

بررسی مولکولی فاکتورهای ویروالانس پاستورلا مولتوسیداهای جدا شده از گوسفند در ایران

الهه رضایی^۱، احمد رضا جباری^{۲*}، مجید اسمعیلی زاد^۳، عباس دوستی^۴

۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- آزمایشگاه ملی تحقیقات پاستورلا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- آزمایشگاه مرکزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۴- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

پدیرش: ۲۰ تیر ۱۳۹۴

دریافت: ۱ مرداد ۱۳۹۳

چکیده

پاستورلا مولتوسیدا یکی از باکتری‌های مهم پاتوژن در انسان و بسیاری از حیوانات می‌باشد. این باکتری عامل بیماری‌های مختلفی از جمله پنومونی در نشخوارکنندگان، رینیت آتروفیک درخوک، وبای مرغان و سپتی سمی هموراژیک در گاو است. عوامل حدت مختلفی در بیماری زایی این باکتری شناسایی شده‌اند؛ از جمله آنها، پروتئین غشای خارجی *OmpH*، آدهسین‌ها شامل ژن‌های *fimA hsf-1 atadD phfA ptfA* و ژن درمونکروتوکسین (*toxA*) را می‌توان نام برد. هدف از این مطالعه بررسی حضور این ژن‌ها در بین جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا به دست آمده از موارد پنومونی در گوسفند است. بدین منظور سی جدایه پاستورلا مولتوسیدا با روش‌های باکتری‌شناسی و بیوشیمیایی تعیین هویت گردیدند. تمام جدایه‌ها با روش *PM-PCR* و استفاده از پرایمر اختصاصی *KMT1* مورد تایید قرار گرفت و با روش *CAP-PCR* تیپ کپسولی آن‌ها مشخص گردید. تایپینگ مولکولی نشان داد که جدایه‌های گوسفندی مورد مطالعه به گروه کپسولی *A* تعلق دارند. همه جدایه‌ها حاوی ژن‌های *OmpH* و *fimA* بودند، اکثر جدایه‌ها (۹۳/۳٪) حاوی ژن‌های *hsf-1 ptfA* و ۹۰٪ دارای ژن *toxA* بودند. کمترین فراوانی در ژن‌های *phfA* و *tadD* مشاهده شد (۳۶/۶٪). حضور عوامل حدت، پتانسیل ژنتیکی جدایه‌های مذکور را برای ایجاد بیماری پنومونی گوسفندان نشان می‌دهد. مطالعه تکمیلی به منظور مشخص شدن نقش فنوتیپی هر یک از عوامل حدت در ایجاد بیماری توصیه می‌شود. به طور کلی بررسی فاکتورهای حدت، به انتخاب سویه مناسب، برای تهیه واکسن کارآمد و مفید کمک می‌کند.

کلمات کلیدی: پاستورلا مولتوسیدا، عوامل حدت، *PCR*

* نویسنده مسئول: احمد رضا جباری

آدرس: موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، حصارک، کرج، ایران. تلفن: ۰۲۶۳۴۵۷۰۰۳۸

پست الکترونیک: a.jabbari@rvsn.ac.ir

مقدمه

پاستورلا مولتوسیدا باکتری کوکوباسیل، گرم منفی، غیر متحرک از خانواده پاستورلاسه می باشد. این باکتری، کپسول دار بوده و بر اساس تفاوت آنتی ژن کپسولی به ۵ گروه A, B, D, E, F و براساس آنتی ژن لیپوپلی ساکارید (LPS) به ۱۶ سرو تایپ تقسیم می شود. این باکتری جزء فلور طبیعی انسان نیست ولی معمولاً در غشای مخاطی حیوانات وحشی و اهلی وجود دارد. پاستورلاها جزء بیشترین گونه هایی هستند که می توانند به عنوان پاتوژن اولیه یا فرصت طلب در میزبان عمل کنند و مسئول خسارتهای اقتصادی فراوانی در صنعت دام و طیور اند (۱۱ و ۱۵).

ارتباط مشخصی بین بیماری هایی ایجاد شده توسط پاستورلا مولتوسیدا و نوع تیپ کپسول وجود دارد. تیپ های A و D باعث بیماری وبای مرغان و پنومونی وابسته به رینیت آتروفیک در خوک می شوند. بیماری رینیت آتروفیک بوسیله سویه های پاستورلا مولتوسیدا توکسین زاء Dermonecrotic ایجاد می شود. تیپ A در گاو باعث پنومونی نیز می گردد، در حالی که تیپ های B و E عامل سپتی سمی خونریزی دهنده هستند (۱).

تاکنون عوامل مختلفی به عنوان فاکتورهای حدت مؤثر در بیماری زایی پاستورلا مولتوسیدا شناخته شده است. فاکتورهای حدت باعث تهاجم به میزبان، تسهیل کلونیزاسیون و اجتناب یا اختلال در مکانیزم های دفاعی، آسیب به بافت های میزبان و همچنین تحریک پاسخ التهابی مضر می شوند. کپسول و لیپوپلی ساکارید (LPS) دو عامل مهم بیماری زایی در پاستورلا مولتوسیدا می باشند. علاوه بر این دو عامل، گروه های مختلفی از جمله پروتئین های غشای خارجی، ادهسین ها، نورآمینیدازها، سیدروفورها، سوپراکسید دسموتاز و

توکسین ها به عنوان عوامل حدت باکتری شناخته شده اند (۴ و ۹).

در پاستورلا مولتوسیدا پروتئین های غشای خارجی نقش مهمی در بیماری زایی دارند و از آن ها می توان برای تهیه واکسن استفاده نمود، از وظایف این پروتئین ها، کمک به باکتری برای انطباق با محیط های مختلف و میزبان می باشند. (۱۶). از پروتئین های غشای خارجی پاستورلا مولتوسیدا که در پاتوژنز نقش دارند، ompH، حائز اهمیت است که به خانواده پورین و پروتئین های تغییر حرارت^۱ مربوط می شود. ompH یک پروتئین عمده غشای خارجی با وزن مولکولی ۳۴ تا ۴۲ کیلودالتون است که تحقیقاتی در مورد بررسی آن به عنوان کاندیدای یک واکسن مؤثر انجام گردیده است (۹ و ۲۰).

چسبندگی باکتری ها به سلول میزبان، یک گام حیاتی در کلونیزاسیون و پاتوژنز بیماری به شمار می رود که توسط ادهسین ها انجام می گردد. ادهسین ها عوامل مؤثر در تثبیت باکتری بر سطح سلول اپی تلیال میزبان محسوب می شوند و در تیپ های A، B و D دیده می شوند. ژن های این گروه شامل $ptfA^2$ ، $fimA^3$ ، $pfhA^4$ ، $hsf-1^5$ ، $hsf-2$ و $tadD^6$ می باشند (۲۱).

خالص سازی فیمبریه به وسیله کروماتوگرافی معکوس یک زیر واحد ۱۸ kDa را نشان می دهد. آنتی سرم ایجاد شده علیه این پروتئین مشخص نمود که پاستورلا دارای فیمبریه نوع ۴، شامل یک زیر واحد آنتی ژنی به نام ptfA می باشد که باعث تسهیل فرایند عفونی، تسهیل اتصال پاستورلا مولتوسیدا به سطوح مخاطی و افزایش

¹ Heat-modifiable protein

² Type 4 fimbriae

³ fimbriae

⁴ Filamentous hemagglutinin

⁵ Autotransporter adhesin

⁶ Putative nonspecific tight adherence protein D



توکسین (ToxA) بر روی سویه‌های گوسفندی در ایران می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

۲۸ جدایه پاستورلا مولتوسیدای گوسفندی مبتلا به پنومونی که در مناطق مختلف ایران از جمله تهران (۲ جدایه)، شیراز (۲ جدایه)، کرمان (۲ جدایه)، اصفهان (۳ جدایه)، فارس (۸ جدایه) و قم (۱۱ جدایه) بین سال‌های ۸۷ تا ۹۱ جدا شده بود، استفاده گردید. علاوه بر این جدایه‌ها، یک سویه واکسینال تیپ A جدا شده از طیور و یک سویه واکسینال تیپ B جدا شده از گاو برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت.

• کشت و جداسازی اولیه

کشت اولیه بر روی محیط آگار خون دار انجام شد و پلیت‌ها در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. کلنی‌های شبیه به پاستورلا مولتوسیدا روی محیط‌های MacConky Agar, SIM, MRVP, KIA, Urease, Ornithin Decarboxilase کشت و مورد بررسی قرار گرفتند. ویژگی‌های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز و تست اندول نیز انجام شد.

• استخراج DNA و انجام PCR

به منظور استخراج DNA مربوط به جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا از کشت ۲۴ ساعته در محیط Blood Agar، از روش boiling استفاده شد. کلنی‌ها از کشت تازه Blood Agar در ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول TE حل شد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 100°C 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 ۴ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر پیش رو، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر معکوس (با غلظت ۵ پیکو

قابلیت چسبندگی به بافت‌های اپی تلیال می‌شود. فیمریه تیپ A قابلیت اتصال خصوصاً در مخاط اپی تلیوم، نازوفارنکس و سلول‌های Hela را دارد. برای مشخص شدن نقش فیمریه نوع ۴ در بیماری زایی نیاز به نوترکیب ptfA است (۲۰). TadD یک آنتی ژن غیراختصاصی است که به پروتئین D می‌چسبد و به میزان قابل توجهی در گروه A وجود دارد (۹ و ۲۰).

pfha مشابه ژن‌های باکتری بوردتلا پرتوسیسی است که به عنوان کنترل کننده چسبندگی بر سلول میزبان و استقرار باکتری در دستگاه تنفسی عمل می‌کند. با بررسی سویه‌های حدت یافته بوقلمون ثابت گردید که در این ژن موتاسیون صورت گرفته است، در نتیجه این ژن در پاستورلا مولتوسیدا یک عامل حدت به شمار می‌رود و در سروگروپ D در مقایسه با سروگروپ A شیوع کمتری را نشان داده است (۲۱).

ژن ToxA کروموزومی یک سم در مونوکروتیک که ۱۴۳ kDa است را کد می‌کند که به عنوان عامل اتیولوژیک اصلی در رینیت آتروفیک به شمار می‌رود (۱۲ و ۱۳).

تاکنون مطالعات اندکی در ایران در جهت بررسی فاکتورهای حدت پاستورلا مولتوسیدا صورت گرفته است و با توجه به اینکه این فاکتورهای حدت در بیماری زایی باکتری دارای اهمیت بالایی می‌باشند، شناسایی آن برای تعیین راهکارهایی جهت تولید واکسن ضروری است لذا انجام چنین پژوهشی در کشور، راه را برای مطالعات آینده هموار می‌سازد.

مطالعه حاضر علاوه بر بررسی بیوشیمیایی پاستورلا مولتوسیدا، به تعیین ژنوتیپ کپسولی و بررسی ۷ فاکتور حدت مهم شامل پروتئین غشای خارجی (OmpH)، ادسین‌ها (TadD, PfhA, Hsf1, FimA, PtfA) و

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. هر کدام از این جفت پرایمرها نیاز به برنامه زمانی و دمایی ویژه دارد که در جدول ۲ نشان داده شده است. (۲۱ و ۲۲)

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. ۱۱ جفت پرایمر برای مطالعه

جدول ۱: پرایمر های استفاده شده برای بررسی فاکتورهای حدت باکتری پاستورلا مولتوسیدا

Primer name	Description	Primer sequence(5'-3')	Amplicon size
(KMT1)P M	Identification all Pasteurella multocida	5'-ATCCGCTATTTACCCAGTGG-3' 5'-GCTGTAAACGAACCTCGCCAC-3'	460
CAPA	Capsule protein A	5'-TGCCAAAATCGCAGTCAG-3' 5'-TGCCATCATGTGTCAGTG-3'	1044
CAPB	Capsule protein B	5'-CATTTATCCAAGTCCACC-3' 5'-GCCCGAGAGTTTCAATCC-3'	758
CAPD	Capsule protein D	5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' 5'-CATCTACCACTCAACCATATCAG-3'	647
OmpH	Outer membrane protein H	5'-CGCGTATGAAGTTTAGGT-3' 5'-TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC-3'	1100
FimA	Fimbriae	5'-CCATCGGATCTAAACGACCTA-3' 5'-AGTATTAGTTCTGCGGGTG-3'	866
PtFA	Type 4 fimbriae	5'-TGTGGAATTCAGCATTTAGTGTGTC-3' 5'-TCATGAATCTTATGCGCAAAAATCCTGCTGG-3'	488
Hsfl	Autotransporter adhesion	5'-TTGAGTCGGCTGTAGAGTTCG-3' 5'-ACTCTTAGCAGTGGGGACAACCTC-3'	654
PfhA	Filamentous hemagglutinin	5'-TTCAGAGGATCAATCTTCG-3' 5'-AACCCAGT TGGTTGTGCG-3'	286
TadD	Putative nonspecific tight adherence protein D	5'-TCTACCCATTTCTAGCAAGGC-3' 5'-ATCATTTCGGGCATCACC-3'	416
ToxA	Dermonecrotic toxin	5'-CTTAGATGAGCGACAAGG-3' 5'-GAATGCCACACCTCTATAG-3'	864

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

Primer	مرحله اول		مرحله اصلی ۳۵×		مرحله نهایی
	واش و اسرشت اولیه	واش و اسرشت	تکثیر اتصال و اسرشت	تکثیر 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, CAPD	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, Hsfl, ToxA	93°C 5 min	93°C 1 min	60°C 45 s	72°C 50 s	72°C 10 min

• تأیید قطعات محصول PCR

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

نتایج

آزمایش زنجیره ای پلیمرز PCR:

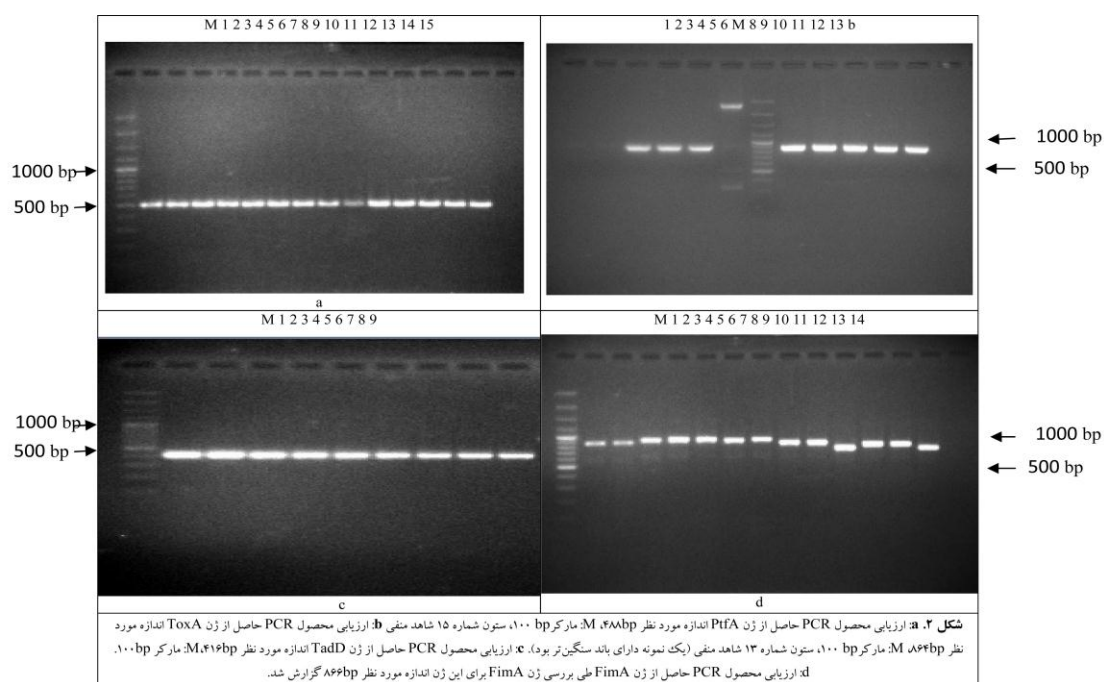
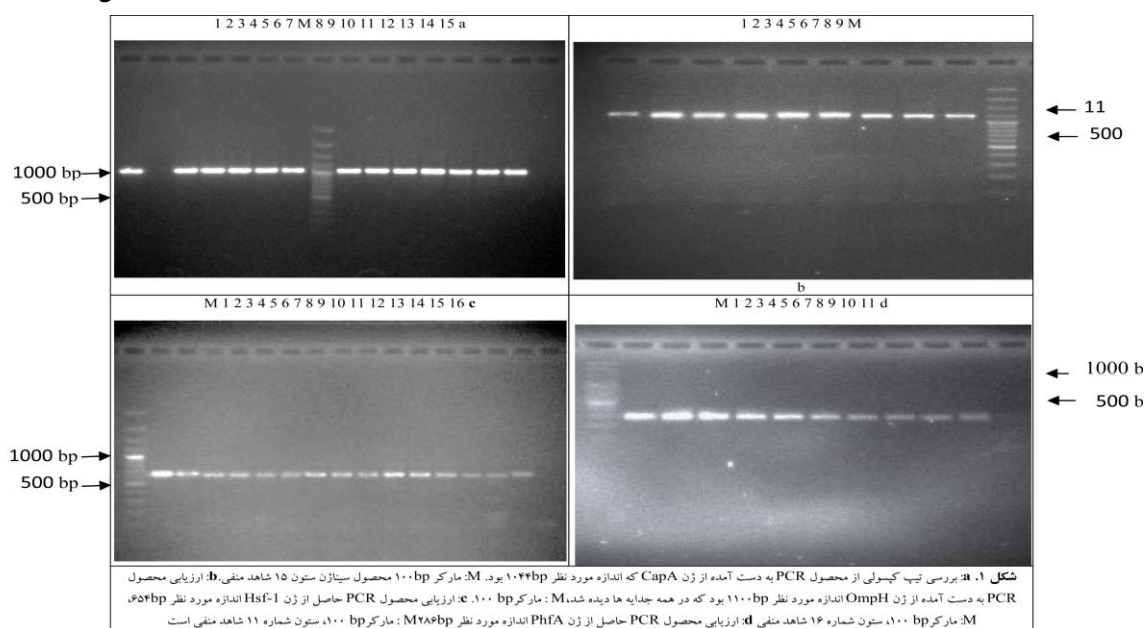
به طور کلی ویژگی های بیوشیمیایی جدایه ها از الگوی کلاسیک پاستورلا مولتوسیدا پیروی داشت (۶). برای تأیید مولکولی گونه پاستورلا مولتوسیدا، از پرایمر اختصاصی گونه KMT-1 استفاده شد که باند با اندازه ۴۶۰ bp را نشان داد و تمام جدایه های جمع آوری شده به روش فوق، مورد تأیید قرار گرفتند.

بررسی مولکولی فاکتورهای ویروانس پاستورلا... ۱۲۳

بررسی ژن PfhA باند مورد نظر در ۱۱ (۳۶/۶٪) جدایه دیده شد (شکل ۱).

در بررسی ژن PtfA، ۲۸ (۹۳/۳٪) جدایه باند مورد نظر را نشان دادند. ژن ToxA در ۲۷ (۹۰٪) جدایه دیده شد و یک جدایه باند سنگین تر نشان داد. ژن TadD نیز در ۱۱ (۳۶/۶٪) جدایه گزارش گردید. در نهایت ژن FimA در ۱۰۰٪ جدایه ها دیده شد (شکل ۲).

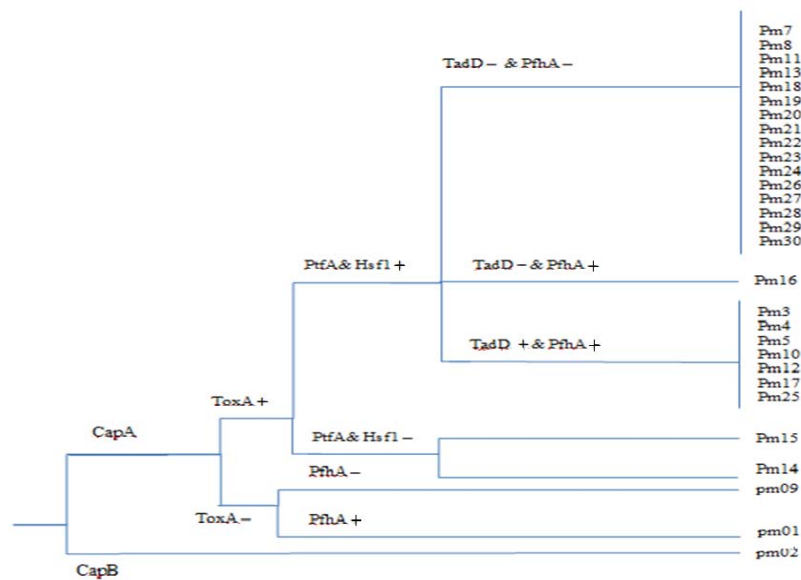
پس از بررسی تیپ کپسولی جدایه ها مشخص گردید همه نمونه ها از نوع تیپ A هستند. نتایج بررسی هریک از ژن ها در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. وجود ژن OmpH با رویت باند مورد نظر در همه جدایه ها، تأیید گردید. ظهور باند مورد نظر در ۲۸ (۹۳/۳٪) جدایه مورد مطالعه نشان دهنده وجود ژن Hsf-1 بود. در



فراوانی ژن های حدت در جدایه های مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. به منظور تأیید نتایج آزمایش PCR، یک قطعه نمونه از محصول PCR هر یک از ژن های مورد مطالعه تخلیص و تعیین توالی گردید و مشخص شد که این ژن های مورد مطالعه با ژن های موجود در بانک ژن ۹۹ درصد تشابه را نشان می دهد.

جدول ۳ فراوانی فاکتورهای حدت در جدایه های پاستورلا مولتوسیدا بررسی شده در این مطالعه

Gene	Virulence factor	No of positives(%)
OmpH	Outer membrane protein H	30/(100)
Hsf-1	Autotransporter adhesion	28/(93.3)
PtfA	Type 4 fimbriae	28/(93.3)
PfhA	Filamentous hemagglutinin	11/(36.6)
TadD	Putative nonspecific tight adherence protein D	11/(36.6)
ToxA	Dermonecrotic toxin	27/(90)
FimA	Fimbriae	30/(100)



شکل ۳ دندروگرام حاصل از فراوانی فاکتورهای حدت

بحث

پاستورلا مولتوسیدا یکی از پاتوژن های اولیه، فرصت طلب و مهم است که به عنوان همزیست در قسمت فوقانی دستگاه تنفسی در بسیاری از حیوانات اهلی و وحشی وجود دارد. این باکتری موجب بیماری های مهم اقتصادی در طیف وسیعی از میزبان ها می گردد و عامل عفونت های انسانی و حیوانی زیادی می باشد (۲).

در این مطالعه به بررسی ویژگی های بیوشیمیایی مختلف برای شناسایی جدایه های پاستورلا مولتوسیدای گوسفندی پرداخته شد. بر اساس نتایج حاصل از جدول ۳ تست های بیوشیمیایی همه جدایه ها، جز تست های MR و اورنی تین دکربوکسیلاز در جدایه های ذکر شده در نتایج، با الگوی کلاسیک این باکتری هم

رابطه فیلوژنی جدایه ها بر اساس وجود یا عدم وجود ژن های حدت در ۳۰ جدایه در شکل ۳ آمده است. نتایج نشان داد که جز یک جدایه (شماره ۲ که به عنوان شاهد استفاده شد) همه نمونه ها تیپ A بودند. به غیر از ۲ جدایه، (شماره ۲ سویه واکسینال و شماره ۹) بقیه جدایه ها دارای ژن ToxA بودند. تنها تفاوت این دو ژن در وجود یا عدم وجود ژن PfhA بود که فقط سویه واکسینال دارای ژن مذکور بود. ژن های PtfA و Hsf1، در دو جدایه (شماره ۱۴ و ۱۵) دیده نشد. مابقی جدایه ها بر اساس وجود یا عدم وجود ژن های TadD و PfhA به ۳ گروه تقسیم شدند. به این ترتیب که ۱۶ جدایه فاقد ژن های TadD و PfhA بودند، ۷ جدایه دارای ژن های مذکور بودند و تنها یک نمونه دارای ژن PfhA و فاقد ژن TadD بود.

طراحی واکسن پاستورلایی مورد مطالعه قرار گرفته شده است. رافوئل و همکاران (۱۹۹۷) به شناسایی، خالص سازی و بررسی خصوصیات کامل ژن PtfA پرداختند. آن‌ها دریافتند، هنگامی که باکتری به داخل بدن میزبان وارد می‌شود ممکن است با شرایط میکروآنروپیل مواجه شود. در این شرایط سلول‌های پاستورلا مولتوسیدا افزایش بیان فیمبریا را در مقایسه با زمانی که سلول‌ها در محیط هوازی رشد می‌کند نشان می‌دهد. (۱۴ و ۱۸)

در مطالعه حاضر فراوانی ژن‌های PtfA و Hsf-1 ۹۳/۳ درصد بود. نقش کلیدی فاکتورهای مذکور در اتصال و تثبیت باکتری روی سلول‌های اپی تلیال خصوصاً دستگاه تنفسی گزارش شده است. (۴ و ۲۳)

طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه تمامی جدایه های گوسفندی پاستورلا مولتوسیدا واجد ژن پروتئین غشاء خارجی (OmpH) می‌باشند. OmpH در اکثریت مطالعات انجام شده به عنوان عامل مؤثر ایمنی زایی قوی شناخته شده است و از نظر ایمنی زایی و واکنش‌های دارایی اهمیت می‌باشد. بنابراین تنوع در الگوی پروتئینی OmpH در میان جدایه های پاستورلا مولتوسیدا به بررسی و برآوردهای اپیدمیولوژیکی کمک می‌نماید. (۵). علی‌رغم اهمیت بیماری زایی پروتئین H پاستورلا مولتوسیدا، متأسفانه مطالعات موثری روی این فاکتور حدت و طراحی واکسن‌های جدید صورت نگرفته است.

نتایج حاصل از مطالعه اواری و همکاران (۲۰۰۶) که بر روی ژن‌های PtfA و PfhA و toxA انجام گردید نشان داد که این ژن‌ها نقش حیاتی در بیماری زایی باکتری ایفا می‌کنند. ارتباط حضور ژن toxA در ارتباط با بیماری زایی پاستورلا مولتوسیدا در خوگ و PfhA و PtfA در ارتباط با بیماری زایی در گاو مشخص گردید.

خوانی داشت. در مطالعه زاهور و همکاران (۲۰۰۶) که به بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی پاستورلا مولتوسیدا پرداخته شد و تفاوت در جدایه های بررسی شده در تولید H₂S بود (۲۴).

در مطالعه حاضر فراوانی تیپ کپسولی A در جدایه های گوسفندی ۱۰۰٪ بود. غالب بودن تیپ کپسولی A در جدایه های پاستورلا مولتوسیدا در مطالعات قبلی نیز از ایران گزارش شده است. دانش لاری و همکاران (۲۰۱۳) فراوانی تیپ کپسولی A را در جدایه های گوسفندی از استان فارس ۹۳/۵٪ اعلام نمودند (۳). بر اساس یافته‌های خامسی و همکاران (۲۰۱۴) فراوانی تیپ A در جدایه های گاوی اخذ شده از ریه در منطقه شهرستان شهرکرد ۷۶/۶٪ بوده است (۱۰). در مطالعه دانش لاری و همکاران (۲۰۱۳) ۲ جدایه (۶/۴٪) گوسفندی و در مطالعه خامسی (۲۰۱۵) و همکاران ۵ جدایه گاوی (۱۶/۶٪) به تیپ کپسولی D تعلق داشتند (۱۰ و ۳). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تیپ کپسولی A در بین جدایه های پاستورلا مولتوسیدا با منشأ نشخوارکنندگان در ایران غالب بوده از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

اساس مولکولی پاتوژنز و ایمنی زایی باکتری پاستورلا مولتوسیدا به طور کامل مشخص نشده است. اما عوامل حدت مهم این باکتری مانند پروتئین‌های غشای خارجی، پروتئین‌های درگیر در جذب آهن، سیالیدازها و آدهسین‌های مختلف نقش مهمی را در کلونیزاسیون و حمله به میزبان ایفا می‌کنند. بنابراین وجود این عوامل در سطح باکتریایی با حدت بیماری مرتبط است. علاوه بر ژن PfhA، ژن‌های PtfA، FimA و Hsf1، TadD از آدهسین‌ها هستند که در این مطالعه به بررسی آن‌ها پرداخته شد. ژن PtfA کدکننده فیمبریله یکی از کاندیداهای مطرح است که برای

شده و ایجاد فرم سپتی سمیک در این حیوانات می‌نماید و وجود نخواهد داشت (۲۳).

طبق مطالعات اواری و همکاران، ژن PfhA در ۲۵٪ از نمونه‌های جدا شده از سگ، ۱۸/۵٪ از گربه، ۲۱/۲٪ از خوک و وجود داشت. در مطالعه حاضر نیز این ژن با فراوانی ۳۶/۶٪ در گوسفندان مشاهده شد (۵). در این مطالعه ژن TadD در ۳۶/۶٪ از نمونه‌ها مشاهده گردید. فراوانی این ژن در مطالعات دیگر روی جدایه خرگوش ۹۱/۳٪ و در جدایه خوک ۴۳/۳٪ گزارش شد (۲۳) و (۲۰). در مطالعه‌ای که روی خرگوش‌ها در برزیل توسط فریرا و همکاران (۲۰۱۲) انجام گرفت ۲۲ فاکتور حدت مهم روی پاستورلا مولتوسیدا مورد بررسی قرار گرفت که شامل فاکتورهای این مطالعه نیز بود. نتایج مطالعه انجام شده با مطالعه‌ای که روی خرگوش‌ها انجام شد متفاوت بود که ممکن است ناشی از میزبان‌های متفاوت باشد (۷).

با توجه به آن که تمام سویه‌های پاستورلا مولتوسیدای مورد مطالعه از ریه گوسفند مبتلا به پنومونی جدا شده‌اند، مطالعات نشان داد که این جدایه‌ها حاوی ژن فاکتورهای اصلی حدت می‌باشند لذا مطالعات تکمیلی به منظور بررسی پاتوژنز جدایه‌ها و نقش اتیولوژیک آن‌ها در بیماری مذکور پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مساعدت و همکاری جناب آقایان سید رضا بنی هاشمی، محمد سخاوتی، علیرضا عرب، علی ملائی و سایر همکاران در بخش هوایی 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 (پروژه به کد: ۹۴۱۰۴-۱۸-۱۸) در آزمایشگاه ملی تحقیقات پاستورلا انجام گردیده است.

شایق و همکاران (۲۰۰۸) میزان شیوع ژن‌های *tbpA* و *toxA* در جدایه‌های گوسفندی و بز در ایران را بررسی کردند. آن‌ها حضور ژن‌های *toxA* را با فراوانی ۹۳/۳٪ و *PfhA* را با فراوانی ۳۷٪ گزارش نمودند که یافته‌های آن‌ها با نتایج این مطالعه مشابه می‌باشد (۱۶) و (۱۷).

در مطالعه خامسی پور و همکاران (۲۰۱۴) فراوانی ژن‌های *ptfA*، *fimA*، *hsf-1*، *pfhA* و *tadD* را در جدایه‌های گاوی پاستورلا مولتوسیدا به ترتیب ۸۰، ۸۰، ۶۰، ۶۰ و ۴۰ درصد بود. فراوانی ژن پروتئین غشاء خارجی *ompH*، ۸۶ درصد گزارش گردیده است (۱۰). دانش لاری و همکاران (۲۰۱۳)، فراوانی ژن‌های *toxA*، *ptfA*، *hgbA* و *ompH* را در بین جدایه‌های گوسفندی از استان فارس به ترتیب ۷۰/۹، ۶۴/۵، ۶۴/۵ و ۷۰/۹٪ اعلام نمودند (۳).

تانگ و همکاران (۲۰۰۹) نمونه‌های پاستورلا مولتوسیدای جدا شده از خوک در چین (۲۳۳ جدایه) را از لحاظ گروه کپسولی، ۱۹ ژن مهم حدت و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی مورد بررسی قرار دادند و با آزمایش PCR نشان دادند که کمتر از ۵۰ درصد از جدایه‌ها واجد فاکتورهای ویرولانس *pfhA*، *tadD*، *toxA* و *pmHAS* بوده و ژن عوامل حدت *toxA* و *pfhA* در هر دو گروه کپسولی A و D نیز حضور داشت (۲۱).

در این مطالعه و با توجه به شکل شماره ۲ ژن *ToxA*، در دو سویه واکسینال تیپ A و تیپ B وجود نداشت. ژن *ToxA* کد کننده توکسین درمونکروتیک بوده که در ایجاد بیماری‌های رینیت آتروفیک در خوک و پنومونی در گوسفند دخیل می‌باشد، به طبع در جدایه‌های A و B که از میزبان‌های طیور و گاو جدا

10. Khamesipour, F., Momtaz, H., Azhdary Mamoreh, M. (2014). Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1-9
11. Kubatzky, K.F. (2012). *Pasteurella multocida* and immune cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 361:53-72.
12. Nagai, Sh., Someno, S., Yagihashi, Takeshi. (1994). Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates *Pasteurella multocida* by PCR. *Journal of clinical Microbiology* 32: 1004-1010.
13. Orth, J.H.C., Aktories, K. (2012). Molecular biology of *Pasteurella multocida* toxin. *Current topics in Microbiology and Immunology* 361: 73-92.
14. Ruffolo, C.G., Tennent, J.M., Michalski, W.P., Adler, B. (1997) Identification, purification, and characterization of the Type 4 Fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infection and immunity* 65: 339-343.
15. Shayegh, J., Dolgari-Sharaf, J., Mikaili, P., Namvar, H. (2009). Pheno- and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. *Iranian Journal of Biotechnology* 8(16):3707-3710.
16. Shayegh, J., Dolgari-Sharaf, J., Mikaili, P., Namvar, H. (2009). Pheno- and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. *Iranian Journal of Biotechnology*. 8: 3707-3710.
17. Shayegh, J., Atashpaz, S., Hejazi, M.S. (2008). Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. *Asian Journal Animal and veterinary advances* 3: 206-213.
18. Sellyei, B., Banyai, K., Magyar, T. (2010). Characterization of the ptfA gene of avian *Pasteurella multocida* strain by allele-specific polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22:607-610.
19. Teerasak, E.K., Burchmore, R., Herzyk, P., Davies, R. (2012). Predicting the outer membrane proteome of *Pasteurella multocida* based on consensus prediction enhanced by result integration and manual confirmation. *Biomedcentral Bioinformatics* 13: 63.

References

1. Arumugam, N.D., Ajam, N., Blackall, P.J., Asiah, N.M., Ramlan, M., Maria, J., Yuslan, S and Thong, K.L. (2011). Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts – a comparison of phenotypic and genotypic method. *Tropical Biomedicine* 28: 55–63.
2. Blackall, P.J., Mifin, J.K. (2000). A review of identification and typing of *Pasteurella multocida*. *Avian Pathology* 29: 271-287.
3. Daneshlari, S., Tahamtan, Y., Kargar, M. (2013). Molecular analysis of virulence factors of *Pasteurella multocida* from sheep and goats. *Online Journal of Veterinary Research*. 17: 675-684.
4. Donnio, P.Y., Allardet-servent, A., Perrin, M., Escande, F., Avril, J.L. (1999). Characterisation of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp. *Multocida* isolated from man and swine. *The Pathological Society of Great Britain and Ireland* 48: 125-131.
5. Ewars, C., Lübke-Becker, A., Bethe, A., Kiebling, S., Filter, M., Wieler, L.H. (2006). Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiological* 31: 304-17.
6. Fegan, N., Blackall, P. J., Pahoff, J. L. (1995). Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolated from Australian poultry. *Veterinary Microbiology*. 47: 281-286.
7. Ferreira, Th.S.P., Felizardo, M.R., Gobbi, D.S., Gomes, C.R., Filsner, P.H., Moreno, M., Paixao, R., Pereira, J., Moreno, A.M. (2012). Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from Rabbits in Brazil. *The scientific world Journal* 10: 1-6.
8. Gautier, A.L., Dubois, D., Escande, F., Avril, J.L., Trieu-Cuot, P., Gailliot O. (2005). Rapid and Accurate Identification of Human Isolates of *Pasteurella* and Related Species by Sequencing the sod A Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 2307-2314.
9. Harper, M., Boyce, J.D., Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis:125 years after Pasteur. *Federation of European Microbiological Societies* 265:1-10.

20. Tan, H.Y., Nagoor, N.H., Sekaran, S.D. (2010). Cloning, expression and protective capacity of 37kDa outer membrane protein gene (ompH) of *Pasteurella multocida* serotype B:2. *Tropical Biomedicine* **27**: 430-441.
21. Tang, X., Zhanqin, ZH., Junyong, Hu., Bin, Wu., Xuwang, Cai., Qigai, He., Huanchun, Ch. (2009). Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strain from swine in china. *Journal of clinical microbiology* **47**: 951-958.
22. Townsend, K.M., Frost, A.J. Lee, CH.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, J.S. (2001). Development of PCR assays species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 1096-1100.
23. Tahamtan, Y., Hayati, M. (2014). Multi drug resistance of *Pasteurella multocida* Spp isolated from Sheep and Goats in Iran. *Research Journal of Microbiology* **19**: 51-58.
24. Zahoor, M.A., Siddique, M. (2006). Characteristics of *Pasteurella multocida* recovered from avian sources. *Pakistan Veterinary* **26**: 41-43.

Molecular Study of Virulence Factors of *Pasteurella Multocida* Isolates from Sheep in Iran

Rezaei, E.¹, Jabbari, A. R.^{2*}, Esmaelizad, M.³, Doosti, A.⁴

1- Faculty of Basic Sciences -Islamic Azad University Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

2- National Pasteurella Research Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3- Central Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

4- Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Received Date: 23 July 2014

Accepted Date: 11 August 2015

Abstract

Pasteurella multocida is responsible for significant infections of a wide range of animal species and human. The organism causes a variety of diseases which include pneumonic pasteurellosis of ruminants, porcine progressive atrophic rhinitis (PAR) in pigs, fowl cholera and bovine haemorrhagic septicaemia (HS). The pathogenicity of *P. multocida* is associated with various virulence factors include outer membrane and porin proteins like ompH, adhesins (ptfA, fimA, hsf-1, pfhA, tadD) and dermonecrotxin (toxA). The aim of this study was to identify the presence of these virulence genes among ovine *P. multocida* isolates. Thirty *P. multocida* isolates obtained from sheep pneumonia cases were identified by bacteriological and biochemical methods. All 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. All of the isolates harboured FimA and OmpH genes. The majority (93.3%) of the isolates contained PtfA, Hsf-1 and (90%) for ToxA. The frequency of TadD and PfhA genes was the lowest (36.6%). Presence of virulence factors of *P. multocida* isolates showed genetically potential in pathogenesis of ovine pneumonia. Further studies for phenotypic determination of virulence factors with ethology of pneumonia are suggested. Overall, investigations of virulence factors help us to selection of suitable strain for an effective vaccine production.

Keywords: *pasteurella*, virulence factors, PCR

*Corresponding author: Jabbari, A.R.

Address: Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Hesarak, Karaj, Iran. Tel: 02634570038

Email: a.jabbari@rvsn.ac.ir