# مطالعه واریانت‌های بیوشیمیائی در بیوارهای گوسفندی *پاستورلا مولتوسیدای* جدا شده از استان آذربایجان‌شرقی

**جلال شایق[1*]، هادی کیوان‌فر[2]، جلیل دلگری شرف[1]، منصور خاکپور[3]**

۱. گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، شبستر، ایران
۲. گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: *Jalal_shayeghi@yahoo.com*

**(دریافت مقاله: ۸۷/۸/۷، پذیرش نهایی: ۸۷/۱۰/۳۰)**

## چکیده

**در این مطالعه واریانت‌های بیوشیمیائی در میان بیوارهای مربوط به ۲٤ جدایه *پاستورلا مولتوسیدای* گوسفندی که توسط روش تخمیر میکروپلیت تعیین بیوتیپ شده‌اند، مطالعه شده است. همه جدایه‌ها از گوسفندان دچار آبریزش بینی استان آذربایجان‌شرقی جداسازی شده بودند. از میان ۵ بیوار شناسائی شده شامل بیوارهای ۲، ۳، ٦، ۷ و ۱۱ تنها بیوارهای ٦ و ۷ دارای واریانت‌های بیوشیمیائی بودند. واریانت‌های مانیتول منفی، مانیتول منفی- اورنتین دکربوکسیلاز (ODC) منفی و مانیتول منفی - مالتوز منفی در میان بیوارهای ٦ و نیز واریانت‌های ساکاروز مثبت در میان بیوارهای ۷ از اختصاصات *پاستورلا مولتوسیدای* گوسفندی در این منطقه است.**

*مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۷، دوره ۲، شماره ۲، ۱۲۸-۱۲۵.*

**کلمات کلیدی** : *پاستورلا مولتوسیدا*، واریانت‌های بیوشیمیائی، گوسفند، آذربایجان‌شرقی

## مقدمه

بیماری‌های تنفسی موجب خسارات اقتصادی فراوان در جمعیّت گوسفندان می‌گردند. در این میان پنومونی مخلوط ناشی از چند نوع باکتری اهمیّت ویژه‌ای دارد. از جمله عوامل دخیل در پنومونی گوسفندی، باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* است که می‌تواند به‌صورت مستقل و یا با همراهی سایر عوامل موجب پنومونی در گوسفند گردد (۲).

تاکنون روش‌های متعددی برای تعیین تحت تیپ‌های *پاستورلا مولتوسیدا* تجربه شده است. اختلاف سرولوژیکی مابین *پاستورلا مولتوسیدا*ها از نظر آنتی‌ژن اختصاصی کپسول در سال ۱۹۵۵ توسط کارتر تعریف گردید. در طبقه‌بندی کارتر که با آزمایش هماگلوتیناسیون غیرفعال صورت می‌گیرد، پنج سروتیپ شناخته شده است که با حروف A ، B ، D ، E و F مشخص می‌گردد. در سال ۱۹۷۲ روش هدلستون با آزمایش رسوبی ژل دیفوزیون بر پایه آنتی‌ژن پیکری O ابداع گردید. بر این اساس ۱۶ سروتیپ پاستورلا مولتوسیدا شناسایی شده است. ترکیب دو تیپ‌بندی کارتر- هدلستون در کنار هم در مطالعات اپیدمیولوژکی از اهمیّت بسیار بالایی برخوردار است (۲).

در سال ۱۹۸۵ *پاستورلا مولتوسیدا* بر پایه هیبریداسیون DNA-DNA به سه زیر گونه *پاستورلا مولتوسیدا* زیر گونه مولتوسیدا، *پاستورلا مولتوسیدا* زیر گونه سپتیکا و *پاستورلا مولتوسیدا* زیر گونه گالیسیدا تقسیم گردیده است. نشان داده شده است که تخمیر دلسیتول وسوربیتول نیز توانائی تفریق این سه زیر گونه از هم را دارد (۷).

در سال ۱۹۹۵ Blackall و همکاران روش کامل‌تری از خصوصیات فنوتیپی را تحت عنوان روش تخمیر در میکروپلیت بر پایه تخمیر ۱۰ کربوهیدرات، واکنش‌های اورنتین دکربوکسیلاز و ONPG ابداع کردند. مطابق این روش *پاستورلا مولتوسیدا* به ۱۶ بیووار تقسیم می‌گردد. هم‌خوانی نسبتاً مناسبی بین این بیوارها و تحت گونه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* وجود دارد، به‌طوری‌که بیوار ۷ و ۸ روش مذکور معادل زیر گونه سپتیکا و گالیسیدای *پاستورلا مولتوسیدا* و زیرگونه مولتوسیدا به نوبه خود به چهارده بیووار تقسیم می‌گردد (۳).

با وجود این‌که در روش تخمیر در میکروپلیت، *پاستورلا مولتوسیدا* به ۱۶ بیووار تتقسیم می‌گردد، اما مطالعات در خصوص نمونه‌های خوکی و طیور وجود برخی از واریانت‌های بیوشیمیائی را نشان می‌دهد که اختلافاتی با بیوارهای مذکور دارند. این واریانت‌ها جهت استفاده در آزمایشات تشخیصی می‌بایست همواره ثبت وگزارش گردند (۴). هدف از این پژوهش بررسی حضور چنین واریانت‌هایی در میان سویه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* گوسفندی در ایران و ثبت آن‌ها می باشد.

## مواد و روش‌کار

در مطالعه حاضر، تعداد ۲٤ جدایه حاصل از گوسفندان دچار آبریزش بینی جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه میکربیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر مورد مطالعات بیوشیمیائی تکمیلی قرار گرفتند. همه ۲٤ جدایه به‌صورت کامل توسط آزمایشات بیوشیمیایی با استفاده از روش تخمیر در میکروپلیت تحت تعیین فنوتیپ قرار گرفتند. توانایی تخمیر قندهای ال- آرابینوز، دلسیتول، دی-گلوکز، دی- لاکتوز، مالتوز، دی-مانیتول، دی-سوربیتول، دی-ساکاروز، دی-تره‌هالوز و دی-زایلوز و نیز فعالیت بتاگالاکتوزیداز، اورنتین دکربوکسیلاز و اوره‌آز واکنش‌های مورد نظر در روش تخمیر در میکروپلیت بودند. این روش توسط Blackall از مؤسسه تحقیقات حیوانات در استرالیا ابداع و در اختیار نگارندگان قرار گرفت. بدیهی است روش ارسالی بدون هیچ کم و کاستی به اجرا درآمده است. شرح انجام آزمایش به اختصار به قرار ذیل است. ابتدا محیط پایه شامل ۱ گرم پپتون، ۰/۵ گرم نمک طعام و ۰/۵ میلی‌لیتر بروموکروزول ارغوانی ۱٪ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیّه و در میکروپلیت‌ها پخش گردید. در مرحله بعد از کربوهیدرات مورد نظر محلول ۲۰٪ آماده شده و به محیط پایه در میکروپلیت‌ها اضافه گردید. در همه گوده‌های ستون اول میکروپلیت‌ها، ۲۰۰ میلی گرم از محیط ONPG و در ستون دوم به‌همان میزان آب تریپتون (برای آزمایش اندول) افزوده شد. جهت تلقیح از محیط تازه ۲٤ ساعته جدایه‌های پاستورلامولتوسیدا سوسپانسیون غلیظی برای آزمایش تهیّه و سپس هر ارگانیزم در ردیفی کامل از میکروپلیت تلقیح می‌گردید. در کنار میکروپلیت تلقیح شده محیط اوره‌آز معمول و آزمایش اورنتین دکربوکسیلاز (ODC) به‌صورت آزمایش لوله نیز استفاده می‌شد. میکروپلیت‌های تلقیح شده در جعبه‌ای مرطوب در ۳۷ درجه گرم خانه‌گذاری می‌گردیدند.

## نتایج

از ۲۳ جدایه تعیین بیوار شده در این مطالعه تعداد ۱۸ مورد متعلّق به *پاستورلا مولتوسیدا* تحت گونه مولتوسیدا بیوار ۲، ۳، ٦ و ۱۱ آن بودند. ٦ جدایه باقی‌مانده از نقطه نظر فنوتیپی متعلّق به *پاستورلا مولتوسیدا* زیر گونه سپتیکا (بیوار ۷) بودند. در میان بیوارهای مذکور بیوار ٦، با هشت جدایه (٤٤/٤ ٪) بیشترین میزان جدایه‌ها را به‌خود اختصاص می‌داد.

واریانت‌های مشاهده شده در این میان نیز بیشتر مربوط به بیوار ٦ و ۷ بودند. در میان بیوارهای ٦، چهار مورد مانیتول منفی،

یک مورد مانیتول و ODC منفی و یک مورد مانیتول و مالتوز منفی بودند. دو مورد از بیوارهای ۷ (*پاستورلا مولتوسیدا* زیر گونه سپتیکا) نیز واکنش ساکاروز مثبت داشتند.

## بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون دو مطالعه در خصوص تعیین فنوتیپ *پاستورلا مولتوسیدا* در ایران انجام پذیرفته است. مطالعه اول توسط جباری و همکاران در سال ۱۳۸۰ بر روی جدایه‌های طیور انجام گرفته و بدون اشاره به بیوارهای جدایه‌های مذکور تمام آن‌ها را *پاستورلا مولتوسیدا* تحت‌گونه مولتوسیدا معرفی نموده است (۱). مطالعه دوم بر روی جدایه‌های گوسفندی توسط Shayegh و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام پذیرفته که *پاستورلا مولتوسیدا* زیرگونه سپتیکا و بیوارهای ۲، ۳، ۴، ۵ ، ۶ و ۱۱ *پاستورلا مولتوسیدا* تحت‌گونه مولتوسیدا گزارش گردیده‌اند (۹). در هیچ‌یک از گزارشات مذکور اشاره‌ای به واریانت‌های احتمالی مورد مشاهده نشده است .

در میان ۲۴ نمونه مورد مطالعه در این بررسی، تعداد ۹ جدایه دارای واکنش‌های بیوشیمیائی غیر معمول بودند. در این میان یک مورد از جدایه‌ها دارای واکنش ODC منفی بود. مطالعات قبلی نیز وجود چنین واریانت‌هایی را در میان جدایه‌های خوکی و ماکیان گزارش کرده بودند (۴ و ۶).

وجود واریانت‌های مانیتول منفی در میان سویه‌های گوسفندی در این مطالعه حائز اهمّیت می‌باشد. مطالعات قبلی وجود واریانت لاکتوز مثبت در میان جدایه‌های خوکی و طیور را گزارش کرده بودند. از دیگر واریانت‌های کربوهیدراتی مهم وجود واریانت‌های دلسیتول منفی در میان بیوارهای ۸ (زیر گونه گالیسیدا) جدا شده از خوک در ویتنام می‌باشد (۱۰). گزارش واریانت مانیتول منفی بیوار ۶ را می‌توان از اختصاصات این بیوار در منطقه مورد مطالعه دانست.

همچنین وجود واریانت‌های ساکاروز منفی بیوار ۷ (زیرگونه سپتیکا) از دیگر اختصاصات جدایه‌های استان آذربایجان‌شرقی است. اگر چه در این مطالعه فراوانی بالائی از بیوار ۷ گزارش شده است، اما مطالعات اخیر نشان داده است که الگوی تخمیر دلسیتول وسوربیتول هماهنگی کافی با روش ژنتیکی تعیین تحت تیپ را ندارند (۵). بدین ترتیب، اگر چه از دید فنوتیپی برخی از جدایه‌های مورد مطالعه زیرگونه سپتیکا باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* تشخیص داده شده‌اند، لیکن برای تأیید نهائی جداسازی این عامل در ایران نیاز به بررسی ژنتیکی بر پایه توالی‌یابی S ۱۶rRNA و دورگه سازی DNA-DNA وجود دارد. احتمال عدم تأیید این جدایه‌ها به‌عنوان زیرگونه سپتیکا با توجّه به ارتباط نزدیک این زیرگونه با جدایه‌های حاصل از گربه و طیور قوت بیشتری به خود می‌گیرد (۵).

## تشکر و قدردانی

راهنمایی‌های اساتید محترم آقایان دکتر محمد سعید حجازی و دکتر تقی زهرائی صالحی در این تحقیق شایسته قدردانی و تشکر است.

## فهرست منابع

۱. جباری، ا.، اسماعیلی، ف.، صفی مرندی، م. و پوربخش، س.ع. (۱۳۸۰): مطالعه بیوتیپ و سروتیپ *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شده از طیور ایران، پژوهش وسازندگی، دوره ۵۲، صفحات: ۶۷-۶۴.

۲. زهرائی صالحی، ت. و شایق، ج. (۱۳۸۶): میکروب‌شناسی دامپزشکی و بیماری‌های میکروبی (بخش بیماری‌های باکتریائی) (ترجمه)، تالیف: کویین وهمکاران، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۷۴-۵۶.

3. Blackall, P.J., Pahoff, J.L. and Bowles, R. (1997): Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs .Veterinary Microbiology, 57: 355–360.

4. Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Marks, D., Fegan, N. and Morrow, C.J. (1995): Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from fowl cholera outbreaks on seven turkey farms. Aust. Vet. J., 57: 382-387.
5. Davies, R.L. (2004): Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. Microbiology, 150.Pt 12: 4199-210.
6. Fegan, N., Blackall, P.J. and Pahoff, J.L. (1995): Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. Vet. Microbiol., 47: 281-286.
7. Harper, M., Boyce, J.D. and Adler, B. (2006): *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol. Lett., 265: 1–10.
8. Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W. and Mannheim, W. (1985): Reclassification of the genus *Pasteurella trevisan* on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis, Pasteurella canis, Pasteurella stomatis, Pasteurella anatis, and Pasteurella langaa*. Int. J. Syst. Bacteriol., 35: 309–322.
9. Shayegh, J., Atashpaz, S. and Hejazi, M.S. (2008): Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. Asian Ani. Vet. Ad., 3(4): 206-13.
10. Townsend, K.M., O'Boyle, D. and Phan, T.T., et al. (1998): Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. Vet. Microbiol., 63: 205-215.