JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۳: ۱۲۹-۱۱۹

بررسی مولکولی فاکتورهای ویرولانس 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 شهر کرد، شهرکرد، ایران

دریافت: ۱ مرداد ۱۳۹۳ *پذیرش: ۲۰ تیر ۱۳۹۴*

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 OmphH، ادهسین ها شامل ژن‌های ptfA، phfA، tadD، hsf-1 و fimA ژن درمونکروتوکسین (toxA) را می‌توان نام برد. هدف از این مطالعه بررسی حضور این ژن‌ها در بین جدایه های پاستورلا مولتوسیدا به دست آمده از موارد پنومونی در گوسفند است. بدین منظور سی جدایه پاستورلا مولتوسیدا با روش‌های باکتری شناسی و بیوشیمیایی تعیین هویت گردیدند. تمام جدایه ها با روش PM-PCR و استفاده از پرایمر اختصاصی KMT1 مورد تائید قرار گرفت و با روش CAP-PCR تیپ کپسولی آن‌ها مشخص گردید. تایپینگ مولکولی نشان داد که جدایه های گوسفندی مورد مطالعه به گروه کپسولی A تعلق دارند. همه جدایه ها حاوی ژن‌های OmphH و fimA بودند، اکثر جدایه ها (۹۳/۳٪) حاوی ژن‌های ptfA، hsf-1 و ۹۰٪ دارای ژن toxA بودند. کمترین فراوانی در ژن‌های tadD و phfA مشاهده شد (۳۶/۶٪). حضور عوامل حدت، پتانسیل ژنتیکی جدایه های 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 طورکلی بررسی فاکتورهای حدت، به انتخاب سویه مناسب، برای تهیه واکسن کارآمد و مفید کمک می‌کند.

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

* نویسنده مسئول: احمدرضا 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

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

پاستورلا مولتوسیدا باکتری کوکوباسیل، گرم منفی، غیر متحرک از خانواده پاستورلاسه می‌باشد. 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 سروتایپ تقسیم می‌شود. این باکتری جزء فلور طبیعی انسان نیست ولی معمولاً در غشای مخاطی حیوانات وحشی و اهلی وجود دارد. پاستورلاها جزء بیشترین گونه‌هایی هستند که می‌توانند 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 بیماری‌هایی ایجاد شده توسط پاستورلا مولتوسیدا و نوع تیپ کپسول وجود دارد. تیپ‌های A و D باعث بیماری وبای مرغان و پنومونی وابسته به رینیت آتروفیک در خوک می‌شوند. بیماری رینیت آتروفیک بوسیله سویه‌های پاستورلا مولتوسیدا توکسین زا Dermonecrotic ایجاد می‌شود. تیپ A در گاو باعث پنومونی نیز می‌گردد، در حالی که تیپ‌های 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 بافت‌های میزبان و همچنین تحریک پاسخ التهابی مضر می‌شوند. کپسول و لیپوپلی ساکارید (LPS) دو عامل مهم بیماری زایی در پاستورلا مولتوسیدا می‌باشند. علاوه بر این دو عامل، گروه‌های مختلفی از جمله پروتئین های غشای خارجی، ادهسین ها، نورآمینیدازها، سیدروفورها، سوپراکسید دسموتاز و توکسین ها به عنوان عوامل حدت باکتری شناخته شده‌اند (۴ و ۹).

در پاستورلا مولتوسیدا پروتئین‌های غشای خارجی نقش مهمی در بیماری زایی دارند و از آن‌ها می‌توان برای تهیه واکسن استفاده نمود، از وظایف این پروتئین‌ها، کمک به باکتری برای انطباق با محیط‌های مختلف و میزبان می‌باشند. (۱۶). از پروتئین‌های غشای خارجی پاستورلا مولتوسیدا که در پاتوژنز نقش دارند،ompH حائز اهمیت است که به خانواده پورین و پروتئین‌های تغییر حرارت[1] مربوط می‌شود.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 موثر انجام گردیده است (۹ و ۲۰).

چسبندگی باکتری‌ها به سلول میزبان، یک گام حیاتی در کلونیزاسیون و پاتوژنز بیماری به شمار می‌رود که توسط ادهسین ها انجام می‌گردد. ادهسین ها عوامل موثر در تثبیت باکتری بر سطح سلول اپی تلیال میزبان محسوب می‌شوند و در تیپ‌های A، B و D دیده می‌شوند. ژن‌های این گروه شامل ptfA[2]، fimA[3]، pfhA[4]، hsf-1[5]، hsf-2 و tadD[6] می‌باشند (۲۱).

خالص سازی فیمبریه به وسیله کروماتوگرافی معکوس یک زیرواحد ۱۸ kDa را نشان می‌دهد. آنتی سرم ایجاد شده علیه این پروتئین مشخص نمود که پاستورلا دارای فیمبریه نوع ۴، شامل یک زیر واحد آنتی ژنی به نام ptfA می‌باشد 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] Autotrqnsporter adhesin
6 Putative nonspecific tight adherence protein D

Archive of SID

www.SID.ir

قابلیت چسبندگی به بافت‌های اپی تلیال می‌شود. فیمبریه تیپ A قابلیت اتصال خصوصاً در مخاط اپی تلیوم، نازوفارنکس و سلول‌های Hela را دارد. برای مشخص شدن نقش فیمبریه 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 پرتوسیس 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 درمونکروتیک 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)، ادهسین ها (PtfA، FimA، Hsf1، PfhA، TadD) و 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 سال های ۸۷ تا ۹۱ جدا شده بود، استفاده گردید. علاوه بر این جدایه ها، 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 پلیت ها در دمای $37^{\circ}c$ 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 جدایه های 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 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 اندازه گیری 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

Archive of SID

www.SID.ir

مـولار از هـر کـدام) و ۶ میکرولیتـر Master Mix (Ampliqon A/S ساخت کشور دانمارک) کـه شـامل میـزان مشخصـی از dNTPs و MgCl2 و Taq DNA polymerase اسـت و غلظـت آن ۲x اسـت در یـک میکروتیوپ استریل مخلوط شـده و سـپس ۱ میکرولیتـر DNA به آن افزوده شد. ۱۱ جفت پرایمـر بـرای مطالعـه حاضر مورد استفاده قرار گرفت که توالی پرایمر ها طبق مقاله تانگ و همکـاران (۲۰۰۹) و تاونسـند و همکـاران (۲۰۰۱) بـود کـه در جـدول ۱ نشـان داده شـده اسـت. هرکدام از این جفـت پرایمرهـا نیـاز بـه برنامـه زمـانی و دمایی ویژه دارد که در جدول ۲ نشان داده شـده اسـت. (۲۱ و ۲۲)

جدول ۱: پرایمر های 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
CAPD	Capsule protein D	5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3 5'-CATCTACCCACTCAACCATATCAG-3'	647
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'- CTTAGATGAGCGACAAGG-3' 5'- GAATGCCACACCTCTATAG-3'	864

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

Primer	مرحله اول واسرشت اولیه	مرحله اصلی 35×			مرحله نهایی تکثیر نهایی
		تکثیر اتصال واسرشت			
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, Hsf1, ToxA	93°c 5 min	93°c 1 min	60°c 45 s	72°c 50 s	72°c 10 min

• تائید قطعات محصول PCR

از هر ژن، یک نمونه محصول PCR جهت تعیین تـوالی بـه شـرکت مـاکروژن در کـره جنـوبی فرسـتاده شـد. توالی های بـه دسـت آمـده بـا اسـتفاده از نـرم افزارهـای Chromas و BLAST مـورد ارزیـابی و تائیـد قـرار گرفتند.

نتایج

آزمایش زنجیره‌ای پلیمراز PCR:

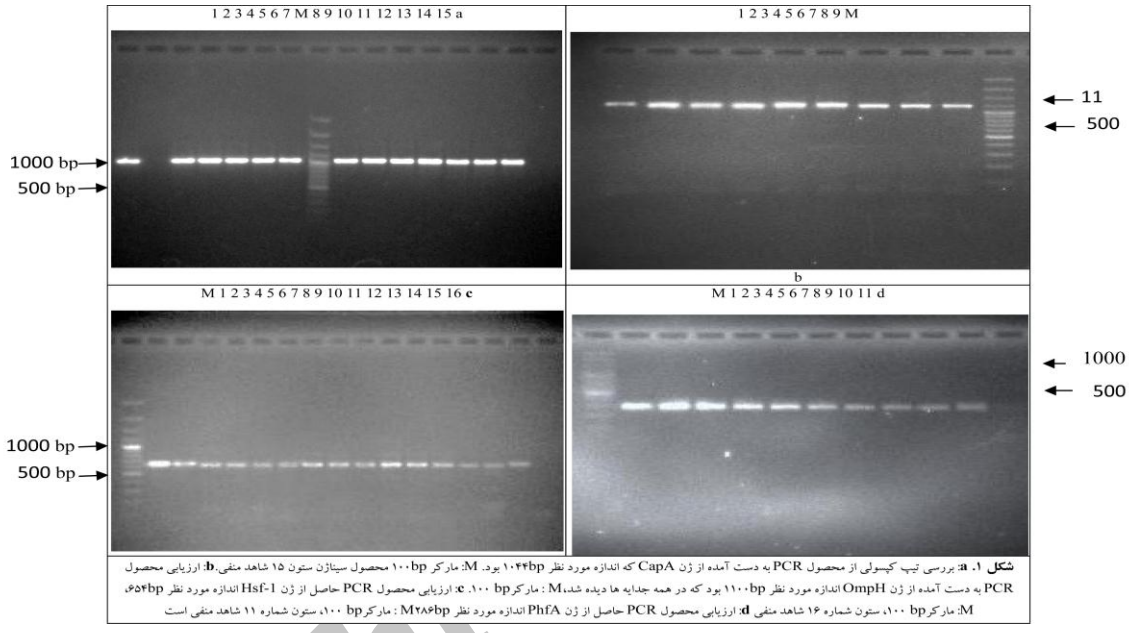
به طور کلی ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه ها از الگـوی کلاسیک پاستورلا مولتوسیدا پیـروی داشـت (۶). بـرای تائیـد مولکـولی گونـه پاسـتورلا مولتوسـیدا، از پرایمـر اختصاصی گونه KMT-1 استفاده شد که باند بـا انـدازه ۴۶۰ bp را نشان داد و تمام جدایه های جمع آوری شده به روش فوق، مورد تائید قرار گرفتند.

Archive of SID

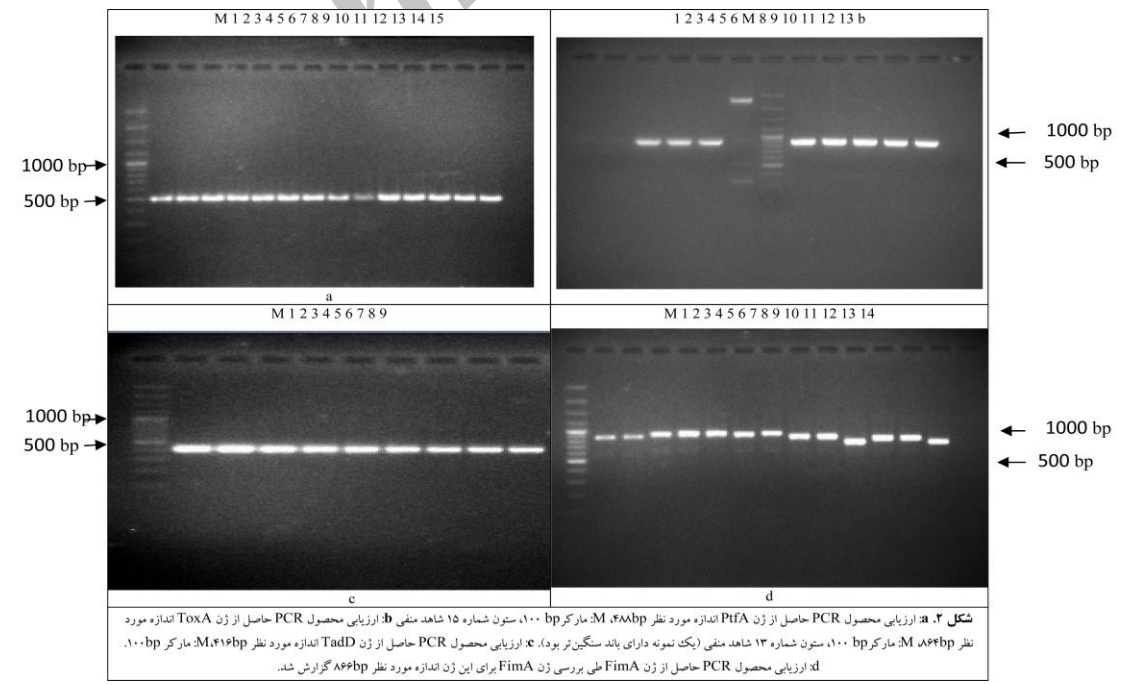
www.SID.ir

پس از بررسی تیپ کپسولی جدایه ها مشخص گردید همه نمونه‌ها از نوع تیپ A هستند. نتایج بررسی هریک از ژن‌ها در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. وجود ژن OmpH با رویت باند مورد نظر در همه جدایه ها، تائید گردید. ظهور باند مورد نظر در ۲۸ (۹۳/۳٪) جدایه مورد مطالعه نشان دهنده وجود ژن Hsf-1 بود. در 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 سنگین‌تر نشان داد. ژن TadD نیز در ۱۱ (۳۶/۶٪) جدایه گزارش گردید. در نهایت ژن FimA در ۱۰۰٪ جدایه ها دیده شد (شکل ۲).



شکل ۱. a: بررسی تیپ کپسولی از محصول PCR به دست آمده از ژن CapA که اندازه مورد نظر ۱۰۴۴bp بود. M: مارکر ۱۰۰bp محصول سیناژن ستون ۱۵ شاهد منفی.**b:** ارزیابی محصول PCR به دست آمده از ژن OmpH اندازه مورد نظر ۱۱۰۰bp بود که در همه جدایه ها دیده شد.M : مارکر bp ۱۰۰. **c:** ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن Hsf-1 اندازه مورد نظر ۶۵۴bp M: مارکر bp ۱۰۰، ستون شماره ۱۶ شاهد منفی **d:** ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن PhfA اندازه مورد نظر M۲۸۶bp : مارکر bp ۱۰۰، ستون شماره ۱۱ شاهد منفی است



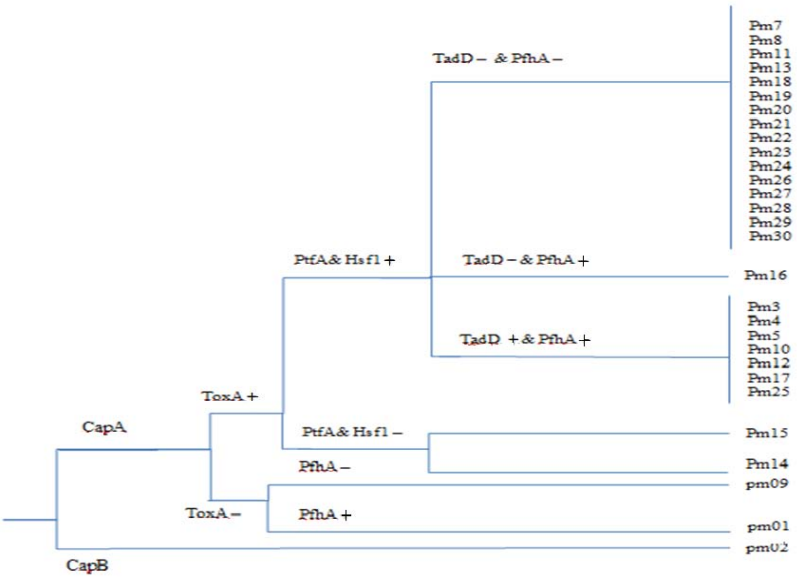
شکل ۲. a: ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن PtfA اندازه مورد نظر ۴۸۸bp، M: مارکر bp ۱۰۰، ستون شماره ۱۵ شاهد منفی **b:** ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن ToxA اندازه مورد نظر ۸۶۴bp M: مارکر bp ۱۰۰، ستون شماره ۱۳ شاهد منفی (یک نمونه دارای باند سنگین‌تر بود). **c:** ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن TadD اندازه مورد نظر M،۴۱۶bp: مارکر bp ۱۰۰. **d:** ارزیابی محصول PCR حاصل از ژن FimA طی بررسی ژن FimA برای این ژن اندازه مورد نظر ۸۶۶bp گزارش شد.

فراوانی ژن‌های حدت در جدایه های مورد مطالعه در جدول ۳ 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.

www.SID.ir

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

رابطه فیلوژنی جدایه ها بر اساس وجود یا عدم وجود ژن‌های 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 نمونه‌ها 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. ژن‌های PtfA و Hsf1، در دو جدایه (شماره ۱۴ و ۱۵) دیده نشد. مابقی جدایه ها بر اساس وجود یا عدم وجود ژن‌های TadD و PfhA به ۳ گروه تقسیم شدند. به این ترتیب که ۱۶ جدایه فاقد ژن‌های TadD و PfhA بودند، ۷ جدایه دارای ژن‌های مذکور بودند و تنها یک نمونه دارای ژن PfhA و فاقد ژن TadD بود.

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 بیماری‌های مهم اقتصادی در طیف وسیعی از میزبان‌ها می‌گردد و عامل عفونت‌های انسانی و حیوانی زیادی می‌باشد (۲).

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

Archive
www.SID.ir

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 کبسولی 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، سیالیداز ها و ادهسین های 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، TadD، Hsf1 و FimA از ادهسین ها هستند که در این مطالعه به بررسی آن‌ها پرداخته شد. ژن PtfA کد کننده فیمبریه یکی از کاندیداهای مطرح است که برای 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 میکروآئروفیل 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 واکسیناسیون دارای اهمیت می‌باشد. بنابراین تنوع در الگوی پروتئینی OmpH در میان جدایه های پاستورلا مولتوسیدا به بررسی و برآوردهای اپیدمیولوژیکی کمک می نماید. (۵). علی رغم اهمیت بیماری زایی پروتئین H پاستورلا مولتوسیدا، متاسفانه مطالعات موثری روی این فاکتور حدت و طراحی واکسن‌های جدید صورت نگرفته است.

نتایج حاصل از مطالعه اوار و همکاران (۲۰۰۶) که بر روی ژن‌های tbpA و pfhA و toxA انجام گردیدنشان داد که این ژن‌ها نقش حیاتی در بیماری زایی باکتری ایفا می‌کنند. ارتباط حضور ژن toxA در ارتباط با بیماری زایی پاستورلا مولتوسیدا در خوک و PfhA و tbpA در ارتباط با بیماریزایی در گاو مشخص گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

شایق و همکاران (۲۰۰۸) میزان شیوع ژن‌های tbpA و toxA در جدایه های گوسفندی و بزی 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 وهمکاران (۲۰۱۴) فراوانی ژن‌های ptfA، fimA، hsf-1، pfhA و tadD را در جدایه های 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 جدایه های 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 جدایه ها 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 جدایه های A و B که از میزبان‌های طیور و گاو جدا شده و ایجاد فرم سپتی سمیک در این حیوانات می‌نماید وجود نخواهد داشت (۲۳).

طبق مطالعات اوار و همکاران، ژن PfhA در ۲۵٪ از نمونه‌های جدا شده از سگ، ۱۸/۵٪ از گربه، ۲۱/۲٪ از خوک 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 میزبان های 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 جدایه ها حاوی ژن فاکتورهای اصلی حدت می‌باشند لذا مطالعات تکمیلی به منظور بررسی پاتوژنز جدایه ها 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 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 (پروژه به کد:۹۴۱۰۴-۱۸-۱۸-۲) در آزمایشگاه ملی تحقیقات پاستورلا انجام گردیده است.

Archive of SID
www.SID.ir

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, KF. (2012). *Pasteurella multocida* and immune cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **361**:53-72.
12. Nagai, Sh., Someno, S., Yagihashi, Takeshi. (1994). Differentation 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 *Pasteurell 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., Gaillot 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 2, 2016

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 dermonecrotoxin (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

Archive of SID

www.SID.ir