

## طبقه‌بندی مولکولی و تجزیه و تحلیل شجره‌ای ژنوتایپ‌های LPS1-8 جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا/ی طیوری در ایران با استفاده از روش LPS- PCR typing

• زهرا یزدان پور

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی پزشکی،

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• احمدرضا جباری (نویسنده مسئول)

آزمایشگاه ملی تحقیقات پاستورلا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی،

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

• مجید اسمعیلی زاد

بخش آزمایشگاه مرکزی و تجهیزات دقیق، موسسه تحقیقات واکسن و سرم 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: تیر ۹۵

Email: ahmadjb@yahoo.com

### چکیده

پاستورلا مولتوسیدا/ی یک پاتوژن گرم منفی و مهم در دامپزشکی می‌باشد که براساس آنتی‌ژن پلی ساکارییدی به ۱۶ سروتایپ با استفاده از روش ژل دیفیوژن تقسیم می‌شود. در این مطالعه روش LPS PCR typing برای تایپینگ مولکولی و آنالیز فیلوژنیک ژنوتایپ‌های LPS1-8 جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا/ی از طیور ایران به کار گرفته شد. در این مطالعه ۳۰ جدایه طیوری پاستورلا مولتوسیدا/ی 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 لیوپلی ساکارییدی 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، ۱۸ جدایه دارای ژنوتیپ L1 (۶۰ درصد) و ۴ جدایه دارای ژنوتیپ L2 (۱۳/۳۳ درصد) و ۵ جدایه دارای ژنوتیپ L3 (۱۶/۶۶ درصد) و ۲ جدایه دارای هر سه ژنوتیپ L1, L2, L3 (۶/۶۶ درصد) و ۱ جدایه دارای دو ژنوتیپ L2, L3 (۳/۳۳ درصد) بودند. هیچکدام ایزوله‌ای با ژنوتیپ‌های دیگر شناسایی نشدند ژنوتیپ‌های L4-L8 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 L1, L2 و L3 پاستورلا مولتوسیدا/ی در جدایه‌های بومی ایران حضور دارند. این تحقیق نشان داد که روش LPS- PCR یک سیستم تایپینگ مناسب برای افتراق بین جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا/ی می‌باشد.

کلمات کلیدی: پاستورلا مولتوسیدا/ی، طیور، ژنوتایپینگ، LPS- PCR

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

Molecular typing and phylogenetic 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 phylogenetic 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  $1-3 \mu\text{m}$  تا  $1-2 \mu\text{m}$  می باشد که سبب بیماری های مختلفی در انسان و حیوانات می شود (۲-۳). از نظر اقتصادی پاتوژن مهم دامپزشکی محسوب می شود عامل اصلی وبای مرغان، سپتی سمی هموراژیک در گاو، رینیت آتروفیک در کبوتر و عفونت در انسان از طریق نیش سگ و گربه ایجاد می شود (۳-۶). عامل وبای مرغان پاستورلا مولتوسیدا است. لویی پاستور در اوایل دهه ۱۸۸۰ توانست اولین واکسن باکتریایی را علیه این بیماری تهیه و با موفقیت استفاده کند. این بیماری به سه شکل فوق حاد، حاد و مزمن بروز می کند.

در بین پرندگان، اردک، غاز و بوقلمون حساس تر از مرغ و خروس هستند و پرندگان مسن بیشتر از جوجه ها درگیر می شوند. در شکل فوق حاد تلفات بالا و ناگهانی تنها علامت مشخص است و در کالبدگشایی، پر خونی لاشه و پتشی متعدد در احشا مشاهده می شود. در حالت حاد، تب بالا، بی اشتها، بی حالی و اسهال دیده شده، مرگ در عرض چند ساعت فرا می رسد. در کالبدگشایی خیز ریوی، پنومونی و پری هیپاتیت بارز است. در حالت مزمن، تورم ملتحمه چشم، تورم و سفتی تاج و ریش، لنگش و تنگی نفس مشاهده می شود که در کالبدگشایی تورم مفصل پنیری در مفاصل پا و اکسودای پنیری در گوش میانی جلب نظر می نماید (۱۵).

پاستورلا مولتوسیدا دارای چندین فاکتور ویروانس شامل: کپسول،

Urease SIM<sup>+</sup> بررسی گردید. برای اطمینان از وجود باکتری پاستورلا مولتوسیدا/ از روش (PM-PCR (KMT<sup>1</sup>) استفاده شد. و در نهایت سرو تایپ 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 ۱۰۰ μl آب مقطر استریل در میکروتیوپ حل گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۹۶ درجه سانتی گراد حرارت 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، ۱۰۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها، MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۱ واحد آنزیم پلیمرز Taq (شرکت سیناژن)، ۵۰ نانوگرم DNA الگو و ۲ میکرولیتر بافر X<sub>10</sub> 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 ۳۰ و طولیل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و نهایتاً مرحله‌ی گسترش نهایی (Extention) (final) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. به منظور شناسایی محصولات PCR، نمونه به همراه بافر لود کننده بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم برآمید به همراه مارکر مولکولی (Sinagen) bp<sub>100</sub> 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 و آنالیز 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. در این مطالعه، از برنامه Chromas<sup>+</sup> Edit sequence 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 بود که همه نمونه‌ها کاتالاز و اکسیداز مثبت، H<sub>2</sub>S منفی، SIM مثبت، M منفی، MR<sup>+</sup> منفی، VP<sup>+</sup> منفی، مک‌کانکی و آوره آز منفی، اما اورنیتین دکربوکسیلاز همه نمونه‌ها بجز دو نمونه APM<sub>14</sub> و APM<sub>1</sub> مثبت بودند. از پرایمر KMT<sup>1</sup> 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

لیپوپلی‌ساکارید، اده‌زین‌ها، پروتئین‌های غشای خارجی، توکسین‌ها و مدیاتورهای تنظیم‌کننده آهن می‌باشد. فاکتورهای ویروانس کلیدی این باکتری کپسول و لیپوپلی‌ساکارید 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 ۷) لیپوپلی‌ساکارید 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 پلی‌ساکاریدی با استفاده از روش ژل دیفیوژن به ۱۶ سرووار تقسیم می‌شوند (۱۴). ایزوله‌های پاستورلا مولتوسیدا/ به یک ساختار لیپو پلی‌ساکارید به منظور همانندسازی داخل بدن و ایجاد بیماری نیاز دارند (۸). اندوتوکسین پاستورلا مولتوسیدا/ دارای لیپید A و هسته پلی‌ساکاریدی می‌باشد که هسته شامل هسته داخلی پایدار و هسته خارجی بسیار متغیر می‌باشد و هراسترین ساختار LPS متفاوتی را بیان می‌کند (۱۰, ۱۲, ۱۳). اندوتوکسین پاستورلا فاقد آنتی‌ژن O می‌باشد و به عنوان یک آنتی‌ژن تیپ خشن (Rough) مطرح می‌شود (۱۶). روشی که استرین‌های پاستورلا مولتوسیدا/ را بر اساس لیپوپلی‌ساکارید 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 لیپوپلی‌ساکارید 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 لیپوپلی‌ساکاریدی می‌باشند پس ۸ ژنوتیپ لیپوپلی‌ساکاریدی را می‌توان در نمونه‌های پاستورلا مولتوسیدا/ شناسایی نمود (۱۱). ژن‌های تشکیل دهنده هسته داخلی LPS شامل: (KdTA, KdTB, gcTA, gcTB, hpTD, hpTc, hpTB, hpTA, KdKA) (۱۱) هر ژنوتیپ دارای تنوع در ساختار لیپوپلی‌ساکارید خود به دلیل موتاسیون نقطه‌ای یا حذف در ناحیه ژن‌های سنتزکننده هسته لیپو پلی‌ساکارید می‌باشد که باعث تغییرات در عملکرد لیپوپلی‌ساکارید باکتری می‌شود (۱۲). هدف از انجام این مطالعه، تایپینگ مولکولی سویه‌های پاستورلا مولتوسیدا/ طیوری موجود در ایران با استفاده از روش PCR typing LPS بود

### مواد و روش کار

#### کشت و شناسایی بیوشیمیایی سویه‌ها

در این مطالعه از تعداد ۳۰ جدایه پاستورلا مولتوسیدا/ جدا شده 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<sup>+</sup>, MacConky Agar<sup>+</sup>, KIA<sup>+</sup>, BHI<sup>+</sup>, MR/VP<sup>+</sup>, Ornithin Decarboxilas<sup>+</sup>

جدایه‌های Genbank اختلافات زیادی وجود داشت.

### بحث

طبقه‌بندی Heddleston (۱۹۷۲) براساس آنتی ژن لیپوپولی 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 عملاً 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 آندونوکلتاز محدودگر REA

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 ژنوتیپ‌های LPS حاصل از جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا نیز در شکل ۳ مشخص شده است. و به این صورت بوده در بین ۳۰ جدایه پاستورلا ۱۸ جدایه 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

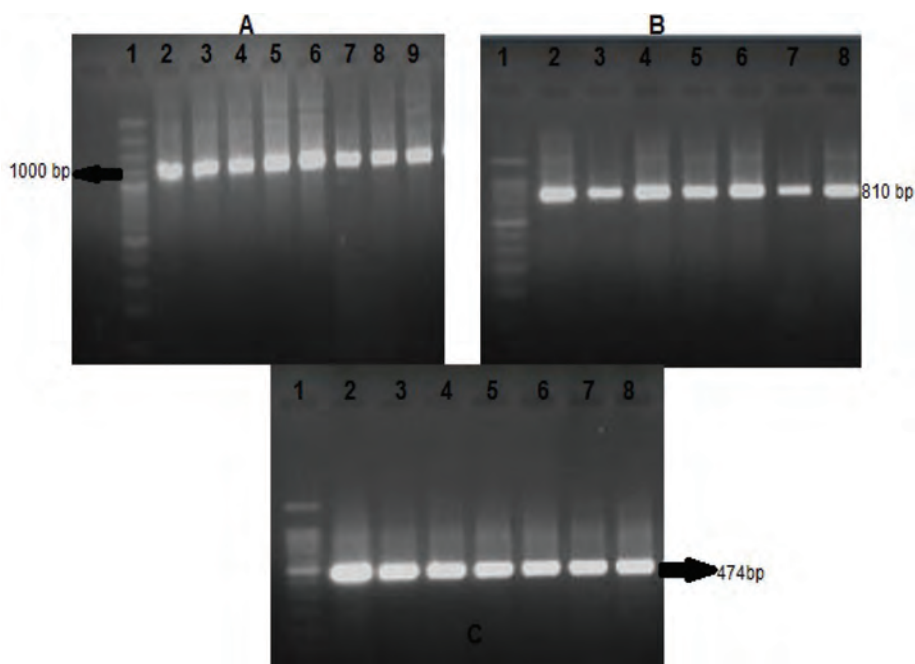
جدول ۱- توالی و جایگاه ژنتیکی پرایمرهای مورد استفاده در تعیین ژنوتیپ لیپوپولی ساکاریدی ۳۰ جدایه پاستورلا مولتوسیدای

طیوری به روش LPS PCR typing

Locus	Primer	Sequence	Location	Product Size (bp)
L1	BAP۶۱۱۹	ACATTCAGATAATACACCCG3'5'	Forward primer in pcgD	۱۳۰۷
	BAP۶۱۲۰	ATTGGAGCACCTAGTAACCC5'3'	Reverse primer in pcgB	
L2	BAP۶۱۲۱	CTTAAAGTAACACTCGCTATTGC3'5'	Forward primer in nctA	۸۱۰
	BAP۶۱۲۲	TTTGATTTCCCTTGGGATAGC5'3'	Reverse primer in nctA	
L3	BAP۶۲۱۳	TGCAGCGAGAGTTGATAAACCATC3'5'	Forward primer in gatF	۴۷۴
	BAP۶۲۱۴	CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA5'3'	Reverse primer in gatF	
L4	BAP۶۱۲۵	TTTCCATAGATTAGCAATGCCG3'5'	Forward primer in latB	۵۵۰
	BAP۶۱۲۶	CTTTATTTGGTCTTTATATATACC5'3'	Reverse primer in latB	
L5	BAP۶۱۲۹	AGATTGCATGGCGAAATGGC3'5'	Forward primer in rmlA	۱۱۷۵
	BAP۶۱۳۰	CAATCCTCGTAAGACCC5'3'	Reverse primer in rmlC	
L6	BAP۶۲۹۲	TCTTATAATTATACTCTCCCAAGG3'5'	Forward primer in nctB	۶۶۸
	BAP۶۲۹۳	AATGAAGGTTTAAAAGAGATAGCTGGAG5'3'	Reverse primer in nctB	
L7	BAP۶۱۲۷	CCTATATTTATATCTCCTCCCC3'5'	Forward primer in ppgB	۹۳۱
	BAP۶۱۲۸	CTAATATATAAACCATCCAACGC5'3'	Reverse primer in ppgB	
L8	BAP۶۱۳۳	GAGAGTTACAAAAATGATCGGC3'5'	Forward primer in natG	۲۵۵
	BAP۶۱۳۴	TCCTGGTTTCATATATAGGTAGG5'3'	Reverse primer in natG	

جدول ۲- نتایج ژنوتیپ LPS در بین سروتاپ های مختلف جدایه های باستورلا مولتوسیدای طیور در مطالعه حاضر

LPS Genotype	Serotype <sup>۱</sup>	Serotype <sup>۲</sup>	Serotype <sup>۳</sup>	Serotype <sup>۴</sup>	Serotype <sup>۴×۳</sup>	Total
L <sub>۱</sub>	-APM۰۵-APM۰۴-APM۰۱ -APM۰۹-APM۰۸-APM۰۶ -APM۱۸-APM۱۷-APM۱۶ -APM۲۲-APM۲۱-APM۱۹ -APM۲۵-APM۲۴-APM۲۳ -APM۲۸-APM۲۷-APM۲۶ APM۳۰-APM۲۹					۲۰
L <sub>۲</sub>		APM۱۰	-APM۱۴ APM۲۰		APM۰۲	۴
L <sub>۳</sub>			APM۱۱	-APM۱۲-APM۰۳ APM۱۵	APM۰۷	۵



شکل ۱- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن‌ها در ژل آگارز ۱ درصد

A: باند ۱ سایز مارکر bp100 سیناژن و باندهای ۹-۲ نمونه‌های (۱-۸) طیوری (LPS1 با سایز bp1107)  
 B: باند ۱ سایز مارکر bp100 سیناژن و باندهای ۸-۲ نمونه‌های (۱-۷) طیوری (LPS2 با سایز bp810)  
 C: باند ۱ سایز مارکر bp100 سیناژن و باندهای ۸-۲ نمونه‌های (۱-۷) طیوری (LPS3 با سایز bp474)

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 پاستورای 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 نمونه‌ها 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

Restreccionendonuelease analysis • ribotyping، ژل الکتروفورز pulsed field، روش Multilocus 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 لیپوپولی ساکارید در ۱۶ تاپ استرین هدلستون پرداخت و توانست ۸ ژنوتیپ لیپوپولی ساکارید پاستورلامولتوسیدا را توسط این روش شناسایی نماید (۱).

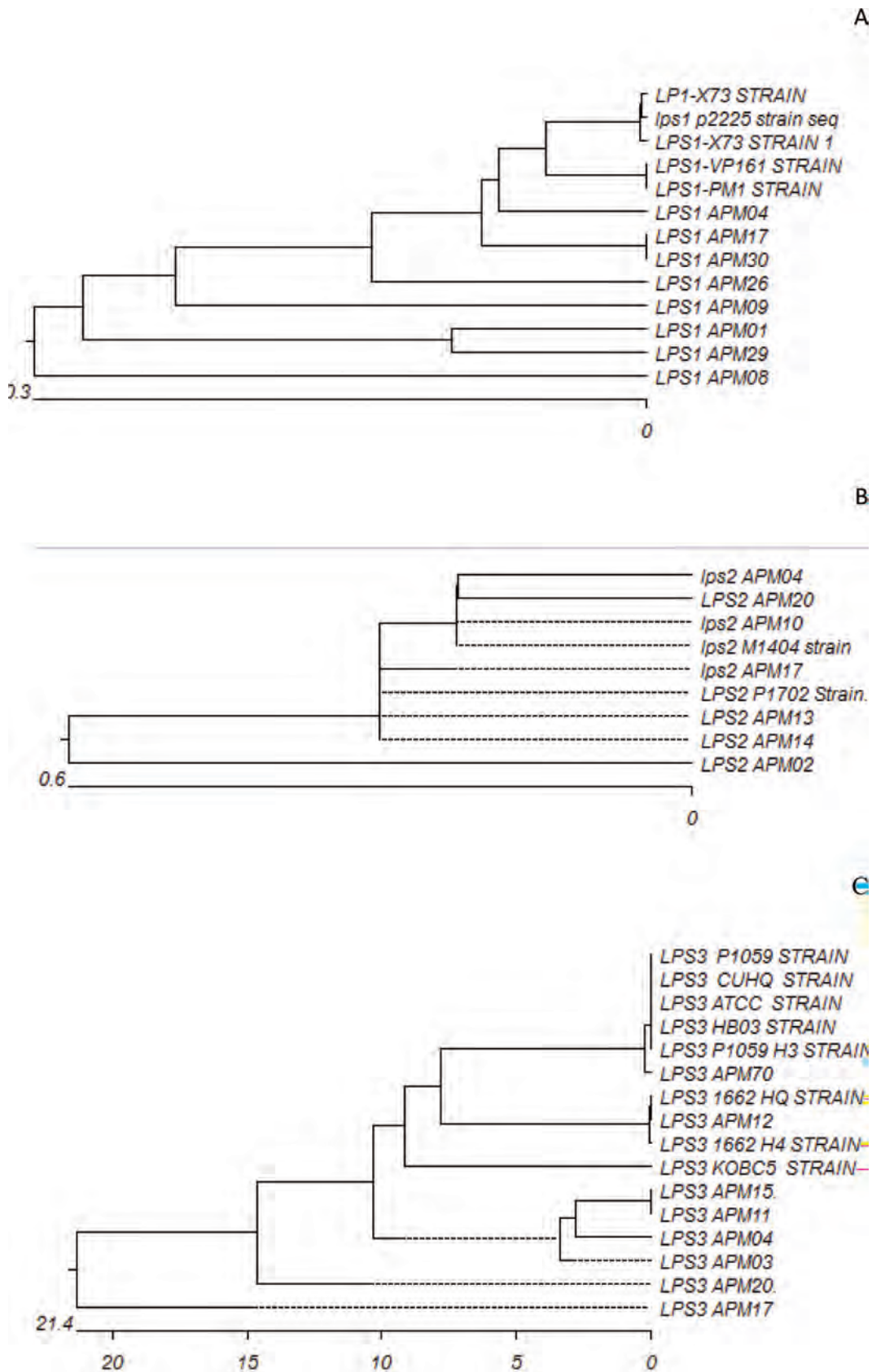
طبقه‌بندی جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا بر اساس ژنوتیپ LPS یک روش تایپینگ جدیدی می‌باشد که می‌تواند اطلاعاتی در مورد تنوع ساختار لیپوپولی ساکارید در میزبان‌های مختلف به ما بدهد.

نتایج انجام تست‌های بیوشیمیایی جهت تعیین سروتیپ روی همه ۳۰ جدایه انجام شده به این صورت بود که بیش‌ترین فراوانی سروتیپ 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 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. هیچ ایزوله‌ای با ژنوتیپ‌های دیگر (L4-L8) شناسایی نشدند. در این مطالعه تعدادی از نمونه‌ها دارای ژنوتیپ چندگانه LPS بودند که 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. APM04، APM17 شامل سه ژن LPS1، LPS2، LPS3 بودند. APM14، APM20 شامل دو ژن،

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

Genotype	Samples	Number	Frequency
LPS1	-APM16-APM09-APM08-APM06-APM05-APM01 -APM24-APM23-APM22-APM21-APM19-APM18 APM30-APM29-APM28-APM27-APM26-APM25	18	60%
LPS2	APM20-APM13-APM10-APM02	4	13.4
LPS3	APM20-APM12-APM11-APM07-APM03	5	16.6
LPS1,2,3	APM17-APM04	2	6.6
LPS2,3	APM20	1	3.4

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



11. Harper, M., Cox, A. D., Michael, F. S., Wilkie, I.W., Boyce, J.D., Adler, B. 2004. A Heptosyltransferase 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.



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 واکنش و سرم‌سازی رازی می‌باشد که با حمایت مالی این مؤسسه انجام شد. نویسندگان ضمن تشکر ویژه از مسئولین این مؤسسه از تمامی همکاران بخش بیوتکنولوژی نیز صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

### منابع مورد استفاده

1. Boyce, J. D, Harper, M. Wilkie, I. W., Alder, B., 2010. *Pasteurella* 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., Townsend KM, Frost, A. J., Ghodussi, 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.