JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره اول، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۲: ۱۱۲-۱۰۱

بررسی مولکولی فاکتورهای ویرولانس *پاستورلا مولتوسیداهای* جدا شده از طیور در ایران

سپیده حق نظری[۱]، احمدرضا جباری*[۲]، کیوان تدین[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم داروئی، تهران، ایران- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۲۳ مرداد ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: ۱۱ تیر ۱۳۹۵

چکیده: *پاستورلا مولتوسیدا باکتری گرم منفی، غیرمتحرک، کوکوباسیل حساس به پنی سیلین متعلق به خانواده پاستورلا سه است که می‌تواند باعث یک عفونت مشترک بین انسان و دام شود همچنین عامل بیماری‌های مهمی از جمله: وبای مرغان در پرندگان اهلی و وحشی، رینیت آتروفیک در خوک، پنومونی یا بیماری تنفسی در گاو و گوسفند، سپتی سمی هموراژیک در گاو و گاومیش و بیماری خرناس در خرگوش می‌باشد. گونه‌هایی که به طور معمول وبای مرغان را در مرغ ایجاد می‌کند به سروتیپ‌های (A:1 , A:3 یا A:4) تعلق دارد. در این مطالعه بر روی سی جدایه از پاستورلا مولتوسیدا جدا شده از طیور تست‌های باکتری شناسی و بیوشیمیایی بر اساس روش کلاسیک انجام گرفت. در این تحقیق جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدای طیور ایران از نظر حضور ژن عوامل ویرولانس کپسول، ompH، فیمبریه و ادهسین‌ها شامل ژن‌های ptfA، pfhA، tadD، hsf-1، fimA و toxA مورد بررسی قرار گرفتند. تمام جدایه‌های آزمایش شده به روش PM-PCR با استفاده از پرایمر KMT1 به عنوان پاستورلا مولتوسیدا مورد تأیید مولکولی قرار گرفتند و با روش CAP-PCR تیپ کپسولی آن‌ها در گروه A قرار گرفت. همه جدایه‌ها (۱۰۰٪) حاوی ژن‌های ompH، ptfA، pfhA، hsf-1 و fimA بودند، پانزده جدایه (۵۰٪) حاوی ژن tad D و ۷۰٪ واجد ژن toxA شناخته شدند. همچنین الگوی حساسیت جدایه‌های مذکور نسبت به ۹ آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت که حساسیت نسبی و کامل در نمونه‌ها مشاهده گردید. دو جدایه (۳/۳۳٪) به آنتی بیوتیک‌های فلومکوئین و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. حساسیت به آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین، آمپی سیلین، لینکوسپکتین، فلورفنیکول، تایلوزین و تیامولین ۱۰۰٪ و کامل بود. حساسیت به آنتی بیوتیک‌های فلومکوئین، انروفلوکساسین ۹۶/۶٪ و نالیدیکسیک اسید ۸۰٪ مشاهده شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جدایه‌های طیوری پاستورلا مولتوسیدای ایران حاوی ژن‌های مهم ویرولانس شناخته شده برای این باکتری می‌باشند که نشان دهنده توانمندی بیماری زایی جدایه‌ها در پرندگان می‌باشد.*

کلمات کلیدی: *پاستورلا مولتوسیدا، عوامل حدت، وبای مرغان، PM-PCR، الگوی آنتی بیوتیک*

*نویسنده مسئول: احمدرضا جباری

آدرس: مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. تلفن: ۰۲۶-۳۴۵۰۲۸۹۹

پست الکترونیک: a.jabbari@rvsri.ac.ir .

مقدمه

پاستورلا مولتوسیدا باکتری کوکوباسیل گرم منفی، غیرمتحرک و غیر همولیتیک است که به خوبی می‌تواند در محیط‌های غنی رشد نماید. گونه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* اسپور تولید نمی‌کنند، در حالی که بسیاری از جدایه‌ها تولید کپسول می‌کنند، که نقش مهمی در بیماری‌زایی *پاستورلا مولتوسیدا* ایفا می‌کند(۱۶). *پاستورلا مولتوسیدا* اولین بار در سال ۱۸۷۸ در بیماری وبای مرغان یافت شد و در سال ۱۸۸۰ توسط لوئی پاستور جداسازی شد و به افتخار او پاستورلا نامیده شد(۱۳). گونه‌های آن بر اساس موقعیت کپسول شان به سروگروپ A, B, D, E, F و ۱۶ سروتیپ‌های سوماتیک براساس لیپو پلی ساکارید (Lps) طبقه بندی شده‌اند(۱۵).

بیماری‌های مهم *پاستورلا مولتوسیدا* عبارتند از: رینیت آتروفیک در خوک، پنومونی تنفسی در گاو و گوسفند، سپتی سمی هموراژیک در گاو و گاومیش، بیماری خرناس در خرگوش. گاهی اوقات می‌تواند باعث ورم پستان، عفونت موضعی و سقط در گاو شود(۱۲)، همچنین می‌تواند باعث یک عفونت مشترک بین انسان و دام در انسان شود که به طور معمول ناشی از گزش یا خراش حیوانات خانگی است(۱۵). این باکتری می‌تواند در سگ، گربه، گاو، اسب، گوسفند، طیور، جوندگان، میمون، خرگوش، شیر، پلنگ، بوفالو و انسان یافت شود(۱۶). در موارد جدی تر در نتیجه باکتریمی می‌تواند موجب استئومیلیت یا اندوکاردیت شود. این باکتری نیز ممکن است از سد خونی مغزی عبور کرده و باعث منتژیت شود(۴).

وبای طیور بیماری مهمی در طیور اهلی و وحشی در سر تا سر جهان است و به صورت سپتی سمی در فرم‌های حاد، تحت حاد، مزمن و موضعی بروز می‌کند. سینوس بینی، مفاصل، تخمدان و سایر بافتها در فرم مزمن بیماری درگیر می‌شوند. ممکن است فرم مزمن به بهبودی پرنده منجر شود یا ممکن است به فرم حاد تبدیل گردد(۱۱ و ۲۱). تقریبا تمام گونه‌های پرندگان به *پاستورلا مولتوسیدا* حساس هستند، بوقلمون‌ها حساس تر از اردک و غاز می‌باشند و از این جهت خسارت زیادی را به صنایع پرورش طیور به ویژه بوقلمون در سر تا سر جهان وارد می‌کند(۵). علائم وبای پرندگان شامل افسردگی، بی اشتهایی و ترشح موکوس از منافذ بدن، سیانوز، التهاب ملتحمه و علائم تنفسی و اسهال بد بو می‌باشد. در این بیماری نیز استرس‌های محیطی نقش مهمی را در بیماری بازی می‌کنند. شیوع بیماری در پرندگان آبزی مهاجر رخ می‌دهد و باعث تلفات می‌گردد.

تیپ A گونه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* علت عمده ی وبای مرغان در طیور است که تولید کپسول هیالورونان می‌کند(۳). گونه‌هایی که به طور معمول وبای مرغان را در مرغ ایجاد می‌کند به سروتیپ‌های (A:3, A:1 یا A:4) تعلق دارد(۱). تیپ B عامل تب هموراژیک در سم داران که تولید یک کپسول با ساختار ناشناخته با ترکیباتی از آرابینوز، مانوز و گالاکتوز می‌کند. تیپ D باعث رینیت آتروفیک در خوک می‌شود اما بعضی اوقات از ارگانسیم‌های دیگر جداسازی می‌شود که تولید کپسولی با ترکیب هپارین می‌کند. تیپ E یک سروتیپ آفریقایی با یک پلی مر کپسولی با ساختاری ناشناخته است که تولید کوندروئتین سولفات می‌کند که باعث بیماری‌زایی در گاو و گاومیش می‌شود. تیپ F نیز از موارد وبای مرغان گزارش شده است(۸).

فاکتورهای بیماری‌زا متعلق به پاتوژن‌ها (باکتری، ویروس، قارچ، پروتوزوئر) می‌باشد و به چند طریق مسئول بیماری‌زایی در میزبان هستند. اتصال به میزبان و

تجمع آن‌ها، تضعیف یا مهار پاسخ ایمنی میزبان و استفاده از میزبان به عنوان منبع غذایی. بعضی از فاکتورهای بیماری‌زا مانند کپسول و اندوتوکسین مربوط به خود پاتوژن (ذاتی) است و یا برخی از آن‌ها مانند توکسین از طریق پلاسمید می‌باشد.

کپسول، لیپوپلی ساکارید، پروتئین‌های غشای خارجی، فاکتورهای جذب آهن، توکسین، فیمبریه و ادهسین، آنزیم‌هایی مانند نورآمینیداز و هیالورونیداز از مهم ترین عواملی هستند که باعث می‌شود *پاستورلا مولتوسیدا* بیماری‌زا باشد(۶).

پروتئین‌های غشاء خارجی OmpA، OmpH و P6 به عنوان سه پروتئین‌های ایمونوژنیک اصلی از *پاستورلا مولتوسیدا* وزیکولهای غشاء خارجی(OMVs) شناخته شده‌اند(۱۴). وزن مولکولی OmpH ۳۴ تا ۴۲ کیلودالتون متغیر است که به عنوان کاندیدای واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۷).

به نظر می‌رسد که فیمبریه و ادهسین‌ها نقش مهمی‌در چسبندگی به سطح سلول‌ها دارند، همچنین فیمبریه در برخی از گونه‌های سروتیپ A *پاستورلا مولتوسیدا* مشاهده شده است که قادر هستند بر روی سطح سلول اپی تلیال میزبان بچسبد. ژن‌های ادهسین‌ها شامل *ptfA*[1]، *fimA*[2]، *pfhA*[3]، *hsf-1*[4]، *hsf-2* و *tadD*[5] می‌باشند.

تیپ IV فیمبریه (پیلی pili) از سروتیپ‌های A ,D ,B از *پاستورلا مولتوسیدا* جداسازی و مشخص شده است که اغلب با بیماری‌زایی در باکتری‌های دیگر به دلیل نقش آنها در اتصال به سطح سلول میزبان مرتبط است(۱۴). پاستورلا دارای فیمبریه نوع ۴، دارای یک زیر واحد آنتی ژنی به نام *ptfA* است که می‌تواند باعث تسهیل اتصال پاستورلا به سطوح مخاطی و افزایش چسبندگی به بافت‌های اپی تلیال شود، برای مشخص شدن نقش فیمبریه نوع ۴ در بیماری‌زایی نیاز به نو ترکیب *ptfA* می‌باشد(۲۵). *tadD* یک آنتی ژن غیر اختصاصی است و به طور قابل توجهی به سروگروپ A و *hsf-1* به سروگروپ D وابسته است(۱۴). *pfhA* به عنوان عامل چسبندگی در دستگاه تنفسی عمل می‌کند و با بررسی‌های انجام شده نشان داده شد که به عنوان عامل حدت به شمار می‌رود و وابستگی کمتری به سروگروپ D نسبت به سروگروپ‌های دیگر دارد(۱۴و ۲۶).

پاستورلا مولتوسیدا توکسین (PMT) اصلی ترین فاکتور در حدت این باکتری است. این پروتئین KDa ۱۴۵ وزن دارد و توسط ژن *toxA* که می‌تواند کروموزومی یا پلاسمیدی باشد، کد می‌شود. ژن *toxA* یک سم درمونکروتیک است که می‌تواند موجب بیماری رینیت آتروفیک شود(۲۸ و ۲۰).

هدف از این مطالعه شناسایی و تأیید مولکولی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* و مقایسه ویژگی‌های بیوشیمیایی آنها، تعیین ژنوتیپ کپسولی و بررسی ۷ فاکتور ویرولانس مهم شامل پروتئین غشای خارجی (OmpH)، ادهسین‌ها (*ptfA*، *fimA*، *hsf1*، *pfhA*، *tadD*) و توکسین (*toxA*) بر روی سویه‌های طیوری در ایران و همچنین تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت و جداسازی

در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شده از پاستورلوز پرندگان که در کلکسیون موسسه رازی به صورت لیوفیلیزه نگهداری می‌شوند

[1] Type 4 fimbriae
[2] fimbriae
[3] Filamentous hemagglutinin
[4] Autotransporter adhesin
[5] Putative nonspecific tight adherence protein D

استفاده گردید. پس از باز کردن آمپول، کشت اولیه در روی محیط BHI و انکوباسیون $37^{\circ}c$ به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. تست‌های بیوشیمیایی بر اساس روش کلاسیک بر روی جدایه‌ها انجام گرفت. پس از رنگ آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی تست‌های اکسیداز و کاتالاز انجام گردید، آزمایشات باکتری شناسی شامل کشت در محیط‌های Blood Agar, MacConky Agar , SIM, MR/VP, KIA, Urease, BHI و Ornithin Decarboxilase و بررسی آنها بود.

تخلیص DNA و آزمایش PCR

به منظور استخراج DNA مربوط به جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* از کشت ۲۴ ساعته در محیط Blood Agar، از روش boiling استفاده گردید..

کلنی‌ها از کشت تازه Blood Agar در ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول TE 1X حل شد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد و سپس ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و بخش رویی حاوی DNA جدا گردید. غلظت نمونه‌های DNA توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. به ازای هر نمونه، ۱ میکرولیتر پرایمر پیش رو، ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس (با غلظت ۱۰پیکو مولار از هر کدام) و ۶ میکرولیتر Master Mix (Ampliqon A/S ساخت کشور دانمارک) که شامل میزان مشخصی از dNTPs و MgCl2 و Taq DNA polymerase است و غلظت آن ۲x است در یک میکروتیوپ استریل مخلوط شده و سپس ۱ میکرولیتر DNA به آن افزوده شد. ۱۰ جفت پرایمر برای مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت که توالی پرایمرها طبق مقاله تانگ و همکاران (۲۰۰۹) و تاونسند و همکاران (۲۰۰۱) بود که در جدول ۱ نشان داده شده است. هرکدام از این جفت پرایمرها نیاز به برنامه زمانی و دمایی ویژه دارد که در جدول ۲ نشان داده شده است(۲۶ و ۲۷).

تأیید قطعات محصول PCR

از هر ژن، یک نمونه محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی فرستاده شد. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزارهای Chromas lite و BLAST مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفتند.

تست حساسیت آنتی بیوتیک

برای انجام تست آنتی بیوگرام به روش دیسک از محیط Mueller Hinton Agar استفاده شد. تست آنتی بیوگرام انجام شده بر طبق جدول تفسیر استاندارد آنتی بیوتیک ارائه شده توسط شرکت پادتن طب و سایت CLSI و EUCAST بررسی و گزارش شد(۲۹).

نتایج

ویژگی‌های باکتری شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* در جدول ۳ نشان داده شده است.

در بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها، باسیل‌های کوتاه (کوکوباسیل) گرم منفی مشاهده گردید. تست‌های کاتالاز و اکسیداز برای همه ی جدایه‌های آزمایش شده (۳۰ جدایه) مثبت بوده و هیچ کدام از جدایه‌ها در محیط MacConky Agar رشد نکردند. آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که همه ی جدایه‌ها از نظر گلوکز و اندول مثبت و از نظر لاکتوز، MR/VP، اوره آز، حرکت منفی بودند. در مورد اورنی تین دکربوکسیلاز ۲۸ جدایه باعث تغییر رنگ محیط اورنی تین دکربوکسیلاز به بنفش (واکنش مثبت) و ۲ نمونه از بنفش به زرد تغییر رنگ دادند(واکنش منفی).

آزمایش PCR تعیین تیپ کپسولی و عوامل حدت

نتایج آزمایش PM-PCR و الکتروفورز در ژل آگارز تکثیر یک قطعه با اندازه ۴۶۰ bp بود. حضور این قطعه مورد انتظار بوده (طبق روش تاونستند) و تأییدکننده *پاستورلا مولتوسیدا* به روش مولکولی می‌باشد. تمام جدایه‌های آزمایش شده به روش PM-PCR به عنوان *پاستورلا مولتوسیدا* مورد تأیید مولکولی قرار گرفتند و با روش CAP-PCR تیپ کپسولی جدایه‌ها مشخص گردید(۲۷). همه جدایه‌ها به تیپ کپسولی A (تکثیر قطعه ۱۰۴۴ bp) تعلق داشتند.

وجود ژن‌های *ompH*، *pfhA* و *hsf-1* با رویت قطعات مورد نظر با اندازه‌های ۱۱۰۰ bp، ۲۸۶ bp، ۶۵۴ bp (به ترتیب) در همه جدایه‌ها تأیید گردید(شکل ۱). همچنین قطعات اختصاصی با اندازه‌های ۴۸۸ bp، ۸۶۶ bp با پرایمر اختصاصی *ptfA* و *fimA* در همه جدایه‌ها (۱۰۰٪) مشاهده گردید. حضور ژن *tadD* (قطعه ۴۱۶ bp) در ۱۵جدایه (۵۰٪) و ژن *toxA* (قطعه ۳۰۰ bp) در ۲۱ جدایه (۷۰٪) نشان داده شد (شکل ۲). بررسی الکتروفورزی ژن *fimA* نشان داد که در ۴ جدایه اختلاف سایز (باند سنگین تر از ۸۶۶ bp) وجود دارد، این یافته نشان دهنده حضور پلی مورفیسم در این ژن می‌باشد.

فراوانی ژن‌های حدت در جدایه‌های مورد مطالعه در جدول ۴ نشان داده شده است. به منظور تائید نتایج آزمایش PCR، یک قطعه نمونه از محصول PCR هر یک از ژن‌های مورد مطالعه تخلیص و تعیین توالی گردید و مشخص شد که این ژن‌های مورد مطالعه با ژن‌های موجود در بانک ژن ۹۹ درصد تشابه را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام با استفاده از ۹ آنتی بیوتیک شامل پنی سیلین، آمپی سیلین، فلومکوئین، لینکوسپکتین، فلورفنیکول، نالیدیکسیک اسید، انروفلوکساسین، تایلوزین و تیامولین در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۱ : پرایمرهای استفاده شده برای بررسی فاکتورهای حدت باکتری *پاستورلا مولتوسیدا*

Primer name	Description	Primer sequence(5'-3')	Amplicon size
(KMT1)PM	Identification all Pasteurella multocida	5’-ATCCGCTATTTACCCAGTGG-3’ 5’-GCTGTAAACGAACTCGCCAC-3’	**460**
CAPA	Capsule protein A	5’-TGCCAAAATCGCAGTCAG-3’ 5’-TTGCCATCATTGTCAGTG-3’	**1044**
CAPB	Capsule protein B	5’-CATTTATCCAAGCTCCACC-3’ 5’-GCCCGAGAGTTTCAATCC-3’	**758**
OmpH	Outer membrane protein H	5’-CGCGTATGAAGGTTTAGGT-3’ 5’-TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC-3’	**1100**
FimA	Fimbriae	5’-CCATCGGATCTAAACGACCTA-3’ 5’-AGTATTAGTTCCTGCGGGTG-3’	**866**
PtfA	Type 4 fimbriae	5’-TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC-3 5’-TCATGAATTCTTATGCGCAAAATCCTGCTGG-3’	**488**
Hsf1	Autotransporter adhesion	5’- TTGAGTCGGCTGTAGAGTTCG-3’ 5’- ACTCTTTAGCAGTGGGGACAACCTC-3’	**654**
PfhA	Filamentous hemagglutinin	5’- TTCAGAGGGATCAATCTTCG -3’ 5’- AACTCCAGT TGGTTTGTCG -3’	**286**
TadD	Putative nonspecific tight adherence protein D	5’- TCTACCCATTCTCAGCAAGGC-3’ 5’- ATCATTTCGGGCATTCACC-3’	**416**
ToxA	Dermonecrotic toxin	5’-TACTCAATTAGAAAAAGCGCTTTATCTTCC-3’ 5’- TCCCAGTAATTTGTCTGTATTTTATCAAAT-3’	**300**

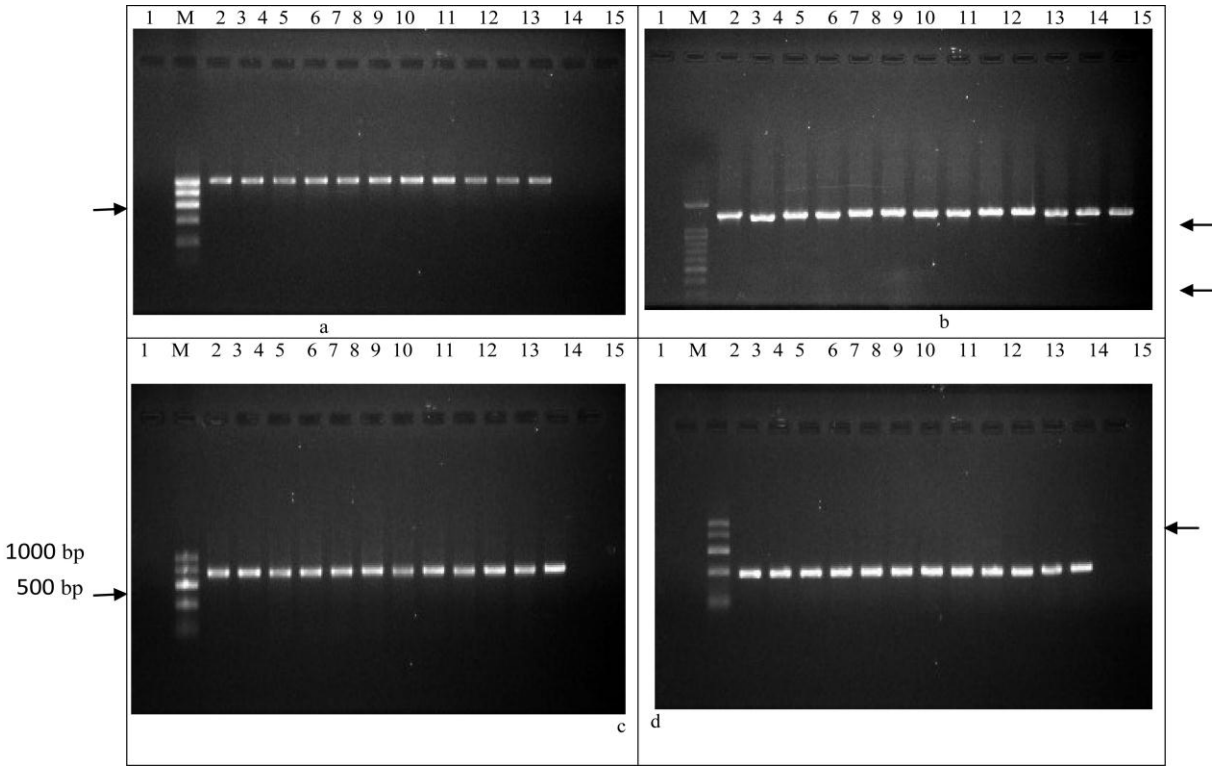
جدول ۲: شرایط دما و زمان واکنش PCR به تفکیک پرایمرهای مورد استفاده

Primer	مرحله اول واسرشت اولیه				مرحله اصلی 35× واسرشت		اتصال	تکثیر	مرحله نهایی تکثیر نهایی	
KMT1	94°c	3 min	94°c	1 min	51°c	30 s	72°c	45 s	72°c	5 min
CAPA , CAPB	93°c	3 min	93°c	1 min	60°c	30 s	72°c	30 s	72°c	5 min
OmpH , PfhA , TadD	93°c	5 min	93°c	1 min	54°c	45 s	72°c	50 s	72°c	10 min
FimA	93°c	5 min	93°c	1 min	68°c	45 s	72°c	50 s	72°c	10 min
PtfA , Hsf1 , ToxA	93°c	5 min	93°c	1 min	60°c	45 s	72°c	50 s	72°c	10 min

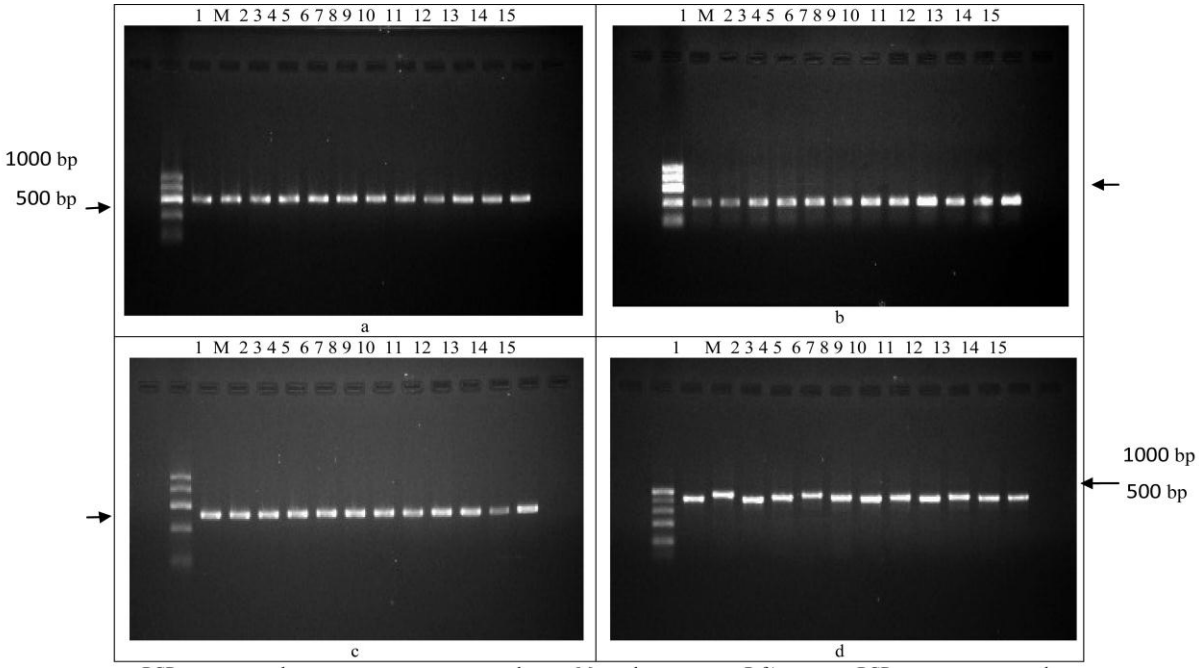
جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا*

Isolation kode	Catalase	Oxidase	KIA	SIM			MR	VP	Macconky	Ornithin	Urease
				M	I	H2S					
1	+	+	Alk/acid*	-	+	-	-	-	-	+	-
2	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
3	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
4	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
5	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
6	+	+	Alk/acid	-	+	-	_	-	-	+	_
7	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
8	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
9	+	+	Alk/acid	-	+	-	_	-	-	+	_
10	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
11	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
12	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
13	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
14	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	_	_
15	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	_	_
16	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
17	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
18	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
19	+	+	Alk/acid	-	+	-	_	-	-	+	_
20	+	+	Alk/acid	-	+	-	_	-	-	+	_
21	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
22	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
23	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
24	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
25	+	+	Alk/acid	-	+	-	_	-	-	+	_
26	+	+	Alk/acid	-	+	-	_	-	-	+	_
27	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
28	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_
29	+	+	Alk/acid	-	+	-	_	-	-	+	_
30	+	+	Alk/acid	-	+	-	-	-	-	+	_

*Alkalin محیط قلیایی



شکل ۱. a: بررسی تیپ کپسولی از محصول PCR به دست آمده از ژن CapA که اندازه مورد نظر ۱۰۴۴bp بود که غیر از جدایه ۲ که سویه واکسنال تیپ B بود ستون ۱۴ در بقیه جدایه‌ها دیده شد، M: مارکر ۲۰۰bp (زوج) شاهد منفی ستون ۱۵.b : ارزیابی محصول PCR به دست آمده از ژن OmpH اندازه مورد نظر ۱۱۰۰bp بود که در همه جدایه‌ها دیده شد، شاهد منفی، ستون ۱، M : مارکر bp ۱۰۰ . c : ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن Hsf-1 اندازه مورد نظر ۶۵۴bp، M : مارکر bp ۲۰۰(فرد)، ستون شماره ۱۵ شاهد منفی d : ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن PhfA اندازه مورد نظر M۲۸۶bp : مارکر bp ۲۰۰(فرد)، ستون شماره ۱۵شاهد منفی است.



شکل ۲. a : ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن PtfA اندازه مورد نظر ۴۸۸bp، M : مارکر bp ۲۰۰(فرد)، ستون شماره ۱۵ شاهد منفی b : ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن ToxA اندازه مورد نظر ۳۰۰bp، M : مارکر bp ۲۰۰(فرد)، ستون شماره ۱۵ شاهد منفی c : ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن TadD اندازه مورد نظر ۴۱۶bp، M : مارکر bp ۲۰۰ (فرد)، ستون شماره ۱۵ شاهد منفی d : ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن FimA طی بررسی ژن FimA برای این ژن اندازه مورد نظر ۸۶۶bp مارکر bp ۲۰۰ (زوج)،ستون شماره ۱۵ شاهد منفی گزارش شد.

جدول ۴ فراوانی فاکتورهای حدت در جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* بررسی شده در این مطالعه

Gene	Virulence factor	posetives(%)
CapA	Capsule protein A	**30(100)**
CapB	Capsule protein B	**0(0)**
ompH	Outer membrane protein H	**30(100)**
hsf-1	Autotransporter adhesion	**30(100)**
ptfA	Type 4 fimbriae	**30(100)**
pfhA	Filamentous hemagglutinin	**30(100)**
tadD	Putative nonspecific tight adherence protein D	**15(50)**
toxA	Dermonecrotic toxin	**21(70)**
fimA	Fimbriae	**30(100)**

جدول ۵ فراوانی نتایج حاصل از تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا*

آنتی بیوتیک	حساس تعداد(درصد)	متوسط تعداد(درصد)	مقاوم تعداد(درصد)
پنی سیلین	۳۰(۱۰۰)	-	-
آمپی سیلین	۳۰(۱۰۰)	-	-
فلومکوئین	۲۹ (۹۶/۶)	-	۱ (۳/۳۳)
لینکوسپکتین	۳۰ (۱۰۰)	-	-
فلورفنیکول	۳۰ (۱۰۰)	-	-
نالیدیکسیک اسید	۲۴ (۸۰)	۵ (۱۶/۶)	۱ (۳/۳۳)
انروفلوکساسین	۲۹ (۹۶/۶)	۱ (۳/۳۳)	-
تایلوزین	۳۰ (۱۰۰)	–	-
تیامولین	۳۰ (۱۰۰)	–	–

بحث

وبای مرغان به عنوان یکی از بیماری‌های عفونی و واگیردار مهم در طیور بومی در ایران شیوع داشته و همواره خطری برای طیور صنعتی به شمار می‌رود. تعیین ویژگی بیولوژیک و بررسی عوامل ویرولانس یا حدت و همچنین الگوی آنتی بیوتیکی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* از موارد بیماری برای پیشگیری و کنترل بیماری در اختیار می‌گذارد.

پاستور و سایر دانشمندان عفونت‌های ناشی از *پاستورلا مولتوسیدا* را در پرندگان و پستانداران به عنوان مسائل مهم دامپزشکی در سال‌های دهه هشتم قرن نوزدهم تشخیص دادند و اولین مورد این عفونت در انسان یک زن روستایی به صورت عفونت خونی ظاهر گردید و در سال ۱۹۱۳ گزارش شد(۷).

در این مطالعه از تست‌های بیوشیمیایی مختلف برای تشخیص *پاستورلا مولتوسیدا* استفاده شد، یکی از مهم‌ترین تست‌های شناسایی این باکتری، کاتالاز و اکسیداز است که در پاستورلا هر دو مثبت هستند، طبق نتایج به دست آمده تست‌های بیوشیمیایی همه نمونه‌ها بجز اورنی تین دکربوکسیلاز در دو نمونه با خصوصیات این باکتری هم خوانی داشت.

در مطالعه‌ای که توسط زهور و همکاران انجام شد به بررسی خصوصیات و تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی پرداخته شد. استفاده از این خصوصیات بیوشیمیایی علاوه بر سریع و ارزان بودن، برای تشخیص عوامل میکروبی مناسب و مفید است(۲۹).

لیتل و همکاران (۱۹۴۳)، ماکی (۱۹۹۵)، بوت و همکاران (۲۰۰۴)، بر روی *پاستورلا مولتوسیدا‌هایی* که از گاو، بوفالو، خوک، پرندگان مبتلا به وبای مرغی، گوسفند و بز جدا کرده بودند آزمایشات بیوشیمیایی و خصوصیات مربوط به کشت را بررسی کردند و نتیجه

گرفتند تمام جدایه‌ها بر روی محیط کشت بلاد آگار همولیز نشان نمی‌دهند، روی محیط مک کانکی آگار رشد ندارند، اکسیداز، کاتالاز و اندول مثبت بوده، نیترات را به نیتریت احیا نموده وتست MR و VP منفی دارند (۲ و ۱۸ و ۱۹).

روش PM-PCR تاونستند و همکاران(۲۰۰۱)، در تشخیص پاستورلا مولتوسیدا از دقت و حساسیت بالایی برخوردار بوده و توسط سایر محققان نیز مورد استفاده قرار گرفته است(۲۷). در این بررسی مشخص شد که روش تشخیص مولکولی PM-PCR با تشخیص کلاسیک باکتریولوژی (بیوشیمیایی) انطباق کامل دارد. در این تحقیق تیپ کپسولی *پاستورلا مولتوسیدا* به روش مولکولی CAP-PCR تعیین شد. تیپ کپسولی جدایه‌های طیوری ایران در گروه کپسولی A قرار گرفتند.

در بررسی انجام شده ژن فاکتورهای حدت *ompH*، *ptfA*، *pfhA*، *fimA* و *hsf-1* در تمام جدایه‌ها ۱۰۰٪ حضور داشتند. حضور ژن‌های *tadD* با فراوانی ۵۰٪ و *toxA* با فراوانی ۷۰٪ در مراتب بعدی قرار گرفتند.

در سال ۲۰۰۹ تانگ و همکاران ۲۳۳ نمونه *پاستورلا مولتوسیدای* جدا شده از خوک در چین را از لحاظ سروتیپ کپسولی، ۱۹ ژن بیماری‌زا و مقاومت آنتی بیوتیکی بررسی کردند و با آزمایش PCR نشان دادند که فاکتورهای ویرولانس *pfhA*، *tadD*، *toxA* و *pmHAS* در کمتر از ۵۰ درصد از جدایه‌ها وجود داشت و ژن ویرولانس *toxA* و *pfhA* در گروه کپسولی A و D نیز وجود داشت(۲۶).

جیونگمین و همکارانش در سال ۲۰۰۷، در آزمایش انجام شده بر روی ژن *ompH* نشان دادند که این ژن شبیه پورین P2 در هموفیلوس آنفولانزا می‌باشد و یک آنتی مونوکلونال بر علیه ompH توانست از موش‌ها در برابر عفونت حفاظت ۱۰۰٪ نماید. OmpH یک آنتی ژن اصلی پروتئین غشاء خارجی از *پاستورلا مولتوسیدا* می‌باشد. طبق مطالعات انجام شده OmpH قادر است حفاظت نسبی در جوجه علیه *پاستورلا مولتوسیدا* را فراهم کند(۱۷).

کارمل و همکارانش در سال ۱۹۹۶ تیپ ۴ فیمبریه را مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند که این پروتئین ۱۸کیلودالتونی دارای یک زیر واحد آنتی ژنی به نام *ptfA* است. *ptfA* باعث تسهیل فرآیند عفونی با تسهیل اتصال *پاستورلا مولتوسیدا* به سطوح مخاطی و قابلیت چسبندگی به بافتهای اپی تلیال می‌شود(۲۳).

ژن *PfhA* طبق مطالعات اوار و همکاران در ۲۵٪ از نمونه‌های جدا شده از سگ، ۱۸/۵٪ از گربه، ۲۱/۲٪ از خوک وجود داشت(۹). فراوانی ژن *tadD* در مطالعات دیگر روی خرگوش ۹۱/۳٪ و در خوک ۴۳/۳٪ گزارش شد(۱۰ و ۲۴). نقش *hsf-1* در اتصال و تثبیت باکتری روی سلول‌های اپی تلیال خصوصا دستگاه تنفس گزارش شده است(۱۴). با توجه به سنگین تر بودن سایز قطعه *fimA* در مورد ۴ جدایه، مطالعات تکمیلی برای مشخص شدن علت اختلاف سایز مشاهده شده در این قطعه پیشنهاد می‌گردد.

به طور کلی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* بومی ایران جدا شده از طیور ویژگی‌های کلاسیک بیوشیمیایی و باکتریولوژیک را دارا بوده و به لحاظ مولکولی (PM-PCR) مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جدایه‌های طیوری *پاستورلا مولتوسیدای* ایران حاوی ژن‌های مهم شناخته شده برای این باکتری می‌باشند که نشان دهنده توانمندی بیماری‌زایی جدایه‌ها در پرندگان می‌باشد. آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که جدایه‌های مذکور در مقابل بیشتر آنتی بیوتیک‌های

آزمایش شده حساس بوده و برای درمان عفونت بسته به مورد قابل توصیه می‌باشند.

باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* دارای ژن‌های حدت مهم و متنوع است از آنجایی که هنوز واکسن کارآمد که حفاظت قابل توجه ایجاد نماید، در دسترس نیست لذا پیشنهاد می‌شود بررسی‌های لازم صورت گیرد همچنین پیشنهاد می‌شود با استفاده از اطلاعات حاصل از مطالعه ژنتیکی حاضر، ویژگی‌های پاتوژنز و حدت سویه‌های مذکور در مدل حیوان آزمایشگاهی و میزبان اصلی مورد مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مساعدت و همکاری جناب آقایان سید رضا بنی‌هاشمی، محمد سخاوتی، علیرضا عرب، علی ملائی و سرکار خانم مریم مهره کش حقیقت و سایر همکاران در بخش هوازی واکسن و سرم سازی رازی جهت انجام این تحقیق تقدیر و تشکر می‌شود. این تحقیق با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انجام گردیده است.

References

1. Blanchlong, JA. Persistence of *pasteurella multocida* in wetlands following avian cholera outbreaks. *Journal of Wildlife Diseases*. **42**: 33-39.
2. Boot, R., Brink, M., Handgraff, P., Timmermans, R. (2004). The use of the bacteria classification procedure to identify *Pasteurellacae* strains in rodents and rabbits. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science.* **31**: 177-183.
3. Borrathybay, E., Sawada, T., Kataoka Y., Ohtsu, N. (2003). A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Veterinary Microbiology*. **97**: 229-243.
4. Casolari C., Fabio U. (1988). Isolation of *Pasteurella multocida* from Human Clinical Specimens First Report in Italy. *European Journal of Epidemiology*. **4**: 389-90.
5. Christensen, J.P., Bisgaard, M. Fowel Cholera. (2000). *Department of Veterinary Microbiology*. **19**: 626-637.
6. Carpenter, T., Khalid, S., Sansom, M S.P. (2007). A multi Domain outer membrane protein from *Pasteurella multocida*: modelling and simulation studies of pmOmpA. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1768**: 2831-2840.
7. Champlin, F.R., Shryock T.R., Patterson, C.E., Austin, F.W. and Ryals, P.E. (2002). Prevalence of a novel capsule-associated lipoprotein among *Pasteurellaceae* pathogenic in animals. *Current Microbiology*. **44**: 297-301.
8. DeAngelis, P., Gunay, N.S. Toida, T., Wen-jun. (2002). Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, Respectively. *Carbohydrate Research*. **337**: 1547-1552.
9. Ewars, C., Lubke_Becker, A., Bethe, A., Kiebling, S., Filter, M., Wieler, L.H. (2006). Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strain isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology*. **31**: 304-17.
10. Ferreira, Th.S.P., Felizardo, M.R., Gobbi, D.S., Gomes, C. R., Filsner, P.H., Moreno, M., Paixao, R. Pereira., J and Moreno, A.M. (2012). Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Pasteurella multocida* strain isolated from Rabbits in Brazil. *The Scientific World Journal*. **38**: 58-67.
11. Glisson, J.R. Bactetial respiratory disease of poultry. (1998). *Department of Avian Medicine, Poultry Science*. **77**: 1139-1142.
12. Guler, L., Gunduz, K., S.Sarisahin, A. (2013). Capsular Typing and Antimicrobial Susceptibility of *Pasteurella multocida* Isolated from Different Hosts. *Department of Microbiology*. **19**: 843-849.
13. Hatfaludi, T., Al-Hasani, K., Gong, L., Boyce, JD., Ford M. (2012). Screening of 71 *Pasteurella multocida* proteins for protective efficacy in a fowl cholera infection model and characterization of the protective antigen PlpE. *PLoS ONE*, *One A Peer-Reviewed, Open Access Journal*. **7**: 1-11.
14. Harper, M., D. Boyce J & Adler B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis:125

years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters* . **265**: 1-10.
15. Jacques, M., Kobisch, M., Belanger, M and Dugal, F. (1993). Virulence of capsulated and noncapsulated isolate of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. *Infection and Immunity*. **61**: 4785-4792.
16. Katarzyna S., Iwona M,D. (2013). Phenotyping and Genotyping of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Poland. *Versita National Veterinary Research Institute*. **57**: 29-34.
17. Lee1, J., Kim Y.B., and Kwon M. (2007). Outer Membrane Protein H for Protective Immunity Against *Pasteurella multocida*. *Journal of Microbiology*. **45**: 179-184.
18. Little, P.A. and lyon B.M. (1943). Demonstration of serological types within the non haemolytic *Pasteurella*. *American Journal of Veterinary Research.* **4**: 110-112.
19. Mackie, J.T., Barton, M., Hindmarsh, M., Holsworth, I. (1995), *Pasteurella haemolytica* septicemia in sheep. *Australian Veterinary Journal*. **72**: 474.
20. Orth, J.H.C., Aktories K. (2012). Molecular biology of *Pasteurella multocida* toxin. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **361**: 73-92.
21. Rhoades, K., R, Ghazikhanian., G.Y , and chin, R.P. (1989). Virulence and infectivity of A:14 strains of *Pasteurella multocida* for Turkey. *Poults*, *U.S.A, Avian Pathology*. **18**: 597-603.
22. Roier,S., Judith C., Fenninger, D., R. Leitner. (2013). Immunogenicity of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* outer membrane Institute of Molecular Biosciences. *International Journal of Medical Microbiology*. **303**: 247-256.
23. Ruffolo, C., Tennent, J., Michalski, W., and Adler, B. (1996). Identification, Purification, and Characterization of the Type 4 Fimbriae of *Pasteurella multocida. American Society For Microbiology Infection and Immunity*. **65**: 339-343.
24. Shayegh, J., Atashpaz. S., Hejazi, M.S. (2008). Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*, *Asian Journal of Animal Veterinary Sciences*. **3**: 206-213.
25. Tan, H.Y., Nagoor, N.H., Sekaran S.D. (2010). Clonig, expression and protective capacity of 37KDa outer membrane protein gene (OmpH) of *pateurella multocida* serotype B:2. *Tropical Biomedicine*. **27** : 430-441.
26. Tang, X., Zhanqin., Junyong, Hu., Bin, Wu., Xawang, Cai., Oigai He., Haunchun Ch. (2009). Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strain from swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**: 951-958.
27. Townsend, K.M. Frost., A.J. Lee, CH.W., Papadimitriou, J.M and Dawkins, J.S. (2001). Development of PCR assays species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 1096-1100.
28. Zywietz, A., Gohla, A., Schmelz, M., Schultz G., and Offermanns S., (2000). Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and G11-independent mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. **27**: 3840-3845.
29. Zahoor, M.A and Siddique, M. (2006). Characteristics of *Pasteurella multocida* recovered from avian sources. *Pakistan Veterinary Journal*. **26** : 41-43.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 1, 2016

Molecular Study of Virulence Factors of P*asteurella multocida* Isolates from Poultry in Iran

Haghnazari, S.[1], Jabbari, A.R.[2*], Tadayon, K.[3]

1- Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran - Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran
2- National Pasteurella Research Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Microbiology Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received Date: 14 August 2014 *Accepted Date: 1 July 2016*

Abstract: *Pasteurella multocida is a Gram-negative, nonmotile, penicillin-sensitive coccobacillus belonging to the pasteurellacea family, and can cause a common infection in humans and animals. P.multocida also important factor in diseases such as fowl cholera in domestic and wild birds, atrophic rhinitis in pigs, cattle and sheep pneumonia or respiratory disease, hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo and sniffle disease in the rabbit. The bacteria types that cause Fowl cholera in bird species normally belong to serotypes (A: 1, A: 3 or A: 4). In this study, thirty strains of P.multocida isolated from poultry were studied using bacteriological and biochemical tests according to the classical methods. Several factors are known as virulence factors of P.multocida. The P.multocida isolates studied in this study were obtained from the poultry in Iran and were examined for the presence of virulence factor capsule gene, ompH, and adhesion fimbriae containing genes ptfA, pfhA, tadD, hsf-1, fimA and toxA. All of the isolates were confirmed as P.multocida by PM-PCR using species specific primers, KMT1. Molecular capsular typing (CAP-PCR) showed that all of the isolates belonged to type A. Of the 30 examined isolates, all (100%) contained ompH ،ptfA ، pfhA ، hsf-1 and fimA genes, fifteen isolates (50%) had tadD gene and 21 isolates (70%) had toxA. Analysis of sensitivity patterns to 9 antibiotics showed relative and complete sensitivity in all the tested samples. Two isolates (3.33%) were resistant to antibiotics Flumequin and Nalidixic Acid. Sensitivity to antibiotics Penicillin, Ampicillin, Lincospectin, Florfenicol, Tylosin and Tiamulin was 100% and complete. Sensitivity to antibiotics Flumequin, Enrofloxacine was observed in 96.6% and sensitivity to Nalidixic Acid was observed in 80%. The results of this study showed that the avian P.multocida isolates had the genes for the important diseases caused by these bacteria. It is concluded that P.multocida has the potential for pathogenicity in birds in Iran.*

Key words: *P.multocida; Virulence factors; Fowel cholera; PM-PCR; Patterns of antibiotic*

**Corresponding author: Jabbari, A.R.*
Address: Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Tel: 026-34502892. Fax: 026-34552194
Email: a.jabbari@rvsri.ac.ir