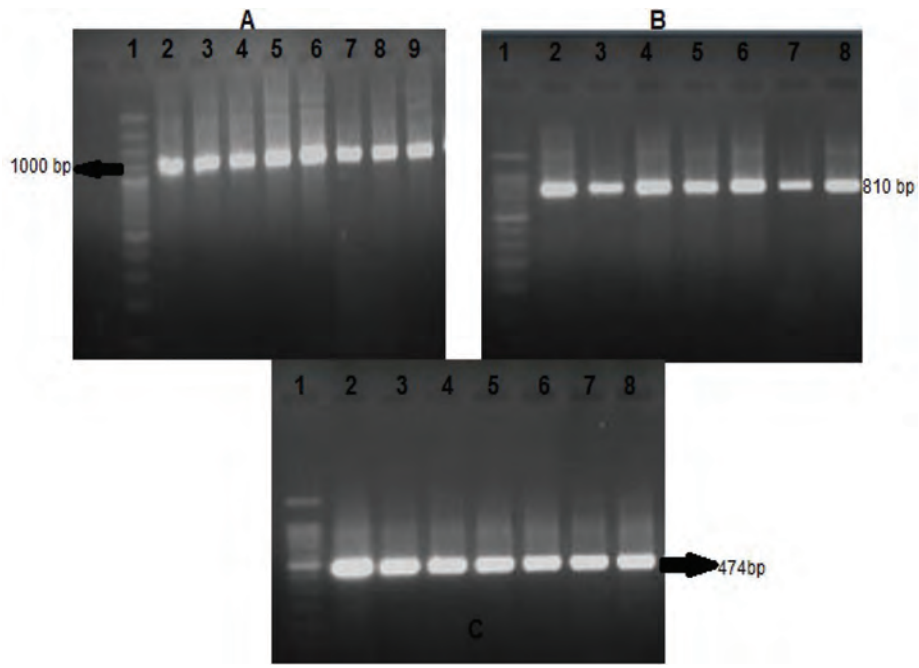
Locus	Primer	Sequence	Location	Product Size (bp)
L۱	BAP۶۱۱۹	ACATTCCAGATAATACACCCG3′5′	Forward primerinpcgD	۱۳۰۷
	BAP۶۱۲۰	ATTGGAGCACCTAGTAACCC5′3′	Reverse primer in pcgB	
L۲	BAP۶۱۲۱	CTTAAAGTAACACTCGCTATTGC3′5′	Forward primerinnctA	۸۱۰
	BAP۶۱۲۲	TTTGATTTCCCTTGGGATAGC5′3′	Reverse primer in nctA	
L۳	BAP۷۲۱۳	TGCAGGCGAGAGTTGATAAACCATC3′5′	Forward primer in gatF	۴۷۴
	BAP۷۲۱۴	CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA5′3′	Reverse primer in gatF	
L۴	BAP۶۱۲۵	TTTCCATAGATTAGCAATGCCG3′5′	Forward primer in latB	۵۵۰
	BAP۶۱۲۶	CTTTATTTGGTCTTTATATATACC5′3′	Reverse primer in latB	
L۵	BAP۶۱۲۹	AGATTGCATGGCGAAATGGC3′5′	Forward primer in rmlA	۱۱۷۵
	BAP۶۱۳۰	CAATCCTCGTAAGACCCCC5′3′	Reverse primer in rmlC	
L۶	BAP۷۲۹۲	TCTTTATAATTATACTCTCCCAAGG3′5′	Forward primer in nctB	۶۶۸
	BAP۷۲۹۳	AATGAAGGTTTAAAAGAGATAGCTGGAG5′3′	Reverse primer in nctB	
L۷	BAP۶۱۲۷	CCTATATTTATATCTCCTCCCC3′5′	Forward primerinppgB	۹۳۱
	BAP۶۱۲۸	CTAATATATAAACCATCCAACGC5′3′	Reverse primer in ppgB	
L۸	BAP۶۱۳۳	GAGAGTTACAAAAATGATCGGC3′5′	Forward primer in natG	۲۵۵
	BAP۶۱۳۴	TCCTGGTTCATATATAGGTAGG5′3′	Reverse primer in natG	

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- نتایج ژنوتیپ LPS در بین سروتایپ های مختلف جدایه های پاستورلا مولتوسیدای طیور در مطالعه حاضر

LPS Genotype	Serotype۱	Serotype۲	Serotype۳	Serotype۴	Serotype ۴×۳	Total
L۱	-APM۰۵-APM۰۴-APM۰۱ -APM۰۹-APM۰۸-APM۰۶ -APM۱۸-APM۱۷-APM۱۶ -APM۲۲-APM۲۱-APM۱۹ -APM۲۵-APM۲۴-APM۲۳ -APM۲۸-APM۲۷-APM۲۶ APM۳۰-APM۲۹					۲۰
L۲		APM۱۰´	-APM۱۴ APM۲۰		APM۰۲	۴
L۳			APM۱۱	-APM۱۲-APM۰۳ APM۱۵	APM۰۷	۵



شکل ۱- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن‌ها در ژل آگارز ۱ درصد
A: باند ۱سایز مارکر bp100 سیناژن و باندهای ۹-۲نمونه‌های۸-۱) طیوری) LPS1 با سایز bp1107
B: باند ۱ سایز مارکرbp100سیناژن و باندهای ۸-۲نمونه‌های (۷-۱) طیوری LPS2با سایزbp810
C: باند ۱ سایز مارکر bp100سیناژن و باندهای ۸-۲نمونه‌های(۷-۱) طیوری LPS 3باسایزbp 474

www.SID.ir

Archive of SID

ribotyping ، Restrictionendonuelease analysis، ژل الکتروفوز pulsed field، روش Multilocuos enzyme electrophoresis و نیز REP-PCR (repetitive extragenicplaindormic PCR)). (۱)

Harper در سال ۲۰۱۴ با روش Multiplex PCR به تعیین ژنوتیپ بر اساس ژن‌های سنتز هسته خارجی لیپوپلی ساکارید در ۱۶ تاپ استرین هدلستون پرداخت و توانست ۸ ژنوتیپ لیپوپلی ساکارید پاستورلامولتوسیدا را توسط این روش شناسایی نماید (۱۱).

طبقه‌بندی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* بر اساس ژنوتیپ LPS یک روش تایپینگ جدیدی می‌باشد که می‌تواند اطلاعاتی در مورد تنوع ساختار لیپوپلی ساکارید در میزبان‌های مختلف به ما بدهد.

نتایج انجام تست‌های بیوشیمیایی جهت تعیین سروتیپ روی همه ۳۰ جدایه انجام شده به این صورت بود که بیش‌ترین فراوانی سروتایپ در سروتیپ نوع ۱ مشاهده شد، تیپ کپسولی همه نمونه‌ها تیپ A می‌باشد. بیش‌ترین میزبان در این آلودگی جوجه مرغ، بیشترین منطقه جغرافیایی، استان مازندران بود چون در این استان میزان بارندگی زیاد بوده و شرایط رشد باکتری پاستورلا به میزان زیادی مشاهده می‌شود. نتایج ژنوتایپ ۳۰ جدایه نشان داد که ۱۸ جدایه دارای ژنوتیپ L1 (۶۰ درصد)، ۴ ایزوله دارای ژنوتیپ L۲(۱۳/۳۳ درصد)، ۵ ایزوله دارای ژنوتیپ L3 (۱۶/۶۶ درصد)، ۲ ایزوله دارای هر سه ژنوتیپ L1,L2,L3(۶/۶۶ درصد)، ۱ ایزوله دارای دو ژنوتیپ L۳,L۲(۳/۳۳ درصد) می‌باشد. هیچ ایزوله‌ای با ژنوتیپ‌های دیگر (L۸-L۴) شناسایی نشدند. در این مطالعه تعدادی از نمونه‌ها دارای ژنوتیپ چندگانه LPS بودندکه خود ژنوتیپ‌های جدیدی را در نمونه‌های ایرانی بوجود آوردند که ممکن است کاندید مناسب برای تولید واکسن به دلیل اثر حفاظتی گسترده‌ای که دارند باشند. APM17، APM04 شامل سه ژن LPS3، LPS2، LPS1 بودند. APM20، APM14 شامل دو ژن LPS2،

LPS3 بودند جدول (۳). نتایج مقایسه توالی‌های بدست آمده با سویه‌های Gene bank با استفاده از نرم‌افزار Megalign نشان داده شد. در ژن LPS1 سویه‌های Gene bank با جدایه‌های پاستورلای ایران در یک گروه قرار نگرفتند. اختلافات ژنتیکی بین آن‌ها وجود داشت. نمونه‌های مورد مطالعه با سویه‌های Gene bank از نظر سروتیپ با هم مشابه بودند اما از نظر میزبان تفاوت داشتند همه نمونه‌ها دارای سروتیپ ۱ بودند.

در ژن، LPS2 نمونه‌های مورد مطالعه با سویه‌های Gene bank مقایسه شدند تنها دو سویه در Gene bank وجود داشت که تعدادی از نمونه‌ها با سویه M1404 (سویه ژن بانک) و تعدادی با سویه P1702 (سویه ژن بانک) در یک گروه دسته‌بندی شدند. سویه‌هایی که با سویه M1404 در یک گروه قرار گرفتند همه دارای تیپ کپسولی A بودند اما سویه M1404 تیپ کپسولی B داشت. از نظر سروتیپ فقط یک نمونه با این سویه مشابه بود. هم‌چنین در سویه P1702 با نمونه‌های مورد مطالعه از نظر سروتیپ با یکدیگر تفاوت داشتند اما دارای تیپ کپسولی A بودند. تعدادی از نمونه‌ها با هیچ کدام از این سویه‌ها گروه‌بندی نشدند.

در ژن LPS3 اختلاف ژنتیکی زیادی بین جدایه‌ها و سویه‌های Gene bank وجود دارد. میزبان تمام نمونه‌های مورد مطالعه در ایران جوجه مرغ و اردک بوده اما سویه‌های Gene bank دارای میزبان‌های متفاوت و سروتیپ‌های متفاوتی بودند. در بین نمونه ها فقط یک نمونه با سویه Gene bank از نظر سروتیپ شباهت دارد و در یک گروه قرار گرفتند. همه نمونه‌های Gene bank دارای تیپ کپسولی A بوده که از این نظر با نمونه‌های مورد مطالعه شباهت دارند.

نتیجه گیری

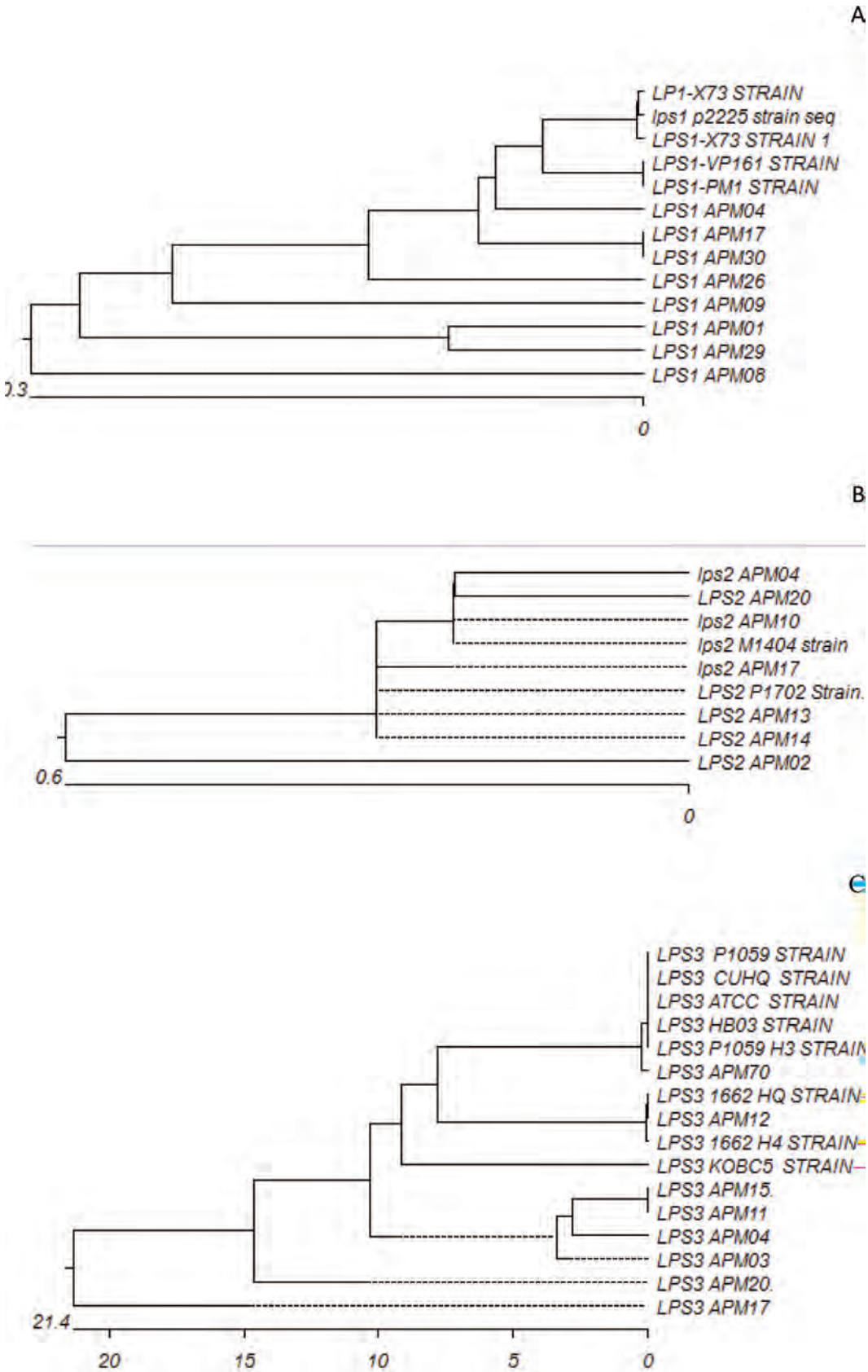
تاکنون از روش LPS PCR typing جهت تایپینگ پاستورلا مولتوسیدا در

جدول ۳- تعداد و فراوانی ژنوتایپ های LPS در بین جدایه پاستورلا مولتوسیدا شناسایی شده به روش LPS PCR typing

Genotype	Samples	Number	Frequency
LPS۱	-APM۱۶-APM۰۹-APM۰۸-APM۰۶-APM۰۵-APM۰۱ -APM۲۴-APM۲۳-APM۲۲-APM۲۱-APM۱۹-APM۱۸ APM۳۰-APM۲۹-APM۲۸-APM۲۷-APM۲۶-APM۲۵	۱۸	۶۰%
LPS۲	APM۲۰-APM۱۳-APM۱۰-APM۰۲	۴	۱۳,۴
LPS۳	APM۲۰-APM۱۲-APM۱۱-APM۰۷-APM۰۳	۵	۱۶,۶
LPS۱,۲,۳	APM۱۷-APM۰۴	۲	۶,۶
LPS۲,۳	APM۲۰	۱	۳,۴

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تعداد و فراوانی ژنوتایپ های LPS در بین جدایه *پاستورلا مولتوسیدا* شناسایی شده به روش LPS PCR typing

www.SID.ir

Archive of SID

ایران استفاده نشده PCR typing، برای بررسی اختلاف سویه‌های پاستورلا مولتوسیدا براساس ژنتیک سنتز LPS می‌باشد. روش LPS PCR typing نشان داد که سه ژنوتیپ L1, L2 و L3 پاستورلا مولتوسیدا در جدایه‌های بومی ایران حضور دارند. این تحقیق نشان داد که روش LPS- PCR یک سیستم تایپینگ مناسب برای افتراق بین جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد و بخشی از طرح‌های تحقیقاتی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی می‌باشد که با حمایت مالی این مؤسسه انجام شد. نویسندگان ضمن تشکر ویژه از مسئولین این موسسه از تمامی همکاران بخش بیوتکنولوژی نیز صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

1. Boyce, J. D, Harper, M. Wilkie, I. W., Alder, B., .2010.P asteurella In: PrescoTT. J. F. (Ed). Pathogenesis of bacterial infections in animals. Blackwell Publishing., Ames, I.A. United States of America. P: 457-470.

2. Boyce, J. D, wilkie, I. W., and B. Alder. 2004. Pasteurella and Mannheimia, In C. L. Gyles, C. O. Thoen, J. F. Prescott, and G. Songer (ed), Pathogenesis of bacterial infections of animals. Blackwell Publishing. Oxford, United Kingdom. P: 385-396.

3. Christensen, J. P. and Bisgaard, M. 2000. Fowl cholera. *Journal of Science and Technology*. 19: 626-637.

4.De Alwis, M. C. 1992. Haemorrhagic Septicaemia a general review. *British Veterinary Journal*. 148: 99-112.

5.Chanter, N. 1990. Molecular aspects of the virulence of *Pasteurella multocida*. *Canadian Journal Veterinary Research*., 54,S45-S47.

6.Weber , D. J., Wolfson, J. S., Swartz, M. N., and Hooper, D. C.1984. *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore), 63,133-154.

7.Jeong, C. G., J.S. Ma, and S.J. Kim. 1987. Fowl Cholera, New animal diseases book, Hyang Moon Book, Seoul P: 264-267.

8. Harper, M., John, D., Boyce and Adler, B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis:125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters*. 265:1-10.

9. Chung JY, Wilkie, I. W., Boyce, J. D., Towensend KM, Frost, A. J., Ghoddusi, M., Alder B. 2001. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Journal of Infectious Diseases and Immunity*. 69:2487-2492.

10. Heddleston ,K. L., Gallagher, J. E., and Rebers, P.A. 1972. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Diseases*. 16: 925-936.

11. Harper, M., Cox, A. D., Michael. F. S., Wilkie, I.W., Boyce, J.D., Adler, B. 2004. A Heptosyltranferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. *Infections and Immunity*. 72: 3436-3443.

12. Harper, M., Michael, F. S., Steen, J. A., John, M., Dorsten, L. V., Parnas, H., Vinogradov E, Adler, B.,Cox A, and Boyce, J.D. 2014. Structural analysis of lipopolysaccharide produced by Heddleston serovars 10,11,12 and 15 and the identification of a new Pasteurella multocida LPS outer core biosynthesis locus, L6. *Glycobiology Journal*. 24: 649-659.

13. Raetz, C. R., Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review. Biochemistry*. 71: 635-700.

14. Blackall, P.J., Mifin, J.K., 2000. A review of identification and typing of *Pasteurella multocida*. *Avian Pathology Journal*. 29: 271–287.

15. Harper, M., John, M., Turni, C., Edmunds, M., Michael., F. S., Adler, B., Blackall, P.J. 2014. Development of a rapid multiplex PCR to genotype *Pasteurella multocida* strains using the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 14_24.

16. Harper, M., Michael, F. S., Steen, J. A., John, M., Wright, C. L., Dorsten, L. V., Vinogradov, E., Adler, B., Cox. A., and Boyce, J. D. 2014. Characterization of the lipopolysaccharide produced by *Pasteurella multocida* serovars 6,7 and 16; identification of lipopolysaccharide genotypes L4 and L8. *Glycobiology Journal*. 25:3,294-302.

17. Harper, M., Michael, F. S., Vinogradov, E., John, M., Boyce, J.D., Adler, B., and Cox A. D. 2012. Characterization of the lipopolysaccharide from Pasteurella multocida Heddleston serovar 9; identification of a proposed bifunctional dTDP-3-acetamido-3,6-dideoxy-{alpha}-D-glucose biosynthesis enzyme. *Glycobiology Journal*. 22:332-344.

18- Townsend, K. M., Boyce, J. D., Chung, J. Y., Frost, A. J., Adler, B. 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 924–929.

19- Rimler, R. B. and. Rhoades, K. R. 1989. *Pasteurella multocida. Pasteurella and Pasteurellosis*. 1: p. 37-73.

www.SID.ir