تایپینگ جدایه‌های ایرانی *پاستورلا مولتوسیدای* گوسفندی و طیور، بر اساس ۴ ژن (L1-L4) بیوسنتز کننده‌ی هسته‌ی خارجی LPS

سیده فهیمه میرحقگوی‌جلالی[۱*]، احمدرضا جباری[۲]، مجید اسمعیلی‌زاد[۳] و زهرا یزدان‌پور[۴]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۱

چکیده

پاستورلا مولتوسیدا یک پاتوژن گرم منفی است که موجب بیماری در حیوان و انسان می‌شود. وبای مرغی و پاستوریولوز گوسفندی از عفونت‌های مهم *پاستورلامولتوسیدا* می‌باشد که ضرر و زیان‌های اقتصادی زیادی را به صنعت دامپروری وارد می‌سازد. عوامل حدت مختلفی در این باکتری شناسایی شده‌اند که لیپوپلی‌ساکارید جزء مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای آن محسوب می‌شوند. هدف از تایپینگ LPS بررسی اختلاف سویه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* بر اساس ژنتیک سنتز LPS می‌باشد. برای انجام تایپینگ مولکولی از کشت خالص هر جدایه با روش جوشاندن، استخراج DNA ژنومی انجام شد و ۳۲ جدایه *پاستورلامولتوسیدای* گوسفندی و ۳۰ جدایه از طیور با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنوتایپینگ لیپوپلی‌ساکاریدی به وسیله‌ی PCR، تعیین ژنوتیپ شدند. سپس، توالی نوکلئوتیدی محصولات PCR از هر ژنوتیپ مشخص و ارتباط آن‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید. نتایج نشان داد از ۳۲ جدایه‌ی گوسفندی، ۱۰ جدایه دارای ژنوتیپ L3 (۳۱/۲۵ درصد) بودند. در جدایه‌های طیور نیز ۱۸جدایه 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. از چهار ژنوتیپ لیپوپلی‌ساکارید *پاستورلا مولتوسیدا*، جدایه‌های گوسفندی تنها دارای ژنوتیپ L3 بودند ولی در مقابل، جدایه‌های طیور دارای ژنوتیپ‌های L3, L2, L1 بودند و هر دو میزبان فاقد ژنوتیپ L4 بودند. این نتایج نشان می‌دهد که فراوانی و پراکندگی ژنوتیپ‌های LPS بسته به نوع میزبان متفاوت می‌باشد. در مقایسه نتایج توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های بومی ایران با جدایه‌های موجود در بانک ژن یک اختلاف قابل توجه در ژنوتیپ L3 و به میزان کم‌تر در ژنوتیپ L1, L2 دیده شد.

کلمات کلیدی: *پاستورلا مولتوسیدا*، گوسفند، طیور، لیپوپلی‌ساکاریدتایپینگ

مقدمه

پاستورلا مولتوسیدا یک کوکوباسیل گرم منفی است که در خانواده‌ی پاستورلاسیه قرار دارد که موجب بیماری در حیوانات و انسان می‌شود و محدوده‌ی میزبانی گسترده با علایم کلینیکی متفاوت دارد (Christidou et al. 2005). این باکتری عامل ایجاد بیماری‌های مهم اقتصادی شناخته شده است که از مهم‌ترین آن‌ها وبای مرغی در پرندگان و عامل پنومونی در گوسفند و پنومونی هموراژیک در گاو و رینیت آتروفیک در خوک و غیره می‌باشد. عفونت ناشی از *پاستورلا مولتوسیدا* علاوه بر دام و طیور، در انسان نیز ممکن است رخ دهد که اهمیت بررسی این باکتری را نشان می‌دهد (Wilkie et al. 2012).

عوامل حدت مختلفی در این باکتری شناسایی شده که برخی از آن‌ها شامل کپسول، لیپوپلی‌ساکارید، توکسین، و پروتئین‌های غشای خارجی می‌باشد. یکی از فاکتورهای

[۱*] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
E-mail: jalali.fahimeh1950@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] دانشیار بخش تحقیق و تولید واکسن‌های بی‌هوازی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۳] استادیار بخش آزمایشگاه مرکزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۴] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

ویرولانس کلیدی این باکتری لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد که این لیپوپلی‌ساکارید نقش مهمی در بیماری‌زایی و تحریک سیستم ایمنی دارد و به عنوان یک آنتی‌ژن حفاظتی نیز مطرح می‌شود (Harper et al. 2006, Brogden and Rebers 1978). اندوتوکسین *پاستورلامولتوسیدا* دارای یک مولکول لیپید A و هسته‌ی پلی‌ساکاریدی که خود شامل هسته‌ی داخلی پایدار و هسته‌ی خارجی بسیار متغیر می‌باشد که هر سویه ساختار LPS متفاوتی را بیان می‌کند (Harper et al. 2011a, 2012, 2013a,b, 2014a,b, St.Michael et al. 2009). اندوتوکسین *پاستورلا مولتوسیدا* فاقدآنتی ژن O می‌باشد و به عنوان یک آنتی‌ژن تیپ خشن (Rough) مطرح می‌شود (Raetz and Whitfield 2002).

تنها روشی که سویه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* بر اساس لیپوپلی‌ساکارید طبقه‌بندی می‌کند روش سرولوژیکی هدلستون می‌باشد که بر پایه‌ی تست رسوبی منتشر در ژل استوار می‌باشد و بر اساس آن می‌توان سویه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* را به ۱۶ سروتیپ طبقه‌بندی کرد (Heddleston et al. 1972). امروزه روش‌های شناسایی و طبقه‌بندی مولکولی مبتنی بر PCR سریع و دقیق بوده و تیپ‌بندی LPS بر پایه‌ی PCR یک روش قابل قبول‌تری نسبت به روش هدلستون می‌باشد. ژن‌های بیوسنتزکننده‌ی هسته‌ی خارجی LPS *پاستورلامولتوسیدا* در یک لوکوس تک بین ژن‌های محافظت شده *priA* و *fpg* قرار گرفته است با آگاهی از ژن‌های بیوسنتزکننده‌ی لیپوپلی‌ساکارید در *پاستورلامولتوسیدا* می‌توان سویه‌ها را بر اساس ژن‌های بیوسنتزکننده‌ی هسته‌ی خارجی لیپوپلی‌ساکارید طبقه‌بندی نمود (Harper et al. 2011b). روش جدیدی بر پایه‌ی مولتی پلکس PCR به جای روش هدلستون در تیپ‌بندی *پاستورلا مولتوسیدا* برای تعیین ژنوتیپ لیپوپلی‌ساکارید توسط Harper و همکاران در سال ۲۰۱۴a به کار گرفته شده است که این روش سریع و مطمئن بوده و به جای تیپ‌بندی سرولوژیکی به کار می‌رود. مطالعه‌ی Harper بر روی سویه‌ی شاخص هر ۱۶سرووار هدلستون نشان می‌دهد که این سروارها تنها دارای ۸ ناحیه‌ی ژنی بیوسنتز کننده‌ی هسته‌ی خارجی لیپوپلی‌ساکاریدی می‌باشند در نتیجه می‌توان ۸ ژنوتیپ لیپوپلی‌ساکاریدی در جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* شناسایی نمود (Harper et al. 2014c). هر ژنوتیپ دارای تنوع در ساختار لیپوپلی‌ساکارید خود در نتیجه‌ی موتاسیون نقطه‌ای یا حذف در ناحیه‌ی ژن‌های بیوسنتزکننده‌ی هسته‌ی خارجی لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد که باعث تغییر در اجزای ساختاری و عملکرد لیپوپلی‌ساکارید باکتری می‌شود (Harper et al. 2014d). هدف از این مطالعه، انجام تایپینگ مولکولی بر اساس ژن‌های بیوسنتز کننده‌ی هسته‌ی خارجی LPS در جدایه‌های ایرانی و مقایسه‌ی نتایج، جهت بررسی تفاوت‌های موجود در ساختار لیپوپلی‌ساکارید در دو میزبان طیوری و گوسفندی می‌باشد و در نهایت نمونه‌های از هر ژنوتیپ توالی‌یابی می‌شوند و با نمونه‌های موجود در بانک ژن از نظر تشابه و عدم تشابه توالی نوکلئوتیدی مورد مقایسه قرار می‌گیرند. مطالعه‌ی فراوانی ژنوتیپ‌ها در نمونه‌های گوسفندی و طیور و نیز تعیین روابط فیلوژنیک آن‌ها می‌تواند اطلاعات قابل توجهی را در خصوص جدایه‌های ایرانی *پاستورلامولتوسیدای* ارائه نماید که زمینه‌ی بررسی اپیدمیولوژیکی و کنترل این باکتری مهم را فراهم می‌سازد. این بررسی که برای اولین بار روی جدایه‌های ایرانی صورت گرفته، باعث افزایش یافته‌های ما، در جهت شناخت بیش‌تر این باکتری در جدایه‌های ایرانی می‌گردد.

مواد و روش کار

همه‌ی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* مورد مطالعه از یک مجموعه نگهداری شده در مؤسسه‌ی رازی استفاده گردید جدایه‌های گوسفندی از استان‌های شیراز (۱۴)، اصفهان (۴)، قم (۷)، تهران (۵)، کرمان (۲) و جدایه‌های طیوری بیش‌تر متعلق به استان‌های شمالی کشور یعنی گیلان (۱۰)، مازندران (۱۲)، تهران (۷)، زنجان (۱) بودند.

۳۰ جدایه *پاستورلا مولتوسیدا* از طیور و ۳۲ جدایه از گوسفند در ابتدا از نظر گونه‌ی *پاستورلا مولتوسیدا* بودن به وسیله‌ی پرایمر KMT1 تأیید شدند. سپس ایزوله‌ها برای حضور یا عدم حضور ژن‌های بیوسنتز کننده‌ی هسته‌ی خارجی LPS که شامل ژن‌های (Pcq-nctA-gatF-latB) می‌باشد مورد آزمایش قرار گرفتند.

کشت‌های اولیه در محیط BHI با انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. بعد از تشخیص نهایی با روش جوشاندن (Boiling) از نمونه-های باکتریایی استخراج DNA به عمل آمد برای استخراج DNA به روش جوشاندن چند پرگنه باکتری در ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شده و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، مایع رویی جدا و از آن به عنوان DNA الگو جهت انجام PCR استفاده گردید. نمونه‌های DNA پس از انتقال به میکروتیوپ‌ها در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. اندازه‌گیری کمی غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ به منظور اطمینان از خلوص DNA استخراج شده انجام گردید.

در انجام آزمایش‌ها از مخلوط تجارتی آماده مصرف Ampliqon استفاده شد. در هر واکنش PCR، ۱۰µl از حجم واکنش را این مخلوط (۲X) و سایر اجزای PCR نظیر پرایمرهای Forward و Reverse (غلظت ۵ pmol) هر کدام ۱µl و نیز ماده ژنتیکی باکتری به مقدار ۲µl افزوده گردیده و نهایتاً با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر به مقدار ۶µl حجم نهایی هر واکنش در سطح ۲۰ میکرولیتر تنظیم شد. در این مطالعه، برای تکثیر ژن‌های هسته‌ی خارجی LPS از پرایمرهای اختصاصی در مقاله‌ی هارپر ۲۰۱۴a استفاده گردید (جدول ۱)، و از یک کنترل منفی برای تشخیص تکثیر غیراختصاصی و آلودگی در واکنش استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Eppendorof انجام شد. شرایط بهینه‌ی PCR طبق پروتکل زیر تعیین گردید ابتدا مرحله‌ی دناتوره DNA الگو به مدت ۱ دقیقه با دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد مرحله‌ی دوم شامل ۳۵ سیکل: مرحله‌ی دناتوره با دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، مرحله‌ی اتصال با دمای ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله‌ی طویل شدن با دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت مرحله‌ی طویل شدن نهایی با دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

به منظور مشاهده‌ی نتایج، ۵ µl از محصول PCR به همراه بافر لودکننده روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم برماید در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت نیم ساعت الکتروفورز شد که در این آزمایش از مارکر مولکولی ۱۰۰bp ترمو (Thermo) برای ژنوتیپ L1 و مارکر ۱۰۰bp سیناژن (Cinnagen) برای ژنوتیپ L2, L3 استفاده شد و به وسیله‌ی دستگاه UV وجود یا عدم وجود باند مشاهده و در نهایت جدایه‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور ژن‌های هسته‌ی خارجی LPS گروه‌بندی شدند.

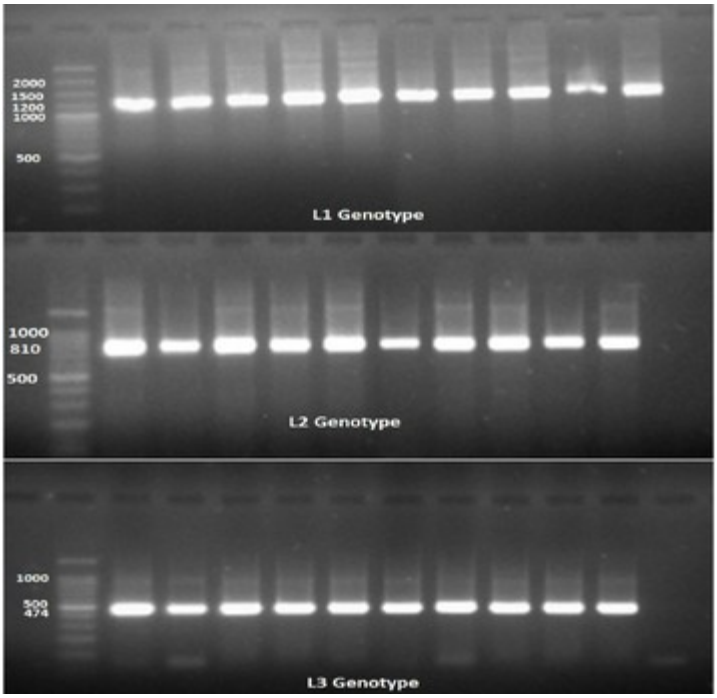
جدول ۱: توالی و جایگاه ژنتیکی پرایمرهای مورد استفاده در تعیین ژنوتیپ لیپوپلی‌ساکاریدی

Locus	Primer	Sequence	Location	Product size(bp)
L1	BAP6119 BAP6120	ACATTCCAGATAATACACCCG ATTGGAGCACCTAGTAACCC	Forward primerinpcgD Reverse primer in pcgB	۱۳۰۷
L2	BAP6121 BAP6122	CTTAAAGTAACACTCGCTATTGC TTTGATTTCCCTTGGGATAGC	Forward primerinnctA Reverse primer in nctA	۸۱۰
L3	BAP7213 BAP7214	TGCAGGCGAGAGTTGATAAACCATC CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA	Forward primer in gatF Reverse primer in gatF	۴۷۴
L4	BAP6125 BAP6126	TTTCCATAGATTAGCAATGCCG CTTTATTTGGTCTTTATATATACC	Forward primer in latB Reverse primer in latB	۵۵۰

در نهایت تعدادی از نمونه‌های مثبت که شامل ۳ نمونه‌ای که دارای ژنوتیپ چندگانه بودند (APM 04, 17, 20) و سایر نمونه‌ها به صورت انتخابی که شامل ۶ نمونه دارای ژنوتیپ L1 (APM 01, 08, 09, 26, 29, 30) و ۴ نمونه دارای ژنوتیپ L2 (APM 02, 10, 13, 14) و ۹ نمونه از ژنوتیپ L3 (APM 03, 11, 12, 15 و SPM 06, 16, 22, 27, 32) بودند برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی توسط پست DHL فرستاده شد. برای مشاهده‌ی توالی و تحلیل نتایج از برنامه‌ی Chromas و 5 Edit Sequence استفاده شد. هم ردیفی توالی جدایه‌های هر ژنوتیپ به همراه توالی‌های موجود در بانک ژن در فرمت نرم‌افزار Clustal W انجام شده سپس با استفاده از نرم‌افزار Mega5 درخت فیلوژنی رسم گردید. نتایج به دست آمده با توالی سویه‌های استاندارد پاستورلا مولتوسیدا موجود در بانک ژن مقایسه شد.

نتایج

با انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای چهار ژنوتیپ LPS ژنوتیپ جدایه‌های ایرانی تعیین شد. باندهای ۱۱۰۷bp و ۸۱۰bp و ۴۷۴bp به ترتیب نشان-دهنده‌ی ژنوتیپ‌های L3, L2, L1 می‌باشد که جدایه‌های گوسفندی تنها در ژنوتیپ L3 قرار گرفتند و جدایه‌های طیور دارای سه ژنوتیپ L3, L2, L1 بودند که باندهای مذکور در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژنوتیپ‌های L3, L2, L1 جدایه‌های گوسفندی و طیور بر روی ژل آگارز ۱ درصد ستون ۱ سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز، ستون ۲ تا ۱۱ نمونه‌های طیور و گوسفندی با ژنوتیپ L3, L2, L1 به ترتیب به اندازه‌ی ۱۳۰۷، ۸۱۰، ۴۷۴ جفت باز، ستون ۱۲ کنترل منفی

از ۳۲ جدایه‌ی گوسفندی، ۱۰ جدایه دارای ژنوتیپ L3 با فراوانی ۳۱/۲۵ درصد بود و از ۳۰ جدایه طیور ۱۸جدایه دارای ژنوتیپ L1 با فراوانی ۶۰ درصد، ۴ جدایه دارای ژنوتیپ L2 با فراوانی ۱۳/۳۳ درصد، ۵ جدایه دارای ژنوتیپ L3 با فراوانی ۱۶/۶۶ درصد، ۱ جدایه با هر دو ژنوتیپ L2, L3 با فراوانی ۳/۳۳ درصد و

۲ جدایه دارای هر سه ژنوتیپ L1, L2, L3 با فراوانی ۶/۶۶ درصد بودند (جدول ۲). نتایج نشان داد که جدایه-های گوسفندی تنها دارای ژنوتیپ L3 و فاقد ژنوتیپ‌های دیگر بود ولی جدایه‌های طیور دارای سه ژنوتیپ L1 و L2 و L3 بودند و هر دو میزبان فاقد ژنوتیپ L4 بودند. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، برخی ژنوتیپ‌ها دارای اختصاصیت میزبانی بوده که تنها در یک نوع میزبان دیده شده و یک ژنوتیپ هم مشترک بین دو میزبان گوسفندی و طیور بوده است. تعدادی از نمونه-های طیور دارای ژنوتیپ‌های چندگانه بودند که به عنوان یک ژنوتیپ جدید در نمونه‌های ایرانی شناخته شد.

جدول ۲: تعداد و فراوانی ژنوتیپ‌های LPS پاستورلامولتوسیدا در جدایه‌های بومی طیوری و گوسفندی

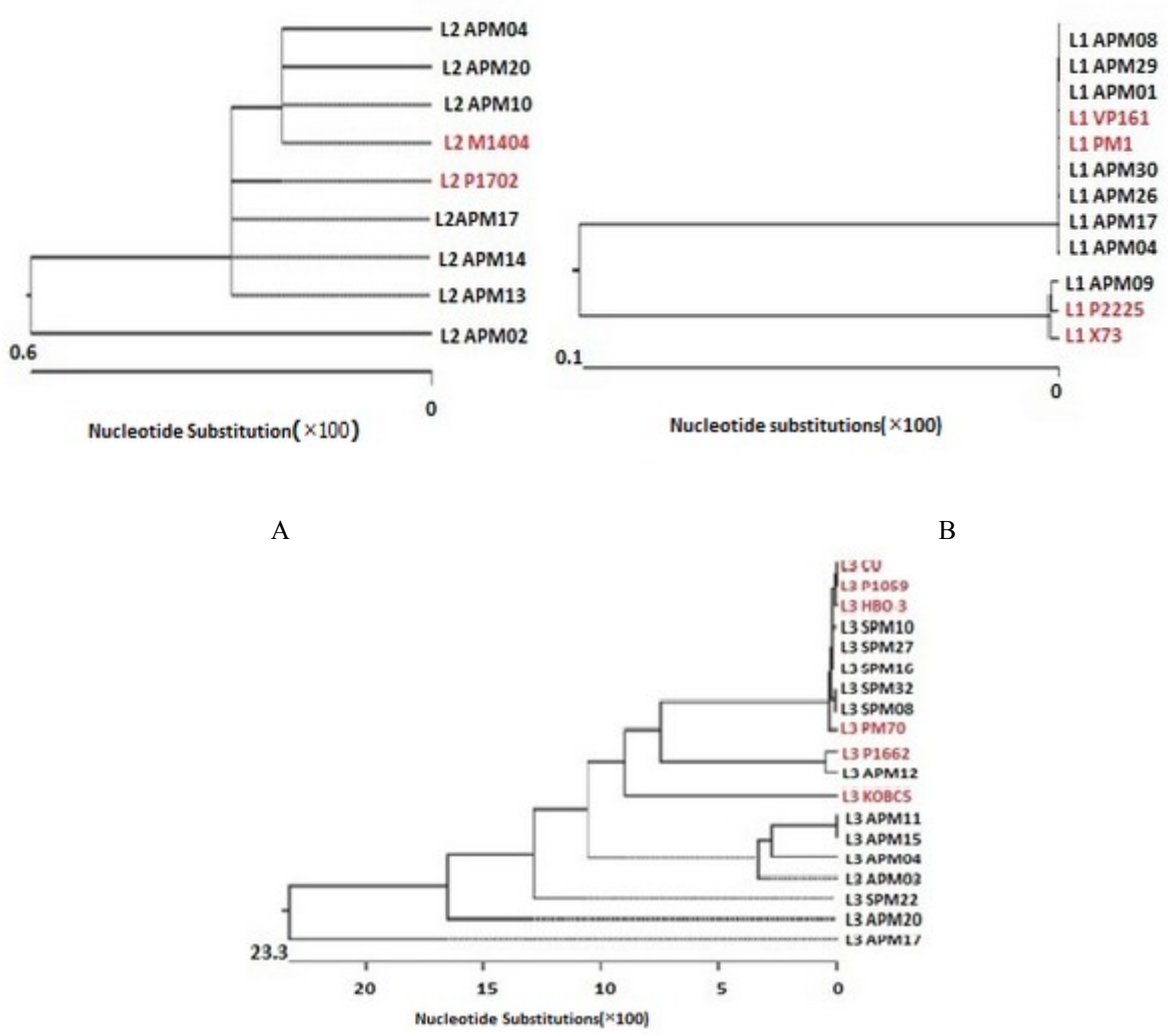
ژنوتیپ	ایزوله ها	تعداد	فراوانی
L1	APM01-APM05-APM06-APM08-APM09-APM16-APM18-APM19-APM21-APM22-APM23-APM24-APM25-APM26-APM27-APM28-APM29-APM30	۱۸	٪۶۰
L2	APM02-APM10-APM13-APM14	۴	٪۱۳/۳۳
L3	APM03-APM07-APM11-APM12-APM15	۵	٪۱۶/۶۶
	SPM06-SPM07-SPM08-SPM09-SPM10-SPM16-SPM22-SPM26-SPM27-SPM32	۱۰	٪۳۱/۲۵
L2-L3	APM20	۱	٪۳/۳۳
L1-L2-L3	APM04-APM17	۲	٪۶/۶۶

APM:(Avian P.multocida)- SPM:(Sheep P.multocida)

تعدادی نمونه از ژنوتیپ‌های مختلف طیوری و گوسفندی تعیین توالی شدند و از نظر قرابت ژنتیکی با توالی جدایه‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. روابط فیلوژنتیکی بر اساس ژن‌های لیپوپلی‌ساکارید جدایه‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار Megalin مورد ارزیابی و درخت فیلوژنیک رسم گردید. در این بررسی از *پاستورلا مولتوسیدا*های استاندارد ثبت شده در سایت NCBI به عنوان سویه‌های رفرانس استفاده شد (جدول ۳) (شکل ۲).

جدول ۳: شماره دسترسی *پاستورلا مولتوسیدا* های استاندارد ثبت شده در سایت NCBI

Isolate	Origin	Accession number
L1-VP161	Chicken	EU089981.1
L1-PM1	Cicken	HQ162666.1
L1-P2225	B0vine	HQ873312.1
L1-X73	Chicken	HQ873311.1
L2-M1404	Bovin	GQ444331.1
L2-P1702	Bovine	GQ444330.1
L3 – HBO3	S wine	CP003328.1
L3 – KOBC5	Swine	HQ162680.1
L3 – CU	Turkey	HQ162671.1
L3 – P1662	Turkey	HQ162670.1
L3 – P1059	Turkey	HQ162669.1
L3 – PM70	Avian	AE004439.1



شکل ۲: درخت فیلوژنی مربوط به بررسی میزان قرابت جدایه‌های تعیین توالی شده گوسفندی و طیور دارای ژنوتیپ L1 و L2 و L3 با جدایه‌های بانک ژن (رنگ قرمز)

APM:(Avian P.multocida)- SPM:(Sheep P.multocida)

در بررسی روابط فیلوژنیک جدایه‌های طیور دارای ژنوتیپ L1 و L2 یک تنوع ژنتیکی خیلی کمی را نشان داده است که این دو ژنوتیپ فقط در جدایه‌های طیوری بودند. در ژن L1، ۴ سویه در بانک ژن وجود داشت که اکثر نمونه‌های بومی با سویه‌های VP161 و PM1 (سویه-های بانک ژن) در یک گروه قرار گرفتند (شکل A). در ژن L2، تنها دو سویه در بانک ژن وجود داشت که تعدادی از جدایه‌های بومی با سویه‌ی M1404 (سویه بانک ژن) و تعدادی با سویه P1702 (سویه بانک ژن) دارای تشابه کامل بودند و یک جدایه بومی (APM02) نسبت به بقیه، یک درصد تنوع ژنتیکی ۰/۶ را نشان داده است (شکل B).

تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ L3 بیش‌تر از بقیه‌ی ژنوتیپ‌ها بوده که یک ژنوتیپ مشترک در طیور و گوسفند می‌باشد و یک درصد تنوع ژنتیکی ۲۳/۳ را نشان می‌دهد. در ژنوتیپ L3 ابتدا بر اساس میزبان دامی و طیور، در دو مجموعه مختلف با اختلاف ژنتیکی آشکار قرار گرفتند که فقط جدایه SPM22 گوسفندی در مجموعه‌ی طیور قرار

گرفته و نسبت به سایر جدایه‌های گوسفندی یک فاصله‌ی ژنتیکی را نشان می‌دهد. تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ L3 در جدایه‌های طیور، بیش‌تر از جدایه‌های گوسفندی دیده می‌شود (شکل C).

بحث

طبقه‌بندی هدلستون بر اساس آنتی‌ژن لیپوپلی-ساکاریدی بوده که با روش رسوبی ژل دیفیوژن پاستورلاها را به ۱۶ سروتیپ تقسیم می‌کند (Heddleston et al. 1972). تنها روش برای تایپینگ *پاستورلا مولتوسیدا* بر اساس LPS مبتنی بر سروتایپینگ هدلستون است که در اغلب موارد زمان‌بر بوده و قادر به تیپ‌بندی همه‌ی سویه‌ها نمی‌باشد و نیز در صحت گزارش‌های روش هدلستون تردید وجود دارد. امروزه روش‌های شناسایی و طبقه‌بندی مولکولی مبتنی بر PCR یک روش قابل قبول‌تری نسبت به روش هدلستون می‌باشد و دیگر روش تعیین تیپ با روش سروتیپی کم‌تر مطرح می‌شود (Rimler and Rhoades 1989).

در سال Harper ۲۰۱۴c با روش Multiplex PCR اقدام به تعیین ژنوتیپ بر اساس ژن‌های بیوسنتز هسته‌ی خارجی لیپوپلی‌ساکارید در سویه‌ی شاخص هر ۱۶ سروتیپ هدلستون پرداخت که توانست ۸ ژنوتیپ لیپوپلی‌ساکارید *پاستورلامولتوسیدا* را با این روش شناسایی نماید. این روش جدید PCR بر خلاف روش سروتیپی می‌تواند اکثر سویه‌ها را تعیین تیپ نماید. با این وجود، این روش نیز موارد محدودی از نمونه‌ها را در بر می‌گیرد و قادر به تعیین تیپ نمی‌باشد که ممکن است در نتیجه حذف ژنی در ناحیه‌ای باشد که پرایمر قرار می‌گیرد بنابراین یکی از مشکلات این روش می‌باشد. اگر چه بیش‌تر موتاسیون‌ها در ژن‌های بیوسنتز کننده‌ی لیپوپلی-ساکارید شامل موتاسیون‌های نقطه‌ای می‌باشد و پدیده‌ی حذف بسیار نادر بوده و در موتاسیون‌های نقطه‌ای هیچ تغییری در نتیجه محصول PCR ایجاد نمی‌شود و ژنوتیپ لیپوپلی‌ساکارید آن تعیین می‌شود.

مطالعات Harper و همکاران بیش‌تر بر روی نمونه‌های طیور بوده که با استفاده از Multiplex PCR، ژنوتیپ هشت‌گانه لیپوپلی‌ساکاریدی ۵۸ جدایه را بررسی نمود که شامل ژنوتیپ‌های L6, L4, L3, L1 بودند که ۱۰ جدایه غیرقابل تیپ‌بندی بودند که آنالیز سکانس نوکلئوتیدی نشان داد که ۹ جدایه شامل لوکوس ژنی LPS3 بودند با تفاوت نوکلئوتیدی قابل توجه در ناحیه‌ای که پرایمر قرار می‌گرفت و ۱ جدایه دارای ژنوتیپ LPS7 بود با حذف در ناحیه‌ای که پرایمر قرار می‌گرفت (Harper et al. 2014c, Dziva et al. 2008). در مقایسه با نتایج Harper، جدایه‌های طیوری *پاستورلا مواتوسیدای* این تحقیق دارای ژنوتیپ LPS2 و فاقد ژنوتیپ LPS4 بودند در صورتی که جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* طیوری در مطالعه‌ی Harper دارای ژنوتیپ LPS4 و فاقد ژنوتیپ LPS2 بودند که این نشان دهنده‌ی تفاوت اپیدمیولوژی ژنوتیپ‌ها در یک میزبان در موقعیت‌های مختلف جغرافیایی می‌باشد.

طبقه‌بندی جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا بر اساس ژنوتیپ LPS نسبت به روش‌های سروتایپینگ آن یک روش تایپینگ جدیدی می‌باشد که اطلاعاتی در مورد تنوع ساختار لیپوپلی‌ساکارید در میزبان‌های مختلف به ما می‌دهد که این متد تایپینگ اطلاعات مفیدی بر اپیدمیولوژی ژنوتیپ‌ها و نتیجه‌گیری کردن از این اطلاعات در جهت کنترل این بیماری را به ما می‌دهد. تا کنون از روش LPS-PCR Typing جهت تایپینگ پاستورلا مولتوسیدا در ایران استفاده نشده که با توجه به اهمیت شناخت این باکتری، این مطالعه می‌تواند اطلاعات قابل توجهی بر پایه‌ی ژنتیک سنتز LPS در جدایه‌های ایرانی به ما بدهد.

آنالیز توالی‌های ژنوتیپ‌های L1, L2 با توالی‌های سایر کشورهای دیگر موجود در بانک ژن درصد بالایی از تشابه را نشان داده که حاکی از این می‌باشد که ژن‌های L1, L2 *پاستورلامولتوسیدا* تغییرات ژنتیکی بسیار کمی دارند. تنها ژنوتیپ L3 تنوع ژنتیکی آشکاری را نشان داده است که یک ژنوتیپ مشترک بین طیور و گوسفند

بوده است و نیز نشان داده شده که پراکندگی ژنوتیپ‌ها، بسته به نوع میزبان متفاوت می‌باشد که برخی ژنوتیپ‌ها اختصاصی یک نوع میزبان بوده و برخی مشترک بین دو میزبان بودند و نیز فراوانی برخی ژنوتیپ‌ها در یک میزبان خاص بیش‌تر از سایر ژنوتیپ‌های دیگر می‌باشد. مانند ژنوتیپ L1 که در نمونه‌های طیور و L3 در نمونه‌های گوسفندی دارای بیش‌ترین فراوانی بوده است.

در این مطالعه برخی نمونه‌ها دارای ژنوتیپ چندگانه LPS بودند که خود ژنوتیپ‌های جدیدی را در نمونه‌های ایرانی به وجود آوردند که ممکن است کاندید مناسب برای واکسن‌های سلولی کشته شده باشند. به دلیل اثر حفاظتی گسترده‌ای که دارند و نیز چون هنوز واکسن اختصاصی پاستوریولوز گوسفندی وجود ندارد LPS تایپینگ می‌تواند اطلاعاتی در جهت تهیه و تکامل واکسن‌های اختصاصی پاستوریولوز گوسفندی به ما ارایه نمایند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از یک طرح تحقیقاتی مؤسسه‌ی تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج می‌باشد که با حمایت مالی این مؤسسه انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان از تمامی همکاران بخش آزمایشگاه مرکزی به پاس همکاری، صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نمایند.

منابع

Brogden, K.A. and Rebers, P.A. (1978). Serologic examination of the Westphal-type lipopoly saccharides of *Pasteurella multocida*. American Journal of Veterinary Research, 39: 1680-1682.

Christidou, A.; Maraki, S.; Gitti, Z. and Tselentis, Y. (2005). Review of *P. multocida* infection over a twelve-year periodin a Tertiary care Hospital. Greece, American Journal of Infectious Diseases, 1(2): 107-110.

Dziva, F.; Muhairwa, A.P.; Bisgaard, M. and Christensen, H. (2008). Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology, 128(1): 1-22.

Harper, M.; John, D.; Boyce, J.D. and Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiology Letter, 265: 1-10.

Harper, M.; St Michael, F.; John, M.; Vinogradov, E.; Adler, B.; Boyce, J.D. and cox, A.D. (2011a). *Pasteurella multocida* Heddleston serovars 1and 14 express different lipopolysaccharide structures but share the same lipopolysaccharide biosynthesis outer core locus. Veterinary Microbiology, 150:289-296.

Harper, M.; Cox, A.D.; Adler, B. and Boyce, J.D. (2011b). *pasteurella multocida* lipopolysaccharide: the long and the short of it. Veterinary Microbiology, 153: 109-115.

Harper, M.; St Michael, F.; Vinogradov, E.; John, M.; Boyce, J.D.; Adler, B. et al. (2012). Characterization of the lipopolysaccharide from *Pasteurella multocida* Heddleston serovar9: identification of a proposed bi-functional dTDP-3-acetamido-3,6-dideoxy - {alpha} - D-glucose biosynthesis enzyme. Glycobiology, 22: 332-344.

Harper, M.; St.Michael, F.; John, M.; Vinogradov, E.; Steen, J.A.; van Dorsten, L. et al. (2013a). *Pasteurella multocida* Heddleston serovar 3 and 4 strains share a common lipopolysaccharide biosynthesis locus but display both Inter-and intrastrain lipopolysaccharide heterogeneity. Journal of Bacteriology, 195: 4854-4864.

Harper, M.; St Michael, F.; Vinogradov, E.; John, M.; Steen, J.A.; Van Dorsten, L. et al. (2013b). Structure and biosynthetic locus of the lipopolysaccharide produced by *Pasteurella multocida* serovars 8 and 13 and the identification of a novel phospho-glycero moiety. Glycobiology, 23: 286-294.

Harper, M.; St Michael, F.; Steen, J.; John, M.; Van Dorsten, L.; Parnas, H. et al. (2014a). Structural analysis of lipopolysaccharide produced by Heddleston serovars 10,11,12 and 15 and the identification of a new *pasteurella multocida* lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus, L6. Glycobiology, 24: 649-659.

Harper, M.; St Michael, F.; Steen, J.A.; John, M.; Wright, C.L.; van Dorsten, L. et al. (2014b). Characterisation of the lipopolysaccharide produced by *Pasteurella multocida* serovars 6,7 and 16; identification of lipopolysaccharide genotypes L4 and L8. Glycobiology, 25(3): 294-302.

Harper, M.; John, M.; Turni, C.; Edmunds, M.; St.Michael, F.; Adler, B. et al. (2014c). 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.

Harper, M.; St Michael, F.S.; Steen, J.A.; John, M.; Wright, A.; van Dorsten, L. et al. (2014d). Characterisation of the lipopolysaccharide produced by *Pasteurella multocida* serovars 6,7 and 16; identification of lipopolysaccharide genotypes L4 and L8. Glycobiology, 25: 3, 294-302.

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

Raetz, C.R. and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review Biochemistry, 71: 635-700.

Rimler, R.B. and Rhoades, K.R. (1989). *Pasteurella multocida.* In Adlam C. and Rutter JM (eds) Pasteurella and pasteurellosis, Academic Press, London, 37-73.

St Michael, F.; Harper, M.; Parnas, H.; John, M.; Stupak, J.; Vinogradov, E. et al.(2009). Structural and genetic basis for the serological differentiation of *Pasteurella multocida* Heddleston serotypes 2 and 5. Journal of Bacteriology, 191: 6950-6959.

Wilkie, I.W.; Harper, M.; Boyce, J.D. and Adler, B. (2012). *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. Current Topics in Microbialogy Immunology, 361: 1-22.

Typing ovine and avian *Pasteurella multocida* isolates from Iran based on LPS outer core biosynthesis loci (L1-L4)

Mirhaghgoye Jalali, S.F.[1]; Jabbari, A.R.[2]; Esmaelizad, M.[3] and Yazdan pour, Z.[1]

Received: 06.01.2018 Accepted: 23.07.2018

Abstract

Pasteurella multocida is a negative gram pathogenic bacteria that causative agent of many diseases in animals and man. Fowl cholera and ovine pasteurellosis are of the most common infection of *P. multocida* that these diseases economic damage entered into the livestock industry. Different virulence factors of *P. multocida* have been introduced that LPS have an important role in virulence of the organism. The aim of LPS typing is determination differences between *P. multocida* strains based on LPS synthesis genetics. For perform molecular typing, DNA extraction was done with the using of a boiling method of each bacterial isolate culture and genotyping done on 32 ovine isolate and 30 avian isolates by PCR with using of specific primers for LPS genotyping experiment. The amplified LPS genes by PCR, then were sequenced and compared to the sequences deposited in the GenBank database from the world. Of the 32 ovine isolates only 10 isolates were contained L3 genotype (%31.25) and of 30 avian isolates 18 isolates were contained L1 genotype (%60), 4 isolates contain L2 genotype (%13.32), 5 isolates contain L3 genotype (%16.66), 2 isolates contain all three genotypes L1, L2, L3 (%6.66), 1 isolate contain both genotype L2, L3 (%3.33). Of the 4 genotypes, ovine isolates were only contain L3 genotype in against, avian isolates were contained L1, L2, L3 genotypes that this was indicated the distribution of LPS genotypes is different based on host type. The sequencing results of Iranian isolates with GenBank isolates showed a significant difference in L3 genotype and less difference in L1, L2 genotypes.

Key words: *Pasteurella multocida*, Ovine, Avian, Lipopolysacarid typing

1- MSc Graduated from Medical Microbiology, Razi Vaccines and Serum Research Institute, Karaj, Iran
2- Associate Professor, Department of Anaerobic Bacterial Vaccines Reserch, Razi Vaccines and Serum Research Institute, Karaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Central Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
Corresponding Author: Merhaghgoye Jalali., E-mail: jalali.fahimeh1950@gmail.com