

مطالعه مولکولی عوامل حدت جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدای مربوط به طیور و

بررسی کشندگی جدایه‌های حاد در جنین و نیمچه ماکیان

رحیم قدیمی پور^{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 شمال غرب 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 هوایی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی،

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۰

چکیده

مطالعه حاضر با هدف تایید مولکولی، تعیین تیپ کپسولی و بررسی ۱۲ عامل مهم حدت شامل *exBD- hgbB hgbA sodC soda oma87 ompH* پاستورلا مولتوسیدای از مناطق مختلف ایران به همراه یک سویه از ارگانیزم 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 *kmtI* و برای تعیین تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت آن‌ها از روش PCR چندگانه و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مسئول بیوستنز کپسول و ژن‌های کدکننده عوامل حدت ارگانیزم بهره برده شد. 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 (۱۱/۱ درصد) غیرقابل تیپ‌بندی بودند. آزمایش شناسایی عوامل حدت نشان داد که ۱۰۰ درصد جدایه‌ها دارای شش ژن حدت *exBD-tonB oma87 ptfA* و *nanH nanB hgbB hgbA sodC* می‌باشند. ژن‌های *ptfA* و *nanH nanB hgbB hgbA sodC* می‌باشند. ژن‌های *exBD-tonB oma87 ptfA* و *nanH nanB hgbB hgbA sodC* می‌باشند. 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 حادث‌ترین جدایه مشخص گردید. نتایج آزمایش تعیین LD_{50} نشان داد که هیچ کدام از پنج جدایه حاد قادر به تلف نمودن پرندگان تحت آزمایش نبودند در حالی که میزان LD_{50} سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز 5×10^1 واحد تشکیل‌دهنده پرگنه به ازای هر پرند (cfu/case) محاسبه گردید و این سویه به‌عنوان حادث‌ترین جدایه تحت بررسی شناسایی شد. یافته‌های پژوهش جاری نشان داد با اینکه جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدای طیور ایران حاوی اغلب ژن‌های حدت بوده و حادث‌ترین آن‌ها قادر به تلف نمودن جنین ماکیان نیز بودند ولی هیچ کدام از این جدایه‌ها توانایی عفونی‌سازی نیمچه ماکیان را نداشته و حدت سویه‌های جداشده از پرندگان مبتلا به شکل فوق‌حد بیماری در طی همه‌گیری‌ها، به مراتب بالاتر می‌باشد. داده‌های مطالعه حاضر می‌تواند در طراحی واکسن‌های جدید و کارآمدی که قادر به ایجاد محافظت قابل قبول در جمعیت‌های دامی باشند، مفید واقع گردد.

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

* نویسنده مسئول: رحیم قدیمی پور

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

تلفن: ۰۴۱-۴۲۳۹۹۰۸۴

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

مقدمه

پاستورلا مولتوسیدا/عضوی از خانواده پاستورلاسه است که شامل گروه بزرگ و متنوعی از گاما پروتئوباکترهای گرم منفی است (۲۲). پاستورلا مولتوسیدا ارگانیسمی کوچک، غیرمتحرک و بی‌هوازی اختیاری است که ممکن است به صورت باسیل یا کوکوباسیل مشاهده گردد. این باکتری یک گونه متنوع بوده و برای تمایز سویه‌های آن روش‌های مرسوم و مولکولی مختلفی توصیف گردیده است. یکی از روش‌های مرسوم برای شناسایی و دسته‌بندی جدایه‌های این ارگانسیم آزمایش‌های سرولوژیکی می‌باشند که بر این اساس پنج تیپ کپسولی (A, B, D, E و F) و ۱۶ تیپ پیکری (سرو تیپ‌های 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 آنزوتوتیک خوک‌ها و گوساله‌ها و پنومونی در گوسفند به عنوان یک عامل تاثیرگذار مهم مطرح باشد. این ارگانسیم بطور معمول در فلور اوروفارنکس سگ‌ها و گربه‌ها یافت شده و گونه‌های پاستورلا معمولترین ارگانسیم‌های مرتبط با زخم‌های عفونی ناشی از گاز گرفتگی سگ و گربه در انسان می‌باشد (۱۷). علائم شایع پاستورلوز در موارد زخم‌های ناشی از گاز گرفتگی حیوانات شامل ادم، سلولیت، تب و آگزودای خونی یا چرکی در محل زخم می‌باشد. در

موارد شدید بیماری، پاستورلوز می‌تواند سریعاً گسترش یافته و منجر به باکتری می و عوارض دیگری از قبیل استئومیلیت، آندوکاردیت و مننژیت گردد (۶ و ۱۱). وبای مرغی یک بیماری سپتیسمیک است که به طور معمول به صورت واگیری و تلفات بالا در بین ماکیان، بوقلمون، اردک و بسیاری دیگر از پرندگان اهلی و وحشی بروز کرده و به عنوان 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 سرو تیپ‌های A:۱، A:۳ و A:۴، A:۳، در اغلب موارد وبای مرغی و سویه‌های متعلق به تیپ‌های D و F باکتری در موارد نادر از بیماری، به عنوان عامل مسبب ضایعات شناسایی گردیده‌اند (۴۰). پاستورلوز طیور سه شکل فوق‌حاد، حاد و مزمن دارد. فرم فوق‌حاد اغلب به صورت تلفات ناگهانی و فرم حاد با علائمی همچون تب، بی‌اشتهایی، ریزش ترشحات موکوسی از دهان، اسهال، افزایش تعداد تنفس و سیانوزه شدن ریش و تاج همراه است. در شکل مزمن عفونت در اعضای همچون ریش، سینوس‌ها، مفاصل بال و پا محدود شده و موجب تورم در این بافت‌ها می‌شود (۳۱). اگرچه وبای مرغی یکی از بیماری‌های شناخته‌شده و قدیمی پرندگان است ولی به دلیل عدم شناسایی کامل مکانیسم بیماری‌زایی و عوامل حداث ارگانسیم مسبب آن، این بیماری هنوز به صورت یکی از معضلات صنعت طیور باقی مانده است (۹). از مهم‌ترین عوامل حداث 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 فعال-کردن دو پروتئین هتروترایمر $G\alpha_{12/13}$ و $G\alpha_q$ ، به ترتیب در مسیر انتقال سیگنال فسفولیپاز C β و مسیر سیگنالینگ

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 Repetitive extragenic palindromic PCR) (REP-PCR) (۳۴) و انگشت‌نگاری بر مبنای تکثیر تصادفی قطعاتی از DNA ژنومی (Random PCR - amplification polymorphic DNA - 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 ارگانسیم‌ها 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 (*oma87*, *ompH*)، سوپراکسید دیسموتازها (*soda*، *sodC*)، عوامل مسئول جذب و متابولیسم آهن (*hgbA*، *hgbB*، *exBD-tonB*)، سیالیدازها (*nanH*, *nanB*)، 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.

متصل به Rho موجب تحریک افزایش اختلالات اسکلت سلولی، تحریک رشد فیروپلاست‌ها و فعال-شدن MAP-کینازها شده و در ایجاد رینیت آتروفیک در خوک‌ها بیشترین نقش را دارد (۲۴ و ۲۸). لیوپلی-ساکارید (LPS) جدار سلولی از دیگر فاکتورهای حدت ارگانسیم است که دارای فعالیت آندوتوکسینی بوده و موجب تحریک آزادسازی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، الفاء 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 مولتوسید/ می‌توان به پروتئین‌های تأمین‌کننده آهن اشاره کرد که مسئول کسب آهن از میزبان و تقویت رشد باکتری می‌باشند و ژن‌های متعدد کدکننده آن‌ها (*exbB*، *tonB* و *exbD*) شناسایی و توصیف شده‌اند (۳). پروتئین‌های غشاء خارجی *OmpA* و *OmpH* از پروتئین‌های اصلی ایمنوژنیک پاستورلا مولتوسید/ می‌باشند که *OmpH* از طریق بالا بردن تیترا آنتی‌بادی و نیز افزایش توانایی تکثیر لنفوسیت‌های T و *OmpA* نیز با افزایش پاسخ ایمنی سلولی موجب محافظت در مقابل ارگانسیم می‌شوند (۷ و ۲۳). هم‌اگلوتینین‌های رشته‌ای (*PfhB1* و *PfhB2*)، فیبرهای سطحی (*Hsf1* و *Hsf2*) و تحت-واحدهای فیمبریه‌ای (*PtfA*، *FimA*، *Flp1*، *Flp2*) این ارگانسیم 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

مواد و روش‌ها

جدایه‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۸ نمونه پاستورلا مولتوسیدا/ جداسازی شده 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 قرار گرفته بودند، استفاده گردید. این جدایه‌ها بصورت لیوفیلیزه در کلکسیون کشت میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز نگهداری می‌شدند. یک سویه از ارگانیسیم نیز که از موارد همه‌گیری پاستورلوز در مناطق شمالی کشور جداسازی شده بود از کلکسیون موسسه تحقیقات واکنش 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 (کیازن، ایران) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰°C جوشانده شد و سپس به مدت یک دقیقه در 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 مولکولی، تعیین تیپ کپسولی و شناسایی

عوامل حدت جدایه‌ها

برای تشخیص قطعی پاستورلا مولتوسیدا، از پرایمرهای اختصاصی ژن *kmt1* این ارگانیسیم 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 (مستمیکس آمپلیکون آلمان، حاوی PCR buffer، MgCl₂، 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، انجام گردید. شرایط دمایی تکثیر ژن فوق مطابق با برنامه مندرج در جدول ۳ انجام شد. پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن هدف، در نهایت 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).

با توجه به دارا بودن اکثر ژن‌های اصلی حدت توسط اغلب جدایه‌های تحت آزمایش، پنج جدایه واجد اکثر ژن‌های مورد بررسی، با مدنظر قراردادن سایر عوامل، انتخاب شدند. این سویه‌های حاد به همراه سویه‌ای از ارگانیسیم که از موارد همه‌گیری پاستورلوز در مناطق شمالی کشور جداسازی شده بود در آزمایش‌های بعدی تحت مطالعه قرار گرفتند.

بررسی حدت سویه‌های حاد در تخم مرغ‌های

جینین‌دار

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 37°C داده شد. از این محیط نیز یک لوپ کامل برداشته شده و در محیط BHI دیگری (۵ میلی‌لیتر) کشت ۱۲ ساعته در دمای 37°C داده شد. 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 100 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 شمارش شده 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 جینین ماکیان (CEL₅₀)، پس از تهیه مجدد رقت‌های 10^{-1} الی 10^{-12} هر جدایه، 100 میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های 10^{-7} الی 10^{-11} که به ترتیب حاوی مقادیر

برای تعیین تیب کپسولی جدایه‌ها، از روش PCR چندگانه تعیین تیب 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 استخراج شده) و پرایمرهای مورد استفاده، 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 *capB* *capA* *capE* *capD* جدایه مورد نظر به‌عنوان تیب کپسولی A، B، D، E و یا F در نظر گرفته شد (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 ارگانیسیم 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 استخراج شده انجام شد. برای تکثیر ژن‌های هدف، طبق روش فورین و همکاران (۲۰۱۳) اقدام شد (۱۲). شرایط مرحله الکتروفورز محصول PCR و مشاهده باندها مشابه PCR تعیین تیب کپسولی جدایه‌ها بود. در این مرحله، در صورت مشاهده باندهای مربوط به هر کدام از ژن‌های حدت مندرج در جدول ۲، جدایه مورد نظر به‌عنوان جدایه حاوی آن عامل حدت در نظر گرفته شد (۱۲ و ۳۷).

بررسی دوز کشندگی ۵۰ درصد (LD₅₀) سویه-

های حاد در نیمچه ماکیان

در این مرحله، هر شش جدایه حاد طبق روش رامانچاندران فیلابی و همکاران (۲۰۱۲) جهت محاسبه LD₅₀ در ماکیان مورد آزمایش قرار گرفتند (۲۹). برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی این جدایه‌ها، ابتدا از کشت ۲۴ ساعته ارگانیسیم‌ها در محیط آگار خون‌دار برداشته شده و در پنج میلی‌لیتر از محیط آگوش BHI کشت پنج ساعته در دمای ۳۷°C داده شد. این کشت با کدورت شماره چهار مک‌فارلند مطابق شده و رقت‌های ۱۰^{-۱} الی ۱۰^{-۷} آن بوسیله سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های ۱۰^{-۷} تا ۱۰^{-۱} 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 شمارش شده از هر رقت محاسبه شد. تعداد باکتری سوسپانسیون مذکور ۱×۱۰^۸ cfu/ml محاسبه گردید.

۱۰^۷، ۱۰^۶، ۱۰^۵، ۱۰^۴ و ۱۰^۳ (cfu/ml) از هر کدام از جدایه‌ها بودند، به صورت داخل حفره کوریوآلانتویک در پنج تکرار به تخم‌مرغ‌های تجاری جنین‌دار ۱۱ روزه نژادهای لاین 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 تلف شدن، در ساعت‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ بعد از تلقیح بررسی شدند. از مایع کوریوآلانتویک جنین‌های تلف شده در هر گروه (به همراه جنین‌های زنده مانده گروه شاهد) جهت کشت‌های باکتریایی و مشاهده مستقیم نمونه برداری به عمل آمد. در نهایت با ملاحظه تلفات جنینی مربوط به هر کدام از جدایه‌ها و بر اساس روش رید و مانس میزان CELD₅₀ هر جدایه محاسبه شد. (۲۶ و ۳۰).

جدول ۱- خصوصیات ژنوتیپی ۱۸ نمونه پاستورلا موتوسیندا جدا شده از واحدهای طیور در استان‌های مختلف کشور به همراه یک سویه حاد

ارگانسیم جدا سازی شده از موارد همه گیری پاستورلوز در مناطق شمالی کشور

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

شد. تمامی نیمچه‌ها تا یک هفته پس از تزریق تحت نظر بوده و در طول این مدت از خون قلب، کبد و طحال پرندگان تلف شده، و نیز آسان‌کشی شده در پایان روز هفتم، به همراه نیمچه‌های زنده مانده گروه شاهد، جهت کشت‌های باکتریایی و مشاهده مستقیم نمونه برداری به- عمل آمد. در نهایت با در نظر گرفتن تعداد پرندگان آلوده شده و بر اساس روش رید و مانس میزان LD₅₀ جدایه‌ها محاسبه شد (۲۹ و ۳۰).

جهت محاسبه LD₅₀ در ماکیان، پس از تهیه مجدد رقت‌های ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۷} هر جدایه، ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های ۱۰^{-۳} تا ۱۰^{-۷} که به ترتیب حاوی مقادیر ۱۰^۴، ۱۰^۳، ۱۰^۲، ۱۰^۱ و ۱۰ (cfu/ml) 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

جدول ۲- ردیف پرایمرهای مورد استفاده جهت تایید گونه، تعیین تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا

| پرایمر اختصاصی | ژن هدف | توالی پرایمر (۵'۳') | طول محصول (bp) | منبع |
|---------------------|------------------|---|----------------|------|
| پاستورلا مولتوسیدا | <i>kmtI</i> | -ATCCGCTATTTACCCAGTGG- -GCTGIAAACGAACTCGCCAC- | ۴۶۰ | (۳۰) |
| تیپ کپسولی A | <i>hyaD-hyaC</i> | -GATGCCAAAATCGCAGTCAG- -TGTGCCATCATTGTCAGTG- | ۱۰۴۸ | |
| تیپ کپسولی B | <i>bcbD</i> | -CATTTATCCAAGCTCCACC- -GCCCGAGAGTTTCAATCC- | ۷۵۸ | |
| تیپ کپسولی D | <i>dcbF</i> | -TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCCC- -CATCTACCCACTCAACCATATCAG- | ۶۴۷ | |
| تیپ کپسولی E | <i>ecbJ</i> | -TCCGCAGAAAATTATTGACTC- -GCTTGCTGCTTGATTTTGTC- | ۵۱۲ | |
| تیپ کپسولی F | <i>fcB</i> | -AATCGGAGAACGCAGAAATCAG- -TTCCGCGTCAATTACTCTG- | ۸۵۲ | |
| پورین | <i>ompH</i> | -CGCGTATGAAGTTTAGGT- -TTAGATTGTGCGTAGTCAAC- | ۴۳۸ | |
| پورین | <i>oma87</i> | -ATGAAAAAAGCTTTAATTGCGAGC- -TGACTTGCGCAGTTGCATAAC- | ۹۴۸ | |
| سوپراکسید دیسمنوتاز | <i>sodA</i> | -TACCAGAATTAGGCTACGC- -GAAACGGGTTGCTGCCGCT- | ۳۶۱ | |
| سوپراکسید دیسمنوتاز | <i>sodC</i> | -AGTTAGTAGCGGGTTGGCA- -TGGTGTGGGTGATCATCATG- | ۲۳۵ | |
| جذب آهن | <i>hgbA</i> | -TGGCGGATAGTCATCAAG- -CAAAGAACCACATACCA- | ۴۱۹ | |
| جذب آهن | <i>hgbB</i> | -ACCGCGTTGGAATTATGATTG- -CATTGAGTACGCTTGACAT- | ۷۸۸ | |
| متابولیم آهن | <i>exBD-tonB</i> | -GGTGGTGATATTGATGCGGC- -GCATCATGCGTGCACGGTT- | ۱۱۴۴ | |
| سیالیداز | <i>nanB</i> | -GTCCTATAAAGTGACGCCGA- -ACAGCAAAGGAAGACTGTCC- | ۵۵۴ | |
| سیالیداز | <i>nanH</i> | -GAATATTTGGCGGCAACA- -TTCTCGCCCTGTCATCACT- | ۳۶۰ | |
| فیمبره تیپ IV | <i>pfIA</i> | -TGTGGAATTCAGCATTTAGTGTGTC- -TCATGAATTCATTATGCGCAAAATCCTGCTGG- | ۴۸۸ | |
| هماگلوتینین | <i>pfhA</i> | -AGCTGATCAAGTGGTGAAC- -TGGTACATTGGTGAATGCTG- | ۲۷۵ | |
| درمونکروتوکسین | <i>toxA</i> | -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

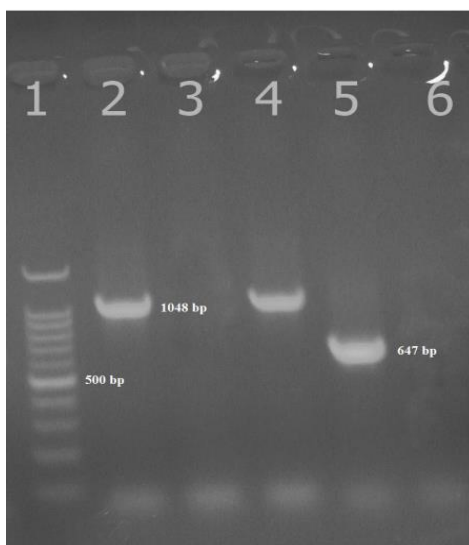
در بررسی حاضر، تمام ۱۸ نمونه پاستورلا مولتوسیدای مورد مطالعه به همراه سویه جدا شده از همه‌گیری پاستورلوز، باند ۴۶۰ جفت بازی مربوط به ژن *kmtI* را نشان داده و تایید مولکولی شدند. بر اساس نتایج

های مورد مطالعه حاوی ژن *toxA* نبودند. از ژن‌های کدکننده عوامل چسبندگی، ژن *ptfA* (با شیوع ۱۰۰ درصد) بسیار شایع‌تر از *pfhA* (۲۷/۷ درصد) بود ($P < 0/05$)؛ همچنین از ژن‌های رمزکننده‌ی سوپراکسید دیسموتاز ژن *sodC* (۱۰۰ درصد) شایع‌تر از *soda* (۶۶/۶ درصد) بود ($P < 0/05$).

اختلاف موجود میان اغلب جدایه‌ها از وجود یا عدم-وجود سه ژن *soda ompH* 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 مورد آزمایش 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* و *ompH* 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).

آزمایش PCR چندگانه تعیین‌تیپ کپسولی نیز از ۱۸ جدایه 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 بانندی مشاهده نشد. آنالیز آماری نشان داد که تیپ کپسولی A در بین سویه‌های جداسازی شده به طور معنی‌داری شایع‌تر از سایر تیپ‌ها می‌باشد ($P < 0/01$) (جدول ۱، شکل ۱).

آزمایش شناسایی عوامل حدت نشان داد که ۱۰۰ درصد جدایه‌های مورد مطالعه دارای شش ژن حدت *sodC*، *hgbA*، *hgbB*، *nanB*، *nanH* و *ptfA* می‌باشند. بررسی‌های آماری نیز مشخص نمود که فراوانی ژن‌های فوق در بین جدایه‌های پاستورلا مولتوسیدا به‌طور قابل-توجهی بیشتر از سایر ژن‌ها می‌باشد ($P < 0/05$). ژن‌های ترتیب در ۹۴/۴، ۹۴/۴، ۸۳/۳، ۶۶/۶ و ۲۷/۷ درصد از جدایه‌ها حضور داشتند درحالی‌که هیچ‌کدام از جدایه-



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR چندگانه تعیین‌تیپ کپسولی بر روی ژل آگارز یک درصد، رنگ آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲: شاهد مثبت (پاستورلا مولتوسیدا/ سرو تیپ A)، چاهک ۳: جدایه پاستورلا مولتوسیدا/ غیر قابل تیپ‌بندی از نظر سرو تیپ کپسولی، چاهک ۴: جدایه پاستورلا مولتوسیدا متعلق به تیپ کپسولی A (قطعه ۱۰۴۸ جفت بازی ژن *capA* در باکتری‌های مورد مطالعه)، چاهک ۵: شاهد مثبت (پاستورلا مولتوسیدا/ سرو تیپ D)، چاهک ۶: شاهد منفی (آب مقطر).

جدول ۳- برنامه دمایی PCR برای تایید گونه، تعیین تیپ کپسولی و شناسایی عوامل حدت جدایه‌های پاستورلا موتوسیدا (۳۷)

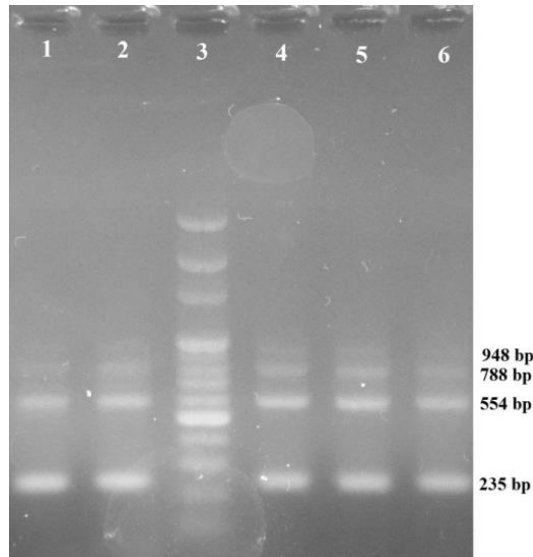
| ژن | سیکل‌ها | دما (°C) | زمان (دقیقه) | تعداد سیکل‌ها |
|---|----------|----------|--------------|---------------|
| <i>kmtI</i> (All pass) | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۱ | ۳۰ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۳۰ |
| | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۱ | ۳۰ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۳۰ |
| cap A (<i>hyaD-hyaC</i>) | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۱ | ۳۰ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۳۰ |
| | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۱ | ۳۰ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۳۰ |
| گروه اول عوامل مرتبط با حدت (<i>pfhA ptfA hgbA sodA</i>) | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۰/۵ | ۲۵ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۲۵ |
| | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۰/۵ | ۲۵ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۲۵ |
| گروه دوم عوامل مرتبط با حدت (<i>toxA nanH exbD-tonB ompH</i>) | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۰/۵ | ۲۵ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۲۵ |
| | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۰/۵ | ۲۵ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۲۵ |
| گروه سوم عوامل مرتبط با حدت (<i>nanB hgbB sodC oma87</i>) | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۰/۵ | ۲۵ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۲۵ |
| | سیکل اول | ۹۵ | ۵ | ۱ |
| | سیکل دوم | ۵۵ | ۰/۵ | ۲۵ |
| | سیکل سوم | ۷۲ | ۱ | ۲۵ |

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 به دست-آمده مرتب شده‌اند که در مرتب‌سازی جدایه‌ها و مشخص شدن حادترین آن‌ها (سویه جدا شده از موارد همه‌گیری پاستورلوز)، علاوه بر میزان تلفات، تقدم در زمان تلف کردن در ساعت‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ بعد از تلقیح نیز مورد ملاحظه قرار گرفته است. بررسی نمونه‌های حاصل از مایع کوریوآلانتوئیک جنین‌های تلف شده در هر گروه، منجر به جداسازی

با توجه به دارا بودن 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 تحت بررسی با سویه جداسازی شده از همه-گیری‌های پاستورلوز مناطق شمالی کشور مورد ملاحظه قرار گرفته 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).

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 ۴: شاهد مثبت (پاستورلا مولتوسیدا/ سرو تیپ A)، چاهک‌های ۱-۲ و ۵-۶: گروه سوم از عوامل حدت مورد مطالعه شامل ژن‌های: *oma87* (۹۴۸bp)، *hgbB* (۷۸۸bp)، *nanB* (۵۵۴bp) و *sodC* (۲۳۵bp) در چهار جدایه - پاستورلا مولتوسیدا/.

میزان LD₅₀ جدایه‌های حاد در ماکیان

جهت محاسبه LD₅₀، رقت‌های مختلف جدایه‌های حاد به نیمچه‌های تخم‌گذار تلقیح گردید، ولی هیچ کدام از رقت‌های ۵ نمونه پاستورلا مولتوسیدا/ مورد مطالعه (ردیف‌های ۲-۶ جدول ۴) تا یک هفته پس از تلقیح قادر به عفونی‌سازی و تلف‌نمودن پرندگان تحت-آزمایش نبودند. در کشت‌های باکتریایی صورت گرفته 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 مانس و بر مبنای آلودگی نمونه-های خون، کبد و طحال اخذشده، میزان LD₅₀ این جدایه در ماکیان 5×10^1 واحد تشکیل‌دهنده پرگنه به ازای هر پرنده (cfu/case) محاسبه گردید و این جدایه به عنوان حادث‌ترین جدایه تحت بررسی شناسایی شد (جدول ۵) (۳۰).

جدول ۴ - میزان باکتری لازم برای کشتن نیمی از جنین ماکیان (CELD₅₀) در جدایه‌های حاد

| ردیف | کد جدایه | CELD ₅₀ /1mL |
|------|----------|-------------------------|
| 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 ^{-۱۰/۸۳} |
| ۶ | PM CH-16 | ۱۰ ^{-۱۰/۲۲} |

جدول ۵ - کشندگی مقادیر مختلف سویه جداشده از موارد همه‌گیری پاستورلوز در نیمچه‌های تخم‌گذار (محاسبه دوز کشندگی ۵۰ درصد

(LD₅₀) این سویه).

| درصد پرندگان تلف- شده | نسبت پرندگان تلف- شده | تجمعی زنده- ها | تجمعی تلفات | پرندگان زنده- مانده | پرندگان تلف‌شده در ۴۸ ساعت | تعداد پرندگان تلقیح- شده | تعداد باکتری رقت (cfu/ml) |
|-----------------------|-----------------------|----------------|-------------|---------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| ۱۰۰ | ۱۶/۱۶ | ۰ | ۱۶ | ۰ | ۵ | ۵ | ۱۰ ^{-۲} |
| ۱۰۰ | ۱۱/۱۱ | ۰ | ۱۱ | ۰ | ۵ | ۵ | ۱۰ ^{-۲} |
| ۸۵/۷۱ | ۶/۷ | ۱ | ۶ | ۱ | ۴ | ۵ | ۱۰ ^{-۳} |
| ۳۳/۳۳ | ۲/۶ | ۴ | ۲ | ۳ | ۲ | ۵ | ۱۰ ^{-۶} |
| ۰/۰ | ۰/۹ | ۹ | ۰ | ۵ | ۰ | ۵ | ۱۰ ^{-۷} |

$$\text{cfu/case } 5 \times 10^1 = \text{cfu} \rightarrow \text{LD}_{50} (1 \times 10^6 \times 10^{-6} \times 4/4) = 1 \times 4/4 = 4 \times 4 = 4 \times 4 = 16$$

بحث

همکاران (۲۰۱۴) و تهمتن و همکاران (۲۰۱۴) بر روی جدایه‌های گوسفندی، بز 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 انجام یافته در کشور مطابقت- داشته 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 غالباً با نتایج حاصل از بررسی حاضر همخوانی دارد. شیواجاندر و همکاران (۲۰۰۶) سویه‌های مرغی پاستورلا مولتوسیدا/ را با استفاده از روش‌های مرسوم و نیز تکنیک‌های متعدد مولکولی موردشناسایی قراردادده و اغلب جدایه‌ها را متعلق به تیپ کپسولی A تشخیص دادند (۳۳). محامد و همکاران (۲۰۱۲) نیز پاستورلا مولتوسیدا/ی شایع در مرغ‌های خانگی را با استفاده از پنج جفت پرایمر اختصاصی، تعیین تیپ کپسولی کرده و اغلب جدایه‌ها را به‌عنوان سروتیپ‌های A:۱ و A:۳ اعلام نمودند (۲۶). همچنین در مطالعه گولر و همکاران

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 *nanH nanB jhgbB jhgbA sodC* و *ptfA* تشخیص داده شدند. همچنین ژن‌های *oma87*، *exBD*، *tonB ompH* و *sodA* به ترتیب در ۹۴/۴، ۹۴/۴، ۸۳/۳ و ۶۶/۶ درصد از جدایه‌ها حضور داشتند در حالی که 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 عزیزی و همکاران (۲۰۰۷)، شایق و همکاران (۲۰۰۸)، دانش‌لاری و همکاران (۱۳۸۹)، خامسی‌پور و

CELD₅₀ 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 تلف کردن جنین‌ها، حدت هر کدام از آنها مشخص شده و سویه جدا شده از موارد همه‌گیری پاستورلوز (PM 3927) به‌عنوان حادترین جدایه شناسایی گردید.

همچنین بر طبق یافته‌های بررسی جاری، جهت محاسبه LD₅₀ جدایه‌های حاد در ماکیان، رقت‌های مختلف آن‌ها بصورت داخل عضلانی به نیمچه‌های تخم‌گذار تزریق گردید ولی هیچ‌کدام از رقت‌های جدایه‌های مورد مطالعه، به استثناء سویه جدا شده از موارد همه‌گیری پاستورلوز که رقت‌های مختلف آن تا ساعت ۴۸ پس از تلقیح منجر به تلف شدن اکثر نیمچه‌ها شده و میزان LD₅₀ آن در ماکیان ۵۰ cfu/case محاسبه شد، قادر به عفونی‌سازی پرندگان تحت آزمایش نبودند. بر اساس نتایج این آزمایش‌ها نیز جدایه PM3927 به-عنوان حادترین جدایه شناسایی شد.

با این‌که در آزمایش‌های بررسی عوامل مرتبط با حدت، اغلب جدایه‌ها حاوی ژن‌های مورد بررسی بودند ولی ردیابی هر یک از فاکتورهای حدت دلیل بر بیان آن ژن و استفاده ارگانسیم از محصول آن نمی‌باشد. بدین معنی که ممکن است 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 تلف نمودن آنها نباشد. در این مطالعه نیز با وجود اینکه اکثر ژن‌های حدت در اغلب جدایه‌ها حضور داشتند و در آزمایش بررسی CELD₅₀ پنج جدایه حاد برای جنین ماکیان، این جدایه‌ها قادر به تلف نمودن جنین‌ها بودند ولی در مراحل بعدی و آزمایش‌های مربوط به

(۲۰۱۳) اکثر سویه‌های پاستورلا مولتوسیدا/ جدا شده از میزبان‌های مختلف با استفاده از روش چندگانه تعیین تیپ کپسولی مربوط به سرو تیپ کپسولی A معرفی شدند (۱۴).

فوریان و همکاران (۲۰۱۳) ژن‌های حدت ۲۵ جدایه مرغی پاستورلا مولتوسیدا/ را با روش PCR چندگانه بررسی نموده و گزارش کردند که ژن‌های ompH, nanB و exBD-tonB, jhgbB, jhgbA, sodC, oma87 در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها، ژن‌های nanH و soda 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 hsf2, fimA, ptfA و nanH در اکثر سویه‌ها حضور دارند (۳۷).

مروری بر نتایج حاصل از آزمایش‌های تعیین تیپ کپسولی در سایر کشورها، که تیپ کپسولی A را به-عنوان تیپ غالب جدا شده از موارد پاستورلوز حیوانات نشان می‌دهد، و نیز نتایج اخذ شده از آزمایش‌های بررسی مارکرهای حدت جدایه‌ها که حاکی از حضور اغلب عوامل حدت در جدایه‌های تحت بررسی است، نشان‌دهنده مطابقت نسبی نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های سایر پژوهشگران است.

در پژوهش جاری با توجه به دارا بودن اغلب فاکتورهای حدت توسط اکثر جدایه‌های تحت بررسی، سایر عوامل تاثیرگذار از قبیل وضعیت سلامتی میزبان، منطقه جداسازی و مطابقت مارکرهای حدت ۱۸ جدایه مورد مطالعه با عوامل حدت موجود در سویه حاد جداسازی شده از موارد همه‌گیری پاستورلوز مناطق شمالی کشور مورد توجه قرار گرفته و شش جدایه (جدول ۴) به‌عنوان جدایه‌های حاد انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج مندرج در جدول ۴ میزان

حبل‌الورید و همکاران (۲۰۰۹) نیز طی مطالعه‌ای حدت سروتیپ A:۱ 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 مولتوسیدا حاصل از مرغ‌های خانگی در مناطق مختلف مصر را با تلقیح $10^6 \times 2/4$ 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 $10^5 \times 1$ cfu از ارگانیسم‌ها به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ۱۱ روزه مورد ارزیابی قرارداد و مشاهده نمودند که قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها برای جنین ماکیان متغیر بوده 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 مورد آزمایش قادر به تلف نمودن اکثر جنین‌های ماکیان در مدت‌زمان ۷۲-۲۴ ساعت بعد از تلقیح بوده و حدت قابل توجهی 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 این‌همه در بررسی حدت این سویه‌ها در جنین و نیمچه ماکیان به‌عنوان مدل حیوان آزمایشگاهی و میزبان اصلی، با اینکه جدایه‌های حاد قادر به تلف نمودن جنین ماکیان بودند ولی هیچ‌کدام از سویه‌ها توانایی عفونی‌سازی نیمچه ماکیان را نداشتند. به نظر می‌رسد جدایه‌

محاسبه LD₅₀ آن‌ها در ماکیان، هیچ‌کدام از جدایه‌ها توانایی عفونی‌سازی ماکیان تحت آزمایش را نداشته و فقط سویه جداسازی شده از موارد همه‌گیری پاستورلوز با وجود تشابه از نظر دارا بودن عوامل حدت با جدایه‌های 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:۱ جدایه طیوری باکتری را در جوجه مرغ‌های هشت هفته‌ای بررسی کرده و گزارش نمودند که ۷cfu/case از ارگانیسم قادر است تمام میزبان‌های تحت آزمایش را در کمتر از ۲۴ ساعت تلف نماید (۳۵). هم‌چنان‌که مشاهده می‌شود سروتیپ A:۱ ارگانیسم که در پژوهش این محققین مورد بررسی قرار گرفته مشابه سویه PM3927 مطالعه جاری حدت بالایی داشته و هر دو جدایه با cfu پایینی قادر به تلف نمودن پرندگان تلقیح‌شده در ۲۴ ساعت اول بعد از تزریق بوده‌اند و از این نظر هم‌خوانی قابل‌توجهی بین نتایج دو مطالعه وجود دارد. همچنین جباری و موذنی جول (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 2×10^6 cfu/case از ارگانیسم گزارش نمودند در حالیکه تلقیح 2×10^6 cfu از سروتیپ ۴ باکتری قادر به تلف نمودن هیچ‌کدام از پرندگان تحت بررسی نبوده است (۱۸). حدت سروتیپ ۱ ارگانیسم مورد استفاده 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.

- 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.

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 جدا شده 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 بتواند 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.,



- 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 hemorrhagic septicemia 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). Coriza infecciosa das galinhas, pasteureloses e outras infecções bacterianas relacionadas. 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. *Kafkas Üniversitesi 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). Experimental 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.

- 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 a multiplex 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.



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

Ghadimipour, R.^{*1}; Ghorbanpoor, M.²; Gharibi, D.³; Mayahi, M.⁴; Jabbari, 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 (CELD₅₀) and lethal dose 50 (LD₅₀) 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 CELD₅₀, 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 LD₅₀ test showed that none of the five acute isolates were able to waste the studied pullets while the LD₅₀ 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, CELD₅₀, LD₅₀

*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