Archive of SID

ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های طیوری *پاستورلا مولتوسیدا* در برخی استان‌های ایران

رحیم قدیمی‌پور[۱،۲]، مسعود قربانپور[۳*]، داریوش غریبی[۴]، منصور میاحی[۵]، احمدرضا جباری[۶]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۲. کارشناس ارشد واکسن‌سازی، بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج- ایران.
۳. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۴. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۵. استاد، گروه علوم‌درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.
۶. دانشیار، آزمایشگاه مرجع تحقیقات پاستورلا، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج- ایران.

دریافت: ۲۷ بهمن ماه ۹۴ **پذیرش:** ۱ تیرماه ۹۵

چکیده

پاستورلوز طیور پرندگان اهلی و وحشی را در بسیاری از نقاط جهان مبتلا می‌کند. پژوهش حاضر با هدف جداسازی و بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* از جمعیت مرغ، بوقلمون، غاز و اردک‌های مناطق مختلف استان‌های مازندران، گیلان، آذربایجان شرقی و خوزستان طراحی گردید. بدین‌منظور بعد از جمع‌آوری تعداد ۷۰۱ نمونه سوآب نایی، با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت، ۱۲ (۱/۷٪) جدایه مظنون به *پاستورلا مولتوسیدا* از این نمونه‌ها جداسازی گردید که با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی ژن *kmt1*، ۷ (۹۹/۰٪) جدایه‌ها تأیید مولکولی شدند. آزمایش‌های تعیین بیوتیپ، تمامی جدایه‌ها را متعلق به *پاستورلا مولتوسیدا* تحت‌گونه *مولتوسیدا* نشان دادند. بر اساس نتایج آزمایش‌های تعیین تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت جدایه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ۵ (۷۱/۴٪) جدایه به‌عنوان سروتیپ A و ۲ (۲۸/۵٪) جدایه نیز به‌عنوان غیرقابل تیپ‌بندی شناسایی شدند. همچنین این آزمایش‌ها نشان داد که ۷۱/۴٪ جدایه‌ها ژن‌های حدت *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *nanB*، *nanH* و *ptfA* دارند و ۵۷/۱٪ از آن‌ها نیز ژن‌های حدت *ompH*، *oma87*، *exBD-tonB* و *pfhA* دارند؛ لیکن هیچ‌کدام از آن‌ها حاوی ژن‌های *toxA* و *soda* نبودند. نتایج آزمایش تعیین الگوی مقاومت دارویی جدایه‌ها به روش انتشار دیسک، نشان داد همه جدایه‌ها (۱۰۰٪) نسبت به سفالکسین، فلومیکوئین، فلورفنیکل، تری‌متوپریم- سولفامتوکسازول، سولتریم و فسفومایسین حساس هستند ولی نسبت به کلوگزاسیلین مقاومت نشان دادند. نتایج بررسی حاضر بیانگر شیوع پایین *پاستورلا مولتوسیدا* در میان طیور موردبررسی در محدوده‌های جغرافیایی تحت‌مطالعه است ($P<0/05$)، با این همه در مقایسه با پژوهش‌های پیشین، مقاومت سویه‌های جداشده نسبت به برخی عوامل ضدمیکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلینی افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: *پاستورلا مولتوسیدا*، پاستورلوز، طیور، عوامل حدت.

مقدمه

پاستورلا عضوی از خانواده پاستورلاسه است که شامل گروه بزرگ و متنوعی از گاماپروتئوباکترهای گرم‌منفی است (۱۳). *پاستورلا مولتوسیدا* ارگانیسمی کوچک، غیرمتحرک و بی‌هوازی اختیاری است که ممکن است به‌صورت باسیل یا کوکوباسیل مشاهده گردد (۱۴). این باکتری، عامل بیماری‌های متعدد دامی از قبیل وبای مرغی (Fowl cholera) در پرندگان اهلی و وحشی

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: m.ghorbanpoor@scu.ac.ir

نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران
www.SID.ir

Archive of SID

است (۱۰). به‌طور معمول، وبای مرغی (پاستورلوز طیور) با واگیری و تلفات بالا در ماکیان، بوقلمون، اردک و بسیاری از دیگر پرندگان اهلی و وحشی بروز می‌کند. این بیماری منجر به تلفات و خسارات اقتصادی گله‌های طیور در بسیاری از نقاط دنیا شده و هنوز به‌عنوان یکی از معضلات صنعت طیور محسوب می‌شود (۵ و ۱۶). مهم‌ترین عوامل حدت شناخته‌شده *پاستورلا مولتوسیدا* شامل کپسول پلی‌ساکاریدی، عوامل اتصالی ارگانیسم، لیپوپلی‌ساکارید (LPS) جدار سلولی، توکسین *پاستورلا مولتوسیدا* (PMT) و پروتئین‌های تأمین‌کننده آهن هستند که در تهاجم باکتری به میزبان‌های مختلف و ایجاد ضایعات گسترده در آن‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۱۰ و ۱۴).

پاستورلا مولتوسیدا یک گونه هتروژنوس بوده و برای تمایز سویه‌های آن روش‌های مرسوم و مولکولی مختلفی توصیف گردیده است (۱۰). روش‌های مرسوم برای شناسایی و دسته‌بندی جدایه‌های مشکوک این ارگانیسم شامل آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی است. از آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی تحت‌گونه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* استفاده شده و بر پایه الگوی واکنش اجرام در استفاده از برخی قندها، سویه‌ها تعیین بیوتیپ می‌شوند (۲). از جمله روش‌های سرولوژیک مورد استفاده برای تعیین سروتیپ *پاستورلا مولتوسیدا*، آزمایش هماگلوتیناسیون غیرفعال و آزمایش انتشار در ژل آگارز هستند که در طی آن‌ها به ترتیب بر اساس پلی‌ساکاریدهای کپسولی و لیپوپلی‌ساکاریدهای جدار باکتری، پنج تیپ کپسولی (A، B، D، E و F) و ۱۶ تیپ پیکری (سروتیپ‌های ۱ تا ۱۶) ارگانیسم متمایز می‌شوند (۱۴). سویه‌های تیپ کپسولی A *پاستورلا مولتوسیدا* به‌خصوص سروتیپ‌های ۱ :A، ۳ :A و ۴،۳ :A آن، در اغلب موارد وبای مرغی و سویه‌های متعلق به تیپ‌های D و F باکتری در موارد نادری از بیماری، به‌عنوان عامل اصلی ضایعات شناسایی گردیده‌اند (۹). با توجه به دشوار بودن تهیه آنتی‌سرم‌های اختصاصی مورد استفاده در روش‌های مرسوم تعیین سروتیپ، امروزه برای شناسایی، تعیین تیپ و نیز تعیین عوامل حدت *پاستورلا مولتوسیدا* از روش‌های پیشرفته مولکولی استفاده می‌شود که از جمله آن‌ها تعیین‌تیپ کپسولی با PCR چندگانه است که در آن از ۵ جفت پرایمر که هر کدام اختصاصی توالی مسئول بیوسنتز کپسول سروتیپ خاصی از ارگانیسم هستند، بهره‌گیری می‌شود (۲۳).

در ایران اولین گزارش مربوط به جداسازی و شناسایی عامل وبای مرغی به سال ۱۳۵۱ برمی‌گردد (۱). در سال ۱۳۶۳ توسلی و همکاران و پس از آن ستوده‌نیا و همکاران عامل این بیماری را از واگیری‌های پاستورلوز طیور در مناطق مرکزی، غربی و به‌ویژه شمالی کشور (استان‌های گیلان و مازندران) جدا کرده و ارگانیسم‌های جداشده را به‌عنوان سروتیپ ۱ و گروه کپسولی A *پاستورلا مولتوسیدا* معرفی کردند. به دنبال این پژوهش‌ها، یک واکسن کشته مونووالان حاوی باکترین سویه محلی ارگانیسم در سال ۱۳۶۳ در مؤسسه رازی تهیه و به‌طور وسیع در استان‌های شمالی، که بیماری به‌صورت آندمیک در آن‌ها حضور دارد، و برخی مناطق دیگر کشور مورداستفاده قرارگرفت (۲۰ و ۲۲). با توجه به ایمنی کوتاه‌مدت حاصل از واکسن‌های کشته و محافظت همولوگ (اختصاصی سروتیپ) ناشی از این واکسن‌ها و نیز ظهور سروتیپ‌های دیگری از باکتری (۲)، علی‌رغم واکسیناسیون‌های انجام‌یافته، همچنان گزارش‌های مربوط به جداسازی *پاستورلا مولتوسیدا* از پرندگان اهلی و وحشی در استان‌های تهران، خراسان، مازندران و دیگر مناطق شمال ایران توسط سازمان دامپزشکی کشور و نیز پژوهشگران دانشگاهی منتشر گردیده است (۳ و ۶). پژوهش حاضر با هدف جداسازی، شناسایی، تعیین‌تیپ کپسولی، بررسی عوامل حدت و نیز ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* در طیور سالم و یا دارای علائم تنفسی در برخی استان‌های کشور، بر اساس روش‌های مرسوم باکتریایی و نیز روش‌های نوین مولکولی طراحی گردید تا درآینده

www.SID.ir

Archive of SID

بتوان از اطلاعات حاصله در سیاست‌های پیشگیری و درمان بیماری بهره جست.

مواد و روش کار

به منظور نمونه‌برداری، تعداد ۷۰۱ نمونه سوآب نایی از جمعیت مرغ، بوقلمون، غاز و اردک‌های سالم و یا دارای علائم تنفسی در مناطق مختلف استان‌های مازندران، گیلان، خوزستان و آذربایجان شرقی طی فصول تابستان و پاییز سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد (جدول ۱). با توجه به حساس بودن ارگانیسم، تمام نمونه‌ها در حداقل زمان ممکن و در محیط انتقالی کری- بلایر و شرایط سرد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردیدند.

جدول ۱- مشخصات مناطق تحت بررسی و طیور موردمطالعه در برخی استان‌های کشور به همراه درصد موارد مثبت از نظر جداسازی قطعی باکتری *پاستورلا مولتوسیدا*

استان	منطقه	طیور تحت مطالعه											
		مرغ			اردک			غاز			بوقلمون		
		تعداد نمونه											
		سالم	دارای علائم تنفسی	تعداد موارد مثبت (٪)	سالم	دارای علائم تنفسی	تعداد موارد مثبت (٪)	سالم	دارای علائم تنفسی	تعداد موارد مثبت (٪)	سالم	دارای علائم تنفسی	تعداد موارد مثبت (٪)
مازندران	ساری	۵	۰	۰ (۰/۰)	۱۵	۴	۰ (۰/۰)	۷	۰	۰ (۰/۰)	۴	۱	۰ (۰/۰)
	قائم شهر	۵	۰	۰ (۰/۰)	۱۲	۲	۰ (۰/۰)	۶	۰	۰ (۰/۰)	۱۰	۳	۰ (۰/۰)
	بابل	۳	۱	۰ (۰/۰)	۴	۳	۴ (۵۷/۱)	۸	۰	۰ (۰/۰)	۳	۰	۰ (۰/۰)
	جویبار	۵	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۳	۰	۰ (۰/۰)	۳	۰	۰ (۰/۰)
مجموع استانی		۱۸	۱	۰ (۰/۰)	۳۱	۹	۴ (۱۰)	۲۴	۰	۰ (۰/۰)	۲۰	۴	۰ (۰/۰)
گیلان	رشت	۲	۳	۰ (۰/۰)	۷	۰	۰ (۰/۰)	۶	۱	۰ (۰/۰)	۴	۰	۰ (۰/۰)
	سیاهکل	۲	۲	۰ (۰/۰)	۱۰	۰	۰ (۰/۰)	۴	۰	۰ (۰/۰)	۴	۴	۰ (۰/۰)
	فومن	۴	۰	۰ (۰/۰)	۲۶	۰	۰ (۰/۰)	۰	۲	۰ (۰/۰)	۳	۶	۰ (۰/۰)
	صومعه سرا	۳	۰	۰ (۰/۰)	۵	۲	۰ (۰/۰)	۶	۰	۰ (۰/۰)	۳	۰	۰ (۰/۰)
مجموع استانی		۱۱	۵	۰ (۰/۰)	۴۸	۲	۰ (۰/۰)	۱۶	۳	۰ (۰/۰)	۱۴	۱۰	۰ (۰/۰)
خوزستان	اهواز	۴۲	۸	۰ (۰/۰)	۱۴	۳	۰ (۰/۰)	۹	۲	۰ (۰/۰)	۷	۰	۰ (۰/۰)
	ملاثانی	۱۳۷	۱۳	۳ (۲٪)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)
	باغملک	۱۳۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)
مجموع استانی		۳۰۹	۲۱	۳ (۰/۹)	۱۴	۳	۰ (۰/۰)	۹	۲	۰ (۰/۰)	۷	۰	۰ (۰/۰)
آذربایجان شرقی	تبریز	۱۲	۱۹	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)
	شبستر	۸	۱۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)
	مرند	۷	۲۶	۰ (۰/۰)	۷	۰	۰ (۰/۰)	۳	۰	۰ (۰/۰)	۵	۰	۰ (۰/۰)
	جلفا	۴	۱۳	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۰	۰	۰ (۰/۰)	۵	۱	۰ (۰/۰)
مجموع استانی		۳۱	۶۸	۰ (۰/۰)	۷	۰	۰ (۰/۰)	۳	۰	۰ (۰/۰)	۱۰	۱	۰ (۰/۰)
جمع کل		۳۶۹	۹۵	۰ (۰/۶)	۱۰۰	۱۴	۴ (۳/۵)	۵۲	۵	۰ (۰/۰)	۵۱	۱۵	۰ (۰/۰)

برای کشت باکتریایی و آزمون‌های بیوشیمیایی، نمونه‌ها روی محیط آگار خون‌دار گوسفندی (۵٪) حاوی ۴g/ml µ از هر کدام از عوامل ضدمیکروبی آمفوتریسین B و ونکومایسین کشت‌شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C و شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری گردیدند؛ سپس پرگنه‌های مشکوک به *پاستورلا مولتوسیدا* (پرگنه‌های ریز، شفاف، گرد و چسبنده) انتخاب و برای آزمایش‌های بعدی خالص‌سازی شدند. جدایه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

خالص‌سازی شده برای مشاهده شکل و اندازه باکتری رنگ‌آمیزی گرم شده و با آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل کاتالاز، اکسیداز، تولید اندول، تحرک، ایجاد همولیز، احیای نیترات، تولید آنزیم اوره‌آز و رشد روی آگار مک‌کانکی و محیط سه‌قندی آهن‌دار (TSI) (تمامی محیط‌ها ساخت شرکت مرک آلمان) تعیین هویت شدند (۱۴). جدایه‌های مظنون به *پاستورلا مولتوسیدا* برای ادامه مطالعه در محیط نگه‌دارنده در دمای ۷۰°C- ذخیره گردیدند.

برای استخراج DNA جدایه‌های مظنون، از روش جوشاندن استفاده گردید. برای این کار، ابتدا چند پرگنه خالص باکتری از روی محیط آگار خون‌دار برداشته شده و به ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. تعلیق حاصل با دستگاه ترموبلاک (کیاژن، ایران) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰°C جوشانده شد و سپس به مدت ۱ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰، سانتریفیوژ شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی در میکروتیوب‌های استریل برای انجام PCR در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شد (۲۱).

برای تشخیص قطعی *پاستورلا مولتوسیدا*، از پرایمرهای اختصاصی ژن *kmt1* این ارگانیسم (جدول ۲) استفاده گردید. 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 2x (مسترمیکس آمپلیکون آلمان، حاوی PCR buffer، $MgCl_2$، dNTPs و Taq DNA Polymerase)، ۴ میکرولیتر آب DEPC، ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و ۵/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، انجام گردید. برنامه دمایی تکثیر ژن مذکور مطابق با روش Tang و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد (۲۱). پس از طی 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 *پاستورلا مولتوسیدا* به‌عنوان شاهد مثبت و آب DEPC به‌عنوان شاهد منفی در ژل آگارز ۱٪ حاوی رنگ ایمن (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داک (UVitec، انگلستان) باندهای تشکیل شده مشاهده گردید. در صورت مشاهده باند ۴۶۰ جفت بازی، جدایه موردنظر *پاستورلا مولتوسیدا* درنظر گرفته شد (۸ و ۲۱).

برای تعیین‌تیپ کپسولی جدایه‌های تاییدشده، از روش PCR چندگانه تعیین‌تیپ کپسولی و ۵ جفت پرایمر اختصاصی (*capA*، *capB*، *capD*، *capE* و *capF*) استفاده گردید (جدول ۲). شرایط PCR بجز حجم واکنش‌گرهای PCR (حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده، ۱ میکرولیتر آب DEPC، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول) و ۴ میکرولیتر از DNA استخراج شده) و پرایمرهای مورداستفاده، مشابه شرایط PCR تشخیص گونه *پاستورلا مولتوسیدا* بود. 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 گرفته شد (۸ و ۲۱).

برای شناسایی عوامل حدت جدایه‌ها، از روش PCR چندگانه و ۱۲ جفت پرایمر، در سه گروه ۴ تایی، که هر کدام اختصاصی ژن رمزکننده یکی از عوامل حدت ارگانیسم (*ompH*، *oma87*، *sodA*، *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *exbD-tonB*، *nanB*، *nanH*، *ptfA*، *pfhA* و *toxA*) بودند، استفاده گردید (جدول ۲). 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 ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده انجام شد. برای تکثیر ژن‌های هدف، طبق روش Furian و همکاران (۲۰۱۳)

www.SID.ir

Archive of SID

اقدام شد. 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 گرفته شد (۷ و ۲۱).

جدول ۲- ردیف‌های بازی و جایگاه پرایمرهای مورداستفاده در تشخیص مولکولی، تعیین‌تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا*

عملکرد	ژن	توالی پرایمر ('۳-'۵)	اندازه قطعه تولیدشده (جفت بازی)	منبع
All	*kmt1*	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	۴۶۰	(۲۱)
تیپ کپسولی A	*hyaD-hyaC*	GATGCCAAAATCGCAGTCAG TGTTGCCATCATTGTCAGTG	۱۰۴۸	(۲۱)
تیپ کپسولی B	*bcbD*	CATTTATCCAAGCTCCACC GCCCGAGAGTTTCAATCC	۷۵۸	(۲۱)
تیپ کپسولی D	*dcbF*	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	۶۴۷	(۲۱)
تیپ کپسولی E	*ecbJ*	TCCGCAGAAAATTATTGACTC GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	۵۱۲	(۲۱)
تیپ کپسولی F	*fcbD*	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG TTCCGCCGTCAATTACTCTG	۸۵۲	(۲۱)
پورین	*ompH*	CGCGTATGAAGGTTTAGGT TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	۴۳۸	(۲۱)
پورین	*oma87*	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC TGACTTGCGCAGTTGCATAAC	۹۴۸	(۲۱)
سوپراکسید دیسموتاز	*sodA*	TACCAGAATTAGGCTACGC GAAACGGGTTGCTGCCGCT	۳۶۱	(۲۱)
سوپراکسید دیسموتاز	*sodC*	AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA TGGTGCTGGGTGATCATCATG	۲۳۵	(۲۱)
جذب آهن	*hgbA*	TGGCGGATAGTCATCAAG CCAAAGAACCACTACCCA	۴۱۹	(۲۱)
جذب آهن	*hgbB*	ACCGCGTTGGAATTATGATTG CATTGAGTACGGCTTGACAT	۷۸۸	(۲۱)
متابولیسم آهن	*exBD-tonB*	GGTGGTGATATTGATGCGGC GCATCATGCGTGCACGGTT	۱۱۴۴	(۲۱)
سیالیداز	*nanB*	GTCCTATAAAGTGACGCCGA ACAGCAAAGGAAGACTGTCC	۵۵۴	(۲۱)
سیالیداز	*nanH*	GAATATTTGGGCGGCAACA TTCTCGCCCTGTCATCACT	۳۶۰	(۲۱)
فیمبریه تیپ IV	*ptfA*	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC TCATGAATTCTTATGCGCAAAATCCTGCTGG	۴۸۸	(۲۱)
هماگلوتینین	*pfhA*	AGCTGATCAAGTGGTGAAC TGGTACATTGGTGAATGCTG	۲۷۵	(۲۱)
درمونکروتوکسین	*toxA*	CTTAGATGAGCGACAAGGTT GGAATGCCACACCTCTATA	۸۶۵	(۲۱)

برای تعیین قدرت تولید اسید از کربوهیدرات‌ها طی فرایند تخمیر توسط جدایه‌ها، محیط‌های قندی مختلف ازجمله آرابینوز، دولسیتول، سوربیتول، ترهالوز و زایلوز موردارزیابی قرارگرفتند (تمامی محیط‌ها ساخت شرکت مرک آلمان). با در نظر گرفتن الگوی تخمیری هر کدام از جدایه‌ها در مورد قندهای فوق بیوتیپ هر نمونه مشخص گردید (۱۴).

برای سنجش حساسیت ضدمیکروبی جدایه‌ها از روش انتشار دیسک استفاده شده و طبق دستورالعمل مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (۴) اقدام گردید. در این روش ابتدا پرگنه‌های رشدیافته در محیط آگار خون‌دار به لوله‌های حاوی محیط تریپتیک سوی براث (TSB) منتقل گردید. محیط‌ها به مدت ۶-۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد تا غلظت میکروبی معادل

www.SID.ir

Archive of SID

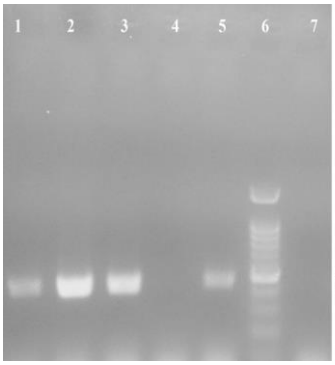
کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند به دست آید (۳×۱۰^{۵} واحد تشکیل‌دهنده پرگنه (cfu) در میلی‌لیتر). با سوآب استریل از تعلیق داخل لوله‌ها برداشته شده و در محیط آگار مولر- هینتون حاوی ۵٪ خون گوسفندی کشت سفره‌ای داده شد؛ سپس دیسک‌های حاوی ۱۹ آنتی‌بیوتیک مختلف (پادتن طب، ایران) روی این محیط‌ها قرارگرفتند. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای $۳۷^{o}C$، برای اندازه‌گیری هاله ممانعت از رشد و تفسیر نتایج به دست آمده نیز بر اساس دستورالعمل مرجع اقدام شده و جدایه‌ها به‌صورت مقاوم (R)، با حساسیت متوسط (I) و حساس (S) توصیف گردیدند.

در پایان نتایج حاصل از آزمایش‌ها با نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS و استفاده از آمار توصیفی و آزمون‌های دقیق فیشر و مربع‌کای آنالیز شده و $P<۰/۰۵$ مبنای اختلاف معنی‌دار درنظر گرفته‌شد.

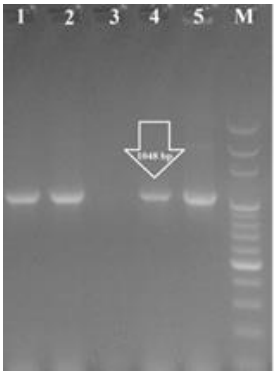
نتایج

در بررسی حاضر، از مجموع ۷۰۱ نمونه جمع‌آوری شده، تعداد ۱۲ جدایه (۱٪/۷) مظنون به *پاستورلا مولتوسیدا* در کشت‌های باکتریایی جداسازی شدند. این جدایه‌ها پرگنه‌های فاقد همولیز بودند، به‌صورت باسیل‌های کوتاه گرم‌منفی مشاهده شده، از نظر آزمایش‌های اکسیداز، کاتالاز و اندول مثبت بوده و از نظر رشد روی محیط مک‌کانکی و حرکت منفی بودند. از جدایه‌های یاد شده، تعداد ۷ جدایه (۰٪/۹۹) در آزمایش مولکولی، باند اختصاصی گونه *پاستورلا مولتوسیدا* را نشان دادند (جدول ۱، شکل ۱).

هر ۴ جدایه استان مازندران مربوط به نمونه‌های اخذشده از اردک‌های سالم بود و میزان آلودگی این پرندگان نسبت به دیگر طیور تحت بررسی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P<۰/۰۵$)، در حالیکه در استان خوزستان هر ۳ جدایه از مرغ‌هایی با علایم تنفسی جداسازی گردید. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش تعیین‌تیپ کپسولی چندگانه، ۵ (۷۱٪/۴) جدایه *پاستورلا مولتوسیدا* باند ۱۰۴۸ جفت بازی را نشان داده و متعلق به تیپ کپسولی A ارگانیسم بوده و ۲ (۲۸٪/۵) جدایه نیز به‌عنوان غیرقابل تیپ‌بندی شناسایی گردید (جدول ۳، شکل ۲).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک‌های ۱، ۳ و ۵: جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* (قطعه ۴۶۰ جفت بازی ژن *kmt1* در باکتری‌های موردمطالعه)، چاهک ۲: شاهد مثبت (*پاستورلا مولتوسیدا* سروتیپ A)، چاهک ۴: نمونه منفی، چاهک ۶: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۷: شاهد منفی



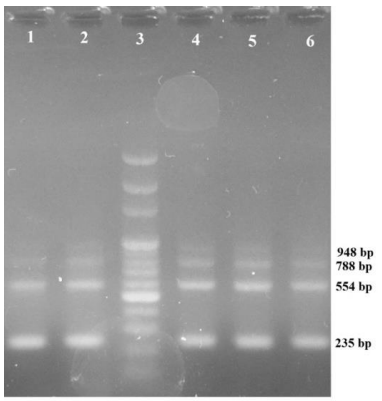
شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR چندگانه تعیین‌تیپ کپسولی بر روی ژل آگارز ۱ درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک ۵: شاهد مثبت (*پاستورلا مولتوسیدا* سروتیپ A)، چاهک‌های ۲-۱ و ۴: جدایه‌های *پاستورلا مولتوسید* متعلق به تیپ کپسولی A (قطعه ۱۰۴۸ جفت بازی ژن *capA* در باکتری‌های مورد مطالعه)، چاهک ۳: جدایه *پاستورلا مولتوسیدا* غیرقابل تیپ‌بندی از نظر سروتیپ کپسولی، چاهک M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از PCR شناسایی عوامل حدت نیز نشان داد که ۷۱/۴٪ جدایه‌ها دارای ژن‌های حدت *sodC*، *hgbA*، *hgbB* ، *nanB*، *nanH* و *ptfA* و ۵۷/۱٪ از آن‌ها دارای ژن‌های حدت *ompH*، *oma87*، *exBD-tonB* و *pfhA* بوده ولی هیچ‌کدام از آن‌ها حاوی ژن‌های *toxA* و *soda* نیستند (جدول ۳، شکل ۳).

نتایج حاصل از آزمایش تعیین بیوتیپ نیز حاکی از تخمیر سوربیتول و زایلوز و عدم تخمیر آرابینوز، دولسیتول و تره‌هالوز توسط جدایه‌ها بوده و همگی آن‌ها (۱۰۰٪) را به‌عنوان *پاستورلا مولتوسیدا* تحت‌گونه *مولتوسیدا* نشان داد. بر اساس نتایج بررسی حاضر، همه جدایه‌ها حداقل نسبت به یک عامل ضدمیکروبی مقاومت داشته و نسبت به ۶ ترکیب آنتی‌بیوتیکی مورد آزمایش حساس بودند. از بین این عوامل ضدمیکروبی، سفالکسین، فلومیکوئین، فلورفنیکل، تری‌متوپریم- سولفامتوکسازول، سولتریم و فسفومایسین دارای بیشترین حساسیت (۱۰۰٪) بوده و انروفلوکسازین و تتراسایکلین در رتبه بعدی (۸۵/۷٪) قرار گرفتند. بیشترین مقاومت (۱۰۰٪) نیز در برابر کلوگزاسیلین مشاهده گردید.



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR چندگانه بر روی ژل آگارز ۱ درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن، برای شناسایی عوامل مرتبط با حدت در جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا*. چاهک ۴: شاهد مثبت (*پاستورلا مولتوسیدا*)، چاهک‌های ۲-۱ و ۶-۵: گروه سوم از عوامل حدت مورد مطالعه شامل ژن‌های: *oma87* (۹۴۸bp)، *hgbB* (۷۸۸bp)، *nanB* (۵۵۴bp) و *sodC* (۲۳۵bp) در ۴ جدایه *پاستورلا مولتوسیدا*، چاهک ۳: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

جدول ۳- خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی ۷ جدایه *پاستورلا مولتوسیدا* جداشده از طیور تحت مطالعه در برخی استان‌های کشور

کد جدایه	استان	منطقه	میزبان/ وضعیت	تیپ کپسولی	ژن‌های حدت موجود
PM CH-1	مازندران	بابل	اردک/ سالم	غیرقابل تیپ‌بندی	*ompH, oma87,sodC,hgbA, hgbB,exBD-tonB,nanB,nanH, ptfA,pfhA*
PM CH-2	مازندران	بابل	اردک/ سالم	A	*ompH, oma87, sodC,hgbA, hgbB,exBD-tonB,nanB,nanH, ptfA,pfhA*
PM CH-3	مازندران	بابل	اردک/ سالم	A	*ompH, oma87, sodC,hgbA, hgbB,exBD-tonB,nanB,nanH, ptfA,pfhA*
PM CH-4	مازندران	بابل	اردک/ سالم	A	*ompH, oma87, sodC,hgbA, hgbB,exBD-tonB,nanB,nanH, ptfA,pfhA*
PM CH-5	خوزستان	ملاثانی	مرغ/ دارای علائم تنفسی	A	
PM CH-6	خوزستان	ملاثانی	مرغ/ دارای علائم تنفسی	غیرقابل تیپ‌بندی	
PM CH-7	خوزستان	ملاثانی	مرغ/ دارای علائم تنفسی	A	*sodC,hgbA,hgbB,nanB, nanH,ptfA*

بحث

در پژوهش حاضر، از ۷۰۱ نمونه سوآب نایی ۷ جدایه *پاستورلا مولتوسیدا* جداسازی شد؛ بنابراین بر اساس یافته‌های این پژوهش *پاستورلا مولتوسیدا* در میان طیور تحت مطالعه، میزان شیوع بالایی نداشت. همچنین نتایج نشان داد که در آزمایش‌های تعیین بیوتیپ، همه جدایه‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

الگوی بیوشیمیایی مشابهی داشته و متعلق به بیوتیپ *مولتوسیدا* بودند. جباری و همکاران نیز در سال ۱۳۸۰ با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی تمامی جدایه‌های طیوری مورد آزمایش این باکتری را متعلق به بیوتیپ *مولتوسیدا* و سروتیپ‌های ۱، ۳، ۴ و ۴، ۳ معرفی کردند (۲). همچنین فریدونی و همکاران در سال ۲۰۰۶ عامل وبای مرغی را در پرندگان آبزی وحشی در شمال ایران (میانکاله) با کمک کشت‌های باکتریایی شناسایی کرده و باکتری جداشده را *پاستورلا مولتوسیدا* تحت‌گونه *مولتوسیدا* تعیین هویت کردند (۶).

در بررسی حاضر، از نمونه‌های اخذ شده از مناطق شمالی کشور تمام جدایه های *پاستورلا مولتوسیدا* از اردک‌های سالم جداسازی شد که حاکی از میزان قابل‌توجه آلودگی این پرندگان نسبت به دیگر طیور تحت بررسی است؛ ولی در جنوب کشور (استان خوزستان) همگی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* از مرغ‌های (مادر بومی) دارای علائم تنفسی جداسازی شدند. کلیدری و همکاران نیز در سال ۱۳۸۳ در استان‌های تهران، خراسان و مازندران، سویه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* را فقط از گله‌های مرغ مادر مبتلا به شکل حاد بیماری جداسازی کردند (۳). جداسازی این باکتری از پرندگان به ظاهر سالم در مطالعه حاضر می‌تواند به این مهم مربوط شود که این جرم ممکن است به‌صورت همزیست در غشاءهای مخاطی دستگاه تنفسی فوقانی پرندگان حضور داشته باشد (۱۴).

در این بررسی برای تعیین هویت ملکولی و تعیین ویژگی‌های ژنوتیپی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدا* از پرایمرهای اختصاصی ژن *kmt1*، پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مسئول بیوسنتز کپسول و عوامل حدت استفاده شد و اکثر جدایه‌ها (۷۱٪/۴) به‌عنوان تیپ کپسولی A و حاوی ژن‌های حدت *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *nanB*، *nanH* و *ptfA* شناسایی گردیدند. جباری و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ با بهره‌گیری از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *kmt1*، *hyaD*، *bcbD* و *dcbF*، ۳۹ جدایه طیوری *پاستورلا مولتوسیدا* را متعلق به تیپ کپسولی A معرفی کردند (۱۱). شایق و همکاران نیز در سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ از پرایمرهای ژن‌های *kmt1*، *bcbD*، *ecbJ*، *fcbD*، *hyaD-hyaC*، *dcbF*، *pfhA*، *toxA*، *hgbB* و *tbpA* برای تعیین‌تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت جدایه‌های گوسفندی و بزی *پاستورلا مولتوسیدا* در استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل استفاده کرده و اغلب جدایه‌ها را مربوط به سروتیپ کپسولی A و دارای ژن‌های حدت *toxA* و *tbpA*، به‌خصوص در حیوانات بیمار، گزارش کردند (۱۷ و ۱۸). همچنین خامسی‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۴ جدایه‌های گاوی *پاستورلا مولتوسیدا* را بررسی ژنوتیپی کرده و اکثر آن‌ها را به‌عنوان تیپ کپسولی A و حاوی ژن‌های حدت *exbD*، *hgbA*، *hgbB*، *ompA*، *ompH*،*oma87* و *sodC*، به‌خصوص در حیوانات بیمار، معرفی کردند (۱۲). نتایج بررسی جاری در توافق با یافته‌های سایر پژوهشگران 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 غالباً با نتایج حاصل از بررسی حاضر هم‌خوانی دارد. Shivachandra و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Furian و همکاران در سال ۲۰۱۴ اکثر جدایه‌های مرغی *پاستورلا مولتوسیدا* را متعلق به تیپ کپسولی A تشخیص دادند (۸ و ۱۹). همچنین Mohamed و همکاران در سال ۲۰۱۲ اکثر سویه‌های پاستورلا *مولتوسیدا* جداشده از مرغ‌های خانگی را به‌عنوان سروتیپ‌های A:۱ و A:۳ معرفی کردند (۱۵). Tang و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ سویه‌های خوکی *پاستورلا مولتوسیدا* را بررسی ژنوتیپی کرده و نشان دادند که ژن‌های *ptfA*، *fimA*، *hsf-2* و *nanH* در اکثر سویه‌ها حضور دارند (۲۱). همچنین Furian و همکاران در سال ۲۰۱۳ ژن‌های حدت ۲۵ جدایه مرغی *پاستورلا مولتوسیدا*

www.SID.ir

Archive of SID

را مورد مطالعه قرارداده و مشاهده کردند که ژن‌های *ompH*، *oma87*، *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *exBD-* *tonB* و *nanB* در ۱۰۰٪ نمونه‌ها، ژن‌های *sodA* و *nanH* در ۹۶٪ نمونه‌ها و ژن *ptfA* در ۹۲٪ نمونه‌ها حضور دارند (۷).

برای کنترل عفونت‌های پاستورلایی استفاده از عوامل ضدمیکروبی روش مفیدی به شمار می‌رود. با این همه، افزایش مقاومت‌های ضدمیکروبی ممکن است تأثیر ترکیبات آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده برای مهار این عفونت‌ها را کاهش دهد. جباری و همکاران در سال ۱۳۸۰ تمام جدایه‌های طیوری *پاستورلا مولتوسیدای* مورد آزمایش را نسبت به کلرامفنیکل، نیتروفورانتوئین و تری‌متوپریم- سولفامتوکسازول حساس و نسبت به باسیتراسین، لینکومایسین و کلوگزاسیلین مقاوم گزارش کردند (۲). در پژوهش دیگری خامسی‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۴ همه ۳۰ جدایه گاوی *پاستورلا مولتوسیدای* تحت مطالعه را به سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول، داکسی‌سیلین، انروفلوکسازین، نیتروفورانتوئین و تتراسایکلین حساس معرفی کردند (۱۲). در پژوهش حاضر، تمام جدایه‌های موردمطالعه نسبت به سفالکسین، فلومایکوئین، فلورفنیکل، تری‌متوپریم- سولفامتوکسازول، سولتریم و فسفومایسین حساس بوده و نسبت به کلوگزاسیلین مقاومت نشان دادند؛ بنابراین بین نتایج این مطالعه و یافته‌های سایر پژوهشگران از نظر حساسیت جدایه‌ها به تری‌متوپریم- سولفامتوکسازول، فلورفنیکل، انروفلوکسازین و تتراسایکلین و مقاومت آن‌ها به کلوگزاسیلین مطابقت وجود دارد. با این همه در مقایسه با مطالعه‌های پیشین، مقاومت سویه‌های جداشده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلینی افزایش یافته است که می‌تواند به‌دلیل استفاده بیش از حد از این عوامل در سیستم‌های پرورشی باشد.

وبای مرغی بیماری مهمی است که پرندگان اهلی و وحشی را در بسیاری از نقاط جهان مبتلا می‌سازد. یافته‌های پژوهش حاضر حاکی از شیوع پایین ارگانیسم عامل این بیماری در میان طیور مورد بررسی در محدوده‌های جغرافیایی تحت مطالعه است. به نظر می‌رسد ضروری است جهت ارزیابی و تجدیدنظرهای احتمالی در برنامه‌های کنترلی بیماری، پژوهش‌هایی نظیر این مطالعه در سایر مناطق کشور نیز صورت گیرد. مطالعات گسترده‌تر روی جدایه‌های *پاستورلا مولتوسیدای* بومی مناطق مختلف ایران، ارزیابی میزان بیماری‌زایی جدایه‌های محلی در انواع جمعیت‌های طیور و تعیین تأثیر اقتصادی عفونت‌های ناشی از پاستورلا، از جمله مواردی است که باید به آن توجه شود.

منابع

۱- بزرگمهری، محمدحسن و افنان، محمد؛ یک مورد واگیری وبای طیور؛ نامه دانشکده دامپزشکی؛ ۱۳۵۱؛ ۲۸(۳): ۲۳-۲۸.

۲- جباری، احمدرضا؛ اسماعیلی، فرهاد؛ وصفی مرندی، مهدی؛ پوربخش، سیدعلی و سهاری، عزیز؛ مطالعه بیوتیپ و سروتیپ *پاستورلا مولتوسیدای* جداشده از طیور ایران؛ پژوهش و سازندگی؛ ۱۳۸۰؛ ۵۲: ۶۴-۶۷.

۳- کلیدری، غلامعلی؛ بزرگمهری، محمدحسن و حسنی‌طباطبایی، عبدالمحمد؛ جداسازی و شناسایی *پاستورلا مولتوسیدا* در گله‌های مرغ مادر؛ مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران؛ ۱۳۸۳؛ ۵۹(۱): ۶۳-۶۵.

4- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approved standard, 3rd Ed.; CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008; Wayne, PA.

www.SID.ir

Archive of SID

pseudotuberculosis; pp: 12-18. In: Dufour-Zavala, L. (Ed.); A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. 5th Ed.; American Association of Avian Pathologists, 2008; Georgia.

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

11- Jabbari, A.R; Esmaelzadeh, M. and Moazeni Jula, G.R; Polymerase chain reaction typing of *Pasteurella multocida* capsules isolated in Iran. Iran. J. Vet. Res., 2006; 7(3): 50-55.

12- Khamesipour, F; Momtaz, H. and Azhdary-Mamoreh, M; Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. Frontiers in Microbiol.; 2014; 5.

13- Kuhnert, P. and Christensen, H; *Pasteurellaceae*: biology, genomics and molecular aspects. Norfolk, Caister Academic Press, 2008; pp: 11-13.

14- Markey, B.K; Leonard, F.C; Archambault, M; Cullinane, A. and Maguire, D; Clinical Veterinary Microbiology. 2nd Ed.; Edinburgh,

5- Dziva, F; Muhairwa, A.P; Bisgaard, M. and Christensen, H; Diagnostic and typing options for investigating disease associated with *Pasteurella multocida*. Vet. Microbiol.; 2008; 128: 1-22.

6- Fereidouni, S; Modir-rousta, H. and Azin, F; The first report of avian cholera in Miankaleh wetland, southeast Caspian Sea. Podoces; 2006; 1(1,2): 71-75.

7- Furian, T.Q; Borges, K.A; Rocha, S.LS; Rodrigues, E.E; Nascimento, V.P do; Salle, C.TP. and Moraes, H.L de S; Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. Pesquisa Veterinaria Brasileira; 2013; 33(2): 177-182.

8- Furian, T.Q; Borges, K.A; Pilatti, R.M; Almeida, C; Nascimento, V.P do; Salle, C.TP. and Moraes, H.L de S; Identification of the capsule type of *Pasteurella Multocida* isolates from cases of fowl cholera by multiplex PCR and comparison with phenotypic methods. Brazil. J. Poult. Sci.; 2014; 16(2): 31-36.

9- Glisson, J.R; Sandhu, T.S. and Hofacre, C.L; Pasteurellosis, avibacteriosis, gallibacteriosis, riemerellosis and

www.SID.ir

Archive of SID

Gautam, R; Singh, V.P; Saxena, M.K. and Srivastava, S.K; Identification of avian strains of *Pasteurella multocida* in India by conventional and PCR assays. Vet. J.; 2006; 172(3): 561-564.

19- Sotoodehnia, A; Vand Yousefi, J. and Aarabi, I; Isolation and typing of *Pasteurella multocida* poultry isolates from Iran. Archiv. Razi Inst.; 1986; 36,37: 85-86.

20- Tang, X; Zhao, Z; Hu, J; Wu, B; Cai, X; He, Q. and Chen, H; Isolation, antimicrobial resistance and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. J. Clinic. Microbiol.; 2009; 47(4): 951-958.

21- Tavasoli, A; Sotoodehnia, A; Aarabi, I. and Vand Yousefi, J; A case report of fowl cholera disease in North of Iran. Archiv. Razi Inst.; 1984; 34,35: 39-41.

22- Townsend, K.M; Boyce, J.D. and Chung, J.Y; Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of amultiplex capsular PCR typing system. J. Clinic. Microbiol.; 2001; 39: 924-929.

The CV Mosby Company, 2013; pp: 307-317.

Mohamed, M.A; Mohamed, M.W; Ahmed, A.I; Ibrahim, A.A. and Ahmed, M.S; *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; 2012; 48(1): 77-86.

15- Nascimento, V.P; Gama, N.M.S.Q. and Canal, C.W; Coriza infecciosa das galinhas, pasteureloses e outras infecções bacterianas relacionadas. 2009; 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.

16- Shayegh, J; Atashpaz, S. and Hejazi, M.S; Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. AJAVA; 2008; 3(4): 206-213.

17- Shayegh, J; Dolgari Sharaf, J; Mikaili, P. and Namvar, H; Pheno- and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. African J. Biotechnol.; 2009; 8: 3707-3710.

18- Shivachandra, S.B; Kumar, A.A;

www.SID.ir

Archive of SID

Vol.11 / No.1
Spring-Summer 2017

Pheno- and genotypic characteristics of *Pasteurella multocida* avian isolates in selected provinces of Iran

Ghadimipour, R.[1,2]; Ghorbanpoor, M.[3*]; Gharibi, D.[4]; Mayahi, M.[5]; jabbary, A. R.[6]

1. PhD Student of Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.
2. Masters Degree of Vaccine, Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj-Iran.
3. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.
4. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.
5. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.
6. Associate Professor, Pasteurella Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj-Iran.

Recieved: 16 February 2016 ***Accepted:*** 22 June 2016

Summary

Poultry pasteurellosis affected domestic and wildbirds all over the world. Present study was designed in order to isolation and survey of pheno- and genotypic characteristics of *Pasteurella multocida* bacterium isolated from chickens, turkeys, geese and ducks in different areas of Mazandaran, Guilan, East-Azarbaijan and Khoozestan provinces. After the collection of 701 tracheal swab samples, 12 (1.7%) strains of *P. multocida* were isolated based on cultural methods; then 7 (0.99%) isolates were confirmed by application of specific primers of *kmt1*. Biotyping tests showed that all isolates are owned by *P. multocida* subspecies *multocida*. Based on the results of capsular typing and detection of virulence factors of the isolates using specific primers, 5 (71.4%) isolates were identified as *P. multocida* serotype A and 2 (28.5%) isolates were untypeable. Also, the tests showed that the *sodC, hgbA, hgbB, nanB, nanH* and *ptfA* genes and *ompH, oma87, exBD-tonB,* and *pfhA* genes were present in 71.4% and 57.1% of the isolates, respectively and *toxA* and *sodA* genes were not identified in any of the studied isolates. According to the results of determination of the drug - resistance patterns of the isolates by disk diffusion method, all isolates (100%) were sensitive to cephalexin, flumequine, florfenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole, sultrim and fosfomycin but were resistant to cloxacillin. The results of this research showed alow prevalence of *P. multocida* among under investigation poultry in the understudy geographic area ($P<0.05$); However, compared with previous studies, isolates resistance increased to some antimicrobial agents such as penicillin antibiotics.

Keywords*: Pasteurella multocida*, Poultry, Pasteurellosis, Virulence factors.

* Corresponding Author E-mail: m.ghorbanpoor@scu.ac.ir

www.SID.ir