مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره چهارم (پیاپی ۳۳) زمستان ۱۳۹۶
صفحات ۳۶۸-۳۶۰

Original Article

ارزیابی بیماری زایی و پلی مورفیسم ژن *omph* پاستورلا مولتاسیدا

مریم اولاد[۱]، یحیی تهمتن*[۲]، نوشین سهرابی[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه پیام نور، واحد ری تهران، ایران، [۲] دانشیار، شعبه شیراز، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران، [۳] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: پاستورلا مولتاسیدا باکتری گرم منفی است که باعث بیماری های تنفسی در حیوانات اهلی و وحشی می شود. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری پاستورلا مولتاسیدا و نیز بررسی پلی مورفیسم ژن *ompH* در این باکتری انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی تعداد ۱۶۰ نمونه سوآب بینی و حلق از بزهای مبتلا به پاستورلوز در استان فارس جمع آوری گردید. طبقه بندی مولکولی و پلی مورفیسم ۲۶ جدایه با روش PCR-RFLP و به کمک آنزیم های برش دهنده *Hin*dIII و *Eco*RI انجام گرفت. هر نمونه با غلظت نیم مک فارلند به دو سر موش تزریق شد. پس از برش ژن *ompH* توسط آنزیم های اندونوکلئاز، در نهایت الگوهای ایجاد شده با مدت زمان مرگ موش ها مقایسه گردید.

یافته ها: آنزیم های *Hin*dIII و *Eco*RI هر کدام الگوهای متفاوتی ایجاد کردند که در مقایسه با میانگین زمان مرگ موش ها قابل توجه بود. تمامی جدایه های کشنده میانگین زمان مرگ زیر ۲۴ ساعت داشتند. همچنین از مجموع ۲۹ پاستورلا مولتاسیدا جدا شده، ۸۹/۶ درصد قادر به مرگ موش ها بودند.

نتیجه گیری: با توجه به الگوهای ایجاد شده، مدت زمان مرگ در موش ها نیز متفاوت بود. بر این اساس نمونه های دارای الگوهای پر تکرار موش ها را در زمان کوتاهتری از بین بردند و کشنده تر بودند. الگوهای ناشی از هضم آنزیمی به منظور شناسایی سویه های حاد و بیماری زا و در نتیجه تهیه سویه های واکسینال به کار می رود. بنابراین با توجه به تنوع پذیری این سویه ها تهیه واکسن های چندگانه ضرورت پیدا می کند.

واژگان کلیدی: پاستورلا مولتاسیدا، پلی مورفیسم، روش PCR-RFLP.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۶

مقدمه

خانواده پاستورلاسه کوکوباسیل هایی به اندازه ۰/۲ تا ۲ میکرومتر و دارای پلی مورفیسم می باشند و اشکال برآمده و رشته ای شکل نیز در آنها دیده می شود. این باکتری ها گرم منفی، بی حرکت، بی هوازی اختیاری و مزوفیل می باشند. همچنین به طور معمول نسبت به پنی سیلین و آنتی بیوتیک های بتالاکتام حساس می باشند (۱ و ۲). اولین بار در سال ۱۸۸۰ لویی پاستور شیمیدان فرانسوی، باکتری پاستورلا (*Pasteurella*) را شناسایی نمود. نام این جنس به پاس زحمات این دانشمند پاستورلا گذاشته شد. در این خانواده پنج جنس وجود دارد. پاستورلا مولتاسیدا (*Pasteurella multocida*) یکی از گونه های این خانواده است که به صورت هم زیست در قسمت فوقانی دستگاه تنفسی و سیستم گوارشی حیوانات اهلی و وحشی وجود دارد. این باکتری در حیواناتی مانند بز وگوسفند سبب پاستورولوز تنفسی و ذات الریه می شود (۳). پاستورولوز یکی از عفونت های مهم متداول و شایع گوسفند و بز در مناطق گرم و معتدل استوایی

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، میدان صنایع الکترونیک، موسسه رازی شیراز.
تلفن: ۰۷۱۳۶۲۴۰۳۳۱ پست الکترونیک: yahyatahamtan@yahoo.com

است که باعث کاهش وزن و مرگ بسیاری از آنها می شود. از این رو ضرر و زیان های اقتصادی زیادی را به صنعت دامپروری وارد می سازد. این باکتری در پنجاه سال اخیر موجب بیماری در انسان شده است (٤).

سویه های *پاستورلا مولتاسیدا* بر اساس آنتی ژن کپسولی به پنج سروتیپ A، B، D، E و F تقسیم بندی می شوند. دو سروتیپ A و D در ایجاد پنومونی درگوسفند و بز در ایران مهم می باشند (٥ و ٦). *KMT1* ژنی است که برای تشخیص مولکولی *پاستورلا مولتاسیدا* استفاده می شود و پرایمری به نام ALL PASS برای آن طراحی شده است. ارتباط مهمی بین پاستورولوز تنفسی و مهم ترین ژن های بیماری زا مانند*ompH*، *hgbA*، *ptfA* و *toxA* وجود دارد (٧).

ژن *omp* سنتز کننده پروتئین غشای خارجی است. *omp* درجه مختلفی از ناهمگونی درون گونه ای را نشان می دهد. این امر می تواند برای ارزیابی تنوع درون گونه ای و تعیین روابط اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرارگیرد.*ompH* مهم ترین ژن باکتری *پاستورلا مولتاسیدا* است که نقش بسزایی در ایمنی زایی دارد. این ژن کدکننده پروتئین *OmpH* در سطح غشای باکتری است و یکی از عوامل مهم بیماریزائی در باکتری *پاستورلا مولتاسیدا* می باشد (٨). امروزه برای شناسائی این باکتری علاوه از آزمون های بیوشیمیائی از روش های مولکولی با حساسیت و اختصاصیت ویژه استفاده می شود. یکی از روش های مولکولی شناسائی و طبقه بندی *پاستورلا مولتاسیدا* *روش* RFLP (Restericition Fragment Lengh Polymorphism) است که پلی مورفیسم بین گونه ها را مشخص می نماید. این روش برای تایید محصول PCR و نیز شناسایی جهش در یک جایگاه باز شناسی آنزیم های برش دهنده مورد استفاده قرار می گیرد (١).

همچنین با این روش می توان ژن *ompH* را شناسایی کرد و به عنوان الگویی برای تمایز گونه های *پاستورلا مولتاسیدا* استفاده نمود (٩). تاکنون بیشتر مطالعات بر روی خوک و پرندگان صورت گرفته است (٨). از آنجایی که در ایران نیز مطالعات کمتری بر روی بز صورت گرفته و از طرفی این حیوان از لحاظ اقتصادی و صنایع غذایی اهمیت دارد، تحقیق در زمینه عوامل بیماری پاستورلوز و تنوع ژنتیکی سویه های بیماریزای آن ضرورت دارد. دانش لاری (Danesh Lari) و همکاران در سال ٢٠١٠ مطالعه ای بر روی عوامل بیماری زای *پاستورلا* در بز و گوسفند انجام دادند (١٠). همچنین گانگ کیو (Gong Q) و همکاران در سال ٢٠١٢ در مطالعه ای نقش ژن *ompH* را در بیماری زایی *پاستورلا* تائید نمودند (١١).

هدف از مطالعه حاضر شناسائی و جداسازی سویه های *پاستورلا مولتاسیدا* و نیز بررسی پلی مورفیسم در جدایه های یاد شده در بز بود.

مواد و روش ها

الف) انتخاب نمونه: در این مطالعه، تعداد ١٦٠ نمونه سوآب از لوزه و بینی بزهای دارای علائم تنفسی و نمونیا شهرستان های شیراز، کوار، زرقان، مرودشت و سروستان در استان فارس جمع آوری گردید. نمونه ها به طورمستقیم بر روی محیط بلاد آگار (هایمدیا، هند) کشت داده شدند و سپس به آزمایشگاه باکتری شناسی منتقل گردیدند.

ب) شناسایی اولیه باکتری: پلیت های کشت داده شده به مدت یک شب در دمای ٣٧ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. بر روی کلنی های مشکوک به باکتری *پاستورلا مولتاسیدا* با استفاده از رنگ آمیزی گرم و آزمون های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، اکسیداز، اندول، سیترات، احیای نیترات، کشت بر روی محیط مک کانکی آگار، اوره، بتاگالاگتوزیداز، MR، VP و TSI مورد ارزیابی قرار گرفتند (١٢ و ١٣). کلونی هایی که به صورت کوکو باسیل های نزدیک بهم و دارای رنگ صورتی بودند به عنوان نمونه های مشکوک *پاستورلا* انتخاب شدند.

ج) استخراج DNA: در ابتدا یک میلی لیتر از کشت ٢٤ ساعته باکتری در محیط مایع BHI (Brain Heart Infusion) (مرک، آلمان) با دور ٤٠٠٠ به مدت ١٠ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از حذف روماند، به منظور استخراج DNA از کیت DNP، سیناژن، ایران و مطابق با دستورالعمل شرکت شازنده استفاده گردید. محلول لیز کننده به رسوب اضافه شد و پس از حل

شدن رسوب به مدت ۱۰ دقیقه در آب در حال جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن میکروتیوب با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. روماند به عنوان DNA الگو مورد استفاده قرار گرفت.

د) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): در این مطالعه به منظور تکثیر ژن های *kmt1* و *ompH* از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X ، کلرید منیزیم ۰/۷۵ میکرومول، dNTPs ۲ میکرومول، ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر از الگو و ۱/۵ واحد آنزیم DNA Taq پلی مراز انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترمال سیکلر (اپندورف، آلمان) با شرایط واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۳ درجه سلیسیوس به مدت ۳ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA ژنومی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس به مدت ٤ دقیقه انجام شد (۷). محصولات PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند و در دستگاه ژل داک (کوداک، آمریکا) مشاهده گردیدند (۹).

ه) انجام PCR-RFLP: در ابتدا مقدار ٤ میکرولیتر از محصول PCR، ۲ میکرو لیتر از PCR Buffer 10X و ۱ میکرولیتر از هر کدام از آنزیم های برش دهنده *Eco*RI و *Hin*dIII (فرمنتاز، آلمان) در میکروتیوپ های جداگانه مخلوط شدند و در دستگاه ترموبلاک (Astec, Block Incubator, Japan) به مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. سپس میکروتیوب ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلیسیوس قرار گرفتند تا آنزیم غیرفعال شود. در نهایت محصول بر روی ژل آگاروز انتقال یافت و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داک عکس برداری گـــردیـد.

و) آزمون کشندگی در موش: باکتری ها از محیط بلاد آگار بر روی محیط BHI کشت داده شدند. پس از ٢٤ ساعت نیم میلی

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه (١٤).

پرایمر	توالی	اندازه قطعات (جفت باز)
KMTSP6-f	ATCCGCGATTTACCCAGTGG	٤٦٠
KMTSP6-r	GCTGTAAACGAACTCGCCAC	
OMPH-f	ACTATGAAAAAGACAATGGTAG	١٢٠٠
OMPH-r	GATCCATTCCTTGCAACTTATT	

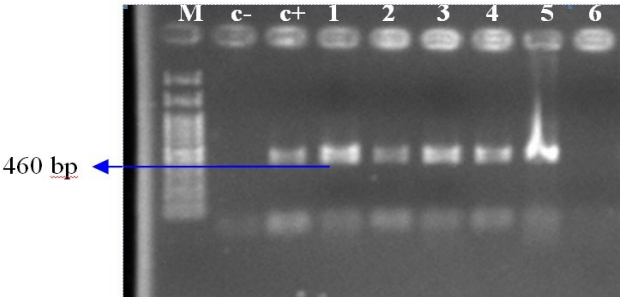
لیتر از هر نمونه با غلظت نیم مک فارلند به دوسر موش (نژاد balb/C) به صورت صفاقی با سرنگ انسولین تزریق شد. موش ها پس از تزریق به مدت ۷۲ ساعت تحت نظر قرار گرفتند (۱۲). زمان مرگ برای هر کدام از موش ها ثبت شد و با الگوهای ایجاد شده توسط روش PCR-RFLP مقایسه گردید.

ز) تجزیه و تحلیل آماری: به منظور آنالیز داده ها از نسخه پانزدهم نرم *افزار SPSS* و آزمون های آماری آنالیز واریانس (ANOVA) آزمون های t-student و مربع کای استفاده گردید.

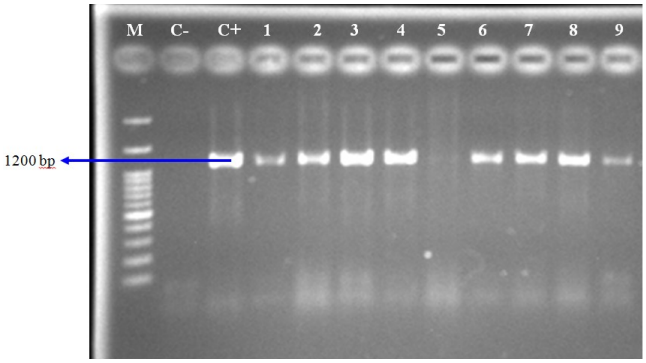
یافته ها

در این مطالعه از مجموع ١٦٠ نمونه سوآب گلو و بینی بزهای دارای علایم تنفسی، تعداد ٤١ نمونه دارای کلنی های گرد خاکستری و برآمده بر روی محیط بلاد آگار و مشکوک به *پاستورلا مولتاسیدا* بودند. این باکتری بر روی محیط کشت مک کانکی قادر به رشد نمی باشد. بنابراین از این ویژگی در شناسایی باکتری استفاده شد (شکل ۱). با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی ۳۱ جدایه به عنوان *پاستورلا مولتاسیدا* شناخته شد. در تمامی جدایه ها آزمون های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، اندول، بتا گالاکتوزیداز و احیای نیترات مثبت بود. اما آزمون های حرکت، MR، VP، اوره و رشد بر روی محیط مک

شکل ۱: کلنی های صاف و خاکستری مدور *پاستورلا*.



شکل ۲: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *kmt1*. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، C-) کنترل منفی، +C) کنترل مثبت، ستون های ۱ تا ۵) نمونه های حاوی ژن *kmt1* (٤٦٠ جفت باز)، ستون ٦) نمونه فاقد ژن *kmt1*.



شکل ۳: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *ompH*. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، C-) کنترل منفی، +C) کنترل مثبت، ستون های ۱ تا ٤ و ٦ تا ۹) نمونه هـای حاوی ژن *ompH* (۱۲۰۰ جفت باز)، ستون ۵) نمونه فاقد ژن *ompH*.

کانکی منفی گزارش گردید. از ۱٦۰ نمونه مورد بررسی ۲۹ نمونه (۱۲/۱۸ درصد) دارای ژن *kmt1* بودند و به عنوان *پاستورلا مولتاسیدا* شناسائی شدند (شکل ۲). پس از تایید مولکولی جدایه های *پاستورلا مولتاسیدا*، وجود ژن *ompH* در سویه ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۲۹ جدایه، تعداد ۲٦ نمونه (۸۹/٦۵٪) ژن *ompH* را داشتند (شکل ۳). از مجموع ۲۹ *پاستورلا مولتوسیدا* تشخیص داده شده، ۲٦ (۸۹/٦۵٪) باکتری قدرت بیماری زایی با میانگین زمان مرگ متفاوتی در موش داشتند. اما سه سویه فاقد ژن *ompH*، نتوانستند موش ها را بکشند. موش هایی که باکتری های حاوی ژن *ompH* را دریافت کرده بودند، در مدت زمان ۸ تا ۲٤ ساعت از بین رفتند. ۷ سرموش در طی ۲٤ ساعت، ۹ سر در ۱٦ ساعت و ۱۰ سر باقیمانده در۸ ساعت از بین رفتند. ۳ سر موشی که نمونه باکتری فاقد ژن *ompH* را دریافت کرده بود، پس از مدت زمان ۲٤ ساعت همچنان زنده ماندند (جدول ۲). محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *ompH* در ۲٦ نمونه باکتری، با دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*dIII برش زده شد. نتایج نشان داد که هر کدام از آنزیم ها الگوی متفاوت برشی دارند (شکل ٤) (جدول ۲). زمان مرگ موش ها (MDT) با توجه به جدایه هایی که الگوی های خاصی از دو آنزیم داشتند نیز در این جدول مشخص شده است. در مجموع تعداد ۱۹ جدایه با آنزیم برش دهنده *Eco*RI الگوی I بدون برش و ۷ نمونه باقی مانده الگوی II ایجاد کردند. اما الگوهای ایجاد شده در اثر آنزیم برش دهنده *Hin*dIII در ۱٦ جدایه II و ۱۰ نمونه III بود.

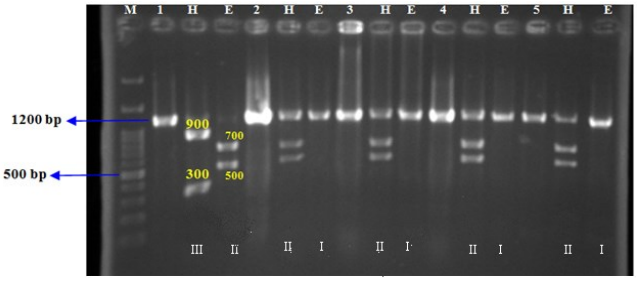
بحث

در این مطالعه از ۲۹ جدایه تنها ۲٦ جدایه توانستند موش ها را در زمان های مختلف بکشند. در مطالعه انجام شده توسط راجینی (Rajini) در سال ۱۹۹۵ بر روی جدایه های *پاستورلا مولتاسیدا* حاد پرندگان، مشخص گردید که از ۱۱ جدایه

جدول ۲: مقایسه زمان مرگ موش ها و الگوی های حاصل از برش دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*dIII در زمان های مشخص.

تعداد کل موش	زمان مرگ موش (ساعت)	تعداد موش از بین رفته	***Hin*dIII**			***Eco*RI**		
			I	II	III	I	II	III
۲۹	۸	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰
	٦-۱٦	۹	۰	٦	۳	٦	۳	۰
	۱٦-۲٤	۷	۰	۰	۷	۳	٤	۰
	تعداد موش از بین رفته با توجه به الگوی برش	۲٦	۰	۱٦	۱۰	۱۹	۷	۰

I: بدون برش، II:دو قطعه ۵۰۰-۷۰۰جفت بازی ، III: دو قطعه ۳۰۰-۹۰۰ جفت بازی



شکل ٤: نتایج RFLP با دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*dIII. حرف E) *Eco*RI و حرف H) *Hin*dIII) M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون های ۱ تا ۵) محصولات PCR، حروف I، II و III در زیر شکل الگوهای ایجاد شده توسط آنزیم های *Eco*RI و *Hin*dIII می باشد. آنزیم *Eco*RI دو نوع الگوی I و II و آنزیم *Hin*dIII دو نوع الگوی II و III را ایجاد نمودند.

پاستورلا مولتاسیدا تعداد ۱۰ جدایه دارای میانگین زمان مرگ کوتاه تر و در نتیجه کشندگی بیشتری بودند. همچنین یک جدایه میانگین زمان مرگ طولانی تر و حدت کمتری داشت (۱۵). در مطالعه احمد وفا (Ahmad Waffa) و همکاران در مالزی در سال ۲۰۱٤ با تزریق *پاستورلا مولتاسیدا* به ۳٦ سر موش، علایم بالینی ۲٤ ساعت پس از تزریق در آنها ظاهر شد و موش ها در مدت ۷۲ ساعت از بین رفتند (۱٦). این در حالی است که در مطالعه محمد مقداد (Mohammad Muqdad) و همکاران در عراق در همان سال بر اثر تزریق باکتری یاد شده به ٦٦ سر موش در ۳ گروه، موش ها بر اثر شدت ضایعه در مدت ۷۲-٤۸ ساعت از بین رفتند (٦).

همچنین در مطالعه مسدوک (Masdooq) و همکاران در نیجریه در سال ۲۰۰۸ از ۱٦ *پاستورلا مولتاسیدا* جدا شده، تنها ۱۲ مورد قادر به ایجاد مرگ در موش بودند (۱۷). گوکبن و آدیل (Gokben & Adil) در سال ۲۰۰٦ نیز از پرندگان مبتلا به بیماری های تنفسی ٦/٤ درصد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا کردند. آنها پس از تزریق به موش و کشته شدن موش ها، توانستند باکتری را از ریه و قلب موش دوباره جداسازی نمایند (۱۸). این تحقیقات، یافته های این مطالعه را تایید می کند که بعضی از سویه های *پاستورلا مولتاسیدا* از حدت بیشتری برخوردار بوده و کشنده تر هستند. تمام جدایه های دارای ژن *ompH* موش ها را در زمان ۲٤ ساعت کشتند. اما سه جدایه فاقد این ژن قادر به کشتن موش ها نبودند. بنابراین احتمالاً ژن *ompH* *پاستورلا مولتاسیدا* نقش مهمی در ایجاد بیماری و سپس مرگ موش ها ایفا می نماید. دانش لاری (Danesh Lari) و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۰ اهمیت دو ژن *ompH* و *toxA* را در بیماری زایی باکتری *پاستورلا مالتوسیدا* نشان دادند (۱۰). گانگ (Gong) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تحقیقی بیماری زایی باکتری *پاستورلا* و نقش ژن *ompH* را در بیماری زایی باکتری تائید کردند (۱۱).

همچنین یافته های مونتسرات (Montserrat) و همکاران در سال ۲۰۰۲ نقش *ompH* را در بیماری زایی *پاستورلا* نشان می دهد (۱۹). یافته های دیویس (Davies) و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز به نقش این ژن در بیماری زایی باکتری *پاستورلا* اشاره دارد (۸). در اثر برش با آنزیم های برش دهنده، آنزیم *Eco*RI دو الگوی I و II و آنزیم *Hin*dIII دو الگوی II و III را ایجاد کردند. از مجموع نمونه ها، تعداد ۱۹ جدایه با آنزیم *Eco*RI الگوی I بدون برش و ۷ نمونه باقی مانده الگوی II را ایجاد کردند. در حالی که الگوهای ایجاد شده در اثر آنزیم *Hin*dIII در ۱٦ جدایه II و ۱۰ نمونه III بود. اما براساس نتایج بوگلارکا (Boglarka) و همکاران در سال ۲۰۱۲ با ۳ آنزیم برش دهنده *Dra*I، *Hin*dIII و *Pvu*I بر روی ژن مشابه پنج الگو ایجاد شد (۹).

جباری (Jabbari) و همکاران در سال ۲۰۰٦ موفق شدند ژن *ompH* را توسط آنزیم های برش دهنده *Hin*dIII، *Eco*RI و CfoI جدایه های *پاستورلا مولتاسیدای* پرندگان را بر اساس پلی مورفیسم ایجاد شده طبقه بندی نمایند. نتایج نشان داد که الگوی های نوع ۱، ۲ و ۳ ایجاد شده توسط PCR-RFLP از جدایه های حاد این باکتری در پرندگان می باشد (۱٤). در حالی که در مطالعه حاضر نیز بیشترین تعداد جدایه های حاد دارای میانگین زمان مرگ زیر ۱٦ ساعت، دارای الگوی I و II برای برش ژن *ompH* با آنزیم های *Eco*RI و *Hin*dIII بود. یافته های این بررسی حاکی از این موضوع است که آنزیم *Hin*dIII در مقایسه با آنزیم Eco*RI* بر روی ژن *omph* با ایجاد برش های بیشتر الگوهای متنوع تری را ایجاد کرده است.

نتایج تحقیق دونیو (Donnio) و همکاران در سال۱۹۹۹ تنوع

آنزیم *Hin*dIII با ۱۲ برش در مقایسه با آنزیم *Eco*RI را نشان می دهد (۲۰). اما در مطالعه جباری (Jabbari) و همکاران در سال ۲۰۰۶ هرکدام از آنزیم های برش دهنده دو الگوی متفاوت ایجاد کردند (۱۴). در مطالعه بوگلارکا (Boglarka) و همکاران در سال ۲۰۱۲ آنزیم *Dra*I با ایجاد ۸ الگوی I–VIII نسبت به دو آنزیم *Hin*dIII و *Pvu*I تنوع بیشتری را ایجاد کردند (۹).

در برش با *Eco*RI الگوی I و II به ترتیب بیشترین و کمترین تکرار را داشت. اما الگوها در برش با آنزیم *Hin*dIII برعکس بود. بر اساس مشاهدات این پژوهش الگوهایی که تکرارپذیری بیشتری داشته اند، باعث بیماری زایی حادتری در موش شده و کشنده تر بوده اند. سویه های بیماری زا و حاد در تهیه سویه های واکسینال به کار می روند. مطالعات زیادی در مورد القای محافظت ایمنی توسط *ompH* انجام شده است (۲۱). این ویژگی برای استفاده در تهیه واکسن با توجه به تنوع پذیری زیاد در سویه های مختلف *پاستورلا مولتاسیدا* مورد توجه قرار گرفته است.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر آنالیز PCR بر پایه هضم ژن *ompH* با موفقیت برای طبقه بندی جدایه های *پاستورلا مولتاسیدا* استفاده شد. الگوهای ایجاد شده در RFLP جایگاه های وسیع هتروژنسیتی را نشان می دهند. با توجه به نتایج چنین برداشت می شود که الگوی ایجاد شده توسط آنزیم های مختلف، متفاوت است. اگرچه تنوع ژنتیکی قابل توجهی در میان گونه های مورد مطالعه وجود دارد. اما رابطه دقیقی نیز بین نوع الگوی RFLP و بیماری زایی نمونه ها مشخص است.

با توجه به الگوهای ایجاد شده، مدت زمان مرگ در موش ها نیز متفاوت بود. به طوری که الگوهایی که تکرار پذیری بیشتری داشتند موش ها را در زمان کوتاهتری از بین برده اند. بنابراین چنین استنباط می شود که الگوهای مختلف ایجاد شده نشان از بیماری زایی متفاوتی در موش ها دارد. از این الگوها می توان به منظور شناسایی سویه های بیماری زا و حاد باکتری *پاستورلا مولتاسیدا* استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت موسسه رازی با پروژه شماره مصوب۱۲-۱۸-۹۴۵۸-۹۴۰۱۴- انجام شده است. نویسندگان این مقاله از سرکار خانم دکتر معصومه حیاتی در بخش بیولوژی مولکولی و جناب آقای مهندس صفر صادق زاده در بخش حیوانات آزمایشگاهی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

Reference

1. Odugbo MO, Odama LE, Umoh JU, Lamorde AG. *Pasteurella multocida* pneumonic infection in sheep: Prevalence. Clin Pathol Studies .2006; 5(3): 59-63.

2. Yakubu D, Moshood R, Pau A, Blessing O, Lola O. Phenotypic Characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from commercial chickens affected by fowl Cholera in Jos, Nigeria. J World Poultry Res .2015; 36: 1096-1100.

3. Ragab MT, Hassan WH, Osman WA. Isolation, identification and antibiogram studies of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and goats in Siwa oasis. Global Veterinaria. 2015; 14(4): 589-594.

4. Nitoslawski S, McConnell TM, Semret M, Stein ML. A case of polyarticular *Pasteurella multocida* septic arthritis. J Infect Dis Med Microbiol. 2016; 7(3): 321-327.

5. Stepniewska K, Urbaniak K, Murkowski-Daniel I. Phenotypic and genotypic characterization

of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Poland. J Vet Sci. 2014; 17(1): 71-77.

6. Muqdad Khaleel M, Firdaus F, Abdullah J, Adamu L. Histopathological changes in mice infected river water contaminated by *Pasteurella multocida* type B: 2. Ame J Anim Vet Sci. 2014; 9(2): 71-76.

7. Sahragard I, Tahamtan Y, Valadan M, Hyati M, Moazeni F. Development of rapid PCR method for simultaneous identification of species, specific capsular type and toxigenicity of *Pasteurella* sp. isolates. Comp Clin Pathol. 2012; 21(6): 1333-1336.

8. Davies RL, MacCorquodale L, Baillie S, Caffrey B. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. J Med Microbiol. 2003; 52: 59-67.

9. Sellyei B, Wehmann E, Magyar T. Sequencing-independent method for the differentiation of the main phylogenetic lineages of *Pasteurella multocida*. J Vet Diagnos Investigat. 2012; 24(4): 735-738.

10. Danesh Lari S, Tahamtan Y, Hayati M, Kargar M. Rapid and simultaneous identity of virulence factors and capsular typing of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and goats by Multiplex PCR. J Microb World. 2010; 3(3): 162-168. [In Persian]

11. Gong Q, Qin CL, Niu M, Cheng F, Sun XF, Zhang AG. Immune efficacy of OmpH and OmpA DNA vaccines against avian *Pasteurella multocida*. Iranian J Vet Res Shiraz Uni. 2013; 14(3): 197-202.

12. Jakeen K El-Jakee, Said Ali S, Ahmed El-Shafii S, Ashgan M, Abdullah A Al-Arfaj, I Mohamed M. Comparative studies for serodiagnosis of haemorrhagic septicaemia in cattle sera. Saudi J Biol Sci. 2016; 23(1): 48-53.

13. Sugun MY, Kwaga JKP, Kazeem HM, Ibrahim NDG, Turaki AU. Isolation of uncommon *Pasteurella multocida* strains from cattle in north central Nigeria. J Vaccin Vaccination. 2016; 7:320.

14. Jabbari AR, Esmaelzadeh M, Moazeni Ju. Polymerase chain reaction typing of *Pasteurella multocida* capsules isolated in Iran. Iran J Vet Res. 2006; 16: 50-55.

15. Rajini R, Sesnagiri RA, Dhanalakshmi K, Sharma BJR. Studies on avian pasteurellosis in Andhra Pradesh Indian. Ind Vet J. 1995; 72(2): 115-118.

16. Waffa A, Al-Gebouri NM, Al-Maaly NM. Study of the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in mice. J Wildlife Dis. 2014; 39: 312-316.

17. Masdooq A, Salihu AE, Muazu A, Habu AK, Ngbede J, Haruna G, Sugun MY. Pathogenic bacteria associated with respiratory disease in poultry with reference to *Pasteurella multocida*. Int J Poultry Sci . 2008; 7(7): 674-675.

18. Gokben O, Adil M. Isolation of aerobic Bacteria from the lungs of chickens showing respiratory disorders and confirmation of *Pasteurella multocida* by polymerase chain reaction (PCR). Elazing Turkey Veterinarski Arhiv. 2006; 76(3): 217-225.

19. Bosch M, Tarrago R, Garrido ME, Campoy S, Fernandez DE, Henestrosa AR, Pérez de Rozas

AM, Badiola I, Barbé J. Expression of the *Pasteurella multocida* ompH gene is negatively regulated by the Fur protein. FEMS Microbiol. 2001; 203: 35-40.

20. Donnio PY, Allardet-Servent A, Perrin M, Escandet F, Avril JL. Characterization of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp *multocida* isolated from man and swine. J Med Microbiol. 1999; 48: 125-131.

21. Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce J, Adler B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol. 2010; 144: 1-17.

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 4, January 2018

Original Article

Evaluation of pathogenicity and polymorphism of *ompH* gene in *Pasteurella multocida*

Maryam Oulad[1], Yahya Tahamtan[2], Noushin Sohrabi[3]

[1]Master Genetic Graduated, Payam Noor University, Faculty Tehran-Center, Rey, Tehran, Iran.
[2]Associated Professor, Shiraz branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Biology, Payam Noor University, Faculty Tehran-Center Pardis new town, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Pasteurella multocida* is a Gram-negative facultative bacterium, causing respiratory diseases in various domestic and wild animals. The aim of this study was isolation and identification of *P. multocida* and investigation of *ompH* gene polymorphism of in goats *P. multocida* isolates.

Material & Methods: In a cross-sectional study a total of 160 swab samples from nose and throat of goats infected with Pasteurellosis in Fars province were collected. The *ompH* gene polymorphism in 26 isolates was genotyped by PCR-RFLP technique. Restriction digestion was performed using *Hind*III and *Eco*RI endonuclease enzymes. Each sample was injected into two mice at a concentration of 0.5 McFarland's standard. After *ompH* gene digestion by endonuclease enzymes, RFLP patterns were compared with mice mean dead time (MDT).

Results: Each *Hind*III and *Eco*RI enzymes made different patterns, which were remarkable in comparison with MDT in mice. All lethal isolates had MDT less than 24 hours. Out of 29 *P. multocida* isolates, 89.6 % were lethal in mice.

Conclusion: According to established patterns, MDT in mice was different. Based on the results, the samples with more frequent patterns killed mice in a shorter time and were more lethal. Enzyme digestion patterns can be used to detect virulent and pathogenic strains and to provide vaccine strains. Considering the variability of these strains, the production of multiple vaccines is necessary.

Keywords: *Pasteurella multocida*, Polymorphism, RFLP-PCR.

Correspondence to: Yahya Tahamtan

Tel: +98 7136240331

E-mail: yahyatahamtan@yahoo.com

Journal of Microbial World 2018, 10(4): 360-368.