Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره اول، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۸: ۳۷-۲۱

مطالعه مولکولی عوامل حدت جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* مربوط به طیور و بررسی کشندگی جدایه‌های حاد در جنین و نیمچه ماکیان

رحیم قدیمی‌پور*[۱]، مسعود قربانپور[۲]، داریوش غریبی[۳]، منصور میاحی[۴]، احمدرضا جباری[۵]

۱- استادیار بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال‌غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرند، ایران

۲- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۵- دانشیار بخش تحقیق و تولید واکسن‌های هوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۲

چکیده

مطالعه حاضر با هدف تایید مولکولی، تعیین تیپ کپسولی و بررسی ۱۲ عامل مهم حدت شامل *ompH*، *oma87*، *sodA*، *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *exBD-tonB*، *tonB*، *nanB*، *nanH*، *ptfA*، *pfhA* و *toxA* ۱۸ جدایه طیوری *پاستورلا مولتوسیدا* از مناطق مختلف ایران به همراه یک سویه از ارگانیسم که از موارد همه‌گیری پاستورلوز در مناطق شمالی کشور جداسازی شده بود، و نیز بررسی کشندگی جدایه‌های حاد در جنین و نیمچه ماکیان طراحی گردید. برای تایید مولکولی جدایه‌های مورد آزمایش از پرایمرهای اختصاصی ژن *kmt1* و برای تعیین تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت آن‌ها از روش PCR چندگانه و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مسئول بیوسنتز کپسول و ژن‌های کدکننده عوامل حدت ارگانیسم بهره برده‌شد. تمام جدایه‌ها از نظر مولکولی تایید شدند ولی از نظر تیپ کپسولی، ۱۶ جدایه (۸۸/۸ درصد) به همراه سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز متعلق به تیپ A بوده و دو جدایه (۱۱/۱درصد) غیرقابل تیپ‌بندی بودند. آزمایش شناسایی عوامل حدت نشان‌داد که ۱۰۰ درصد جدایه‌ها دارای شش ژن حدت *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *nanB*، *nanH* و *ptfA* می‌باشند. ژن‌های *oma87*، *exBD-tonB*، *ompH*، *sodA* و *pfhA* نیز به ترتیب در ۹۴/۴، ۹۴/۴، ۸۳/۳، ۶۶/۶ و ۲۷/۷ درصد از جدایه‌ها حضور داشتند درحالی‌که هیچ‌کدام از آن‌ها حامل ژن *toxA* نبودند. جهت تعیین میزان کشندگی ۵۰ درصد جدایه‌ها برای جنین ماکیان (Chicken embryo lethal dose 50) ($CELD_{50}$) و نیز محاسبه دوز کشندگی ۵۰ درصد آن‌ها در ماکیان (Lethal dose 50) (LD_{50})، رقت‌های مختلف پنج جدایه حاد واجد اکثر ژن‌های حدت و نیز سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز به ترتیب به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار و نیمچه‌های تخم‌گذار تلقیح گردیدند. بر اساس نتایج محاسبه $CELD_{50}$، با اینکه هر شش جدایه قادر به تلف نمودن جنین ماکیان بودند ولی سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز به‌عنوان حادترین جدایه مشخص گردید. نتایج آزمایش تعیین LD_{50} نشان داد که هیچ‌کدام از پنج جدایه حاد قادر به تلف نمودن پرندگان تحت‌آزمایش نبودند در حالی‌که میزان LD_{50} سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز 5×10^{1} واحد تشکیل‌دهنده پرگنه به ازای هر پرنده (cfu/case) محاسبه گردید و این سویه به عنوان حادترین جدایه تحت بررسی شناسایی شد. یافته‌های پژوهش جاری نشان داد با اینکه جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* طیور ایران حاوی اغلب ژن‌های حدت بوده و حادترین آن‌ها قادر به تلف‌نمودن جنین ماکیان نیز بودند ولی هیچ‌کدام از این جدایه‌ها توانایی عفونی‌سازی نیمچه ماکیان را نداشته و حدت سویه‌های جداشده از پرندگان مبتلا به شکل فوق‌حاد بیماری در طی همه‌گیری‌ها، به مراتب بالاتر می‌باشد. داده‌های مطالعه حاضر می‌تواند در طراحی واکسن‌های جدید و کارآمدی که قادر به ایجاد محافظت قابل‌قبول در جمعیت‌های دامی باشند، مفید واقع گردد.

کلمات کلیدی: پاستورلا مولتوسیدا، پاستورلوز طیور، عوامل حدت، $CELD_{50}$، LD_{50}

*نویسنده مسئول: رحیم قدیمی‌پور

آدرس: بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال‌غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرند، ایران

تلفن: ۰۴۱-۴۲۳۹۹۰۸۴

پست الکترونیک: R.ghadimipour@rvsri.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پاستورلا مولتوسیدا عضوی از خانواده *پاستورلاسه* است که شامل گروه بزرگ و متنوعی از گاماپروتئوباکترهای گرم‌منفی است (۲۲). *پاستورلا مولتوسیدا* ارگانیسمی کوچک، غیرمتحرک و بی‌هوازی اختیاری است که ممکن‌است به‌صورت باسیل یا کوکوباسیل مشاهده گردد. این باکتری یک گونه متنوع بوده و برای تمایز سویه‌های آن روش‌های مرسوم و مولکولی مختلفی توصیف گردیده‌است. یکی از روش‌های مرسوم برای شناسایی و دسته‌بندی جدایه‌های این ارگانیسم آزمایش‌های سرولوژیکی می‌باشند که بر این اساس پنج تیپ کپسولی (A، B، D، E و F) و ۱۶ تیپ پیکری (سروتیپ‌های ۱ تا ۱۶) برای این باکتری مشخص شده است (۲۵).

پاستورلا مولتوسیدا عامل بیماری‌های متعدد دامی از قبیل وبای مرغی (Fowl cholera) (FC) در پرندگان اهلی و وحشی، سپتی‌سمی هموراژیک (Hemorrhagic septicemia) (HC) در سم‌داران، رینیت آتروفیک (Atrophic rhinitis) (AR) در خوک‌ها و خرناس در خرگوش‌ها است که اهمیت اقتصادی فراوانی در صنایع دام‌پروری دارند (۱۵). *پاستورلا مولتوسیدا* همچنین می‌تواند در برخی بیماری‌ها از قبیل کمپلکس تنفسی گاوان، پنومونی آنزئوتیک خوک‌ها و گوساله‌ها و پنومونی در گوسفند به‌عنوان یک عامل تاثیرگذار مهم مطرح باشد. این ارگانیسم بطور معمول در فلور اوروفارنکس سگ‌ها و گربه‌ها یافت شده و گونه‌های *پاستورلا* معمولترین ارگانیسم‌های مرتبط با زخم‌های عفونی ناشی از گازگرفتگی سگ و گربه در انسان می‌باشند (۱۷). علائم شایع پاستورلوز در موارد زخم‌های ناشی از گازگرفتگی حیوانات شامل ادم، سلولیت، تب و اگزودای خونی یا چرکی در محل زخم می‌باشد. در موارد شدید بیماری، پاستورلوز می‌تواند سریعا گسترش یافته و منجر به باکتریمی و عوارض دیگری از قبیل استئومیلیت، آندوکاردیت و مننژیت گردد (۶ و ۱۱).

وبای مرغی یک بیماری سپتی‌سمیک است که به‌طور معمول به‌صورت واگیری و تلفات بالا در بین ماکیان، بوقلمون، اردک و بسیاری دیگر از پرندگان اهلی و وحشی بروز کرده و به‌عنوان یکی از عوامل مهم تلفات و خسارات اقتصادی گله‌های طیور در بسیاری از نقاط دنیا به‌شمار می‌رود (۲۷). سویه‌های تیپ کپسولی A *پاستورلا مولتوسیدا* به‌خصوص سروتیپ‌های A:۱، A:۳ و ۴، A:۳ آن، در اغلب موارد وبای مرغی و سویه‌های متعلق به تیپ‌های D و F باکتری در موارد نادری از بیماری، به‌عنوان عامل مسبب ضایعات شناسایی گردیده‌اند (۴۰). پاستورلوز طیور سه شکل فوق‌حاد، حاد و مزمن دارد. فرم فوق‌حاد اغلب به‌صورت تلفات ناگهانی و فرم حاد با علائمی همچون تب، بی‌اشتهایی، ریزش ترشحات موکوسی از دهان، اسهال، افزایش تعداد تنفس و سیانوزه‌شدن ریش و تاج همراه‌است. در شکل مزمن عفونت در اعضایی همچون ریش، سینوس‌ها، مفاصل بال و پا محدودشده و موجب تورم در این بافت‌ها می‌شود (۳۱). اگرچه وبای مرغی یکی از بیماری‌های شناخته‌شده و قدیمی پرندگان است ولی به‌دلیل عدم شناسایی کامل مکانیسم بیماری‌زایی و عوامل حدت ارگانیسم مسبب آن، این بیماری هنوز به‌صورت یکی از معضلات صنعت طیور باقی مانده‌است (۹). از مهم‌ترین عوامل حدت شناخته‌شده *پاستورلا مولتوسیدا* یک پروتئین سیتوتوکسیک بنام توکسین *پاستورلا مولتوسیدا* (PMT) است که یک پروتئین ۱۴۶kDa بوده و توسط ژن *toxA* کد می‌شود و با فعال‌کردن دو پروتئین هتروترایمر $G\alpha_q$ و $G\alpha_{12/13}$، به ترتیب در مسیر انتقال سیگنال فسفولیپاز Cβ و مسیر سیگنالینگ

www.SID.ir

Archive of SID

متصل به Rho موجب تحریک افزایش اختلالات اسکلت سلولی، تحریک رشد فیبروبلاست‌ها و فعال-شدن MAP–کینازها شده و در ایجاد رینیت آتروفیک در خوک‌ها بیشترین نقش را دارد (۲۴ و ۲۸). لیپوپلی-ساکارید (LPS) جدار سلولی از دیگر فاکتورهای حدت ارگانیسم است که دارای فعالیت آندوتوکسینی بوده و موجب تحریک آزادسازی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، القاء نکروز عروقی و ترومبوز می‌شود (۵). کپسول پلی‌ساکاریدی جرم نیز از طریق کاهش فعالیت ماکروفاژها و کاهش آسیب‌پذیری باکتری در مقابل فعالیت باکتری‌کشی کمپلمان عمل کرده و ترکیب آن در سویه‌های سروتیپ A، D و F باکتری، به ترتیب از اسید هیالورونیک، هپارین و کندروتین ساخته شده‌است (۲۵). از دیگر عوامل حدت *پاستورلا مولتوسیدا* می‌توان به پروتئین‌های تأمین‌کننده آهن اشاره‌کرد که مسئول کسب آهن از میزبان و تقویت رشد باکتری می‌باشند و ژن‌های متعدد کدکننده آن‌ها (*tonB*، *exbB* و *exbD*) شناسایی و توصیف‌شده‌اند (۳). پروتئین‌های غشاء خارجی OmpH و OmpA از پروتئین‌های اصلی ایمنوژنیک *پاستورلا مولتوسیدا* می‌باشند که OmpH از طریق بالا بردن تیتر آنتی‌بادی و نیز افزایش توانایی تکثیر لنفوسیت‌های Tو OmpA نیز با افزایش پاسخ ایمنی سلولی موجب محافظت در مقابل ارگانیسم می-شوند (۷ و ۲۳). هماگلوتینین‌های رشته‌ای (*PfhB1* و *PfhB2*)، فیبرهای سطحی (*Hsf1* و *Hsf2*) و تحت-واحدهای فیمبریه‌ای (*PtfA*، *FimA*، *Flp1*، *Flp2*) این ارگانیسم نیز در چسبیدن جرم به سلول‌های میزبان نقش دارند (۴). با توجه به دشوار بودن تهیه آنتی‌سرم‌های اختصاصی برای استفاده در سیستم مرسوم تعیین سروتیپ جدایه‌های *پاستورلا مولتوسید*، امروزه برای شناسایی، تعیین تیپ و نیز تعیین عوامل حدت *پاستورلا مولتوسید*از روش‌های سریع و دقیق مولکولی از قبیل استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *kmt1* و یا پرایمرهای ژن RNA ریبوزومی ۲۳S (۱۵ و ۳۸)، تعیین توالی ژن RNA ریبوزومی ۱۶S (۲)، سیستم تعیین تیپ کپسولی چندگانه (A multiplex capsular typing system)، سیستم شناسایی چندگانه عوامل حدت (۳۹)، آنالیز تنوع طولی قطعات حاصل از تکثیر (Amplified fragment length polymorphism) (AFLP) (۱)، انگشت‌نگاری بر مبنای تکثیر توالی‌های تکرارشونده خارج‌ژنومی (- Repetitive extragenic palindromic PCR) (REP-PCR) (۳۴) و انگشت‌نگاری بر مبنای تکثیر تصادفی قطعاتی از DNA ژنومی (Random amplification polymorphic DNA -PCR) (RAPD-PCR) (۲۰) استفاده می‌شود.

در سال‌های اخیر ردیابی مارکرهای حدت پاستورلاها از طریق تکنیک‌های نوین مولکولی به‌عنوان یک جزء کلیدی در تعیین بیماری‌زایی این ارگانیسم‌ها به شمار می‌رود. با توجه به آندمیک بودن پاستورلوز طیور در کشور و ضررهای اقتصادی ناشی از آن، مطالعه پیش‌رو به‌منظور تایید مولکولی، تعیین تیپ کپسولی و بررسی ۱۲ عامل مهم حدت شامل پروتئین‌های غشاء خارجی (*ompH*، *oma87*)، سوپراکسید دیسموتازها (*sodA*، *sodC*)، عوامل مسئول جذب و متابولیسم آهن (*hgbA*، *hgbB*، *exbD-tonB*)، سیالیدازها (*nanB*، *nanH*)، عوامل چسبندگی (*ptfA*، *pfhA*) و توکسین (*toxA*) *پاستورلا مولتوسید*های جداشده از طیور در برخی استان‌های کشور و نیز بررسی کشندگی جدایه‌های حاد در جنین و نیمچه ماکیان طراحی گردید تا در آینده بتوان از اطلاعات حاصله برای طراحی واکسن‌های جدید و موثر جهت پیشگیری از این بیماری بهره جست.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

جدایه‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۸ نمونه *پاستورلا مولتوسیدا* جداسازی‌شده از واحدهای طیور به‌ظاهر سالم و یا دارای علائم تنفسی که دارای سابقه بیماری پاستورلوز و تلفات بوده و در فاصله زمانی فروردین ماه تا اسفند ماه سال ۱۳۹۴ در استان‌های مختلف کشور مورد بررسی قرارگرفته بودند، استفاده گردید. این جدایه‌ها بصورت لیوفیلیزه در کلکسیون کشت میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز نگهداری می‌شدند. یک سویه از ارگانیسم نیز که از موارد همه‌گیری پاستورلوز در مناطق شمالی کشور جداشده بود از کلکسیون موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه گردید (جدول ۱).

کشت جدایه‌ها و استخراج DNA

جدایه‌های مورد آزمایش به‌وسیله کشت‌های مرسوم باکتریایی، خصوصیات مورفولوژی و آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی و تعیین هویت شده‌بودند (۲۵). جهت تایید مولکولی، تعیین تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت این جدایه‌ها نیاز به DNA ژنومی بود که به منظور استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده گردید. برای این امر پس از باز کردن آمپول‌ها، ابتدا نمونه‌ها در محیط آبگوشت BHI و سپس بر روی آگار خون‌دار کشت شده و چند پرگنه خالص باکتری از این محیط برداشته شده و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید. تعلیق حاصل توسط دستگاه ترموبلاک (کیاژن، ایران) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰°C جوشانده شد و سپس به مدت یک دقیقه در دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی در میکروتیوب‌های استریل برای انجام آزمایش‌های مولکولی در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شد (۳۷).

تایید ملکولی، تعیین‌تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت جدایه‌ها

برای تشخیص قطعی *پاستورلا مولتوسیدا*، از پرایمرهای اختصاصی ژن *kmt1* این ارگانیسم استفاده گردید (جدول ۲). برای انجام PCR از میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر استریل و فاقد DNAase و دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده ۲X (مسترمیکس آمپلیکون آلمان، حاوی PCR buffer، $MgCl_2$، dNTPs و *Taq* DNA Polymerase)، چهار میکرولیتر آب DEPC، ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و ۵/۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده، انجام‌گردید. شرایط دمایی تکثیر ژن فوق مطابق با برنامه مندرج در جدول ۳ انجام شد. پس از طی‌شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن هدف، درنهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی (bp) (سیناژن، ایران) و سویه تاییدشده تیپ A *پاستورلا مولتوسیدا* (تهیه شده از کلکسیون کشت میکروبی دانشگاه شهید چمران اهواز که با هر دو روش بیوشیمیایی و مولکولی تعیین هویت شده‌بود) به‌عنوان شاهد مثبت و آب DEPC به‌عنوان شاهد منفی در ژل آگارز یک درصد حاوی رنگ ایمن (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داک (UVitec، انگلستان) باندهای تشکیل‌شده مشاهده گردید. در صورت مشاهده باند ۴۶۰ جفت بازی، جدایه موردنظر به‌عنوان *پاستورلا مولتوسیدا* تایید نهایی گردید (۱۳ و ۳۷).

www.SID.ir

Archive of SID

برای تعیین‌تیپ کپسولی جدایه‌ها، از روش PCR چندگانه تعیین‌تیپ کپسولی و پنج جفت پرایمر اختصاصی استفاده گردید (جدول ۲). شرایط PCR بجز حجم واکنش‌گرهای PCR (حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده، یک میکرولیتر آب DEPC، دو میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول) و چهار میکرولیتر از DNA استخراج‌شده) و پرایمرهای مورداستفاده، مشابه شرایط PCR تشخیص گونه *پاستورلا مولتوسیدا* بود (جدول ۳). در این مرحله، در صورت مشاهده باندهای ۱۰۴۸، ۷۵۸، ۶۴۷، ۵۱۲ و ۸۵۲ جفت بازی به ترتیب برای ژن‌های *capA*، *capB*، *capD*، *capE* و *capF*، جدایه موردنظر به‌عنوان تیپ کپسولی A، B، D، E و یا F درنظر گرفته‌شد (۱۳ و ۳۷).

برای شناسایی عوامل حدت جدایه‌ها، از روش PCR چندگانه و ۱۲ جفت پرایمر، در سه گروه چهارتایی، که هر کدام اختصاصی ژن رمزکننده‌ی یکی از عوامل حدت ارگانیسم بودند، استفاده گردید (جداول ۲ و ۳). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده، ۳/۵ میکرولیتر آب DEPC، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول) و پنج میکرولیتر از DNA استخراج‌شده انجام شد. برای تکثیر ژن‌های هدف، طبق روش فوریان و همکاران (۲۰۱۳) اقدام شد (۱۲). شرایط مرحله الکتروفورز محصول PCR و مشاهده باندها مشابه PCR تعیین تیپ کپسولی جدایه‌ها بود. در این مرحله، در صورت مشاهده باندهای مربوط به هر کدام از ژن‌های حدت مندرج در جدول ۲، جدایه موردنظر به‌عنوان جدایه حاوی آن عامل حدت در نظر گرفته‌شد (۱۲ و ۳۷).

با توجه به دارابودن اکثر ژن‌های اصلی حدت توسط اغلب جدایه‌های تحت‌آزمایش، پنج جدایه واجد اکثر ژن‌های مورد بررسی، با مدنظر قراردادن سایر عوامل، انتخاب‌شدند. این سویه‌های حاد به همراه سویه‌ای از ارگانیسم که از موارد همه‌گیری پاستورلوز در مناطق شمالی کشور جداسازی شده‌بود در آزمایش‌های بعدی تحت مطالعه قرارگرفتند.

بررسی حدت سویه‌های حاد در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار

برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی، از فاز رشد لگاریتمی شش جدایه حاد مورد آزمایش استفاده شد. بدین منظور از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها در محیط آگار خون‌دار برداشته شده و در پنج میلی‌لیتر از محیط آبگوشت BHI کشت چهار ساعته در دمای ۳۷°C داده شد. از این محیط نیز یک لوپ کامل برداشته شده و در محیط BHI دیگری (۵ میلی‌لیتر) کشت ۱۲ ساعته در دمای ۳۷°C داده‌شد. این کشت‌ها با کدورت شماره پنج مک‌فارلند مطابق شده و رقت‌های 10^{-1} الی 10^{-12} هر کدام از آن‌ها در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های 10^{-7} الی 10^{-12} هر جدایه تهیه شده و به دو پلیت آگار خون‌دار انتقال یافته و کشت سفره‌ای داده شد. پس از ۲۴ ساعت، تعداد پرگنه‌های هر پلیت شمارش شده و میانگین تعداد پرگنه‌های شمارش‌شده از هر رقت محاسبه شد که میانگین تعداد باکتری سوسپانسیون مذکور 3×10^{14} واحد تشکیل‌دهنده پرگنه در هر میلی‌لیتر (cfu/ml) برآورد گردید.

جهت تعیین میزان کشندگی ۵۰ درصد جدایه‌ها برای جنین ماکیان ($CELD_{50}$)، پس از تهیه مجدد رقت‌های 10^{-1} الی 10^{-12} هر جدایه، ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های 10^{-7} الی 10^{-11} که به ترتیب حاوی مقادیر

www.SID.ir

Archive of SID

10^{7}، 10^{6}، 10^{5}، 10^{4}و 10^{3} (cfu/ml) از هر کدام از جدایه‌ها بودند، به‌صورت داخل حفره کوریوآلانتوئیک در پنج تکرار به تخم‌مرغ‌های تجاری جنین‌دار ۱۱ روزه نژادهایلاین تلقیح گردید (۲۶ و ۳۰). به پنج تخم‌مرغ جنین‌دار هم به عنوان شاهد، ۱۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی استریل تلقیح شد. تمامی تخم‌مرغ‌ها به مدت ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شده و جنین‌های آن‌ها از نظر میزان تلفات و زمان تلف‌شدن، در ساعت‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ بعد از تلقیح بررسی شدند. از مایع کوریوآلانتوئیک جنین‌های تلف‌شده در هر گروه (به همراه جنین‌های زنده‌مانده گروه شاهد) جهت کشت‌های باکتریایی و مشاهده مستقیم نمونه‌برداری به‌عمل‌آمد. در نهایت با ملاحظه تلفات جنینی مربوط به هر کدام از جدایه‌ها و بر اساس روش رید و مانش میزان $CELD_{50}$ هر جدایه محاسبه شد. (۲۶ و ۳۰).

بررسی دوز کشندگی ۵۰ درصد (LD_{50}) سویه‌های حاد در نیمچه ماکیان

دراین مرحله، هر شش جدایه حاد طبق روش راماچاندران فیلایی و همکاران (۲۰۱۲) جهت محاسبه LD_{50} در ماکیان موردآزمایش قرار گرفتند (۲۹). برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی این جدایه‌ها، ابتدا از کشت ۲۴ ساعته ارگانیسم‌ها در محیط آگار خون‌دار برداشته شده و در پنج میلی‌لیتر از محیط آبگوشت BHI کشت پنج ساعته در دمای ۳۷°C داده شد. این کشت با کدورت شماره چهار مک‌فارلند مطابق شده و رقت‌های 10^{-1} الی 10^{-7} آن بوسیله سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های 10^{-5} تا 10^{-7} به دو پلیت آگار خون‌دار انتقال یافته و کشت سفره‌ای داده شد. پس از ۲۴ ساعت، تعداد پرگنه‌های موجود در هر پلیت شمارش شده و میانگین تعداد پرگنه‌های شمارش‌شده از هر رقت محاسبه شد. تعداد باکتری سوسپانسیون مذکور 1×10^{8} cfu/ml محاسبه گردید.

جدول ۱- خصوصیات ژنوتیپی ۱۸ نمونه *پاستورلا مولتوسیدا* جداشده از واحدهای طیور در استان‌های مختلف کشور به همراه یک سویه حاد ارگانیسم جداسازی شده از موارد همه‌گیری پاستورلوز در مناطق شمالی کشور

ردیف	کد جدایه	استان	منطقه	میزبان/ وضعیت	تیپ کپسولی	ژن‌های حدت موجود
۱	PM CH-1	مازندران	بابل	اردک/ به ظاهر سالم	غیرقابل تیپ‌بندی	*ompH, oma87,sodC,hgbA, hgbB,exBD-tonB,nanB,nanH, ptfA,pfhA*
۲	PM CH-2	مازندران	بابل	اردک/ به ظاهر سالم	A	*ompH, oma87, sodC,hgbA, hgbB,exBD-tonB,nanB,nanH, ptfA,pfhA*
۳	PM CH-3	مازندران	بابل	اردک/ به ظاهر سالم	A	*ompH, oma87, sodC,hgbA, hgbB,exBD-tonB,nanB,nanH, ptfA,pfhA*
۴	PM CH-4	مازندران	بابل	اردک/ به ظاهر سالم	A	*ompH, oma87, sodC,hgbA, hgbB,exBD-tonB,nanB,nanH, ptfA,pfhA*
۵	PM CH-5	خوزستان	ملاثانی	مرغ/ دارای علائم تنفسی	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۶	PM CH-6	خوزستان	ملاثانی	مرغ/ دارای علائم تنفسی	غیرقابل تیپ‌بندی	*sodC,hgbA,hgbB,nanB, nanH,ptfA*
۷	PM CH-7	خوزستان	ملاثانی	مرغ/ دارای علائم تنفسی	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۸	PM CH-8	مازندران	بابل	اردک/ به ظاهر سالم	A	*ptfA, pfhA, hgbA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۹	PM CH-9	مازندران	بابل	مرغ/ دارای علائم تنفسی	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۰	PM CH-10	مازندران	آمل	مرغ/ دارای علائم تنفسی	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۱	PM CH-11	مازندران	بابل	بوقلمون/ به ظاهر سالم	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۲	PM CH-12	مازندران	آمل	اردک/ به ظاهر سالم	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۳	PM CH-13	مازندران	آمل	اردک/ به ظاهر سالم	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۴	PM CH-14	مازندران	آمل	بوقلمون/ به ظاهر سالم	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۵	PM CH-15	مازندران	بابل	اردک/ به ظاهر سالم	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۶	PM CH-16	مازندران	آمل	اردک/ به ظاهر سالم	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۷	PM CH-17	مازندران	بابل	اردک/ به ظاهر سالم	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۸	PM CH-18	مازندران	بابل	مرغ/ دارای علائم تنفسی	A	*sodA, hgbA, ptfA, nanH,ompH, exBD-tonB, sodC, nanB, hgbB, oma87*
۱۹	PM3927	گیلان	تالش	مرغ/بیمار	A	*ompH, oma87,sodC,hgbA, hgbB,exBD-tonB,nanB, ptfA,pfhA,sodA*

www.SID.ir

Archive of SID

جهت محاسبه LD_{50} در ماکیان، پس از تهیه مجدد رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-7} هر جدایه، ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-7} که به ترتیب حاوی مقادیر 10^{4}، 10^{3}، 10^{2}، 10^{1} و (cfu/ml) ۰ از هر کدام از جدایه‌ها بودند، به صورت داخل عضلانی به پنج گروه پنج قطعه‌ای از نیمچه‌های تجاری تخم‌گذار ۱۳ هفته‌ای نژاد LSL تلقیح گردید. به هر کدام از پرندگان گروه شاهد نیز ۱۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی استریل تلقیح شد. تمامی نیمچه‌ها تا یک هفته پس از تزریق تحت‌نظر بوده و در طول این مدت از خون قلب، کبد و طحال پرندگان تلف‌شده، و نیز آسان‌کشی شده در پایان روز هفتم، به همراه نیمچه‌های زنده‌مانده گروه شاهد، جهت کشت‌های باکتریایی و مشاهده مستقیم نمونه‌برداری به‌عمل‌آمد. در نهایت با درنظر گرفتن تعداد پرندگان آلوده‌شده و بر اساس روش رید و مانش میزان LD_{50} جدایه‌ها محاسبه شد (۲۹ و ۳۰).

جدول ۲- ردیفِ پرایمرهای مورد استفاده جهت تایید گونه، تعیین‌تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا*

پرایمر اختصاصیِ	ژن هدف	توالی پرایمر (´۳-´۵)	طول محصول (bp)	منبع
پاستورلا مولتوسیدا	*kmt1*	-ATCCGCTATTTACCCAGTGG- -GCTGTAAACGAACTCGCCAC-	۴۶۰	(۳۷)
تیپ کپسولی A	*hyaD-hyaC*	-GATGCCAAAATCGCAGTCAG- -TGTTGCCATCATTGTCAGTG-	۱۰۴۸	
تیپ کپسولی B	*bcbD*	-CATTTATCCAAGCTCCACC- -GCCCGAGAGTTTCAATCC-	۷۵۸	
تیپ کپسولی D	*dcbF*	-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC- -CATCTACCCACTCAACCATATCAG-	۶۴۷	
تیپ کپسولی E	*ecbJ*	-TCCGCAGAAAATTATTGACTC- -GCTTGCTGCTTGATTTTGTC-	۵۱۲	
تیپ کپسولی F	*fcbD*	-AATCGGAGAACGCAGAAATCAG- -TTCCGCCGTCAATTACTCTG-	۸۵۲	
پورین	*ompH*	-CGCGTATGAAGGTTTAGGT- -TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC-	۴۳۸	
پورین	*oma87*	-ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC- -TGACTTGCGCAGTTGCATAAC-	۹۴۸	
سوپراکسید دیسموتاز	*sodA*	-TACCAGAATTAGGCTACGC- -GAAACGGGTTGCTGCCGCT-	۳۶۱	
سوپراکسید دیسموتاز	*sodC*	-AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA- -TGGTGCTGGGTGATCATCATG-	۲۳۵	
جذب آهن	*hgbA*	-TGGCGGATAGTCATCAAG- -CCAAAGAACCACTACCCA-	۴۱۹	
جذب آهن	*hgbB*	-ACCGCGTTGGAATTATGATTG- -CATTGAGTACGGCTTGACAT-	۷۸۸	
متابولیسم آهن	*exBD-tonB*	-GGTGGTGATATTGATGCGGC- -GCATCATGCGTGCACGGTT-	۱۱۴۴	
سیالیداز	*nanB*	-GTCCTATAAAGTGACGCCGA- -ACAGCAAAGGAAGACTGTCC-	۵۵۴	
سیالیداز	*nanH*	-GAATATTTGGGCGGCAACA- -TTCTCGCCCTGTCATCACT-	۳۶۰	
فیمبریه تیپ IV	*ptfA*	-TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC- -TCATGAATTCTTATGCGCAAAATCCTGCTGG-	۴۸۸	
هماگلوتینین	*pfhA*	-AGCTGATCAAGTGGTGAAC- -TGGTACATTGGTGAATGCTG-	۲۷۵	
درمونکروتوکسین	*toxA*	-CTTAGATGAGCGACAAGGTT- -GGAATGCCACACCTCTATA-	۸۶۵	

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌ها بوسیله نسخه ۱۷ نرم‌افزار SPSS و استفاده از آمار توصیفی و آزمون‌های دقیق فیشر و مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

تشخیص قطعی، تیپ کپسولی و عوامل حدت جدایه‌ها

در بررسی حاضر، تمام ۱۸ نمونه *پاستورلا مولتوسیدای* مورد مطالعه به همراه سویه جداشده از همه‌گیری پاستورلوز، باند ۴۶۰ جفت بازی مربوط به ژن *kmt1* را نشان داده و تایید مولکولی شدند. بر اساس نتایج

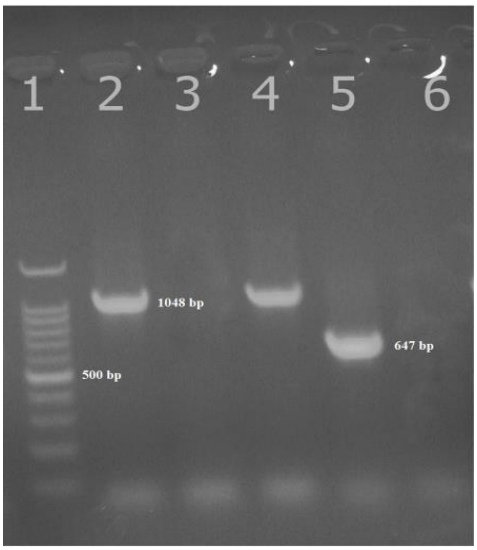
www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش PCR چندگانه تعیین‌تیپ کپسولی نیز از ۱۸جدایه تحت بررسی، ۱۶ جدایه (۸۸/۸ درصد) به همراه سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز باند ۱۰۴۸ جفت بازی را نشان داده و متعلق به تیپ کپسولی A بودند و دو جدایه (۱۱/۱ درصد) نیز به‌عنوان غیرقابل تیپ‌بندی شناسایی شده و در الکتروفورز آنها هیچ باندی مشاهده نشد. آنالیز آماری نشان داد که تیپ کپسولی A در بین سویه‌های جداسازی شده به طور معنی‌داری شایع‌تر از سایر تیپ‌ها می‌باشد (P <۰/۰۱) (جدول ۱، شکل ۱).

آزمایش شناسایی عوامل حدت نشان‌داد که ۱۰۰ درصد جدایه‌های موردمطالعه دارای شش ژن حدت *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *nanB*، *nanH* و *ptfA* می‌باشند. بررسی‌های آماری نیز مشخص‌نمود که فراوانی ژن‌های فوق در بین جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* به‌طور قابل-توجهی بیشتر از سایر ژن‌ها می‌باشد (P <۰/۰۵). ژن‌های *oma87*، *exBD-tonB*، *ompH*، *sodA* و *pfhA* نیز به ترتیب در ۹۴/۴، ۹۴/۴، ۸۳/۳، ۶۶/۶ و ۲۷/۷ درصد از جدایه‌ها حضور داشتند درحالی‌که هیچ‌کدام از جدایه-های موردمطالعه حاوی ژن *toxA* نبودند. از ژن‌های کدکننده عوامل چسبندگی، ژن *ptfA* (با شیوع ۱۰۰ درصد) بسیار شایع‌تر از *pfhA* (۲۷/۷ درصد) بود (P <۰/۰۵)؛ همچنین از ژن‌های رمزکننده‌ی سوپراکسید دیسموتاز ژن *sodC* (۱۰۰ درصد) شایع‌تر از *sodA* (۶۶/۶ درصد) بود (P <۰/۰۵).

اختلاف موجود میان اغلب جدایه‌ها از وجود یا عدم-وجود سه ژن *ompH*، *sodA* و *pfhA* ناشی می‌شد. تقریباً تمامی سویه‌های مناطق شمالی کشور (استان مازندران) بدون توجه به گونه و وضعیت سلامتی میزبان، از بین ۱۲ عامل حدت موردآزمایش اغلب آن‌ها (۱۰ ژن، ۸۳/۳ درصد) را دارا بودند. این درحالی‌است که از سه جدایه بدست‌آمده از مناطق جنوبی (استان خوزستان)، یک جدایه فقط واجد ژن‌های *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *nanB*، *nanH* و *ptfA* بود و از دو جدایه باقیمانده هر دو از نظر *sodA* مشابه ۱۰ نمونه مناطق شمالی کشور بوده ولی یکی از آن‌ها از نظر *ompH* شبیه ۱۴ مورد از جدایه‌های این مناطق بود (جدول ۱، شکل ۲).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR چندگانه تعیین‌تیپ کپسولی بر روی ژل آگارز یک درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲: شاهد مثبت (*پاستورلا مولتوسیدا* سروتیپ A)، چاهک ۳: جدایه *پاستورلا مولتوسیدا* غیرقابل تیپ‌بندی از نظر سروتیپ کپسولی، چاهک ٤: جدایه *پاستورلا مولتوسید* متعلق به تیپ کپسولی A (قطعه ۱۰٤۸ جفت بازی ژن *capA* در باکتری‌های موردمطالعه)، چاهک ٥: شاهد مثبت (*پاستورلا مولتوسیدا* سروتیپ D)، چاهک ٦: شاهد منفی (آب مقطر).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- برنامه دمایی PCR برای تایید گونه، تعیین‌تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* (۳۷)

ژن	سیکل‌ها		دما (°C)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل‌ها
kmt1 (All pass)	سیکل اول	واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۵	۱
	سیکل دوم	واسرشته‌سازی	۹۵	۱	۳۰
		اتصال	۵۵	۱	۳۰
		تکثیر	۷۲	۱	۳۰
	سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۱۰	۱
cap A (*hyaD-hyaC*) cap B (*bcbD*) cap D (*dcbF*) cap E (*ecbJ*) cap F (*fcbD*)	سیکل اول	واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۵	۱
	سیکل دوم	واسرشته‌سازی	۹۵	۱	۳۰
		اتصال	۵۵	۱	۳۰
		تکثیر	۷۲	۱	۳۰
	سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۱۰	۱
گروه اول عوامل مرتبط با حدت (*sodA، hgbA، ptfA، pfhA*)	سیکل اول	واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۵	۱
	سیکل دوم	واسرشته‌سازی	۹۴	۰/۵	۲۵
		اتصال	۵۵	۰/۵	۲۵
		تکثیر	۷۲	۱	۲۵
	سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۵	۱
گروه دوم عوامل مرتبط با حدت (*ompH، exbD-tonB، nanH، toxA*)	سیکل اول	واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۵	۱
	سیکل دوم	واسرشته‌سازی	۹۴	۰/۵	۲۵
		اتصال	۵۵	۰/۵	۲۵
		تکثیر	۷۲	۱	۲۵
	سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۵	۱
گروه سوم عوامل مرتبط با حدت (*oma87، sodC، hgbB، nanB*)	سیکل اول	واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۵	۱
	سیکل دوم	واسرشته‌سازی	۹۴	۰/۵	۲۵
		اتصال	۵۵	۰/۵	۲۵
		تکثیر	۷۲	۱	۲۵
	سیکل سوم	تکثیر نهایی	۷۲	۵	۱

با توجه به دارابودن اکثر ژن‌های اصلی حدت (۱۰ ژن، ۸۳/۳ درصد) توسط ۱۵ جدایه از ۱۸ جدایه موجود، سایر عوامل نظیر گونه و وضعیت سلامتی میزبان، منطقه جداسازی و نیز مقایسه تفاوت فاکتورهای حدت جدایه‌های تحت‌بررسی با سویه جداسازی شده از همه-گیری‌های پاستورلوز مناطق شمالی کشور مورد ملاحظه قرارگرفته و در نهایت جدایه‌های PM CH-2، PM CH-4، PM CH-10، PM CH-11 و PM CH-16 به همراه سویه حاد حاصل از همه‌گیری پاستورلوز، به-عنوان شش جدایه حاد جهت انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند (جدول ۴).

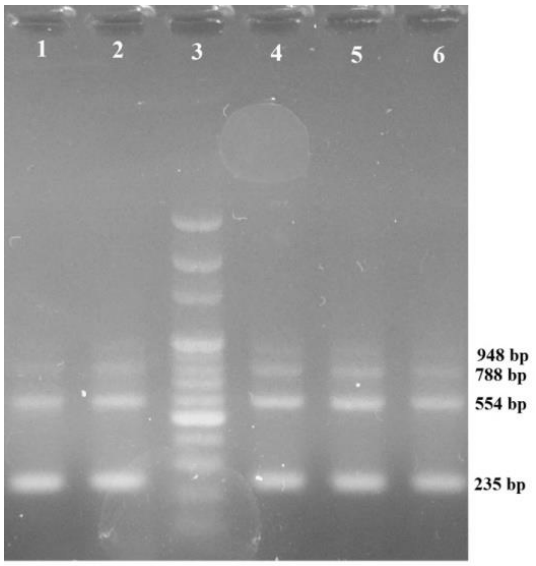
کشندگی جدایه‌های حاد در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار

نتایج حاصل از محاسبه $CELD_{50}$ هر کدام از شش جدایه حاد برای جنین ماکیان در جدول ۴ منعکس شده است. در این جدول جدایه‌ها بر مبنای حدت به‌دست-آمده مرتب شده‌اند که در مرتب‌سازی جدایه‌ها و مشخص شدن حادترین آن‌ها (سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز)، علاوه بر میزان تلفات، تقدم در زمان تلف‌کردن در ساعت‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ بعد از تلقیح نیز موردملاحظه قرارگرفته است. بررسی نمونه‌های حاصل از مایع کوریوآلانتوئیک جنین‌های تلف‌شده در هر گروه، منجر به جداسازی

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* با استفاده از کشت‌های مرسوم باکتریایی در هر یک از نمونه‌ها گردید. از نمونه‌های حاصل از جنین‌های گروه شاهد که همگی زنده بودند هیچ باکتری جدا نگردید.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR چندگانه جستجوی برخی عوامل حدت جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* بر روی ژل آگارز یک درصد، رنگ-آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک ۳: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ٤: شاهد مثبت (*پاستورلا مولتوسیدا* سروتیپ A)، چاهک‌های ۲-۱ و ٦-٥: گروه سوم از عوامل حدت مورد مطالعه شامل ژن‌های: *oma87* (۹٤۸bp)، *hgbB* (۷۸۸bp)، *nanB* (٥٥٤bp) و *sodC* (۲۳٥bp) در چهار جدایه - *پاستورلا مولتوسیدا*.

میزان LD_{50} جدایه‌های حاد در ماکیان

جهت محاسبه LD_{50}، رقت‌های مختلف جدایه‌های حاد به نیمچه‌های تخم‌گذار تلقیح گردید، ولی هیچ‌کدام از رقت‌های ۵ نمونه *پاستورلا مولتوسیدای* مورد مطالعه (ردیف‌های ۶-۲ جدول ۴) تا یک هفته پس از تلقیح قادر به عفونی‌سازی و تلف‌نمودن پرندگان تحت-آزمایش نبودند. در کشت‌های باکتریایی صورت‌گرفته بر روی نمونه‌های خون قلب، کبد و طحال نیمچه‌های آسان‌کشی شده تا پایان روز هفتم نیز هیچ باکتری جدا نگردید. این در حالی بود که بعد از تلقیح رقت‌های متفاوت سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز (ردیف ۱ جدول ۴)، تلفات ماکیان مورد آزمایش از ساعت هشت بعد از تزریق شروع شده و نیمچه‌ها تا ساعت ۴۸ پس از تزریق تحت‌نظر بوده و میزان تلفات آن‌ها ثبت گردید. کشت‌های انجام‌یافته بر روی نمونه-های خون قلب، کبد و طحال نیمچه‌های تلف‌شده تا پایان ساعت ۴۸، منجر به جداسازی باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* از هر یک از آن‌ها گردید. در کشت‌های انجام‌یافته بر روی نمونه‌های حاصل از نیمچه‌های آسان-کشی شده گروه شاهد هیچ باکتری جدا نگردید. با استفاده از روش رید و مانش و بر مبنای آلودگی نمونه-های خون، کبد و طحال اخذشده، میزان LD_{50} این جدایه در ماکیان 5×10^{1} واحد تشکیل‌دهنده پرگنه به ازای هر پرنده (cfu/case) محاسبه گردید و این جدایه به عنوان حادترین جدایه تحت بررسی شناسایی شد (جدول ۵) (۳۰).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول٤ - میزان باکتری لازم برای کشتن نیمی از جنین ماکیان ($CELD_{50}$) در جدایه‌های حاد

ردیف	کد جدایه	$CELD_{50}$/۰/۱mL
۱	PM 3927	$۱۰^{-۱۲}$
۲	PM CH-4	$۱۰^{-۱۲}$
۳	PM CH-2	$۱۰^{-۱۲}$
۴	PM CH-11	$۱۰^{-۱۱}$
۵	PM CH-10	$۱۰^{-۱۰/۸۲}$
۶	PM CH-16	$۱۰^{-۱۰/۷۲}$

جدول ۵- کشندگی مقادیر مختلف سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز در نیمچه‌های تخم‌گذار (محاسبه دوز کشندگی ۵۰ درصد (LD_{50}) این سویه).

درصد پرندگان تلف‌شده	نسبت پرندگان تلف‌شده	تجمعی زنده‌ها	تجمعی تلفات	پرندگان زنده‌مانده	پرندگان تلف‌شده در ۴۸ ساعت	تعداد پرندگان تلقیح‌شده	تعداد (cfu/ml)	باکتری رقت
۱۰۰	۱۶/۱۶	۰	۱۶	۰	۵	۵	$۱۰^{۴}$	$۱۰^{-۳}$
۱۰۰	۱۱/۱۱	۰	۱۱	۰	۵	۵	$۱۰^{۳}$	$۱۰^{-۴}$
۸۵/۷۱	۶/۷	۱	۶	۱	۴	۵	$۱۰^{۲}$	$۱۰^{-۵}$
۳۳/۳۳	۲/۶	۴	۲	۳	۲	۵	$۱۰^{۱}$	$۱۰^{-۶}$
۰/۰	۰/۹	۹	۰	۵	۰	۵	۰	$۱۰^{-۷}$

$cfu/case\ ۵\times۱۰^{۱} = cfu \rightarrow LD_{50}۱\times۱۰^{۸}\times۱۰^{-۷}\times۴/۸=۱۰\times۴/۸=۴۸$

بحث

بر اساس نتایج مطالعه جاری، هر ۱۸ جدایه مورد آزمایش، باند مربوط به ژن اختصاصی گونه *پاستورلا مولتوسیدا* را نشان دادند ولی از نظر تیپ کپسولی، ۱۶ جدایه متعلق به تیپ کپسولی A بوده و دو جدایه نیز غیرقابل تیپ‌بندی بودند. در آزمایش‌های شناسایی مارکرهای حدت، ۱۰۰ درصد جدایه‌ها حاوی شش ژن حدت *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *nanB*، *nanH* و *ptfA* تشخیص داده‌شدند. همچنین ژن‌های *oma87*، *exBD-tonB*، *ompH*، *sodA* و *pfhA* به ترتیب در ۹۴/۴، ۹۴/۴، ۸۳/۳، ۶۶/۶ و ۲۷/۷ درصد از جدایه‌ها حضور داشتند در حالی‌که هیچ‌کدام از جدایه‌ها حاوی ژن *toxA* نبودند.

در توافق با نتایج پژوهش حاضر، جباری و همکاران (۲۰۰۶) با بهره‌گیری از روش چندگانه تعیین تیپ کپسولی، ۳۹ جدایه طیوری *پاستورلا مولتوسیدا* را متعلق به تیپ کپسولی A شناسایی کرده و این گروه را عامل عمده موارد وبای مرغی در ایران گزارش نمودند (۱۹). در مطالعات عزی و همکاران (۲۰۰۷)، شایق و همکاران (۲۰۰۸)، دانش‌لاری و همکاران (۱۳۸۹)، خامسی‌پور و همکاران (۲۰۱۴) و تهمتن و همکاران (۲۰۱۴) بر روی جدایه‌های گوسفندی، بزی و گاوی *پاستورلا مولتوسیدا* در مناطق مختلف کشور نیز سروتیپ غالب، سروتیپ کپسولی A بوده است (۸، ۱۰، ۲۱، ۳۲ و ۳۶). همانگونه که مشاهده می‌شود نتایج بررسی جاری با یافته‌های اغلب مطالعات مولکولی انجام‌یافته در کشور مطابقت‌داشته و نشان می‌دهد که تیپ کپسولی A به‌عنوان تیپ غالب جداشده از موارد پاستورلوز حیوانات پرورشی در ایران می‌باشد.

مطالعات سایر پژوهشگران در دیگر کشورها نیز غالبا با نتایج حاصل از بررسی حاضر همخوانی دارد. شیواچاندرا و همکاران (۲۰۰۶) سویه‌های مرغی *پاستورلا مولتوسیدا* را با استفاده از روش‌های مرسوم و نیز تکنیک‌های متعدد مولکولی موردشناسایی قرارداده و اغلب جدایه‌ها را متعلق به تیپ کپسولی A تشخیص دادند (۳۳). محامد و همکاران (۲۰۱۲) نیز *پاستورلا مولتوسیدای* شایع در مرغ‌های خانگی را با استفاده از پنج جفت پرایمر اختصاصی، تعیین‌تیپ کپسولی کرده و اغلب جدایه‌ها را به‌عنوان سروتیپ‌های A:1 و A:3 اعلام نمودند (۲۶). همچنین در مطالعه گولر و همکاران

www.SID.ir

Archive of SID

(۲۰۱۳) اکثر سویه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* جداشده از میزبان‌های مختلف با استفاده از روش چندگانه تعیین تیپ کپسولی مربوط به سروتیپ کپسولی A معرفی شدند (۱۴).

فوریان و همکاران (۲۰۱۳) ژن‌های حدت ۲۵ جدایه مرغی *پاستورلا مولتوسیدا* را با روش PCR چندگانه بررسی‌نموده و گزارش کردند که ژن‌های *ompH*، *oma87*، *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *exBD-tonB* و *nanB* در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها، ژن‌های *sodA* و *nanH* در ۹۶ درصد نمونه‌ها و ژن *ptfA* در ۹۲ درصد نمونه‌ها حضور دارند (۱۲). تانگ و همکاران (۲۰۰۹) نیز با بررسی ژنوتیپی سویه‌های خوکی *پاستورلا مولتوسیدا* نشان دادند که ژن‌های *ptfA*، *fimA*، *hsf2* و *nanH* در اکثر سویه‌ها حضور دارند (۳۷).

مروری بر نتایج حاصل از آزمایش‌های تعیین‌تیپ کپسولی در سایر کشورها، که تیپ کپسولی A را به‌عنوان تیپ غالب جداشده از موارد پاستورلوز حیوانات نشان می‌دهد، و نیز نتایج اخذشده از آزمایش‌های بررسی مارکرهای حدت جدایه‌ها که حاکی از حضور اغلب عوامل حدت در جدایه‌های تحت‌بررسی است، نشان‌دهنده مطابقت نسبی نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های سایر پژوهشگران است.

در پژوهش جاری با توجه به دارابودن اغلب فاکتورهای حدت توسط اکثر جدایه‌های تحت‌بررسی، سایر عوامل تاثیرگذار از قبیل وضعیت سلامتی میزبان، منطقه جداسازی و مطابقت مارکرهای حدت ۱۸ جدایه موردمطالعه با عوامل حدت موجود در سویه حاد جداسازی شده از موارد همه‌گیری پاستورلوز مناطق شمالی کشور مورد توجه قرارگرفته و شش جدایه (جدول ۴) به‌عنوان جدایه‌های حاد انتخاب و مورد آزمایش قرارگرفتند. نتایج مندرج در جدول ۴ میزان $CELD_{50}$ هر یک از شش جدایه حاد *پاستورلا مولتوسیدا* را برای جنین ماکیان نشان می‌دهد که بر اساس میزان تلفات هر جدایه و با ملاحظه تقدم در زمان تلف‌کردن جنین‌ها، حدت هر کدام از آنها مشخص‌شده و سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز (PM 3927) به‌عنوان حادترین جدایه شناسایی گردید.

همچنین بر طبق یافته‌های بررسی جاری، جهت محاسبه LD_{50} جدایه‌های حاد در ماکیان، رقت‌های مختلف آن‌ها بصورت داخل عضلانی به نیمچه‌های تخم‌گذار تزریق گردید ولی هیچ‌کدام از رقت‌های جدایه‌های موردمطالعه، به استثناء سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز که رقت‌های مختلف آن تا ساعت ۴۸ پس از تلقیح منجر به تلف‌شدن اکثر نیمچه‌ها شده و میزان LD_{50} آن در ماکیان ۵۰cfu/case محاسبه شد، قادر به عفونی‌سازی پرندگان تحت‌آزمایش نبودند. بر اساس نتایج این آزمایش‌ها نیز جدایه PM3927 به‌عنوان حادترین جدایه شناسایی شد.

با این‌که در آزمایش‌های بررسی عوامل مرتبط با حدت، اغلب جدایه‌ها حاوی ژن‌های موردبررسی بودند ولی ردیابی هر یک از فاکتورهای حدت دلیل بر بیان آن ژن و استفاده ارگانیسم از محصول آن نمی‌باشد. بدین‌معنی‌که ممکن‌است در روش‌های مولکولی مارکرهای متعدد حدت در یک جدایه شناسایی شوند ولی جدایه مدنظر بدلیل عدم بیان آن ژن‌ها، در مراحل بررسی حدت و یا دوز عفونی در مدل حیوان آزمایشگاهی و یا میزبان اصلی، قادر به عفونی‌سازی و یا تلف‌نمودن آنها نباشد. در این مطالعه نیز با وجود اینکه اکثر ژن‌های حدت در اغلب جدایه‌ها حضور داشتند و در آزمایش بررسی $CELD_{50}$ پنج جدایه حاد برای جنین ماکیان، این جدایه‌ها قادر به تلف‌نمودن جنین‌ها بودند ولی در مراحل بعدی و آزمایش‌های مربوط به

www.SID.ir

Archive of SID

محاسبه LD_{50} آن‌ها در ماکیان، هیچ‌کدام از جدایه‌ها توانایی عفونی‌سازی ماکیان تحت‌آزمایش را نداشته و فقط سویه جداسازی شده از موارد همه‌گیری پاستورلوز با وجود تشابه از نظر دارا بودن عوامل حدت با جدایه-های تحت بررسی توانست پرندگان مورد آزمایش را بطور سریع متاثر نموده، عفونی کرده و تلف نماید.

در تطابق با بخشی از نتایج مطالعه جاری، ستوده‌نیا و همکاران (۲۰۰۴) حدت سروتیپ A:1 جدایه طیوری باکتری را در جوجه مرغ‌های هشت هفته‌ای بررسی-کرده و گزارش نمودند که ۷cfu/case از ارگانیسم قادر است تمام میزبان‌های تحت‌آزمایش را در کمتر از ۲۴ ساعت تلف نماید (۳۵). هم‌چنان‌که مشاهده می‌شود سروتیپ A:1 ارگانیسم که در پژوهش این محققین موردبررسی قرارگرفته مشابه سویه PM3927 مطالعه جاری حدت بالایی داشته و هر دو جدایه با cfu پایینی قادر به تلف‌نمودن پرندگان تلقیح‌شده در ۲۴ ساعت اول بعد از تزریق بوده‌اند و از این نظر هم‌خوانی قابل-توجهی بین نتایج دو مطالعه وجوددارد. همچنین جباری و موذنی جولا (۲۰۰۵) حداقل دوز کشندگی (Minimum lethal dose) (MLD) سروتیپ‌های ۱، ۳ و ۴ جدایه‌های طیوری ارگانیسم را در موش، خرگوش و جوجه مرغ‌ها بررسی کرده و برای سروتیپ ۱ و ۳ جرم به ترتیب ۲۰ و ۲×۱۰^{۶}cfu/case از ارگانیسم گزارش نمودند در حالیکه تلقیح ۲×۱۰^{۸}cfu از سروتیپ ۴ باکتری قادر به تلف‌نمودن هیچ‌کدام از پرندگان تحت‌بررسی نبوده است (۱۸). حدت سروتیپ ۱ ارگانیسم مورداستفاده در بررسی ایشان مانند حدت سویه PM3927 (۵۰cfu/case) در پژوهش جاری بالا بوده است. همچنین حدت سروتیپ ۴ مشابه سویه‌هایی از مطالعه جاری که اغلب مارکرهای حدت را داشته ولی کم حدت بودند، پایین بوده است.

حبل‌الورید و همکاران (۲۰۰۹) نیز طی مطالعه‌ای حدت سروتیپ A:1 جدایه طیوری باکتری را در جوجه‌های چهار هفته‌ای عاری از پاتوژن‌های خاص (Specific pathogen free) (SPF) ۷۵ cfu بدست آورده و گزارش نمودند که تمامی پرندگان در کمتر از ۱۶ ساعت تلف می‌شوند (۱۶). محامد و همکاران (۲۰۱۲) نیز حدت ۲۱ جدایه *پاستورلا مولتوسیدای* حاصل از مرغ‌های خانگی در مناطق مختلف مصر را با تلقیح $۲/۴\times۱۰^{۸}$cfu از این ارگانیسم‌ها به موش‌ها آزمایش کرده و گزارش نمودند که این جدایه‌ها میزبان‌ها را بین ۲۴-۱۸ ساعت تلف می‌نمایند. این محققین همچنین حدت جدایه‌ها را از طریق تلقیح داخل حفره کوریوآلانتوئیک ۱×۱۰^{۵}cfu از ارگانیسم‌ها به تخم‌مرغ-های جنین‌دار ۱۱ روزه موردارزیابی قرارداده و مشاهده نمودند که قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها برای جنین ماکیان متغیربوده و میزان کشندگی آن‌ها بین ۸۰-۲۰ درصد است که در مدت‌زمان ۱۲۴-۳۰ ساعت قادر به ایجاد این تلفات می‌باشند (۲۶). در مطالعه حاضر نیز جدایه‌های موردآزمایش قادر به تلف‌نمودن اکثر جنین-های ماکیان در مدت‌زمان ۷۲-۲۴ ساعت بعد از تلقیح بوده و حدت قابل‌توجهی را در این مرحله از آزمایش‌ها از خود نشان دادند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که جدایه‌های طیوری *پاستورلا مولتوسیدا* که از مناطق مختلف ایران جداسازی شده بودند حاوی اغلب ژن‌های مهم و متنوع شناخته شده مرتبط با حدت این ارگانیسم بودند. با این-همه در بررسی حدت این سویه‌ها در جنین و نیمچه ماکیان به‌عنوان مدل حیوان آزمایشگاهی و میزبان اصلی، با اینکه جدایه‌های حاد قادر به تلف‌نمودن جنین ماکیان بودند ولی هیچ‌کدام از سویه‌ها توانایی عفونی-سازی نیمچه ماکیان را نداشتند. به نظر می‌رسد جدایه-

www.SID.ir

Archive of SID

های حاصل از میزبان‌های سالم و یا دارای علائم بیماری حتی در مناطقی که بیماری بصورت آندمیک در آن‌ها حضور دارد از نظر توانایی متاثر نمودن و تلف کردن میزبانان اصلی، قادر به رقابت با جدایه‌های حاصل از موارد همه‌گیری بیماری نبوده و حدت سویه‌های جداشده از پرندگان مبتلا به شکل فوق‌حاد بیماری در طی همه‌گیری‌ها، به مراتب بالاتر می‌باشد. اطلاعات ژنتیکی جدایه‌های مطالعه حاضر و بررسی حدت آنها در حیوان آزمایشگاهی و میزبان اصلی می‌تواند در طراحی واکسن‌های جدید و کارآمدی که بتوانند محافظت قابل‌توجهی را در جمعیت‌های دامی ایجاد نمایند، مفید واقع گردند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند مراتب تشکر و امتنان خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز در تامین هزینه پژوهشی این مطالعه ابراز دارند.

منابع

1- Blehert, D.S., Jefferson, K.L., Heisey, D.M. et al. (2008). Using amplified fragment length polymorphism analysis to differentiate isolates of *Pasteurella multocida* serotype 1. *Journal of Wildlife Diseases* **44**: 209-225.

2- Boerlin, P., Siegrist, H.H., Burnens, A.P. et al. (2000). Molecular identification and epidemiological tracing of *Pasteurella multocida* meningitis in a baby. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 1235-1237.

3- Bosch, M., Garrido, M.E., Llagostera, M. et al. (2002). Characterization of the *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infection and Immunity* **70**: 5955-5964.

4- Boyce, J.D., Adler, B. (2006). How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? *Current Opinion in Microbiology* **9**: 117-122.

5- Boyce, J.D., Harper, M., St Michael, F., John, M., Aubry, A., Parnas, H., Logan, S.M., Wilkie, I.W., Ford, M., Cox, A.D., Adler, B. (2009). Identification of novel glycosyltransferases required for assembly of the *Pasteurella multocida* A:1 lipopolysaccharide and their involvement in virulence. *Infection and Immunity* **77**: 1532-1542.

6- Brook, I. (2009). Management of human and animal bite wound infection: an overview. *Current Infectious Disease Reports* **11**: 389–395.

7- Confer, A.W., Ayalew, S. (2013). The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Veterinary Microbiology* **163**: 207–222.

8- Danesh Lari, S., Tahamtan, Y., Hayati, M., Kargar, M. (2010). Rapid and simultaneous identity of virulence factors and capsular typing of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and goats by multiplex PCR. *Journal of Microbial world* **3**:162-168. (in Persian).

9- Dziva, F., Muhairwa, A.P., Bisgaard, M., Christensen, H. (2008). Diagnostic and typing options for investigating disease associated with *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology* **128**: 1-22.

10- Ezzi, A., Moradi Bidhendi, S., Jabbari, A.R. (2007). Survey on pneumonic pasteurellosis in slaughtered sheep and goats at Ziaran abattoir. *Archives of Razi Institute* **62**: 235-239.

11- Fukuchi, T., Morisawa, Y. (2009). A case of cat-scratch-induced *Pasteurella multocida* infection presenting with disseminated intravascular coagulation and acute renal failure. *Journal of Japanese Association for Infectious Diseases* **83**: 557–560.

12- Furian, T.Q., Borges, K.A., Rocha, S.L.S., Rodrigues, E.E., Nascimento, V.P. do, Salle, C.T.P., Moraes, H.L. de S. (2013). Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* **33**: 177-182.

13- Furian, T.Q., Borges, K.A., Pilatti, R.M., Almeida, C., Nascimento, V.P. do, Salle, C.T.P., Moraes, H.L. de S. (2014). Identification of the capsule type of *Pasteurella Multocida* isolates from cases of fowl cholera by multiplex PCR and comparison with phenotypic methods.

www.SID.ir

Archive of SID

23-Kumar, B., Chaturvedi, V.K., Somrajan, S.R., Kumar, P., Sreedevi, R., Kumar, S. et al. (2011). Comparative immune response of purified native OmpH protein derived from *Pasteurella multocida* P52 and oil adjuvant vaccine against hemorrhagicsepticemia in mice. *Indian Journal of Animal Sciences* **81**: 1193–1196.

24- Lax, A.J., Pullinger, G.D., Baldwin, M.R., Harmey, D., Grigoriadis, A.E., Lakey, J.H. (2004). The *Pasteurella multocida* toxin interacts with signalling pathways to perturb cell growth and differentiation. *International Journal of Medical Microbiology* **293**: 505-512.

25- Markey, B.K., Leonard, F.C., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire, D. (2013). Clinical Veterinary Microbiology. 2nd Ed., Edinburgh, The CV Mosby Company, pp: 307-317.

26- Mohamed, M.A., Mohamed, M.W., Ahmed, A.I., Ibrahim, A.A., Ahmed, M.S. (2012). *Pasteurella multocida* in backyard chickens in upper Egypt: Incidence with polymerase chain reaction analysis for capsule type, virulence in chicken embryos and antimicrobial resistance. *Veterinaria Italiana* **48**: 77-86.

27- Nascimento, V.P., Gama, N.M.S.Q., Canal, C.W. (2009). Corizainfecciosa das galinhas, pasteureloses e outrasinfecçõesbacterianasrelacionadas. pp: 503-530. In: Berchieri Júnior, A., Silva, E.N., Di Fábio, J., Sesti, L. and Zuanaze, M.A.F. (Ed.), Doenças das Aves, 2nd Ed., FACTA, Campinas.

28- Orth, J.H., Aktories, K., Kubatzky, K.F. (2007). Modulation of host cell gene expression through activation of STAT transcription factors by *Pasteurella multocida* toxin. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 3050-3057.

29- Ramachandranpillai, R., Govindapillai, K.N., Mini, M., Joseph, L., Saseendranath Raghavan, M. (2012). Immunopotency of novel oil adjuvant vaccines employing *Pasteurella multocida* biofilm and capsule enhanced organisms in ducklings. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **36**: 367-372.

30- Reed, L.J., Muench, H.A. (1938). Simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* **27**: 493-497.

Brazilian Journal of Poultry Science **16**: 31-36.

14- Guler, L., Gunduz, K.,Sarisahin, A.S. (2013). Capsular typing and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from different hosts. *KafkasÜniversites Veteriner Fakültesi Dergisi* **19**: 843-849.

15- Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. (2010). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4th Ed., Blackwell Publishing, pp: 325-346.

16- Hablolvarid, M.H., MoazeniJula, G., jabbari, A.R. (2009). Experimintal study of peracute fowl cholera due to *Pasteurella multocida* vaccinal strain (serotype A:1) in chickens. *Archives of Razi Institute* **64**: 57-60.

17- Hey, P., Gow, P., Torresi, J., Testro, A. (2012). Cirrhosis, cellulitis and cats: a 'purrfect' combination for life-threatening spontaneous bacterial peritonitis from *Pasteurella multocida*. *British Medical Journal Case Reports*, doi: 10.1136/bcr-2012-007397.

18- Jabbari, A.R., MoazeniJula, G.R. (2005). Fowl cholera: Evaluation of a trivalent *Pasteurella multocida* vaccine consisted of serotypes 1, 3 and 4. *Archives of Razi Institute* **59**: 103-111.

19- Jabbari, A.R., Esmaelzadeh, M., MoazeniJula, G.R. (2006). Polymerase chain reaction typing of *Pasteurella multocida* capsules isolated in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research, University of Shiraz* **7**: 50-55.

20- Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K. et al. (2003). Molecular typing of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotype A:1 isolates from cattle in Japan. *Epidemiology and Infection* **131**: 939–946.

21- 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**: Article 536, www.frontiersin.org, doi: 10.3389/fmicb.2014.00536.

22- Kuhnert, P., Christensen, H. (2008). *Pasteurellaceae*: Biology, Genomics and Molecular Aspects. Norfolk, Caister Academic Press, pp: 11-13.

www.SID.ir

Archive of SID

31- Saif, Y.M. (2008). Diseases of Poultry. Wiley-Blackwell, Ames.
32- Shayegh, J., Atashpaz, S., Hejazi, M.S. (2008). Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances (AJAVA)* **3**: 206-213.
33- Shivachandra, S.B., Kumar, A.A., Gautam, R., Singh, V.P., Saxena, M.K., Srivastava, S.K. (2006). Identification of avian strains of *Pasteurella multocida* in India by conventional and PCR assays. *The Veterinary Journal* **172**: 561-564.
34-Shivachandra, S.B., Kumar, A.A., Chaudhuri, P. (2008). Molecular characterization of avian strains of *Pasteurella multocida* serogroup A:1 based on amplification of repetitive regions by PCR. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **31**: 47–62.
35- Sotoodehnia, A., Ataei, S., MoazeniJula, G.R., Jabbari, A.R., Tabatabaei, M. (2004). Virulence of avian serotype A:1 *Pasteurella multocida* for chickens and mice. *Archives of Razi Institute* **58**: 91-96.
36- Tahamtan, Y., Hayati, M., Namavari, M.M. (2014). Isolation and identification of *Pasteurella multocida* by PCR from sheep and goats in Fars province, Iran. *Archives of Razi Institute* **69**: 89-93.
37- Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q., Chen, H. (2009). Isolation, antimicrobial resistance and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 951-958.
38- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J.S. (1998). Development of PCR assays for species and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 1096-1100.
39- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y. et al. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of amultiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 924–929.
40- Wilkie, I.W., Grimes, S.E., O'Boyle, D., Frost, A.J. (2000). The virulence and protective efficacy for chickens of *Pasteurella multocida* administered by different routes. *Veterinary Microbiology* **72**: 157-168.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 1, 2019

Molecular Study of Virulence Factors of Avian Isolates of P*asteurella multocida* and Survey of Acute Isolates Lethality in Embryonic egg and Pullet

Ghadimipour, R. [*1]; Ghorbanpoor, M. [2]; Gharibi, D.[3]; Mayahi, M.[4]; Jabbary, A.R.[5]

1- Assistant Professor, Department of Research and Development, North-West Branch of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Marand, Iran

2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

5- Associate Professor, Pasteurella Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 10 June 2017 Accepted: 3 September 2017

Abstract

Present study was designed in order to molecular confirmation, capsular typing and detection of 12 important virulence factors include ompH, oma87, sodA, sodC, hgbA, hgbB, exBD-tonB, nanB, nanH, ptfA, pfhA and toxA in 18 Pasteurella multocida avian isolates from different areas of Iran with a strain of the organism was isolated from the epidemic pasteurellosis in the Northern region, and also survey of acute isolates lethality in poultry embryos and pullet. Molecular confirmation of tested isolates was performed using specific primers of kmt1. As well, capsular typing and detection of virulence factors of isolates were performed by application of multiplex PCR method and using specific primers of capsule biosynthesis genes and genes encoding virulence factors of organism. All isolates were confirmed molecularly but based on the results of capsular typing, 16 (88.8%) isolates with strain isolated from epidemic pasteurellosis were identified as type A and 2 (11.1%) as untypeable isolates. Detection of virulence genes showed that all studied isolates has six virulence genes of sodC, hgbA, hgbB, nanB, nanH and ptfA. The oma87, exBD-tonB, ompH, sodA and pfhA genes were respectively present in 94.4, 94.4, 83.3, 66.6 and 27.7% of the isolates, but there was not any toxA positive isolates. To determine the chicken embryo lethal dose 50 ($CELD_{50}$) and lethal dose 50 (LD_{50}) of the isolates, different dilutions of five acute isolates containing the majority of virulence genes as well as strain isolated from epidemic pasteurellosis were respectively inoculated to embryonated chicken eggs and lying pullets. Based on the results of $CELD_{50}$, though all six isolates were able to waste the poultry embryos, but strain isolated from epidemic pasteurellosis was recognized as the most acute isolate. Results of LD_{50} test showed that none of the five acute isolates were able to waste the studied pullets while the LD_{50} of strain isolated from epidemic pasteurellosis was determined 5×10^1 colony forming unit per bird (cfu/case), and this strain was identified as the most acute understudy isolate. The findings of this study showed that, despite the presence of the majority of virulence genes in P. multocida avian isolates in Iran, and that the most acute isolates were able to waste the poultry embryos but they were not infectious to lying pullets, and virulence of strains isolated from birds with hyperacute form of the disease is far higher. Our data could be useful in the design of new and efficient vaccines that would be acceptable protection in animal populations.

Keywords: Pasteurella multocida, Avian pasteurellosis, Virulence factors, $CELD_{50}$, LD_{50}

**Corresponding author: Ghadimipour, Rahim*

Address: Department of Research and Development, North-West Branch of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Marand, Iran. Tel: 041-42399084

E-mail: R.ghadimipour@rvsri.ac.ir

www.SID.ir