DOI: 10.22092/vj.2018.120268.1423
شماره ۱۲۰ پاییز ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

شناسایی سویه‌های واکسن گاومیش و پرندگان *پاستورلا مولتوسیدا* ساخت موسسه رازی بر مبنای نسخه استرالیا طبقه‌بندی ژنتیکی به روش آنالیز توالی نوکلئوتیدها در لوکوس‌های چندگانه

• **مهشید سیروش**
بخش واکسن های باکتریایی هوازی دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **سبا برهانی**
پردیس علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی گیلان، رشت، ایران
• **محیا ایرانشاهی**
پردیس علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی گیلان، رشت، ایران
• **احمدرضا جباری، رایناک قادری، محمد سخاوتی، سیدرضا بنی‌هاشمی و مجید ولدان**
بخش واکسن های باکتریایی هوازی دامپزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **سحر عباسی**
پردیس علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی گیلان، رشت، ایران
• **کیوان تدین (نویسنده مسئول)**
بخش واکسن های باکتریایی هوازی دامپزشکی،موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۰۷-۱۱-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۱۶-۱۲-۱۳۹۶
Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

چکیده

سپتی سمی همراه با خونریزی در اساس یک بیماری عفونی دستگاه تنفسی در نشخوارکنندگان و پرندگان می‌باشد که توسط پاستورلا مولتوسیدا ایجاد و منجر به خسارت‌های اقتصادی قابل توجه می‌گردد. در میانه سال‌های دهه 1930 و در ابتدای دهه 1980 میلادی سویه‌های ایرانی گاومیش (Pm Razi0001) و پرندگان (Pm Razi0002) پاستورلا مولتوسیدا از حیوانات بیمار جداسازی و تاکنون از آنها در تولید واکسن پاستورلوز موسسه رازی استفاده شده است. تکنیک ژنوتایپینگ "تعیین توالی در چند ناحیه ژنی" Multi Locus Sequence Typing (MLST) analysis یک روش استاندارد در ژنوتایپینگ پاستورلا مولتوسیدا می‌باشد. این تحقیق بدنبال شناخت ساختار ژنومی سویه‌های واکسن پاستورلوز ساخت موسسه رازی ایران می‌باشد. ماده ژنتیکی به روش ساده جوشانیدن از کشت میکروبی سویه‌ها فراهم گردید. از KMT1-PCR برای احراز هویت سویه‌ها به عنوان پاستورلا مولتوسیدا استفاده شد. نسخه استرالیا روش ژنوتایپینگ MLST شامل ۷ ژن حیاتی *of adk, est, pmi, zwf, mdh, gdh and pgi* همراه با اصلاحات اندک بر روی سویه‌های هدف اجرا گردید. تیپ ژنتیکی و کلونال کمپلکس مربوطه با مراجعه به بانک اطلاعات مرجع RIRDC-MLST تعیین شد. تیپ‌های ST_{352} و ST_{129} (به ترتیب متعلق به کلونال کمپلکس‌های CC_{122} و CC_{129}) در مورد سویه‌های واکسن گاومیش و پرندگان شناسایی شدند. دانستن اینکه آیا استفاده از این سویه‌ها به صورت واکسن در دهه‌های متوالی گذشته تاثیر بنیادین در جمعیت و اپیدمیولوژی این باکتری در ایران داشته است هنوز نیاز به انجام مطالعات بیشتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: MLST، کلونال کمپلکس، ژنوتیپ، اپیدمیولوژی، پاستورلوزیس

Veterinary Researches & Biological Products No 120 pp: 2-9

Characterization of bubaline and avian vaccine strains of *Pasteurella multocida* from Razi institute as displayed by the Australian version of Multi Locus Sequence Typing analysis

By: Siroush, M., Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Borhani, S., Science & Technology Complex of Gilan Azad University, Rasht, Iran. Iranshahi, M., Science & Technology Complex of Gilan Azad University, Rasht, Iran. Jabbari, J., Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Ghaderi, R., Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Sekhavati, M., Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Banihashem, S. R., Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Valadan, M., Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Abbasii, S., Science & Technology Complex of Gilan Azad University, Rasht, Iran. Tadayon, K., (Corresponding Author) Veterinary Aerobic Bacteria Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Received: 2018-01-27 **Accepted: 2018-03-07**

Hemorrhagic septicemia (HS) is principally an infectious disease of respiratory tract caused by *Pasteurella multocida* in ruminants and birds resulting in huge economic repercussions. In the mid 1930s and early 1980s the Iranian buffalo (Pm Razi0001) and chicken (Pm Razi0002) strains of *Pasteurella multocida* were collected respectively from diseased animals. These strains have been used ever since for preparation of pasteurellosis vaccine at Razi institute. Multi Locus Sequence Typing (MLST) analysis is a standard method of genotyping for *P. multocida*. This was conducted to assess genomic structure of the vaccine *P. multocida* strains at Razi institute. Genomic material was prepared from freshly cultured strains through a simplified boiling protocol. KMT1-PCR was used to authenticate identity of strains as *P. multocida.* The Australian RIRDC-MLST typing system targeting 7 housekeeping genes of *adk, est, pmi, zwf, mdh, gdh* and *pgi* loci with few modifications was performed on strains. The Sequence Type (ST) and the corresponding clonal complex of the strains was determined by consulting the RIRDC-MLST database. Two STs were identified with ST352 (a subgroup of clonal complex CC122) and ST129 (a subgroup of clonal complex CC129) assigned for the buffalo (Pm Razi0001) and fowl (Pm Razi0002) strains, respectively. If using these strains as vaccine for all the past consecutive decades has had major impacts in population and epidemiology of *P. multocida* in this country, much more work is required.

Key words: MLST, Clonal complex, Genotype, epidemiology, Pasteurellosis

مقدمه

پاستورلوز یکی از بیماری‌های تنفسی مهم نشخوارکنندگان بزرگ (۹) و کوچک (۶) شناخته می‌شود. پاستورلا مولتوسیدا در عین حال یک باکتری بیماری‌زای مشترک نیز محسوب می‌شود و می‌تواند سبب آلودگی و عفونت در میزبان‌های انسانی بگردد (۲۲).

نخستین گزارش‌ها از وجود پاستورلوز در میان نشخوارکنندگان ایران

توسط دلپی، رستگار و رفیعی در موسسه رازی ارائه شده است (۴) علاوه بر گاو و گوسفند آلودگی به پاستورلا مولتوسیدا در بز (۱۴, ۲۱)، شتر (۱۸)، سگ (۱۳) و گربه (۱۳) و همچنین پرندگان (۷, ۱۶) نیز در ایران مشاهده و گزارش گردیده است.

در حال حاضر سویه مورد استفاده در تولید واکسن پاستورلوز گاو و گاومیش در ایران به Pm Razi۰۰۰۱ شهرت دارد که بر اساس اطلاعات در دسترس نظر می‌رسد در سال‌های میانی دهه ۱۳۱۰ از نمونه‌های آسیب‌شناسی مربوط به گله‌های گاومیش مبتلا به پاستورلوز در خوزستان در موسسه رازی جداسازی (۵) و از طریق تجدید کشت، لیوفلیزاسیون و همچنین انجماد در دماهای پایین تر از۵۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده است. سویه فعلی مورد استفاده در تولید واکسن پاستورلوز پرندگاندر ایران (Pm Razi۰۰۰۲) نیز در اوایل دهه ۱۹۸۰ میلادی در جریان همه‌گیری‌های مشاهده شده در منطقه سارستیل شهرستان آستارا از ماکیان بومی جداسازی و به روش مشابه سویه گاومیش نگهداری می‌گردد.

در سه دهه اخیر با معرفی روش‌های تایپینگ مولکولی دانش حاضر از اپیدمیولوژی و تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های باکتریایی، دچار تغییرات بنیادین شده است. در سال ۲۰۱۰ روش تایپینگ MLST در مورد پاستورلا مولتوسیدا توسط Subaaharan و Blackall در استرالیا معرفی گردید (۳, ۱۷). در طول سال‌های بعد در انگلستان نیز Davies به معرفی یک سیستم هم ارز اقدام نمود. در نتیجه این فعالیت‌ها در حال حاضر دو بانک اطلاعات بین‌المللی MLST بنام‌های RIRDC-MLST Rural Industries (Research and Development Corporation (RIRDC استرالیا و Multi-host MLST انگلستان وجود دارد که هر دوی آن‌ها از طریق آدرس https://pubmlst.org/databases/ قال دستیابی می‌باشند. در مطالعه حاضر با توجه به ضرورت‌های بین‌المللی در تعیین هویت و مشخص نمودن خصوصیات ژنتیکی سویه(هاي) آزمایشگاهی مورد استفاده در تولید فرآورده‌های بیولوژیك و از جمله واکسن پاستورلوز، روش تایپینگ RIRDC-MLST بر روی دو سویه آزمایشگاهی تولید واکسن پاستورلوز گاومیش Razi Pm۰۰۰۱ و پرندگان Razi Pm۰۰۰۲ اعمال گردید و نتایج بدست آمده با اطلاعات موجود در خارج از ایران مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتری

سویه‌های *Pasteurella mulotcida* Razi ۰۰۰۱ و *Pasteurella mulotcida* Razi ۰۰۰۲ بعنوان سویه های واکسن به ترتیب گاو (و گاومیش) و پرندگان در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

بازیافت

تجدید کشت باکتری و استخراج DNA ژنومی باکتری

محتویات میکروتیوب‌های حاوی دو سویه (محیط نگه‌دارنده TSB همراه با ۵۰ درصد گلیسیرین) ذخیره شده (فریزر ۷۵- درجه سانتی‌گراد) بر روی پلیت‌های آگار خون‌دار تجدید کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای دستیابی به ژنوم ژنتیکی باکتری یك لوپ پلاستیکی (۱۰ میکرولیتر) کامل از کشت باکتری به یک میکروتیوب دارای واشر ضد نشت (O-ring) محتوی ۴۰۰ µl بافر TB-lysis انتقال و تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در کف یک بن ماری حاوی آب در حال جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) استقرار یافت. سوسپانسیون باکتری غیر فعال شده سانتریفوژ (۱۰ دقیقه در g۸۷۰۰) و بخش مایع بالایی شناور برداشت گردید و از فیلتر سرسرنگی ۰,۲ µl عبور داده شد. این محلول محتوی ژنوم باکتری‌ها تا زمان مصرف در یخچال یا فریزر نگهداری شد.

برای طراحی و ساخت پرایمر فایل الکترونیکی (fasta file) کروموروم سویه *Pasteurella multocida* Pm۷۰ از طریق https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000011705.1 استخراج گردید. موقیت مکانی لوکوس‌های هفتگانه MLST بر مبنای MLST Multi-host *P. multocida* Scheme در این ژنوم با استفاده از برنامه Artemis (۲) شناسایی شدند. سپس در مورد هرلوکوس یک قطعه ژنتیکی به طول حدود ۲ kb از ژنوم

جدول ۱- نتایج MLST typing در میان دو سویه تحت مطالعه. کد مشخصه هر آلل بر اساس بانک اطلاعات بین المللی MLST در مورد هر ژن و هر سویه/جدایه تعیین و نشان داده شده است.

Strain/Isolate	adk	est	pmi	zwf	mdh	gdh	pgi	(Sequence Type(ST	(Clonal complex (CC
Cattle/buffalo vaccine strain	۵۲	۳۷	۲۱	۱۷	۴	۲	۱۷	۳۲۵	۱۲۲
Chicken vaccine strain	۲۱	۳۳	۲۶	۲	۱۷	۲۰	۲۰	۱۲۹	۱۲۹

جدول۲- جزئیات پرایمرهای مربوط به لوکوس ها و مناطق ژنتیکی مورد استفاده در تحقیق حاضر. موقعیت مکانی نوکلئوتیدها و اندازه محصولات PCR مربوط به هر لوکوس بر اساس ژنوم سویه استاندارد Pm۷۰ *Pasteurella multocida* ذکر شده اند. * طراحی نوبت دوم پرایمر. در مورد لوکوس KMT۱ توالی نوکلئتیدها در پرایمر PmKMT۱SP۶ طراحی Townsend و قطعه هم ارز در ژنوم سویه Pm ۷۰ مشخص شده است.

Locus/primer	Gene name	Nucleotide sequence (۳' →۵')	Start	Stop	Expected size (bp)	Target size (bp)	Reference (s)
PmKMT۱T۷	KMT۱	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	۱۵۵۲۶۶۳	۱۵۵۲۶۸۲	۴۶۰		۱۹
PmKMT۱SP۶		GCCGTAAACGAACTCGCTAC (Townsend)	۱۵۵۲۲۲۶	۱۵۵۲۲۴۵			
adkf	Adenylate kinase	GCTTTCGCTTCTGCTTGGTAG	۳۲۳۸۰۲	۳۲۳۸۲۲	۷۲۹	۴۶۶	This study
adkr		GCAGAACAACGCGCATAACT	۳۲۴۵۱۱	۳۲۴۵۳۰			
estf	Esterase	TGGCAAAAGATGTTGTCGTGT	۱۰۲۹۷۵	۱۰۲۹۹۵	۷۴۹	۵۳۵	
estr		GGCATTATAACCCGCACTGGA	۱۰۳۷۰۳	۱۰۳۷۲۳			
pmif *	Mannose-۶-Phosphate Isomerase	CGTGCCTTGAGACAGGGTAA	۹۷۸۶۵۹	۹۷۸۶۷۸	۸۷۶	۶۰۲	
pmir *		AGCCTGTCCCAGTTTGGTTC	۹۷۹۵۱۵	۹۷۹۵۳۴			
zwff *	Glucose-۶-Phosphate	CCGTGTTAGGTGTGGCAAGA	۱۷۵۱۸۴۷	۱۷۵۱۸۶۶	۸۱۸	۴۹۹	
zwfr *		TGCCGGTACACCTTTTTCCT	۱۷۵۲۶۴۵	۱۷۵۲۶۶۴			
mdhf	Malate Dehydrogenase	ATCAGAACGTCCCGTGCAAA	۲۳۲۱	۲۳۴۰	۷۰۹	۵۲۰	
mdhr		CGGCGGTTTTAGGTTTAGGC	۳۰۲۰	۳۰۲۹			
gdhf *	Glutamate dehydrogenase	TTCCGCAGACCAGTATAAACG	۴۵۸۲۸	۴۵۸۴۸	۸۰۹	۵۲۹	
gdhr *		GCAAAGGCGGTTCCGATT	۴۶۶۱۹	۴۶۶۳۶			
pgif	Phospho Glucose Isomerase	ACGGCAAAAGACGAAAGTCA	۴۸۹۱۳۷	۴۸۹۱۵۶	۷۳۲	۵۵۹	
pgir		CGAGTTGGTTGGTTTATTTCCC	۴۸۹۸۴۷				

باکتری به گونه‌ای انتخاب گردید که لوکوس مورد نظر بصورت تقریبی در میانه آن قرار گیرد. با هدف جستجو بدنبال بهترین زوج پرایمر PCR در طول قطعه انتخاب شده از برنامه Primer ۳ (۲۰) استفاده شد بطوری که اندازه مورد انتظار محصول PCR کوچکتر از ۱۰۰۰ زوج باز قرار داشته باشد (جدول ۱-۲).

آزمایش‌های PCR

از دستگاه ترموسایکلر اپندورف (منهایم، آلمان) و از کیت تجارتی آمپلیکون از محصولات شرکت آمپلیکور (Ampliquor®, Denmark) برای اجرای تمام آزمون‌های PCR استفاده شد. با استفاده از روش پیشنهادی سخاوتی (۱۲) امکان اجرای بهترین پروتکل PCR فراهم گردید . برای دستیابی به حجم نهایی هر واکنش معادل با ۱۲ µL از master mix و DMSO به ترتیب برابر با ۶ و ۰/۵ میکرولیتر استفاده شد. برای هر واکنش مقدار ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از دو پرایمر، ۲ میکرولیتر از نمونه DNA و ۲/۵ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد. در مورد اجرای مراحل واکنش‌های PCR پروتکل شامل یك مرحله اولیه گرمایش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و بدنبال آن ۳۵ نوبت از یك چرخه سه مرحله‌ای مشتمل بر گرمایش در دمای ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گرمایش در دمای ۶۰ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یك مرحله گرمایش ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گردید. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از آگاروز (۱/۵ درصد) لا اعمال جریان الکتریکی بمدت ۲ ساعت بر روی ژل (۲ v/cm) انجام شد.

تخلیص محصول PCR

تعیین توالی نوکلئوتیدها و تعیین اندازه محصولات PCR با پرداخت هزینه مربوطه توسط شرکت عامل تعیین توالی نوکلئوتیدها (ماکروژن کره جنوبی) انجام پذیرفت.

برای مشاهده فایل‌های گرافیکی توالی نوکلئوتیدها از برنامه Chromas Lite (ver ۲,۰۱) (قابل دریافت از تارنمای http://www.brothersoft.com/chromas-lite-۴۰۴۳۷۹.html)، برای تلفیق توالی‌های حاصل از تعیین توالی محصولات PCR و مقایسه گرافیکی و تعیین اندازه این قطعات از برنامه Clustal X (ver ۲,۰,۱۱) (محصول The European Bioinformatics Institute و قابل دریافت از تارنمای http://www.brothersoft.com/clustal-x-۴۰۵۰۳۷.html). همچنین برای استخراج و موقعیت‌یابی لوکوس‌های ژنتیکی تحت مطالعه در ژنوم سویه‌های استاندارد از نرم افزار Artemis قابل دریافت از تارنمای http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis استفاده شد.

در مورد تکنیک MLST در مورد هر یک از ژن‌های ۷ گانه در مورد هر سویه/جدایه با مراجعه به وب سایت هدف pubmlst..http://ukmirror۴ org/pmultocida_rirdc/ توالی نوکلئوتیدی آلل شماره ۱ هر ژن اخذ و به کمک نرم‌افزار برنامه Clustal X در مقایسه با توالی بدست آمده هر سویه/جدایه تحت آزمون همطراز (Alligned) گردید. قسمت هم اندازه و هم ارز آلل از ژنوم مجزا گردید و به وب سایت جهت تعیین کد مشخصه عرضه شد. در صورت عدم وجود سابقه گزارش قبلی از سکانس مورد نظر، اطلاعات سویه/جدایه همراه با فایل الکترونیکی کروماتوگراف تعیین توالی (Trace files) جهت اخذ کد مشخصه و ثبت آلل جدید به آدرس پست الکترونیکی محقق نگهدارنده وب سایت (Curator) ارسال گردید. در حال حاضر (p.blaclall@uq.edu.au Pat Blackall) مسئولیت نگهداری از این وب سایت را برعهده دارد. تیپ ژنتیکی MLST هر جدایه/سویه که به اصطلاح (Sequence Type (ST نامیده می شود توسط وب سایت و با ملاحظه ترکیب جمعی آلل‌های ۷ گانه تعریف می‌گردد. مجموعه‌ای از ST که از یک تیپ اجدادی منشعب شده در طول زمان اشتقاق یافته باشند به نام کمپلکس کلونال Clonal complex نامیده می‌شوند. به شکل مرسوم ST و کلونال کمپلکس‌ها توسط مسئول نگهداری وب سایت تعریف و معرفی می‌گردند.

رسم تصاویر و نمودارهای مرتبط با ارتباط اپیدمیولوژیک میان سویه‌ها/جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioNumerics Ver ۶,۷ انجام گردید.

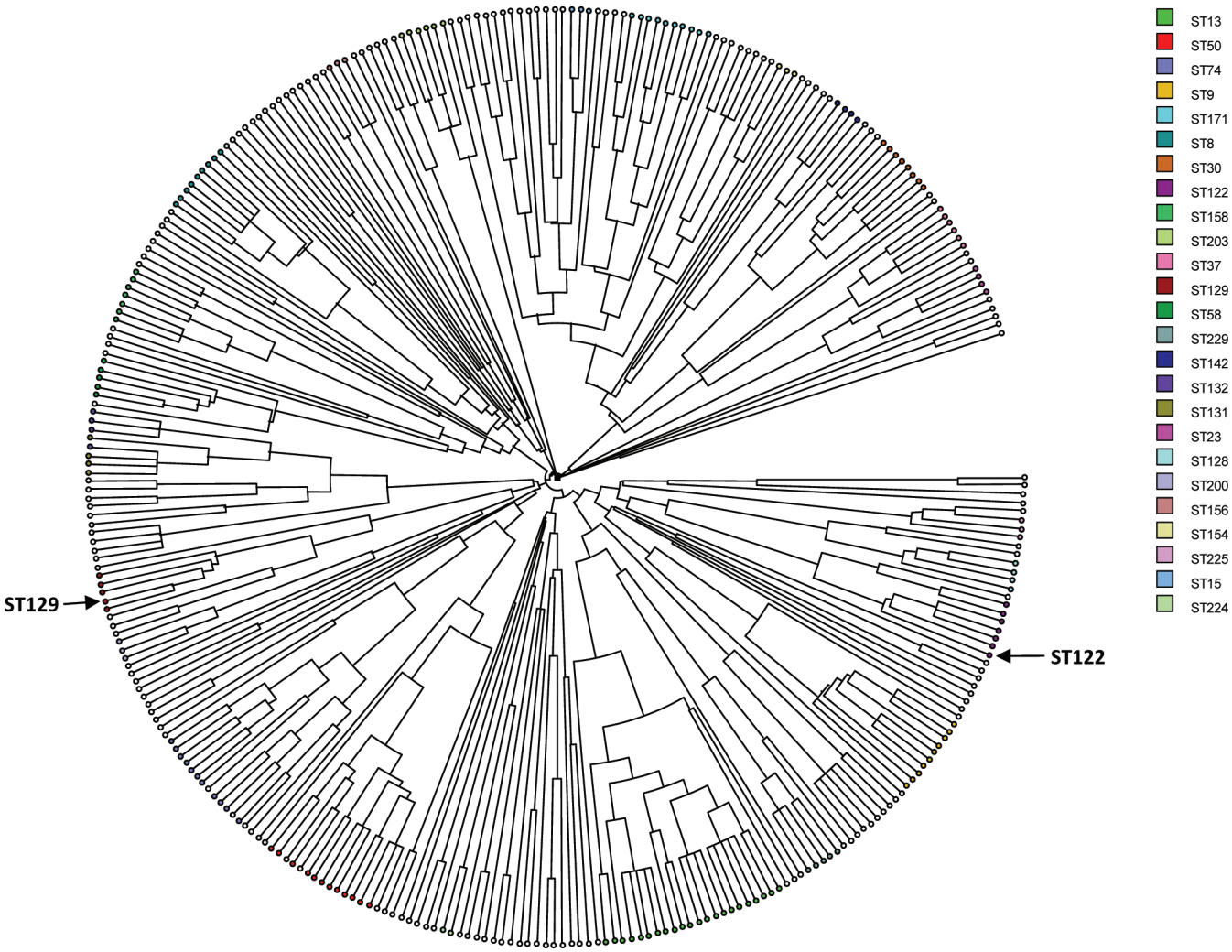
نتایج واکنش‌های PCR در آزمایش PCR-KMT

با اجرای پروتکل بهینه شده بر روی ژنوم استخراج شده دو سویه Pm Razi ۰۰۰۱ و Pm Razi ۰۰۰۲ قطعاتی به طول ۴۶۰ bp تولید گردیدند که بدین ترتیب هویت هر دو سویه به عنوان Pm مورد تائید قرار گرفت.

در آزمایش‌های ۷ گانه PCR-MLST، از طریق ارجاع به وب سایت بانک اطلاعات MLST،آلل متناظر در هر لوکوس در مورد دو سویه تحت بررسی تعیین گردید. بر اساس اطلاعات موجود تنها آلل جدید مربوط به ژن *adk*، شناخته شد که با کد مشخصه ۵۲ در بانک MLST ثبت گردید (جدول ۱-۳).

بحث

تا ابتدای ژانویه ۲۰۱۸ میلادی تعداد ۳۴۶ مورد تیپ MLST که به اصطلاح Sequence Type خوانده می شود در بانک اطلاعات Pasteurella multocida RIRDC MLST ثبت شده است (pubmlst..http://ukmirror۴ org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet. pl?file = pmultocida_rirdc_profiles. xml&page=download_profiles). اجرای روش Pasteurella multocida RIRDC MLST بر روی ۲ سویه ایرانی در جریان مطالعه حاضر وجود دو تیپ ژنتیکی (ST) را در میان آنها نشان داد نشان داد که بر اساس اطلاعات موجود در بانك اطلاعات بین‌المللی موجود در استرالیا با کدهای مشخصه ST۱۲۹ و ST۳۵۲ شناخته می‌شوند. این ژنوتایپ‌ها بترتیب در کلونال کمپلکس‌های CC۱۲۲ و CC۱۲۹ طبقه‌بندی می‌گردند. کلونال کمپلکس CC۱۲۲ شامل ۷ تیپ ژنتیکی تعریف شده ۶۳، ۱۲۲، ۱۲۷، ۱۶۲، ۲۹۲، ۳۲۲ و ۳۲۵ می‌باشد. در بانک اطلاعات MLST استرالیا بخش قابل توجهی (حدود ۱۰ درصد) از کل سویه‌های ثبت شده پاستورلا مولتوسیدا متعلق به کمپلکس کلونال ST۱۲۲ می‌باشندکه اکثریت این سویه‌ها (۸۴ درصد) از دام‌های مبتلا به پاستورلوز جداسازی گردیده اند (۸). گزارشات موجود نشان می‌دهند که این کمپلکس ST۱۲۲ در کشورهای منطقه شرق و میانه آسیا و ازجمله هندوستان (۱, ۱۱)، پاکستان، اندونزی، میانمار، تیمور شرقی و تایلند فراوان‌ترین سویه ایجادکننده بیماری در نشخوارکنندگان می‌باشد (۸). این کمپلکس در اروپا و از جمله در دانمارک (۱۰) نیز گزارش می‌گردد. پیشینه جداسازی سویه واکسن Pm Razi ۰۰۰۱ در ایران به دهه



شکل ۱- نمایش آنالیز خوشه ای به روش درخت حلقوی بر مبنای UPGMA Similarity matrix نشان دهنده ارتباط ژنتیکی میان ۲۵ کلونال کمپلکس MLST تعریف شده در جمعیت جهانی پاستورلا مولتوسیدا . دو سویه واکسن ایران همراه با تیپ ژنتیکی آنها مشخص شده اند.

۱۹۳۰ میلادی باز می‌گردد. این قدیمی‌ترین سویه پاستورلا مولتوسیدا جداسازی شده در کشور است که در حال حاضر بصورت زنده در اختیار می‌باشد. وجود این سویه در محدوده جغرافیایی ایران با یافته‌های موجود در تایید حضور و فعالیت این سویه در کشورهای شرق و میانه آسیا و فعالیت آن در این بخش از آسیا احتمال پیدایش و تکامل منطقه‌ای این سویه را تایید می‌نماید (۸). کاهش فراوانی و یا ناپدیدشدن سویه‌های بیماری‌زای باکتری‌هایی که از آنها در تولید واکسن و یا آنتی‌ژن‌های تشخیصی در گله‌های دام استفاده می‌گردد پیش از این گزارش شده است به عنوان مثال می‌توان به فقدان سویه *Mycobacterium bovis* AN۵ عامل بیماری سل گاوی که از آن در تولید توبرکولین گاوی مورد نیاز در تست سل گاو استفاده می‌شود اشاره نمود . این باکتری نخستین بار در ۱۹۴۸ در انگلستان جداسازی گردید ولی در حال حاضر در خاک این کشور دیده نمی‌شود (۱۵). بر همین اساس احتمال حضور فعلی و فعالیت بیماری‌زایی سویه Pm Razi۰۰۰۱ در جغرافیای ایران پس از چند دهه اجرای واکسیناسیون می‌تواند جالب توجه باشد.

کلونال کمپلکس CC۱۲۹ شامل ۷ تیپ ژنتیکی تعریف شده ۱۱۵, ۱۲۹ , ۱۲۷ , ۲۰۱ , ۲۳۱ , ۲۸۰ می‌باشد. سویه‌های مرتبط با این تیپ ژنتیکی از شرق آسیا گزارش می‌گردند (۲۳) همانند سویه واکسن گاومیش در حال حاضر اطلاع کافی از وضعیت تنوع ژنتیکی در جمعیت سویه‌های پاستورلا مولتوسیدا موجود در گله‌های پرندگان ایران وجود ندارد.

نتیجه گیری و پیشنهادات

ما نمی‌دانیم واکسیناسیون نشخوارکنندگان اهلی و پرندگان صنعتی و بومی در دهه‌های اخیر تا چه اندازه بر روی جمعیت سویه‌های در چرخش پاستورلا مولتوسیدا در ایران تاثیر گذاشته است. آیا سویه‌های فعلی غالب در کشور نسبت به سال‌های پیشین تغییر یافته‌اند؟ پاسخ به این سوالات و بسیاری سوالات مشابه دیگر می‌تواند در نتیجه اجرای یک سیستم جامع جداسازی و ژنوتایپینگ جدایه‌های این باکتری و بکارگیری تکنیک‌های استاندارد و از جمله MLST مورد بررسی قرار گیرد و به موضوع ضرورت یا عدم نیاز به ورود بذرهای جدید پاتوژن در تولید واکسن‌های بومی پرداخته شود.

تشکر و قدردانی

۱- همه هزینه‌های این تحقیق از جمله هزینه‌های مواد مصرفی و هزینه‌های تعین توالی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ثبت ۹۴۱۰۸-۱۸-۱۸-۲ تامین مالی و علاوه بر آن فضا و تجهیزات آزمایشگاهی نیز توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی فراهم گردیده است.
۲- سویه واکسن پاستورلوز گاو و گاومیش موسسه به همت لویی دلپی، رضا رستگار و عزیز رفیعی در دهه بیست و سویه واکسن پرندگان توسط ایرج اعرابی و عباس ستوده نیا در دهه هفتاد شمسی جداسازی و در موسسه رازی آرشیو گردیده‌اند.
۳- میزان مشارکت مهشید سیروش، سبا برهانی، سحر عباسی و محیا ایرانشاهی در تهیه و نگارش این مقاله به عنوان نویسندگان اول مساوی می‌باشد. مطالب این مقاله بیانگر بخشی از یافته‌های پروژه پایان‌نامه کارشناسی ارشد نامبردگان می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1- Aiswarya V., Y.A. Chatur, B.B. Bhanderi, R.A. Mathakiya and A. Roy. 2017. Multilocus sequence typing of *P. multocida* isolates of buffalo origin from gujarat state of India. *Buffalo Bulletin* 36,385-399.

2- Carver T., S.R. Harris, M. Berriman, J. Parkhill and J.A. McQuillan. 2012. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 28,464-469.

3- Christensen H. and M. Bisgaard. 2010. Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of Pasteurellaceae of veterinary importance. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 123,20-30.

4- Delpy L. 1938. A study on infectious disease of farmed animals in Persia. 1 ed. The Persian Department of Agriculture. Karaj.

5- Delpy L. and R. Rastegar. 1940. Maladies contagieuses non parasitaires-sur une nouvelle méthode de vaccination contre la pasteurellose des bovins et des buffles. *Archives of Razi Institute* 2,1-18.

6- Garcia-Alvarez A., A.I. Vela, E. San Martin, F. Chaves, J.F. Fernandez-Garayzabal, D. Lucas and D. Cid. 2017. Characterization of *Pasteurella multocida* associated with ovine pneumonia using multi-locus sequence typing (MLST) and virulence-associated gene profile analysis and comparison with porcine isolates. *Veterinary microbiology* 204,180-187.

7- Jabbari A., A. Saharee and F. Esmaily. 2003. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* obtained from poultry in Iran. *Journal of Veterinary Malaysia* 15,15-19.

8- Moustafa A.M., M.D. Bennett, J. Edwards, K. Azim, M.A. Mesaik, M.I. Choudhary, P. Pathanasophon, A. Worarach, Q. Ali, M. Abubakar and R. Anjum. 2013. Molecular typing of haemorrhagic septicaemia-associated Pasteurella multocida isolates from Pakistan and Thailand using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Research in veterinary science* 95,986-990.

9- Nefedchenko A.V., T.I. Glotova, A.G. Glotov, V.A. Ternovoy and A.O. Sementsova. 2017. Prevalence of different OmpH-types among *Pasteurella multocida* isolated from lungs of calves with respiratory problems. *Microbial pathogenesis* 104,184-189.

10- Petersen A., M. Bisgaard, K. Townsend and H. Christensen. 2014. MLST typing of *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia and development of a real-time PCR specific for haemorrhagic septicaemia associated isolates. *Veterinary microbiology* 170,335-341.

11- Sarangi L.N., P. Thomas, S.K. Gupta, A. Priyadarshini, S. Kumar, V.K. Nagaleekar, A. Kumar and V.P. Singh. 2015. Virulence

gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 38,33-39.

12- Sekhavati M., K. Tadayon, R. Ghaderi, R. Banihashemi, A.R. Jabbari, G. Shokri and N. Karimnasab. 2015. "In-house" production of DNA size marker from a vaccinal *Bacillus anthracis* strain. *Iranian journal of microbiology* 7,45.

13- Shirzad-Aski H. and M. Tabatabaei. 2016. Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates obtained from poultry, ruminant, cats and dogs using RAPD and REP-PCR analysis. *Molecular biology research communications* 5,123-132.

14- Shirzad Aski H. and M. Tabatabaei. 2016. Occurrence of virulence-associated genes in *Pasteurella multocida* isolates obtained from different hosts. *Microbial pathogenesis* 96,52-57.

15- Smith N.H., S.V. Gordon, R. de la Rua-Domenech, R.S. Clifton-Hadley and R.G. Hewinson. 2006. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis. Nature Reviews Microbiology* 4,670-681.

16- Sotoodehnia A. 1990. *Pasteurella multocida* type B: 2 Isolated from poultry in Iran. *Archives de l'Institut Razi* (Iran Islamic Republic).

17- Subaaharan S., L.L. Blackall and P.J. Blackall. 2010. Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida. Veterinary microbiology* 141,354-361.

18- Tahamtan Y., O. Amrabadi and R. Shahryari. 2016. Identification of *Pasteurella multocida* and molecular diagnosis of haemorrhagic septicaemia in Iranian camels. *REVUE DE MEDECINE VETERINAIRE* 167,126-132.

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

20- Untergasser A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm and S.G. Rozen. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* 40,e115.

21- Valadan M., A. Jabbari, M. Niroumand, Y. Tahamtan and H. Bani. 2014. Isolation and identification of *Pasteurella multocida* from sheep & goat in Iran. *Archives of Razi Institute* 69,47-55.

22- Wallace J.A., J. Hussain, A. Unzueta and G. Morelli. 2017. *Pasteurella multocida* Bacteremia and Peritonitis in a Patient With Cirrhosis: A Life-Threatening Case From a Prick of a Cactus. *Journal of investigative medicine high impact case reports* 5,2324709617726103.

23- Wang Y., J. Zhu, C. Lu, B. Wu, D. Liu, W. Hang, H. Liu and X. Liu. 2013. Evidence of circulation of an epidemic strain of Pasteurella multocida in Jiangsu, China by multi-locus sequence typing (MLST). Infection, genetics and evolution : *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 20,34-38.