مطالعه تنوع مولکولی باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* در جدایه‌های گاوی و گاومیشی استان آذربایجانشرقی به روش برش با آنزیم‌های تعیین حدودی

جلال شایق*[۱]، علی‌رضا منادی[۲]، جلیل دولگری‌شرف[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، استادیار گروه دامپزشکی، شبستر، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، استادیار گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، کارشناس ارشد گروه دامپزشکی، شبستر، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: Jalal_shayeghi@yahoo.co.in
(دریافت مقاله: ۹۲/۵/۲۸ پذیرش نهایی: ۹۳/۴/۳)

چکیده

در مقاله حاضر، جهت مطالعه بیشتر تنوع ژنتیکی جدایه‌های باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شده از گاو و گاومیش تعداد ۱۰ نمونه شامل ۸ نمونه گاوی و ۲ نمونه گاومیشی با روش برش با آنزیم‌های تعیین حدودی مورد مطالعه قرار گرفت. این روش با استفاده از آنزیم آندونوکلئاز Hha-I اجرا و در نتیجه دو نوع الگوی مشخص I و II تولید شد. در هر دو الگو نمونه‌های گاوی و گاومیشی حضور داشتند. برخلاف مطالعات مشابه تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها اندک بود. در ضمن با توجه به مشابهت سویه‌های گاومیشی و گاوی در این مطالعه، پیشنهاد می‌گردد مطالعه دیگری با نمونه‌های بیشتر جهت بررسی امکان انتقال سویه‌های گاوی و گاومیشی در میان هم بررسی گردد.

کلید واژه‌ها: ***پاستورلا مولتوسیدا*، گاو و گاومیش، روش برش با آنزیم‌های تعیین حدودی، تنوع مولکولی.**

مقدمه

پاستورلا مولتوسیدا یکی از عوامل باکتریائی بسیار مهم در بیماری‌های گاو و گاومیش بوده و علاوه بر آن در گوسفند، خوک و طیور نیز ایجاد بیماری می‌کند. این باکتری در گاو عامل سپتی سمی هموراژیک (Hemorrhagic septicemia) و یکی از عوامل دخیل در تب حمل و نقل و پاستورلوز ریوی گاوی (Bovine pneumonic pasteurellosis) می‌باشد. در گوسفند نیز *پاستورلا مولتوسیدا* از عوامل دخیل در پاستورلوز ریوی محسوب می‌شود. این بیماری یکی از مشکلات جدی در طب گاو و گوسفند بوده و امروزه تلاش‌های بسیاری در جهت مبارزه و پیشگیری از این بیماری در حال انجام می‌باشد (Quine *et al*., 2002).

مطالعه و تعیین تیپ در *پاستورلا مولتوسیدا* به هر دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی مورد ارزیابی قرار گرفته و سیستم‌های متعددی برای آن مطرح است. اما روش‌های

مطالعه فنوتیپی *پاستورلا مولتوسیدا* با ایراداتی روبرو می‌باشند (Towensend *et al*., 2001). بنابراین، در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های شناسائی و دسته‌بندی با روش‌های مولکولی رایج گردیده و تلاش‌های بسیاری در جهت تقسیم‌بندی باکتری بر پایه خصوصیات ژنتیکی در حال انجام است. از روش‌های مهم تعیین ژنوتیپی می‌توان به روش برش با آنزیم‌های تعیین حدودی (Restrictions endonuelease analysis, REA)، Ribotyping، Pulsed field gel electrophoresis، Multilocus enzyme electrophoresis و نیز REP-PCR (Repetitive-extragenic plaindormic PCR) اشاره کرد. در میان این روش‌ها روش REA به تنهائی یا در کنار روش Ribotyping جهت تعیین قرابت اپیدمیولوژیک بین جدایه‌های مختلف شده و میزان صحت حساسیت و اختصاصیت این روش بسیار بالا ارزیابی گردیده است (Blackall and Miffin, 2000).

تاکنون استفاده از روش فوق در مطالعات اپیدمیولوژیک جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* از طیور، گاو، خوک وگوزن نتایج مطلوبی را در پی داشته است (Davise *et al*., 2004; Weiser *et al*., 2003) تاکنون دو مطالعه با این روش در ایران روی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* در طیور و نیز بز و گوسفند انجام شده است (Jabbari *et al*., 2002; Shayegh *et al*., 2011).

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌ها: در مطالعه حاضر تعداد ۱۰ جدایه حاصل از پنومونی گاو که در آزمایشگاه میکربیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر قبلاً مورد مطالعات بیوشیمیائی قرار گرفته و به روش مولتی پلکس PCR تایید و نیز از نظر کپسولی تعیین تیپ شده بود (Shayeh *et al*., 2010a)، تهیه شد (جدول ۱).

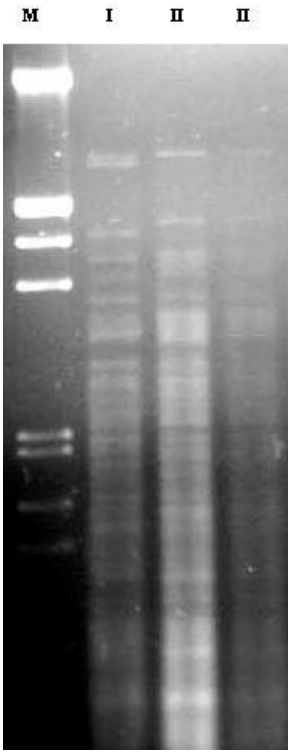
استخراج DNA: روش استخراج DNA برای همه جدایه‌ها با استفاده از پروتکل بلاکال و همکاران، با اصلاحاتی به شرح ذیل انجام گردید (Blackall *et al*., 1995). ابتدا ۲ تا ۳ پرگنه *پاستورلا مولتوسیدا* در محیط BHI broth (مرک) ، داخل لوله‌های درپیچ دار به ابعاد ۱۲×۱٦ کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با حرکت ملایم به‌مدت ۲٤ساعت انکوبه شدند. لوله حاوی باکتری در ٦۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی بیرون ریخته شد و یک میلی‌لیتر از بافر فسفاته نمکی (PBS) به پلیت حاصله افزوده گردید. در مرحله بعد محتوای لوله به یک میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری تمیز ریخته شده، مجدداً در ۱۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌منظور شستشو سانتریفیوژ انجام گرفت. این عمل ۳ بار تکرار شد. سپس مقدار یک میلی‌لیتر از بافر سالین ۰/۸۵ درصد و EDTA ۰/۰۵ مولار به آن افزوده و به‌شدت ورتکس شد. در مرحله بعد مقدار ۱۰۰۰µl از محلول لیزوزیم (فرمنتاز) با غلظتی برابر ۲۰ mg/ml به میکروتیوب فوق افزوده گردیده و در داخل بن ماری با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ٦۰ دقیقه انکوبه و سپس به آرامی مخلوط گردید. مقدار ۱۰۰µl از محلول SDS ۲۵ درصد به میکروتیوب فوق افزوده و دوباره به آرامی مخلوط شد. در مرحله بعد مقدار ۱۰µl از محلول پروتئیناز k با غلظتی برابر ۲۱/٤ mg/ml به میکروتیوب فوق افزوده شده و در داخل یخ به مدت ۱۵دقیقه انکوبه و سپس به آرامی مخلوط گردید. میکروتیوب فوق در داخل بن‌ماری با دمای ٦۵ درجه

سلسیوس به‌مدت ۲۵ دقیقه انکوبه و مقدار µl ۱۰/۵ ازمحلول RNase با غلظتی برابر mg/ml ۱۰به میکروتیوب فوق افزوده و در داخل بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و سپس به آرامی سر و ته گردید. در مرحله بعدی مقدار µl ۸۰۰ از محلول کلروفرم-فنل (۱ به ۱) به عصاره فوق افزوده شده و با احتیاط و به آرامی مخلوط گردید. پس از آن میکروتیوب فوق در rpm ۱٤۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه در ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. فاز رویی داخل میکروتیوب به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری جدید و تمیز انتقال داده شد. مقدار ۰/۲۵ حجم کلی از محلول استات سدیم ۳ مولار به محتوای میکروتیوب فوق افزوده و به آرامی مخلوط شد. مقدار ۲/۵ برابر حجم کلی از اتانول مطلق با دمای ۲۰- درجه سلسیوس به محتوای میکروتیوب فوق افزوده و به آرامی مخلوط گردیده و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، میکروتیوب‌ها در دور rpm ۱٤۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه در ٤+ درجه سانتریفیوژ گردیدند. اتانول با وارونه قرار دادن میکروتیوب حاوی DNA استخراج شده، خارج و تا خشک شدن کامل در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از آن مقدار µl۱۰۰ آب دیونیزه به آن اضافه و به آرامی با سمپلر مخلوط شد. پس از استخراج بلافاصله غلظت DNA استخراج شده با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲٦۰ نانومتر محاسبه گردید.

اجرای روش REA با استفاده از آنزیم HhaI: پس از تنظیم غلظت DNA استخراج شده به میزان ۵ میکروگرم روش REA پیشنهاد شده توسط Sambrook (۱۹۹۵)، به‌مدت ۳ ساعت مورد هضم آنزیمی با آنزیم HhaI قرار داده و پس از خنثی‌سازی آنزیم طبق بروشور کارخانه سازنده مقدار ۲۰میکرولیتر از DNA هضم شده با ٤ میکرولیتر از 6xLoading Dye solution مخلوط و به‌صورت افقی در ژلی از آگارز با غلظت ۰/۷ درصد در ۲۵ ولت و به‌مدت ۱٦ ساعت الکتروفورز گردید. ژل حاصله به‌مدت ۳۰ دقیقه در اتیدیوم بروماید، رنگ‌آمیزی و سپس با استفاده از دستگاه Thech UV عکس‌برداری گردید.

یافته‌ها

روش REA با استفاده از آنزیم HhaI: نتایج حاصل از استخراج DNA پس از ارزیابی با روش اسپکتروفتومتر و الکتروفورز نشان از استخراج با نتایج مطلوب و غلظت مناسب داشت. نتایج حاصل از اجرای روش تعیین تیپ REA پس از استخراج DNA رضایت‌بخش بوده و الگوهای حاصل از هضم آنزیمی در شکل ۱ ارائه شده‌اند. بررسی الگوهای حاصله از REA وجود ۲ الگو (I و II) را نشان می‌دهد. هر دو الگوی حاصله بین جدایه‌های به‌دست آمده از گاو و گاومیش مشترک بودند (جدول ۱).



شکل۱- M: نشانگر فاژی لامبدا، I: الگوی شماره I ،II: الگوی شماره II

جدول ۱- نمونه‌های مورد استفاده و نتایج حاصله

شماره جدایه	میزبان جدا شده	ژنوتیپ کپسولی	الگوی REA
۱	گاو	A	I
۲	گاومیش	D	I
۳	گاو	B	I
۴	گاو	A	II
۵	گاو	A	II
۶	گاومیش	A	II
۷	گاو	A	II
۸	گاو	B	II
۹	گاو	B	II
۱۰	گاو	B	II

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر، اولین مطالعه ژنوتیپی درخصوص جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* گاوی و گاومیشی در ایران با روش برش با آنزیم‌های تعیین حدودی است. نتایج تنها دو نوع الگوهای حاصله از روش مذکور را نشان می‌دهد. این نتایج در مقایسه با نتایج مطالعات مشابه در ایران (Jabbari et al., 2002; Shayegh *et al*., 2011) بیان می‌دارد که جدایه‌های گاوی و گاومیشی

برخلاف جدایه‌های گوسفندی و بزی و همچنین جدایه‌های طیور دارای تنوع ژنتیکی کمتری می‌باشند و در تیپ‌بندی به این روش به الگوهای کمتری تعلق می‌گیرند.

شایق و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه جدایه‌های بزی و گوسفندی توانسته‌اند آنها را به ترتیب در ۵ و ٦ گروه تقسیم‌بندی نمایند (Shayegh *et al*., 2011). مطالعه جباری و همکاران (۲۰۰۲) نیز تنوع بیشتری را در میان جدایه‌های طیور در کشور نشان می‌دهد (Jabbari *et al*., 2002).

نتایج این مطالعه با یافته‌های دیویس در سال ۲۰۰٤روی جدایه‌های گاوی مغایرت دارد. در مطالعه دیویس (۲۰۰٤) این تنوع بیشتر گزارش شده است و شاید این امر به‌دلیل محدود بودن نمونه‌های گاوی و گاومیشی در مطالعه حاضر باشد (Davise *et al*., 2004).

مطالعه توامان تعلق تیپ‌های کپسولی مختلف به الگوهای مشخص روش برش با آنزیم‌های تعیین حدودی در مطالعه حاضر رابطه خاصی را بین این دو دسته نشان نمی‌دهد. در مطالعات مشابه نیز چنین ارتباطی ملاحظه نگردیده بود. بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه نتایج مطالعات قبلی را تصدیق می‌کند (Jabbari *et al*., 2002; Shayegh *et al*., 2011).

ارتباط میان جدایه‌های گاوی با گاومیشی که تنها در دو الگو دیده می‌شوند و شاید احتمال تبادلات جدایه‌ائی میان این دو گونه میزبانی را مطرح سازد. هر چند تعداد بیشتری جدایه از هر دو میزبان برای چنین ادعایی لازم است. برخی از مطالعات امکان چنین رویدادی را در میان دو میزبان گوسفند و بز در حیات وحش (Wesseir *et al*., 2002; Rudolph *et al*., 2003) و در گله‌های مخلوط گوسفند و بز در روش سنتی نگه‌داری ایشان در برخی کشورها از جمله ایران (Shayeh, *et al*., 2010b; Shayegh *et al*., 2011) محتمل دانسته‌اند. احتمال وجود چنین ارتباطی در میان گاو و گامیش نیز با توجه به سیستم پرورشی سنتی این دو حیوان در ایران نیز دور از ذهن نیست.

با توجه به نتایج به‌دست آمده احتمال تبادل جدایه‌های گاوی و گاومیشی مطرح می‌گردد. پیشنهاد می‌شود این فرضیه با تعداد جدایه‌های بیشتر *پاستورلا مولتوسیدا* و نیز روش‌های دیگر همچون بررسی تشابه توالی ١٦sRNA تکرار گردد.

منابع

- Blackall, P.J. and Mifin, J.K. (2000). A review of Identification and typing of *Pasteurella multocida* Avian Pathology, 29: 271-287.
- 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. Australian Veterinary Journal, 72(4): 135-138.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R. and Reilly, S. (2004). Characterisation of bovine strains 2 of Pasteurella multocida and comparison with isolates of avian, ovine and porcine 3 origin. Veterinary Microbiology, 99: 145-158.

- Jabbari, A.R., Saharee, A. and Esmaily, F. (2002). Characterization of avian *Pasteurella multocida* isolates by protein profiles and Restrection endonuelase analysis chromosomal DNA. Archive of Razi Institute, 15(1): 143-159.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2003). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. U.K., London: Blackwell Publishing.
- Rudolph, K.M., Hunter D.L., Forey W.J., Cassirer E.F., Rimler R.B. and Ward A.C.S. (2003). Sharing of Pasteurella spp. Between Free-ranging Bighorn Sheep and Feral Goats. Journal of Wildlife Diseases, 39(4): 897-903.
- Shayegh, J., Atashpaz, S., Zahraei Salehi, T. and Hejazi, M.S. (2010a). Potential of *Pasteurella multocida* Isolated from Healthy and Diseased Cattle and Buffaloes in Induction of Diseases. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 54: 299-304.
- Shayegh, J., Parvizi, M. and Hejazi, M.S. (2010b). Diversity of Caprine and Ovine Pasteurella multocida Isolates Based on 16s rRNA Gene Sequencing. Iranian Journal of Veterinary Research, 11(4): 373-377.
- Shayegh, J., Mikaili, P., Dolgari Sharaf, J., Kamani, J. and Beheshti, R. (2011). Restriction endonuclease analysis: isolation and identification of ovine and caprine Pasteurella multocida. Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences, 1(9): 611-613.
- Weiser, G.C., DeLong, W.J., Paz, J.L., Shafii, B., Price, W.J. and Ward, A.C. (2003). Characterization of Pasteurella multocida associated with pneumonia in bighorn sheep. Journal of Wild Animal Disease, 39: 536-544.

Molecular diversity of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and buffaloes in East Azerbaijan province based on restriction endonuclease analysis

Shayegh, J.[1*], Monadi, A.[2], Dolgari Sharaf, J.[3]

1- Assistant Professor, College of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Master of Science, College of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.
*Corresponding author's email: Jalal_shayeghi@yahoo.co.in
(Received: 2013/8/19 Accepted: 2014/6/24)

Abstract

In order to increase information about the molecular diversity of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and buffalo, 2 buffalo and 8 cattle isolates were investigated by Restriction Endonuclease Analysis (REA). REA was performed with Hha-I Endonuclease which established 2 distinct profiles: I and II. Cattle and buffalo isolates fell into both REA profiles. Contrary to previous studies, the genetic diversity of the isolates was negligible. Considering the similarity of cattle and buffalo isolates is the present study, further studies witch larger samples should be carried out to investigate the possibility of inter-species transmission.

Key word: *Pasteurella multocida*, Cattle and buffalo, Restriction Endonuclease Analysis, Genetic diversity.