مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره سوم (پیاپی ۸)، پاییز ۱۳۸۹
صفحات ۱۶۸ ـ ۱۶۲

Original Article

شناسایی سریع و هم زمان عوامل بیماریزا و تیپ‌های کپسولی پاستورلا مالتوسیدا جدا شده از گوسفند و بز با روش Multiplex PCR

سمانه دانش لاری[۱]، دکتر یحیی تهمتن*[۲]، معصومه حیاتی[۳]، محمد کارگر[۴]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [۲]استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه میکروبیولوژی، [۳]کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه میکروبیولوژی، [۴]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: باکتری پاستورلا مالتوسیدا به صورت هم زیست در دستگاه تنفسی فوقانی و سیستم گوارشی بسیاری از حیوانات اهلی و وحشی وجود دارد. سروتیپ‌های A و D این باکتری از مهم ترین عوامل ایجادکننده ذات الریه در گوسفند و بز به شمار می‌روند. فیمبریه و ادهسین، کپسول، توکسین، فاکتور جذب آهن، پروتئین غشای خارجی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماریزای این باکتری محسوب می شوند. هدف از این پژوهش طراحی روش Multiplex PCR برای تشخیص هم زمان و سریع مهم‌ترین ژن‌های بیماریزا، تیپ‌بندی کپسولی و نیز شناسایی پاستورلا مالتوسیدا جدا شده از گوسفند و بز دارای علائم تنفسی در استان فارس بود.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۵۰۰ سوآب از لوزه و بینی گوسفند و بز دارای علائم تنفسی و مشکوک به پاستورولوز تنفسی از استان فارس جمع آوری گردید. در ابتدا با استفاده از تست های بیوشیمیایی گونه باکتری شناسایی و تأئید گردید. سپس به کمک پرایمرهای اختصاصی مهم‌ترین فاکتورهای حدت باکتری به همراه تیپ کپسولی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در این مطالعه ۸۳/۸ درصد از سویه های پاستورلا مالتوسیدا سروتیپ کپسولی A و ۶/۴ درصد سروتیپ D بودند. همچنین میزان فراوانی ژن‌های *omph, ptf A, hgbA, toxA* به ترتیب ۷۷/۴٪، ۷۴/۱۹٪، ۶۷/۷۴٪ و ۶۷/۷۴٪ گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: اکثر سویه‌های پاستورلا مالتوسیدا جدا شده از گوسفندان و بزها در استان فارس توکسیژن بودند و سروتیپ کپسولی A در بین جدایه‌ها شیوع بیشتری داشت. از میان ژن‌های بیماریزای مورد بررسی، دو ژن *toxA* و *ompH* کد کننده درمونکروتوکسین و پروتئین غشای خارجی، بیشترین میزان شیوع را در سویه‌های جداسازی شده از گوسفند و بزها داشتند. بنابراین پایش دو ژن یاد شده می تواند نقش موثری در اپیدمیولوژی و عفونت تنفسی گوسفند و بز داشته باشد.

واژگان کلیدی: پاستورلا مالتوسیدا، عوامل بیماریزا، Multiplex PCR، بز، گوسفند.

دریافت: خرداد ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: شهریور ۱۳۸۹

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، میدان صنایع الکترونیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب کشور، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۷۱۱۶۲۴۰۳۳۱
پست الکترونیک: yahyatahamtan@yahoo.com

مقدمه

پاستورلا مالتوسیدا (*Pasteurella multocida*) باکتری گرم منفی است که به صورت هم زیست در قسمت فوقانی دستگاه تنفسی و سیستم گوارشی بسیاری از حیوانات اهلی و وحشی وجود دارد. این باکتری قادر است در پرندگان بیماری وبا، در گاو و بوفالو سپتی‌سمی هموراژیک و در حیواناتی مانند بز و گوسفند پاستورولوز تنفسی و ذات‌الریه ایجاد کند. پاستورولوز یکی از عفونت های متداول و مهم گوسفندی شایع در مناطق گرم و معتدل استوایی است که می تواند موجب کاهش وزن و مرگ بسیاری از گوسفندان گردد. بنابراین مرگ و میر ناشی از این بیماری می‌تواند ضرر و زیان‌های اقتصادی زیادی را به صنعت دامپروی وارد سازد (۱). سویه‌های پاستورلا مالتوسیدا بر اساس آنتی ژن کپسولی به پنج سروتیپ A، B، D، E و F تقسیم بندی می‌شوند. از این میان سروتیپ‌های A و D از مهم ترین عوامل ایجاد ذات‌الریه در گوسفند و بز به شمار می‌روند (۲). سویه‌های پاستورلا مالتوسیدا از نظر قدرت بیماریزایی متفاوت هستند. لیپوپلی‌ساکارید، فیمبریه و ادهسین، کپسول، توکسین، فاکتور جذب آهن، فاکتور ترشح سیالیداز، هیالورونیداز و پروتئین غشای خارجی مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی این باکتری می‌باشند. ارتباط مهمی بین بروز پاستورلوز تنفسی و حضور مهم ترین ژن‌های بیماریزای باکتری مانند *ompH*، *hgbA*، *ptfA*، *toxA*، *hydD* و *dcbF-hydC* مشاهده شده است (۳). از میان پنج فاکتور بیماریزا، ژن toxA سنتز کننده درمونکروتوکسین است و برای پیشرفت بیماری پاستورولوز در گوسفند و بز ضروری می‌باشد. ژن *ptfA* در سروتیپ های A، B و D پاستورلا مالتوسیدا، سنتز کننده فیمبریه (پیلی) تیپ چهار می‌باشد و نقش مهمی در اتصال باکتری به سلول‌های اپی‌تلیوم مخاط میزبان دارد. همچنین ژن *ompH* در سنتز پروتئین غشای خارجی دخالت دارد و به دلیل خاصیت ایمنی زایی و تحریک سیستم ایمنی میزبان در بیماری‌زایی باکتری می‌تواند نقش مهمی را داشته باشد (۴).

ژن *hgbA* سنتز کننده پروتئین متصل شونده به هموگلوبین است. این پروتئین موجب افزایش سمیت سویه‌های پاستورلا مالتوسیدا شده و در متابولیسم آهن نیز دخالت دارد (۵). با توجه به اینکه باکتری پاستورلا مالتوسیدا دارای عوامل حدت متعددی بوده و هر یک نقش مهمی در بیماریزایی باکتری ایفا می‌کنند، بنابراین تشخیص بیماری پاستورولوز بسیار مهم می‌باشد. علاوه بر نشانه‌ها و علائم بالینی، در دو دهه اخیر توسعه تکنیک‌های مولکولی پیشرفته نیز توانسته است در سرعت و دقت شناسایی بیماری نقش مهمی ایفا کند. علاوه بر تشخیص پاستورلا مالتوسیدا، از این تکنیک‌ها در تیپ بندی کپسولی و شناسایی فاکتورهای بیماریزای باکتری نیز استفاده شده است. برخی از این تکنیک‌ها عبارتند از: PCR، Ribotyping، Resterection Endonuclease Analyse (REA)، Colony hybridization assay، Filled Alternation Gel Electrophoresis (FAGE) (۶). روش Multiplex PCR به دلیل حساسیت و تخصصی بودن و نیز دستیابی به نتایج در زمان اندک، می‌تواند در تشخیص باکتری و شناسایی عوامل بیماریزای آن بسیار با اهمیت باشد (۷). به عنوان مثال در سال ۲۰۱۱ صحراگرد و همکاران با طراحی یک Multiplex PCR توانستند به طور هم زمان گونه، جنس، سروتیپ کپسولی و نیز ژن *toxA* باکتری پاستورلا مالتوسیدا را در دام‌های دارای علائم تنفسی در استان فارس شناسایی کنند (۸).

این مطالعه با هدف طراحی روش Multiplex PCR به منظور شناسایی سریع و هم زمان مهم ترین ژن‌های بیماریزای پاستورلا مالتوسیدای جدا شده از گوسفند و بز دارای علائم تنفسی انجام گرفت. همچنین در این بررسی، تیپ‌بندی کپسولی و شناسایی باکتری مذکور با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

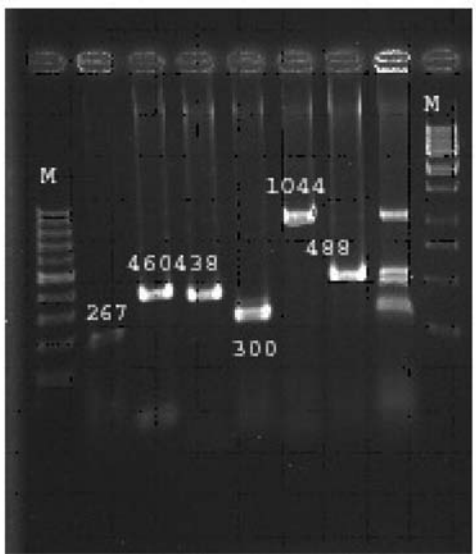
الف) جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها: تعداد ۵۰۰ نمونه سوآب از لوزه و بینی گوسفند و بز که دارای علایم تنفسی و نمونیا بودند از استان فارس جمع آوری شد. تمامی نمونه‌ها در محیط انتقالی Stuart و Brain Heart Infusion (BHI) و در شرایط سرد به آزمایشگاه میکروب شناسی مؤسسه رازی شیراز منتقل گردیدند. نمونه‌های سوآب بر روی بلاد آگار کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. برای مشاهده شکل

جدول۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Multiplex PCR.

پرایمر	ژن	توالی ´۳→´۵	اندازه قطعه bp
Allpass	*KMT1*	ATCCGCGATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	٤٦٠
Capsular typeA	*hydD-hydC*	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCAGTG	١٠٤٤
Capsular typeD	*dcbF*	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	٧٦٠
DNT	*toxA*	TACTCAATTAGAAAAAGCGCTTTATCTTCC TCCCAGTAATTTGTCTGTATTTTATCAAA	٣٠٠
HgbA	*hgbA*	TCAACGGCAGATAATCAGGG GCGGGAATGCTGAAGATAAG	٢٦٧
PtfA	*ptfA*	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC	٤٨٨

باکتری از رنگ‌آمیزی گرم و برای تشخیص نهایی پاستورلا مالتوسیدا از تست‌های بیوشیمیایی مانند ایندول، کاتالاز، اکسیداز، MR(Methyl-Red)، VP(Voges-proskaure) و مک کانکی آگار (همگی مربوط به شرکت مرک آلمان) استفاده شد.

ب) استخراج *DNA*: ابتدا چند کلنی خالص باکتریایی از روی محیط بلاد آگار برداشته و در ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل حل گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه Block incubator جوشانده شد. سپس به مدت یک دقیقه در دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. ۲ میکرولیتر از مایع رویی آن به عنوان DNA الگو در آزمایش PCR استفاده شد.



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز حاصل از PCR مربوط به ژن‌های cap A (۱۰۴۴bp) و cap D (۷۶۰bp) در پاستورلا مالتوسیدا. M) سایز مارکر (۱۰۰bp و ۱Kbp).

ج) شناسایی عوامل بیماری‌زا: از روش Multiplex PCR برای شناسایی ژن‌های *ompH*، *hgbA*، *ptfA*، *toxA*، *capD*، *KMT1* و *capA* استفاده گردید. همچنین از سویه استاندارد باکتری پاستورلا مالتوسیدا به عنوان کنترل مثبت و از مخلوطی حاوی تمامی واکنشگرهای PCR به جز DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ میکرولیتر از نمونه DNA، ۱ میکرومول از پرایمرهای ژن *hydc-hydD*، *dcbF*، ۰/۲ میکرومول از پرایمرهای ژن‌های *ptfA*، *ompH*، *KMT1* و ۰/۴ میکرومول از پرایمرهای ژن‌های toxA، *hgbA* (جدول ۱)، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer (1×)، ۱/۵ میکرو مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومول dNTPs و ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید. سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (MaStercycler Gradient Eppendorf Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصول PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه تا ۱ ساعت الکتروفروز گردید. در

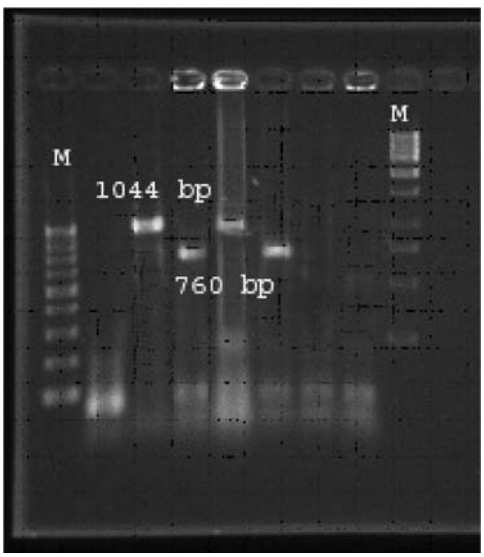
جدول۲: نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی و Multiplex PCR.

نوع حیوان	تعداد نمونه	نمونه های مثبت	*toxA*	*capA*	*capD*	*ptfA*	*HgbA*	*omph*
گوسفند	۳۲۰ (٪٦٤)	۲۵ (٪۷/۸)	۲۲ (٪۸۸)	۲۱ (٪۸٤)	۲ (٪۸)	۲۰ (٪۸۰)	۲۰ (٪۸۰)	۲۲ (٪۸۸)
بز	۱۸۰ (٪۳٦)	٦ (٪۳/۳)	۱ (٪۵)	۵ (٪۸۳/۳)	۰ (٪۰)	۱ (٪۵)	۱ (٪۵)	۲ (٪۳۳/۳)
کل	۵۰۰	۳۱ (٦/۲)	۲۳ (۷٤/۱۹)	۲٦ (۸۳/۸)	۲ (٦/٤)	۲۱ (٦۷/۷٤)	۲۱ (٦۷/۷٤)	۲٤ (۷۷/٤)

نهایت محصول PCR به‌وسیله دستگاه Gel Documentation (Kodak, USA) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه از مجموع ۵۰۰ نمونه جمع‌آوری شده از گوسفند و بزهای دارای علایم تنفسی، ۳۱ نمونه (٪۶/۲) به عنوان پاستورلا مالتوسیدا شناخته شدند. این نمونه‌ها از نظر تست‌های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز و اندول مثبت و مک کانکی منفی بودند. نتایج به دست آمده از روش Multiplex PCR برای



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز حاصل از PCR در نمونه‌های مثبت پاستورلا مالتوسیدا. M) سایز مارکر (۱۰۰bp و ۱Kbp)، ستون ۱) ژن *hgbA* (۲۶۷bp)، ستون ۲) ژن *KMT1* (۴۶۰bp)، ستون ۳) ژن *ompH* (۴۳۸bp)، ستون ۴) ژن *toxA* (۳۰۰bp)، ستون ۵) ژن *hydD-hydC* (۱۰۴۴bp) ستون ۶) ژن *ptf A* (۴۸۸bp) و ستون ۷) Multiplex PCR هم زمان تمامی نمونه‌ها.

تیپ‌بندی کپسولی باکتری پاستورلا مالتوسیدا و شناسایی مهم‌ترین ژن‌های بیماریزای باکتری در جدول ۲ و شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. از میان فاکتورهای بیماریزای شناسایی شده، رابطه معناداری بین ژن *hgbA* (فاکتور جذب آهن) و ژن *toxA* (فاکتور درمونکروتوکسین) وجود داشت ($p<0.05$).

بحث

در سال های اخیر باکتری پاستورو لا مالتوسیدا به دلیل ایجاد بیماری مشترک در انسان و دام نه تنها در صنعت دامپروری، بلکه در جوامع انسانی نیز تأثیر گذار بوده و از این رو بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱ و ۲). در این مطالعه از روش تشخیص سریع Multiplex PCR به منظور بررسی هم زمان مهم ترین فاکتورهای حدت و تعیین نوع سروتیپ کپسولی استفاده گردید. از مجموع ۳۱ نمونه آلوده به پاستورو لا مالتوسیدا، ۲۵ مورد در گوسفند و ۶ مورد در بز مشاهده شد. گوکبن (Gokben) و آدیل (Adil) در سال ۲۰۰۴ در ترکیه ۱۶ پاستورلا مالتوسیدا را از گوسفند و بزهای دارای عفونت تنفسی جدا کردند. از میان نمونه‌های مثبت ۱۵ مورد در گوسفند و یک مورد در بز گزارش شده بود که با نتایج به دست آمده در این مطالعه هم خوانی دارد. شاید بتوان دلیل این مشاهده را به حساسیت بیشتر گوسفندان نسبت به استرس ناشی از حرارت مربوط دانست. به همین دلیل در آب و هوای مناطق گرمسیری به دلیل تغییرات زیاد دما در طول شبانه روز اثرات این استرس بیشتر است و در نتیجه عفونت تنفسی توسط پاستورلا در گوسفند بیشتر از بز دیده می شود (۹ و ۱۰).

در پژوهش حاضر بیشترین فاکتورهای حدت باکتری پاستورلا مالتوسیدا از گوسفندان دارای علائم تنفسی جداسازی شد. اما اوگوچوکو (Ugochukwu) و همکاران در سال ۲۰۰۸ از نواحی شرقی و شمالی نیجریه سویه‌های پاستورلا مالتوسیدا را بیشتر از بزهای دارای عفونت تنفسی جداسازی کردند که با یافته‌های پژوهش جاری مغایرت دارد (۱۱).

در مطالعه حاضر سروتیپ کپسولی A نسبت به سروتیپ کپسولی D شیوع بیشتری داشت. این نتایج با یافته‌های شایق (Shayegh) و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطابقت دارد. به طوری که در مطالعه آن‌ها ۹۰ درصد از سویه‌های پاستورلا مالتوسیدا دارای سروتیپ کپسولی A و ۱۰ درصد از سویه‌ها دارای سروتیپ D بودند. همچنین محققین یاد شده گزارش کردند که ژن‌های تولید سم درمونکروتیک ($toxA$) و پروتئین غشای خارجی ($ompH$) در میان سویه‌های جدا شده بیشترین فراوانی را دارند (۱۲).

نتیجه گیری

با توجه به حضور چندین فاکتور بیماریزای مهم در سویه‌های پاستورلا مالتوسیدا، تشخیص بیماری پاستورلوز بر اساس شناسایی هم زمان این فاکتورهای حدت از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. مطالعه حاضر این مهم را با ارائه روش Multiplex PCR محقق ساخته است به طوری که با به‌کارگیری این روش می‌توان هم زمان تیپ کپسولی و عوامل حدت را تعیین نمود. در این مطالعه اکثر سویه‌های پاستورلا مالتوسیدا جدا شده از گوسفند و بزها در استان فارس دارای سروتیپ کپسولی A بودند. از میان ژن‌های بیماریزای شناسایی شده، دو ژن $toxA$ و $ompH$ که کدکننده درمونکروتوکسین و پروتئین غشای خارجی هستند، دارای بیشترین میزان شیوع در سویه های جداسازی شده بودند. از طرفی تفاوت فاحشی در میزان عوامل حدت بین گوسفند و بزها مشاهده نشده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این دو ژن از مهم‌ترین فاکتورهای بیماریزای باکتری به شمار می‌روند و به ویژه ارتباط معنی داری با بیماریزایی در گوسفندان دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کارکنان موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز به دلیل در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاهی و حمایت‌های اجرایی تحقیق کمال امتنان را دارند.

References

1. Odugbo MO, Odama LE, Umoh JU, Lamorde AG. *Pasteurella multocida* pneumonic infection in sheep: Prevalence, clinical and pathological studies. Small Ruminant Res. 2006; 66)1-3): 273-277.
2. Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJS. Development of PCR assay for species and type specific identification of *P. multocida isolates*. J Clin Microbiol. 1998; 36(4): 1096-1100.
3. Tang X, Zhao Z, Hu J, Wu B, Cai X, He Q, Chen H. Isolation ,antimicrobial resistance ,and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. J Clin Microbiol. 2009; 47(4): 951-958.
4. Davies RL, MacCorquodale R, Baillie S, Caffrey B. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophicrhinitis. J Med Microbiol. 2003; 52(1): 59-67.
5. Sellyei B, Bányai K, Magyar T. Characterization of the *ptfA* gene of avian *Pasteurella multocida* strains by allele-specific polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest. 2010; 22(4): 607-610.
6. Rajini R, Sesnagiri RA, Dhanalakshmi K, Sharma BJR. Studies on avian pasteurellosis in Andhra Pradesh. Indian Vet J. 1995; 72: 115-118.
7. Shayegh J, Parvizi M, Hejazi MS. Diversity of caprine and ovine *Pasteurella multocida* isolates based on *16S* rRNA gene sequencing. Iran J Vet Res. 2010; 11(4): 33- 34.
8. Sahragard I, Tahamtan Y, Valadan M, Hayati M, Moazene F, Shirazi Z. Development of rapid PCR method for simultaneous identification of species, specific capsular type, and toxigenicity of *Pasteurella sp.* isolates. Comp Clin Pathol. 2011; 2: 23-28.
9. Ozbey G, Muz A. Isolation of aerobic bacterial agent from the lungs of sheep an goats with pneumonia and detection of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolityca* by polymerase chain reaction in Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2004; 28(1): 209- 216.

10. Gimenez D, Rodning S. Reproductive management of sheep and goats. Albuma Cooperative Extention System (ACES), ANR-1316. 2007; 1-12.
11. Ugochukwu EL. Isolation and characterization of *Pasteurella multocida* from caprine pneumonic lungs. Anim Res Inter. 2008; 5(2): 880-882.
12. Shayegh J, Sharaf J, Mikaili P, Namvar H. Pheno-and genotypig of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. Afr J Biotechnol. 2009; 8(16): 3707-3710.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 3, Sep. 2010

Rapid and simultaneous identity of virulence factors and capsular typing of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and goats by Multiplex PCR

Samaneh Danesh Lari[1], Yahya Tahamtan[2], Masoumeh Hayati[3], Mohammad Kargar[4]

[1]M.Sc., Deaprtment of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Research Institute-Shiraz, Iran
[3]M.Sc., Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Research Institute-Shiraz, Iran
[4]Associate Professor, Deaprtment of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

Abstract

Background and objective: Pasteurella multocida exist commensally in respiratory track of a variety of wild and domestic animals. Serotypes A and D are responsible for pneumonia in goats and sheep, and fimbriae, adhesions, capsule, toxin, iron uptake factor and outer membrane protein are its important virulence factors. The aim of this study was to design a multiplex PCR for fast and simultaneous detection of more important virulence factors of *P. multocida* isolated from sheep and goats as well as their capsular typing and identification.

Materials and Methods: Totally 500 nasal swabs were collected from the goats and sheeps suspected to respiratory signs of pasteurellasis. After isolation abd detection of *P. multosida* by biochemical examination, the bacteria were assayed by specific primers for identification of major important virulence factors and their capsular typing.

Result: Capsular typing of the isolates by PCR showed two capsular types A, D with 83.8% and 6.4% prevalence, respectively. The results also showed that 23 (74.19%), 21 (67.74%), 21(67.74%) and 24(77.4%) of the isolates were positive for presence of *toxA, hgbA, ptfA* and *ompH* genes, respectively.

Conclusion: The most isolated *P. multocida* from goat and sheep were toxigenic, and capsular type A was the most common isolates in the Fars province. The remarkable high prevalence of *toxA* and *ompH* among the afflicted sheep and goats may imply to important role of these genes in epidemiology and virulence of *P. multocida*. Furthermore the high prevalence of *P. multocida* typeA harbor *toxA* gene can be attributed to its important role in the respiratory infection.

Keywords: Pasteurella multocida, Virulence factor, Multiplex PCR, Sheep, Goats.

Correspondence to: Yahya Tahamtan
E-mail: yahyatahamtan@yahoo.com
Tel: +987116240331
Journal of Microbial World 2010 3(3): 162-168