مطالعه الگوی پروتئینی *پاستورلا مولتوسیدا* جداشده از طیور و مقایسه حدت پروتئین تیپ های شناسایی شده در موش

دکتر احمدرضا جباری[1]* دکتر مهدی وصفی مرندی[2] دکتر عزیز سهاری[3]

دریافت مقاله: ۳۰ آذر ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۳۰ اردیبهشت ماه ۱۳۸۲

هدف: تعیین ویژگی الگوی پروتئینی و طبقه بندی نمونه های *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شده از طیور استان مازندران، بررسی ایمنیت متقاطع و نیز مقایسه حدت پروتئین تیپهای شناسایی شده در مدل موشی.

نمونه ها: تعداد ۱۸ نمونه *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شده از طیور استان مازندران که در طی ده سال (۱۳۸۸-۱۳۶۸) در مؤسسه رازی جدا شده اند.

روش: مقدار ۳۰-۲۵ میکروگرم پروتئین خام تهیه شده از جدایه ها در سیستم ناپیوسته در ژل سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید الکتروفورز گردید. غلظت آکریل آمید در ژل جدا کننده ۱۲/۵ درصد و در ژل متراکم کننده ۴/۵ درصد بود. حداقل دوز کشنده هر تیپ پروتئینی با تزریق رقتهای مختلف باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* به گروههای سه تایی موش از طریق داخل صفاقی تعیین گردید. چهار گروه ده تایی موش ایمن شده با سویه واکسینال به همراه چهار گروه ده تایی به عنوان کنترل برای بررسی ایمنی متقاطع با سایر تیپهای پروتئینی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج: بیش از ۳۰ باند پلی پپتیدی در فاصله بین ۲۴ تا ۱۷۴ کیلو دالتون مشاهده شد. شکل کلی الگوهای پروتئینی جدایه ها بسیار به هم شباهت داشت. اختلاف عمده بین آنها در محل قرار گرفتن یکی از باندهای اصلی موسوم به پروتئین H بود. این باند در جدایه های مختلف در سه موقعیت ۳۸، ۳۶/۵ و ۳۴ کیلو دالتون قرار داشت که بر همین اساس جدایه ها را در سه پروتئین تیپ (III,II,I) جای داد. ایمن سازی گروه های موش با سویه واکسینال (پروتئین تیپ I) توانست آنها را در مقابل چالش با پروتئین تیپ همنوع (همولوگ) حفاظت نماید.

نتیجه گیری: براساس یافته های این مطالعه تهیه یک واکسن پلی والان متشکل از هر سه پروتئین تیپ جهت پیشگیری از وبای مرغان در این منطقه پیشنهاد می گردد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۳، ۲۰۱-۱۹۷.

واژه های کلیدی: *پاستورلا مولتوسیدا*، الگوی پروتئینی، حدت، ایمنیت متقاطع.

پاستورلا مولتوسیدا عامل مولد پاستورلوز در حیوانات اهلی و پرندگان می باشد. پاستورلوز طیور که به وبای مرغان نیز موسوم است یکی از عوامل مهم تلفات و خسارات اقتصادی در بسیاری از نقاط جهان است. در ایران بیماری عمدتاً بومی مناطق شمالی کشور است اما به طور اسپورادیک در دیگر مناطق کشور نیز بروز می نماید (۲،۲۲) پاستورلوز طیور سه شکل فوق حاد، حاد و مزمن دارد. فرم فوق حاد اغلب به صورت تلفات ناگهانی و فرم حاد با علائمی همچون تب، بی اشتهایی، ترشحات موکوسی از دهان، اسهال، افزایش تعداد تنفس و سیانوزه شدن ریش و تاج همراه می باشد. در شکل مزمن عفونت در اعضایی همچون ریش، سینوسها، مفاصل بال و پا محدود شده و باعث تورم در این بافتها می شود (۸،۲۱).

تاکنون برای شناسایی و طبقه بندی *پاستورلا مولتوسیدا* روشهای متعددی به کار رفته است که هر کدام دارای مزایا و معایب خاص می باشند. روش بیوتایپینگ اگرچه از نظر تکنیک و انجام پذیری دارای مزیت است اما نتوانسته به خوبی بین جدایه های *پاستورلا مولتوسیدا* از همه گیریهای متفاوت یا مناطق جغرافیایی مختلف تمایزی را نشان دهد (۱). سروتایپینگ روش مرسومی است که معمولاً برای شناسایی و تعیین هویت جدایه های *پاستورلا مولتوسیدا* توصیه می شود. اما به دلیل آنکه تولید آنتی بادیهای اختصاصی و استاندارد عملاً با مشکلاتی مواجه است. آزمایشگاههای خاص، این آنتی بادیها را در حجم محدود تولید می کند و لذا برای تایپینگ از این نظر لازم است تا نمونه ها به این آزمایشگاهها (که در سطح جهان تعداد آنها معدود است) ارسال شوند.

استفاده از روشهای مولکولی برای شناسایی تعیین هویت و دسته بندی باکتری ها در سالهای اخیر بسیار رایج شده و علاوه بر آن که ابزار و وسایل آنها تقریباً در همه جا قابل تهیه و دسترسی است معمولاً اطلاعات دقیقتری را نسبت به روشهای معمول در اختیار می گذارد (۱۴).

۱) مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج، کرج - ایران.
۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه پوترا، سردانگ - مالزی.
*) نویسنده مسؤول ahmadrj@yahoo.com

Protein fingerprinting of avian *Pasteurella multocida* and virulence of its prototype in mouse

Jabbari, A. R.,[1] Vasfi Marandi, M.,[2] Saharee, A. A.[3]

[1]*Razi Serum and Vaccine Research Institute Hesarak Karaj, Karaj-Iran.* [2]*Department of Clinical Sciences Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.* [3]*Department of Clinical Sciences Faculty of Veterinary Medicine University of Putra, Serdang- Malaysia.*

Objective: Determination and classification of *Pasteurella multocida* isolates from poultry in Mazandaran province, study of cross-protection and virulence among different protein types in mouse.

Samples: Eighteen *Pasteurella multocida* isolates obtained from poultry during 10 years (1988-1998) from Mazandaran province.

Procedure: Twenty five to thirty µg of bacterial protein was electrophoresed in a discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis system. The concentration of acrylamide in resolving and stacking gels were 12% and 4.5% respectively. Minimum lethal dose of each protein type was determined by IP injection of several bacterial dilutions to groups (n= 3) of Balb/c mice. To study the cross- protection, four groups of 10 mice were immunized with vaccinal strain. The immunized mice together with control groups were challenged with homologous and heterologous protein type isolates.

Results: The electrophoretic pattern of the isolates contained over 30 polypeptide bands ranging from 24 to 174 kda. The overall protein pattern of the isolates were similar. The main difference was in the position of a major protein band, which is known as protein H. The position of this band was presented in 38, 36.5 and 34 kda. Based on this difference the isolates were classified as protein types I, II and III respectively. Immunization of mice with the vaccinal strain (protein type I) protected the animals against homologous challenge.

Conclusion: According to results of this study, preparation of a polyvalent vaccine containing different protein types are suggested to prevent fowl cholera in Mazandaran province. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 3: 197-201, 2003.***

Key words: *Pasteurella multocida*, Protein fingerprinting, Virulence, Cross-immunity.

Corresponding author email:ahmadrj@yahoo.com

جدول۱- سویه های *پاستورلا مولتوسیدا* جداشده از موارد پاستورلوز طیور در استان مازندران در طی سالهای ۱۳۶۸ تا ۱۳۷۸ در مؤسسه رازی.

×	کد مطالعه	میزبان	منطقه	پروتئین تیپ
۱	PMI020	مرغ	ساری	III
۲	PMI022	مرغ	آمل	III
۳	PMI026	مرغ	قائم شهر	II
۴	PMI028	مرغ	بابل	II
۵	PMI032	مرغ	ساری	II
۶	PMI033	اردک	قائم شهر	I
۷	PMI035	اردک	آمل	II
۸	PMI036	غاز	ساری	I
۹	PMI038	غاز	بابل	I
۱۰	PMI039	اردک	قائم شهر	I
۱۱	PMI040	مرغ	ساری	I
۱۲	PMI041	مرغ	آمل	I
۱۳	PMI042	مرغ	قائم شهر	I
۱۴	PMI043	مرغ	آمل	I
۱۵	PMI044	اردک	آمل	I
۱۶	PMI045	اردک	آمل	II
۱۷	PMI046	مرغ	ساری	II
۱۸	PMI047	مرغ	آمل	III

جدول ۲- پروتئین تیپ پاستورلا مولتوسیدا های جدا شده از موارد وبای مرغان در استان مازندران.

تیپ پروتئینی	تعداد	درصد	جدایه ها
I	۹	۵۰	PMI030-PMI036-PMI038-PMI039-PMI040-PMI041-PMI042-PMI043-PMI044
II	۶	۳۳	PMI026-PMI028-PMI032-PMI035-PMI045-PMI046
III	۳	۱۷	PMI020-PMI022-PMI047

الکتروفورز عصاره پروتئین باکتری ها در ژل اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulphate-poly acrylamide gel electrophoresis "SDS-PAGE") برای شناسایی و دسته بندی باکتریها به کرات مورد استفاده قرار گرفته است. سدیم دودسیل سولفات (SDS) که در ترکیب ژل آکریل آمید به کار می رود، پیوندهای کوالانسی بین اتمهای گوگرد (S-S) پروتئینها را باز کرده و در نتیجه مولکولهای درشت پروتئینی را به رشته های پلی پپتیدی آن تجزیه می نماید. رشته های پلی پپتیدی در حضور SDS به طور یکنواخت بار منفی گرفته و لذا میزان حرکت آنها در ژل آکریل آمید به سمت قطب مثبت بر اساس وزن مولکولی خواهد بود (۶،۲۳). استفاده از این روش برای مطالعه و طبقه بندی باکتری هایی چون *پاستورلا همولیتیکا* (۵)، *پاستورلا مولتوسیدا* (۱۱،۲۰)، *بورلیا بورگدوفری* (۴)، *بروسلا ابورتوس* (۹،۲۵) *ونیسریا گونوره* (۱۲) توسط محققان مختلف گزارش شده است.

هدف از مطالعه حاضر تعیین ویژگی الگوی پروتئینی و طبقه بندی نمونه های *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شده از طیور استان مازندران و نیز مقایسه حدت پروتئین تیپهای شناسایی شده در مدل موشی بوده است.

مواد و روش کار

جدایه ها: تعداد ۱۸ نمونه *پاستورلا مولتوسیدا* که از موارد همه گیریهای پاستورلوز در واحدهای طیور استان مازندران در مؤسسه رازی طی ده سال گذشته (۱۳۷۸-۱۳۶۸) جدا شده بود در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است (جدول ۱).

تهیه پروتئین خام باکتری: کشت ۲۴ ساعته باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* در ۳۷ درجه سانتیگراد با PBS استریل (pH= ۷/۴) شسته شده و غلظت آن در حدود سه میلیارد جرم در میلی لیتر تنظیم گردید. بدین ترتیب که کدورت سوسپانسیون باکتری طوری تنظیم شد که در طول موج ۵۴۰ نانو متر جذب نوری معادل ۰/۶۶۰ داشته باشد. پس از سانتریفوژ (۱۳۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه) سوسپانسیون باکتریایی، به رسوب حاصل بافر لیز کننده معادل ۰/۱ مول تریس اسید کلریدریک، (pH= ۸/۶) و ۱۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد سدیم دودسیل سولفات افزوده شد. همچنین ۲۰ میکرولیتر از محلول فنیل متیل سولفونیل فلورید (Phenyl methyl sulfonyl fuoride "PMSF") با غلظت ۰/۰۴ مول به ازای هر میلی لیتر بافر لیز کننده اضافه گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. پس از سانتریفوژ (۱۳۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه) فاز رویی که حاوی پروتئین خام باکتری بود جدا شده و پس از تعیین میزان پروتئین به روش Lowry تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۵).

الکترو فورز ژل پلی اکریل آمید: در این مطالعه از روش لاملی (۱۳) که الکتروفورز ناپیوسته در ژل پلی آکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات می باشد استفاده گردید. غلظت آکریل آمید در ژل جدا کننده (Separating) ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم کننده (Stacking gel) ۴/۵ درصد بود. از تترامتیلن دی آمین (Tetrametylendiamine "TEMED") برای پلیمریزه کردن ژل آکریل آمید استفاده گردید.

مقدار ۳۰-۲۵ میکروگرم نمونه پروتئین از هر جدایه در حجم ۲۴ میکرولیتر در گوده های ژل پلی آکریل آمید ریخته شد. نمونه ها با ولتاژ ۵۰ ولت (در ژل متراکم کننده) و ۱۲۰ ولت (در ژل جداکننده) الکتروفورز گردیدند.

برای رنگ آمیزی، ژل آکریل آمید در محلول رنگ کوماسی بلو ۰/۳ در صد به مدت دو ساعت قرار داده شد و پس از آن با محلول استیک اسید ۳۰ درصد رنگبری شد.

تعیین وزن مولکولی باند های پروتئینی با محاسبه فاکتور (RF-value"RF") که نسبت به مسافت طی شده هر باند به مسافت طی شده رنگ می باشد تعیین گردید. ابتدا منحنی استاندارد با استفاده از مارکر پروتئینی که حاوی ۷ باند پروتئینی با وزن مولکولی مشخص بود رسم شده و سپس با مقایسه RF هر یک از باند ها با منحنی استاندارد وزن مولکولی آن مشخص گردید.

تعیین حداقل دوز کشنده: حداقل دوز کشنده (MLD) کمترین تعداد باکتری است که قادر می باشد صد در صد حیوانات (موش) چالش شده را بکشد. رقتهای مختلف باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* به گروه های سه تایی موش از طریق داخل محوطه شکمی تزریق گردید. موشهای تزریق شده تا سه روز تحت نظر بوده و میزان تلفات هر گروه یادداشت می شد. کمترین رقت باکتری که باعث کشتن تمامی موشهای گروه می شد به عنوان MLD آن تیپ تعیین شد.

بررسی ایمنی متقاطع بین تیپهای پروتئینی: برای این آزمایش ۸۰ سر موش نر Balb/c با وزن حدود ۲۵ گرم مورد استفاده قرار گرفت، چهل سر موش با دو بار به فاصله دو هفته تزریق (۰/۲ میلی لیتر داخل عضلانی) واکسن تهیه شده از سویه واکسینال PMI030 (پروتئین تیپ I) ایمن شدند. به چهل موش باقیمانده حجم مساوی سالین نرمال استریل تزریق گردید (گروه کنترل چالش). یک هفته پس از آخرین تزریق هر دسته به چهار گروه هر یک شامل ۱۰ سر موش تقسیم شدند. هر گروه واکسینه به همراه یک گروه غیرواکسینه (کنترل) با یکی از سویه های PMI030 ، PMI034 (پروتئین تیپ I) PMI032 (پروتئین تیپ II) و PMI047 (پروتئین تیپ III) چالش گردیدند. تعداد باکتری مورد استفاده برای چالش مساوی حداقل دوز کشنده هر سویه بود که طی آزمایش قبل مشخص گردید. موشهای تزریق شده تا

جدول ۳- نتایج تلفات موشها پس از تزریق[1] رقتهای مختلف سه پروتئین تیپ *پاستورلا مولتوسیدا*.

جدایه	پروتئین تیپ	10^{7}	10^{6}	10^{5}	10^{4}	10^{3}	10^{2}	10^{1}
PMI030	I	۳/۳	۳/۳	۳/۳	۳/۳	۳/۳	۳/۳	۱/۳[2]
PMI032	II	۳/۳	۳/۳	۳/۳	۳/۳	۳/۳	۲/۳	۰/۳
PMI047	III	۳/۳	۳/۳	۳/۳	۳/۳	۱/۳	۰/۳	۰/۳

۱) تزریق از راه داخل صفاقی انجام شده است. ۲)کسر معادل تعداد موش تلف شده (صورت) به تعداد موش چالش شده (مخرج) می باشد.

یک هفته نگهداری شده و تلفات و عوارض ناشی از چالش ثبت گردید. پس از کالبد شکافی موشهای تلف شده یک قطره از خون قلب در کنار شعله بر روی ژلوز خون کشت داده می شد و حضور باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* جستجو می گردید.

نتایج

الگوی الکتروفورزی پروتئین جدایه ها: با بررسی ژلهای پلی آکریل آمید رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو مشخص شد که الگوی هر یک از جدایه ها حاوی بیش از ۳۰ باند پلی پپیدی که در فاصله بین ۲۴ تا ۱۷۴ کیلودالتون قرار دارند می شود. اغلب این باند ها در بخش میانی ژل در فاصله بین ۳۰ تا ۹۴ کیلو دالتون واقع بودند. شکل کلی الگو های پروتئین جدایه ها بسیار به هم شباهت داشت، اما اختلاف عمده بین الگوها در محل یکی از باندهای اصلی (ماژور) موسوم به پروتئین H مشاهده گردید. این باند در جدایه های مختلف در سه موقعیت ۳۸، ۳۶/۵ و ۳۴ کیلو دالتون قرار داشت که بر همین اساس آنها را به ترتیب در سه پروتئین تیپ III,II,I قرار داد. جدول ۲ نتایج حاصل الکتروفورز پروتئین جدایه ها و تصویر ۱ نمونه ای از الگوهای پروتئینی را در ژل SDS-PAGE نشان می دهند.

بر اساس دانسیته باندها پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو، ۸ باند اصلی (ماژور) در الگوی پروتئینی جدایه ها مشاهده گردید که به ترتیب از سبک به سنگین عبارت اند از:۳۸،۳۲،۳۰،۲۷ (۳۸-۳۴)، ۴۵،۴۷،۵۲ و ۹۷ کیلو دالتون.

همان گونه که جدول ۲ نشان می دهد ۹ جدایه (۵۰ درصد) الگوی پروتئینی مشابه سویه واکسینال دارد (پروتئین تیپ I) در حالی که ۹ جدایه دیگر الگویی متفاوت نسبت به سویه واکسینال نشان می دهند. هر سه پروتئین تیپ (I,II,III) در بین جدایه های مناطق ساری و آمل شناسایی شد در حالی که جدایه های مربوط به مناطق قائم شهر و بابل در استان مازندران به دو پروتئین تیپ I و II تعلق داشتند.

حداقل دوز کشنده: نتایج حاصل از این چالش گروههای موش برای تعیین حداقل دوز کشنده در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج حداقل دوز کشنده برای پروتئین تیپ I (سویه واکسینال و جدایه PMI034) معادل CFU ۱۰۰بود در حالی که این شاخص برای پروتئین تیپ II (جدایه PMI032) ۱۰۰۰ و برای پروتئین تیپ III (PMI047) معادل CFU ۱۰۰۰۰ به ازای هر موش به دست آمد.

حفاظت متقاطع: نتایج چالش موشهای واکسینه با سویه PMI030 (پروتئین تیپ I) در مقابل تزریق همولوگ و هترولوگ در جدول ۴ آورده شده است. این نتایج نشان می دهد که واکسیناسیون با پروتئین تیپI حفاظت بالایی در مقابل چالش با جدایه های همولوگ (PMI030 و PMI034) دارد. در حالی که واکسن فوق الذکر توانست فقط تا ۵۰ درصد در مقابل چالش با جدایه های هترولوگ شامل PMI032 (پروتئین تیپ II) و PMI047 (پروتئین تیپ III) در موشهای تزریق شده ایجاد حفاظت نماید.

جدول ۴- نتایج چالش موشهای ایمن شده با واکسن تهیه شده از سویه PMI030 علیه تزریق با پروتئین تیپهای همولوگ و هترولوگ.

جدایه	پروتئین تیپ	دوز چالش[1]	تعداد موشهای زنده پس از چالش			
			در گروه واکسینه		در گروه کنترل	
			تعداد	درصد	تعداد	درصد
PMI030	I	$2/2\times10^{2}$	۸/۱۰	۸۰	۰/۱۰	۰
PMI034	I	$1/9\times10^{2}$	۷/۱۰	۷۰	۰/۱۰	۰
PMI032	II	$1/5\times10^{3}$	۵/۱۰	۵۰	۰/۱۰	۰
PMI047	III	$1/3\times10^{4}$	۵/۱۰	۵۰	۰/۱۰	۰

۱) این مقادیر بیانگر تعداد CFU باکتری است که در حجم ۰/۲ میلی لیتر و از راه صفاقی تزریق گردید.

بحث

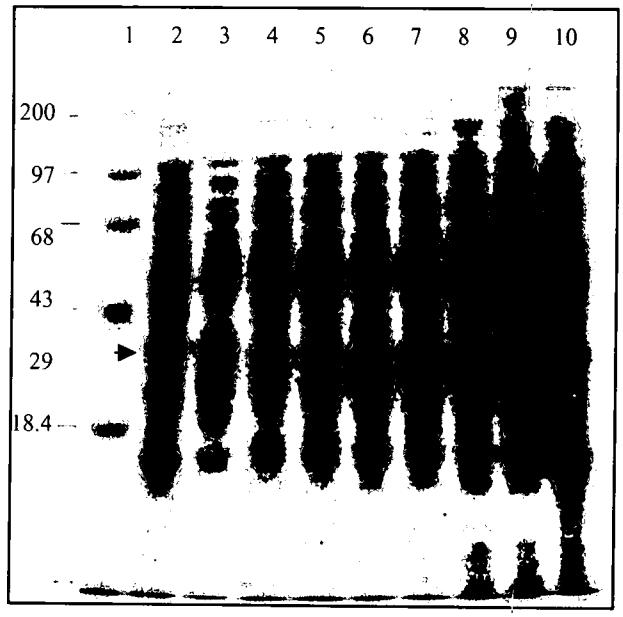
استفاده از آنالیز الگوی پروتئین *پاستورلا مولتوسیدا* در ژل پلی اکریل آمید جهت دسته بندی و شناسایی جدایه های *پاستورلا مولتوسیدا* توسط برخی محققان اعلام گردیده است. Choi و همکاران در سال ۱۹۸۹ توانستند با این روش بین سویه های تحت یک سروتیپ سوماتیک و وصفی مرندی و همکاران در سال ۱۹۹۸ توانستند جدایه های با یک گروه کپسولی را از هم تفریق نمایند. وصفی نمونه های *پاستورلا مولتوسیدا* با گروه کپسولی A را بر اساس وزن مولکولی پروتئین H به سه تیپ یا دسته پروتئین شامل AIII AI, AII, تقسیم نمود (۲۴).

عبد اللهی در سال ۱۹۹۰ با استفاده از روش فوق الذکر جدایه های *پاستورلا مولتوسیدای*گاوی را بر اساس الگوی پروتئینی در ۱۲ گروه قرار داد (۳).

در این مطالعه الگوی الکتروفورزی عصاره پروتئین *پاستورلا مولتوسیدا* جداشده از طیور مورد بررسی قرار گرفت.

بیوتایپینگ این جدایه ها که بر اساس خواص بیوشیمیایی آنها انجام شده نتوانست بین آنها تمایزی نشان دهد زیرا از نظر الگویی ویژگیهای بیوشیمیایی بسیار به هم شبیه بوده و همگی به عنوان *پاستورلا مولتوسیدا* بیوتیپ (تحت گونه) مولتوسیدا شناخته شدند (۱). در این مطالعه الکتروفورز عصاره پروتئینی در ژل پلی آکریل آمید توانست بین جدایه های یک بیوتیپ تفریق ایجاد نماید. اگرچه در یک نگاه کلی تشابه بین الگوی الکتروفورزی جدایه ها قابل توجه است اما یک تفاوت مهم در محل باند پروتئینی که موسوم به پروتئین H می باشد در بین آنها مشاهده گردید. تحقیقات انجام شده بر روی جدایه های *پاستورلا مولتوسیدای*طیور و خوک که توسط محققین دیگر انجام شده نتایج مشابهی را نشان داده است. Ireland و همکاران در سال ۱۹۹۱ یازده جدایه *پاستورلا مولتوسیدای* طیور را بر اساس موقعیت (وزن مولکولی) پروتئین H در سه پروتئین تیپ III,II,I قرار دادند. وزن مولکولی این پروتئین در این سه تیپ به ترتیب ۳۸ ، ۳۶ و ۳۴ کیلو دالتون بود که به نتایج این مطالعه بسیار مشابهت دارد (۱۰). یافته های Lugtenberg و همکاران در سال ۱۹۸۴ نشان داد که بین تیپ پروتئین جدایه های *پاستورلا مولتوسیدای*خوک و پاتوژنز ارتباط وجود دارد. آنها مشاهده کردند که همه جدایه های با پروتئین تیپ I در آزمون ترزیق داخلی جلدی خوکچه هندی عوارضی که نشانگر پاتوژنسیته آنهاست را ایجاد نمودند. آنها همچنین نشان دادند که پروتئین H یکی از پروتئینهای غشای خارجی باکتری می باشد (۱۸). Luo و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که یک آنتی بادی تک بنیانی علیه پروتئین H پاستورلا مولتوسیدا موش و خرگوش را علیه چالش با سویه همولوگ محافظت می نماید (۱۷).

حداقل دوز کشنده (MLD) در سه پروتئین تیپ مختلف به عنوان شاخصی از حدت (ویرولانس) جدایه ها تعیین گردید. نتایج این مطالعه



تصویر ۱- الگوی پروتئین جدایه های *پاستورلا مولتوسیدا* - ستون ۱: مارکر پروتئینی متشکل از پروتئینهایی با وزن مولکولی مشخص ستون ۲: PMI030 ستون ۳: PMI028 و ستون ۴: PMI045 و ستون ۵: PMI046 و ستون ۶: PMI020 ستون ۷: PMI031 ستون ۸: PMI025 ستون۹: PMI032 ستون ۱۰: PMI035. فلش موقعیت پروتئین H را نشان می دهد.

نشان می دهد که بین سه پروتئین تیپ از نظر میزان MLD اختلاف قابل توجهی وجود دارد. به طوری که این مقدار برای پروتئین تیپ I (سویه واکسینال) CFU ۱۰۰ در میلی لیتر است در حالی که این میزان برای پروتئین تیپ III,II به ترتیب یک و دو لوگ بالاتر از این مقدار می باشد. به عبارت دیگر حداقل باکتری مورد نیاز برای کشتن همه موشهای تزریق شده در یک گروه برای پروتئین تیپ I به ترتیب۰/۱ و ۰/۰۱همین مقدار از پروتئین تیپهای III,II می باشد. لذا می توان گفت که ویرولانس یا کشندگی پروتئین تیپ I به ترتیب ۱۰ و ۱۰۰ برابر تیپهای III,II می باشد. نکته قابل ذکر دیگر اختلاف در فاصله زمانی بین تزریق تا زمان مرگ برای حیوانات چالش شده است. این زمان برای پروتئین تیپ I به طور قابل توجهی کوتاهتر از همین زمان برای تیپهای III,II بود (اطلاعات نشان داده نشده است).

تاکنون مطالعاتی در زمینه نقش پروتئین H در پاتوژنز و ایمنی زایی *پاستورلا مولتوسیدا* انجام گردیده است. Botcher و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان داد که پروتئینهای غشای خارجی *پاستورلا مولتوسیدای* جدا شده از گاو و خوک به لایه سلولهای (موکوسی) نای حیوان میزبان (گاو یا خوک) متصل می شود (۷). با این حال رابطه دقیق بین پروتئین تیپ *پاستورلا مولتوسیدای* طیور و پاتوژنز آنها بر بافتهای میزبان به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. واکسن کشته تهیه شده از پروتئین تیپ I *پاستورلا مولتوسیدا* در این مطالعه توانست ایمنیت (حفاظت) قابل توجهی بر علیه چالش با سویه همولوگ ایجاد نماید. اما از تولید ایمنیت قابل قبول علیه سویه هترولوگ ناتوان بود. Luo و همکاران در سال ۱۹۹۷با تولید آنتی بادی علیه پروتئین H در خرگوش و تزریق آن به جوجه توانستند ایمنیت غیرفعال علیه چالش با سویه همولوگ ایجاد نمایند. ولی تلاش آنها برای ایجاد حفاظت علیه سویه های هترولوگ بی نتیجه ماند (۱۹).

از آنجا که الگوی پروتئینی جدایه ها تشابه زیادی با یکدیگر داشت، ایجاد حفاظت ناقص (۵۰ درصد) در موشهای واکسینه علیه سویه هترولوگ می تواند ناشی از حضور آنتی ژن های مشترک باشد که مطالعات بیشتر در این زمینه توصیه می گردد.

واکسنی که در حال حاضر به منظور جلوگیری از پاستورلوز طیور در مؤسسه رازی ساخته می شود از سویه ای با پروتئین تیپ I تهیه می گردد و با توجه به آنکه بر اساس یافته های این مطالعه حداقل دو پروتئین تیپ دیگر نیز در منطقه مازندران فعال است، لذا توصیه می شود یک واکسن سه تایی با ترکیبی از جدایه هایی از هر پروتئین تیپ (I,II,III) تهیه و پس از طی آزمایشات تجربی و صحرایی، جایگزین واکسن فعلی گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری آقایان دکتر آشتیانی، دکتر اسماعیلی، دکتر پوربخش و دکتر ستوده نیا در انجام این مطالعه تقدیر و تشکر می شود.

References

۱. جباری، ا.، اسماعیلی، ف.، وصفی مرندی، م. و پوربخش، س.ع. (۱۳۸۰): مطالعه بیوتیپ و سروتیپ *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شده از طیور ایران، پژوهش و سازندگی، دوره ۵۲، صفحه: ۶۴-۶۷.

۲. کلیدری، غ.ع. (۱۳۷۷): جداسازی و شناسایی *پاستورلا مولتوسیدا* در مزارع مرغ مادر، پایان نامه دکتری تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صفحه: ۷۳-۸۸.

3. Abdullahi, M. Z., Gilmour, N. J. L. and Poxton, I. R. (1990): Outer membrane proteins of bovine strains of *Pasteurella multocida* type A and their doubtful role as protective antigens. J. Med. Microbiol. 32: 55- 61.
4. Adam, T., Gabriele, G., Christiane, R. and Gobel, B. (1991): Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdoferi* isolates from various sources. Infect. Immun. 59: 2579-2585.
5. Bahaman, A.R., Norlida, A.B., Sheikh-Omar, A.R. and Saad, Z. (1994): Protein profiles of *Pasteurella haemolytica* isolates obtained from sheep and goats in Malaysia. Tropical Biomed. 11: 83-86.
6. Bejo, S.K. (1997): Characterization of leptospiral isolates obtained from selected cattle farms in Malaysia. Master's thesis. University Putra Malaysia. PP:36-55.
7. Botcher, L., Lubke, A. and Helmann. (1991): *In vitro* binding of *Pasteurella multocida* cell wall preparations to tracheal mucus of cattle and swine and to tracheal epithelial cell wall preparation of cattle. J. Vet. Med. 38: 721- 730.
8. Choi, K.H., Maheswaran,S.K. and Felice, L.J. (1989): Characterization of outer membrane protein enriched extracts from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. Am. J. Vet. Res. 50: 676-683.
9. Hill, A.R. and Cook, D.R. (1994): Protein profiles of *Brucella suis* and *Brucella abortus* in isoelctric focusing and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Vet. Microbiol. 39: 25-32.
10. Ireland, L., Adler, B. and Milner, A. R. (1991): Proteins and antigens of *Pasteurella multocida* serotype 1 from fowl cholera. Vet. Microbiol. 27: 175-185.

11. Johonson, R.B., Dewkins, H. J. S. and Spencer, T. L. (1991): Electrophoretic profiles of *Pasteurella multocida* isolates from animals with haemorrhagic septicaemia. Am. J. Vet. Res. 52: 1644-1648.

12. Klimpel, K.W. and Clarck, V.L. (1988): Multiple protein differences exist between *Neisseria gonorrhoeae* type 1 and type 4. Infect. Immun. 56: 808-814.

13. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

14. Lema, M. and Brown, A. (1983): Electrophoretic characterization of soluble protein extracts of *Legionella pneumophila* and other members of the family legionellaceae. J. Clinic. Microbiol. 17: 1132-1140.

15. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurment with the filin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

16. Lu, Y-S., Afendis, S.J. and Pakes, S.P. (1988): Identification of immunogenic outermembrane proteins of *Pasteurella multocida* 3:A in rabbits. Infect. Immun. 56: 1532-1537.

17. Lu, Y-S., Aguila, H.N., Lay, W.C. and Pakes, S.P (1991): Antibodies to outer membrane proteins but not to lipopolysaccharide inhibit pulmonary proliferation of *Pasteurella multocida* in mice. Infect. Immun. 59: 4517-4523.

18. Lugtenberg, B., Van Boxtel, R. and De Jong, M. (1984): Atrophic rhinitis in swine : correlation of *Pasteurella multocida* pathogenicity with membrane protein and lipopolysaccharide proteins. Infect. Immun. 46: 48-54.

19. Luo, Y., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Hancock, R. E. W., Bains, M., Cheng, I. H. and Wang, C. (1997): Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (ompH) of *Pasteurella multocida* X-73. J. Bacteriol. 179: 7856-64.

20. Ramandi, and Adler, B. (1991): Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide (LPS) antigens of *Pasteurella multocida* and the role of LPS in immunity. Vet. Microbiol. 26: 335-347.

21. Rhoades, K.R. and Rimler, R. B. (1991): Pasteurellosis. In "B. W. Calneck and H.J. Barnes, Diseases of Poultry". 9th ed. Iowa State University Press, Ames, USA. PP: 145-162.

22. Sotoodehnia, A., Vandyousefi, J. and Aarabi, I. (1986): Isolation and typing of *Pasteurella multocida* poultry isolates from Iran. Arch. Inst. Razi. 36, 37 :85-86.

23. Takacs, B. (1979): Electrophoresis of proteins in polyacrylamide slab gels. In immunological methods." Academic Press. PP: 81-104.

24. Vasfi Marandi, M., and Mittal, K. R. (1998): An outer membrane protein H (OmpH) but not OmpA specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors protect mice against *Pateurella multocida* infection. Infec. Imun. 65: 4502-4508.

25. Verstrate, D.R, and Winter, A.J. (1984): Comparision of sodium dodecyl sulphate Polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. Infect. Immun. 46: 182-187.