التوصيف الجزيئي لجرثومة *Pasteurella multocida* وأنماطها المصلية المعزولة من الأبقار والأغنام في مدينة الديوانية

جنان ناظم صادق
كلية الطب البيطري/ جامعة القادسية

عدنان حمد الحمداني
كلية الطب / جامعة القادسية

قاسم حليم كشاش
كلية الطب البيطري/ جامعة القادسية

الخلاصة

بالنظر الى التشابه الكبير في الصفات المظهرية والكيموحيوية للأجناس التي تنتمي الى عائلة (Pasteurellaceae) فقد هدفت الدراسة الى عزل و تشخيص جرثومة *Pasteurella multocida* المسببة للأصابات التنفسية في الأبقار والأغنام والعديد من الحيوانات الأخرى بأستخدام الطرائق الروتينية (الزرع والاختبارات الكيموحيوية) ثم أستخدام الطرائق الجزيئية كوسيلة تشخيصية توكيدية مع إجراء تنميط مصلي لهذه العزلات بأستخدام بادئات نوعية بأستخدام تقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة ، إذ اشتملت الدراسة على جمع 150 نموذج من الرئات المصابة والمسحات الأنفية ومسحات اللوزتين من الأبقار والأغنام للمدة 1 / 11 / 2010 ولغاية1 / 4/ 2011 من حظائر حيوانية ومجازر مختلفة في مدينة الديوانية . تم زرع العينات على (وسط اكار الدم ووسط الماكونكي ووسط تربتون الصويا) تم شخصت العينات بعد العزل مظهرياً بأستخدام الطرائق الزرعية والكيموحيوية للمستعمرات النامية .أظهرت نتائج تفاعل السلسلة المتبلمرة (PCR) كفحص توكيدي للعزلات بعد أستخلاص ال DNA من العزلات وتضخيمه بأستخدام بادئات نوعية للجرثومة والتي تعرف ب KMT- 1 وجود حزمة واحدة ل DNA المضخم مقدارها 460 زوجاً قاعدياً.ولغرض تنميط عزلات جرثومة ال *Pasteurella multocida* بأستخدام(PCR) ،استخدمت بادئات نوعية بالمحفظة (CAPA,CAPB,CAPD,CAPE,CAPF) إذ اظهرت النتائج الى ان النمط المصلي (B) للجرثومة هو السائد في الأبقار وذو وزن جزيئي 760 زوجاً قاعدياً في حين كان النمط المصلي (A) هو السائد في الأغنام وذو وزن جزيئي 1044 زوجاً قاعدياً وقد خلصت الدراسة الى أن نتائج التشخيص الجزيئي للجرثومة بأستخدام ال (PCR) وأنماطها المصلية كانت ذات حساسية (97%) وخصوصية (82.05) عالية عند مقارنتها مع التشخيص الروتيني لها في الأبقار والأغنام .

المقدمة

تعد جرثومة الباستوريلا ملتوسيدا (*Pasteurella multocida*) واحدة من أهم الجراثيم المتعايشة بصورة طبيعية في القناة التنفسية والهضمية للحيوانات السليمة ولكنها تصبح مسببات مرضية أولية او ثانوية للعديد من الحيوانات كالأبقار والأغنام والخنازير والماعز وتسبب اخماجا للقناة التنفسية العليا والرئتين بشكل خاص كما تسبّب إلتهاب السحايا (Meningitis) ، التهاب المفاصل (Arthritis) والتهاب الضرع (Mastitis) بشكل ثانوي. (1,2) كما أشار (3) الى أن جرثومة الباستوريلا ملتوسيدا يمكنها أن تصيب مواضع مختلفة من الجسم وتسبب ألتهاب نقي العظم(Osteomyelitis) أو التهاب الشغاف (Endocarditis).وتعد عوامل الأجهاد مثل التغيرات المفاجئة في الطقس ، جهد الشغل (Work stress) ، سوء التغذية (Malnutrition) عوامل مهيئة تعمل على خفض مناعة الجسم ومن ثم تخترق تلك المسببات القناة التنفسية العليا وتسبب الخمج (Infection) (4,5). إذ ذكر (6) أن الخسائر في الثروة الحيوانية في الهند نتيجة الأصابة بهذه الجرثومة تقدر بحوالي (3300) رأس من الماشية سنويا نتيجة إصابتها بأخماج حادة .أشار (7) الى أن جرثومة ال *P.multocida* تساهم في إحداث أوبئة مرضية (Epidemic disease) تنفسية شديدة في الأبقار و الأغنام و الماعز والخنازير والأرانب والدواجن.تشكل الأخماج التنفسية مشكلة صحية واقتصادية شائعة في الحيوانات الحقلية وبشكل خاص الحملان والعجول لما تسببه من خسائر اقتصادية تتمثل بنفوق الحيوانات أو الأخماج المزمنة التي ينتج عنها الضعف العام وأنخفاض الإنتاج لقلة كفاءة التحويل الغذائي يضاف أليها الخسائر الناتجة عن تكاليف العلاج ، التغذية وإجراءات السيطرة بالإضافة إلى زيادة فرص تعرض الحيوان الى أمراض أخرى . (8,9) وبالنظر لأهمية هذه الجراثيم في إحداث أخماج للجهاز التنفسي وذات الرئة وبشكل وبائي في مضائف متعددة من الحيوانات الأقتصادية كالأبقار والأغنام والماعز مما يؤدي إلى حدوث خسائر أقتصادية كبيرة وبالنظر لوجود تشابه كبير بالصفات المظهرية والزرعية للأجناس الموجودة ضمن عائلة (Pasteurellaceae) والتي تضم خمسة أجناس وهي مهمة من الناحية المرضية الوبائية للحيوانات وهي: *Actinobacillus* و *Hamophilus* و *Lonepinella* و *Mannheimia* و *pasteurella* مما يتطلب أستخدام الطرائق الجزيئية (Molecular methods) لتوصيفها بشكل دقيق وتحديد النوع (Species) والنمط (type) لجرثومة الباستوريلا أعتماداً على تضخيم بعض البادئات النوعية (specific primers) التي تشفر الى جين(gene) أوعامل ضراوة(Virulence factor) لتسلسل بعض القواعد النايتروجينية للحامض النووي DNA ، ولندرة

الدراسات حول هذا الموضوع وخاصة على المستوى الجزيئي ، أرتأينا القيام بهذه الدراسة وصممت الدراسة الحالية لتوصيف جرثومة الباستوريلا ملتوسيدا والمعزولة من الأبقار والأغنام المصابة بألتهاب الجهاز التنفسي العلوي وذات الرئة في مدينة الديوانية مظهريا بأستخدام الطرائق الزرعية الكيموحيوية وجزيئياً بأستخدام تفاعل السلسلة المتبلمرة (PCR) وتحديد الأنماط المصلية (serotypes) لنوع *Pasteurella multocida*

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Samples collection

جمعت العينات من الأغنام والأبقار للمدة من 1 /2010/11 حتى 1 / 4 /2011 والتي شملت على عينات المسحات الأنفية وبعدد (50عينة) من منطقة اللوزتين (50عينة) من الأبقار والأغنام و (50عينة) رئة من الأبقار والأغنام الهالكة حديثا إذ بلغ العدد ألإجمالي للعينات المأخوذة المستخدمة للدراسة (150) مناصفة بين الأبقار والأغنام وأعتمدت طريقة جمع العينات حسب الجزء المأخوذ منه كالأتي:

1-المسحات الأنفية: تم أخذ المسحات من التجويف الأنفي الداخلي (Nasal cavity) للأغنام والأبقار التي تظهر عليها علامات سريريه تنفسية بواسطة المسحات القطنية المعقمة (Cotton Swabs) وسجّل جنس الحيوان وعمره ، ثم زرعت مباشرة على الأوساط الزرعية لغرض التشخيص .

2-عينات الرئة: جمعت الرئات المصابة من الحيوانات المذبوحة أو الهالكة حديثاً والتي كانت تعاني من إصابات تنفسية حادة وتم ذلك بعد تعيين الآفة المرضية العيانية للرئة والتي يتم تمييزها بملاحظة وجود تكبد أو تغير في اللون ثم تؤخذ الرئة المصابة خلال مدة نصف ساعة بعد هلاك الحيوان أو ذبحه وتوضع في أكياس نظيفة وتؤشر عليه جنس الحيوان وعمره ، بعدها نقلت هذه العينات في حاويات نظيفة ومبردة الى المختبر لأجراء العزل والتشخيص الجرثومي.

3- مسحات اللوزتين: تم أخذ المسحات من منطقة اللوزتين من الأبقار والأغنام التي تظهر عليها علامات سريرية للإصابات التنفسية بواسطة المسحات القطنية المعقمة (Cotton swabs) وسجّل جنس الحيوان وعمره ، ثم زرعت مباشرة على الأوساط الزرعية لغرض العزل الجرثومي والتشخيص .

تشخيص العزلات الجرثومية: Identification of bacterial isolates

أ-الصفات الزرعية والمجهرية

اعتمدت الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على الأوساط الغذائية التفريقية مثل شكل وحجم ولون المستعمرات النامية وحل الدم (haemolysis)على وسط اكار الدم فضلاً عن فحص المسحات المحضرة من المستعمرات المزارع النقية للعينات بعد تصبيغها بصبغة كرام وصبغة ازرق المثيل وفحصت تحت العدسة الزيتية للتحرّي عن شكل الخلايا و ترتيب الخلايا والتصبيغ القطبي.

ب- الأختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

أختبار الأوكسيديز (Oxidase test)
أختبار الكاتاليز (Catalase test)
أختبار ألأنزيم المحلل لليوريا(Urease test)
أختبار السكر الثلاثي والحديد (Triple sugars Iron test)
فحص قابلية الجراثيم على الحركة (Motility test)

تفاعل السلسلة المتبلمر (Polymerase chain reaction)

أجري فحص تفاعل سلسلة البلمره للتحري عن جرثومة ال (*Pasturella multocida*) المعزولة من الأغنام والأبقار باستخدام بادئات ال DNAللجين KMT-1 gene وكذلك أستخدم هذا الفحص للتنميط المصلي serotyping لجرثومة *Pasturella multocida* باستخدام بادئات جينات المحفظة CAP genes وحسب طريقة (10)، يتكون الفحص من عدة خطوات:

1- إستخلاص الحامض النووي الديوكسي رايبوزي البكتيري (Genomic DNA extraction)

تم استخلاص الحمض النووي (DNA) من جراثيم ال *Pasturella multocida* وذلك باستخدام عدة جاهزة وحسب تعليمات الشركة المجهزة .

آ- عدة استخلاص الحمض النووي Geneaid(USA) (Genomic DNA Mini Kit)

ب- عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة(AccuPower ® (South Korea)Bioneer (PCR PreMix

2- تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمره بأستخدام عدة ال AccuPower® PCR PreMix المجهزه من قبل شركة ال Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة كالاتي :

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمره في انابيب (PCR) المجهزه مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمره مع إضافة المكونات الأخرى لمزيج التفاعل وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول (1)

3- برنامج الدورات الحرارية لتضخيم ال DNA

أجري تفاعل سلسلة البلمره بأستخدام المضخّم الحراري لجهاز ال(Thermocycler) PCR) . وتم برمجة الجهاز حسب طريقة (10) لكل بادئ وتم تكرار

الدورات الحرارية لكل بادئ الى 30 دورة، كما فـــي الجدول (2)

الجدول(1) مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة البلمرة (PCR pre mix)

PCR master mix		Volume
DNA template		2.5µL
Primers	Forward primer	1.5µL
	Reversed primer	1.5µL
PCR water		19.5 µL
Total		25µL

الجدول (2) الظروف المثلى لتضخيم DNA بواسطة المضخم الحراري حسب نوع البادئ Primers المستخدم لجرثومة الباستوريلا ملتوسيدا.

Thermocycling	Primers					
	KMT-1	CAPA	CAPB	CAPD	CAPE	CAPF
Initial Denaturation	95 °C 5min	95 °C 5min	95 °C 5min	95 °C 5min	95 °C 5min	95 °C 5min
Denaturation	95 °C 60sec	95 °C 30sec	95 °C 30sec	95 °C 30sec	95 °C 30sec	95 °C 30sec
Annealing	55˚c 1min	55˚c 30sec	55˚c 30sec	55˚c 30 sec	55˚c 30 sec	55˚c 30sec
Extension	72°C 1min	72°C 90min	72°C 90sec	72°C 90sec	72°C 90sec	72°C 90sec
Final extension	72 °C 7min	72 °C 5min	72 °C 5min	72 °C 5min	72 °C 5min	72 °C 5min
Hold	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C

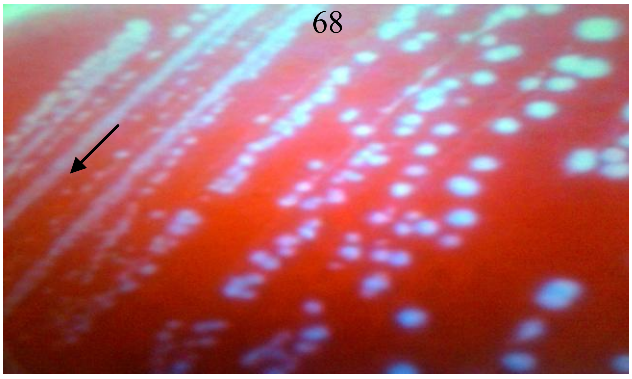
4-الترحيل الكهربائي الهلام Gel electrophoresis

تم أجراء الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز المحضــر بنسبة 1.5% تحت فرق جهد 100فولــت وتيــار 80 امبير وزمن ساعة لغرض الكشف عن حزم (Bands) الـDNA المستخلص وال DNA المضخم والذي يمثل نـــواتج التضـــخيم (Amplicon size) أو نـــواتج الـPCR (PCR Products) وحسب طريقة (11)

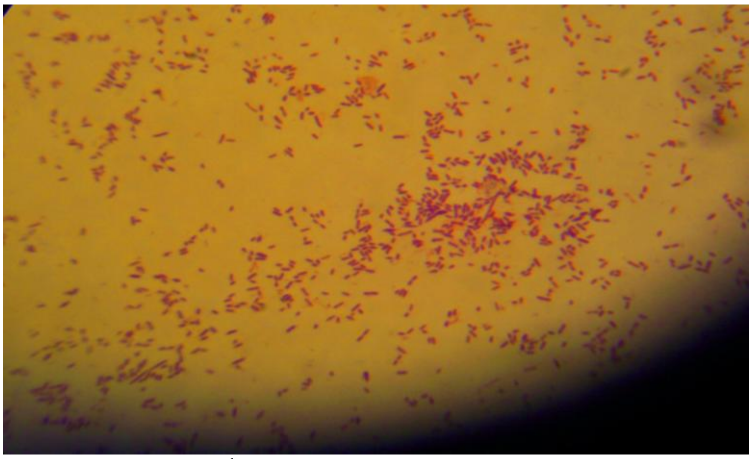
النتائج

1- نتائج العزل

أظهرت نتائج التشـــخيص علـــى الوســـطين الزرعيين اكار الدم المغني واكـــار المـــاكونكي بعـــد تنمتها لمدة 24-48 ســـاعة عنـــد (37) م˚ نمـــو مستعمرات صغيرة رمادية الى بيضاء شبه شفافة لم تظهر أي تحلل على اكار الدم ذات رائحة مميزة الشكل (1).أما على وسط اكار الماكونكي لم تظهر أي نمـــو وبالتالي تعود هذه العزلات الـــى نـــوع الباســـتوريلا ملتوسيدا ، من جهة أخرى فقد اظهرت نتائج الفحص المجهري للمستعمرات التي لم تعطي أي تحلل علـــى اكار الدم بعد تصبيغها بصبغة كرام بكونهـــا جـــراثيم سالبة للصبغة عصوية قصـــــــيرة اوعصـــــــوية بيضـــــــوية (cocco bacilli) وتعـــــــود لجرثومة*Pasteurella multocida*(2)

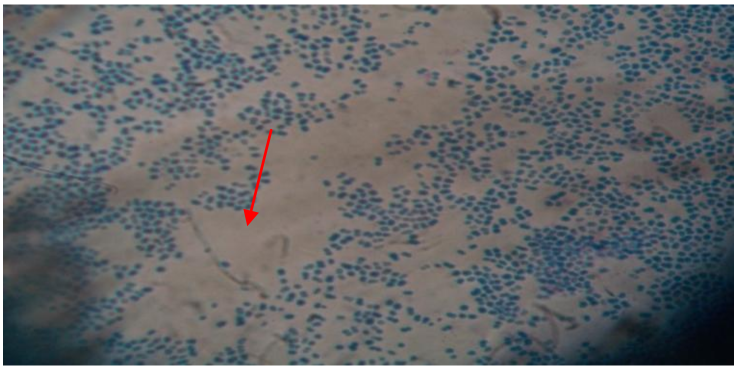


الشكل (1) مستعمرات الباستوريلا النامية وسط اكار الدم غير المحللة للدم



الشكل (2) جرثومة الباستوريلا ملتوسيدا السالبة لصبغة كرام (عصوية أو عصوية بيضوية) (قوة التكبير X10)

اما نتيجة الفحص المجهري للمستعمرات المصبوغة بصبغة المثيل الأزرق فأظهرت صفة التصبيغ القطبي (Polar staing) الشكل (3)



الشكل(3) خاصية التصبيغ القطبي لجرثومة ال *Pasturella multocida*

بينت نتائج الأختبارات الكيموحيوية للمستعمرات التي لم تعطي أي نمو على اكار الماكونكي اظهرت كونها موجبة لفحص الأوكسيديز والكاتليز والأندول في حين اعطت نتائج سالبة لكل من فحص القابلية على الحركة وإنتاج اليوريز ، في حين اعطت العزلات نتائج موجبة لفحص كبريتيد الهيدروجين H_2S .الجدول (3)

الجدول (3) يبين نتائج الفحوصات الكيموحيوية لجرثومة الباستوريلا ملتوسيدا

69

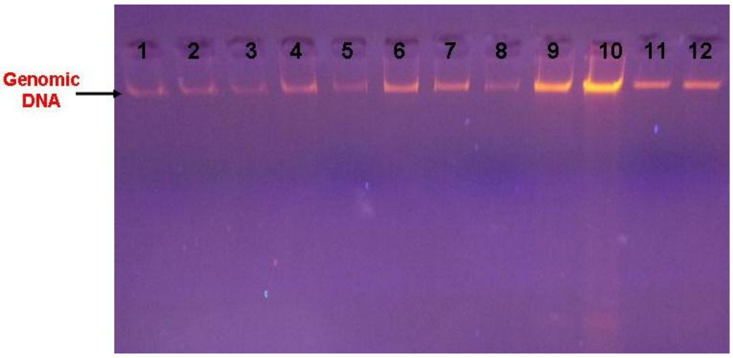
ت	الصفة الكيموحيوية	التفاعل
1	تحلل اكار دم الأغنام	-
2	النمو على أكار الماكونكي	−
3	إنتاج الأندول	+
4	إنتاج اليوريز	-
5	انتاج كبريتيد الهيدروجين	+
6	إنتاج الكاتليز	+
7	إنتاج الأوكسيديز	+

(+) موجبة للفحص (−) سالبة للفحص

2- تفاعل السلسلة المتبلمرة P0lymerase chain reaction

2 - 1 أستخلاص ال DNA

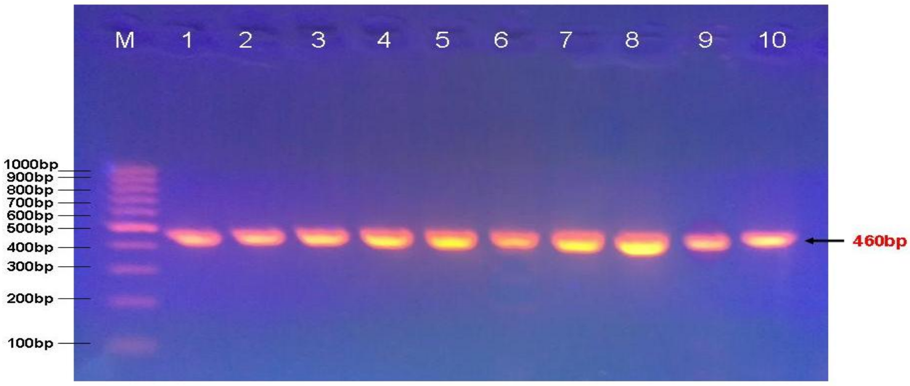
اظهرت نتائج تفاعل السلسلة المتبلمرة (PCR) للعزلات الجرثومية المشخصة مظهريا وزرعيا لل*Pasteurella multocida* والبالغ عددها (82) عزلة من الأبقار والأغنام وبعد استخلاص الDNA بأستخدام العدة المستخدمة لهذا الغرض وترحيله كهربائيا في هلام الأكاروز(1.5 %) والكشف عنه بأستخدام صبغة الأثيديوم برومايد وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للDNA الشكل(4).



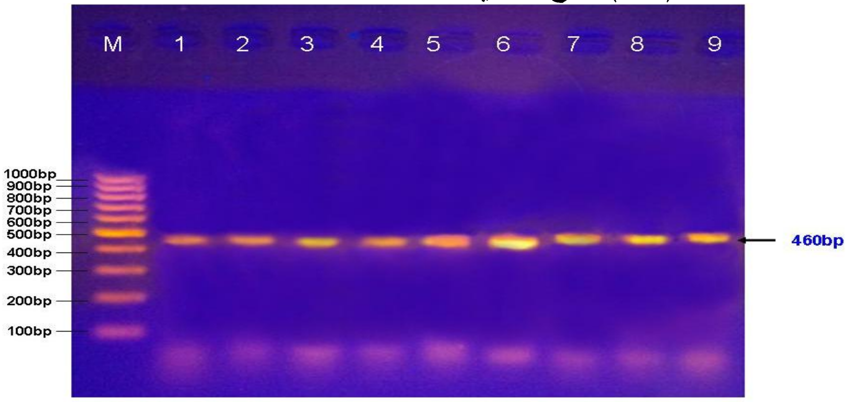
(4) نواتج استخلاص ال DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لجرثومة الباستوريلا المعزولة من الأغنام والأبقار(الأعمدة (1-12) العزلات المختبرة)

2-2 .التشخيص ألتوكيدي لعزلات ال *P .multocida* بأستخدام تقنية تضاعف السلسلة المتبلمرة

أظهرت نتائج تضخيم البادئات النوعية (Specific primer والمتمثلة بالجين(KMT-1) والذي يمثل هوية او بصمة (DNA finger printing) لجرثومة ال *P. multocida* ذو وزن جزيئي 460 زوج قاعدي للعينات للأبقار الشكل (5)والشكل (6) يمثل نواتج تضخيم جين KMT-1 للأغنام بعد ترحيلها على هلام الأكاروز (1.5%) والمصبوغة بصبغة الأثيديوم برومايد وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية ثم حساب حجم الDNA المضخم من خلال مقارنته بالحجم الجزيئي (100-1000 marker) زوج قاعدي.



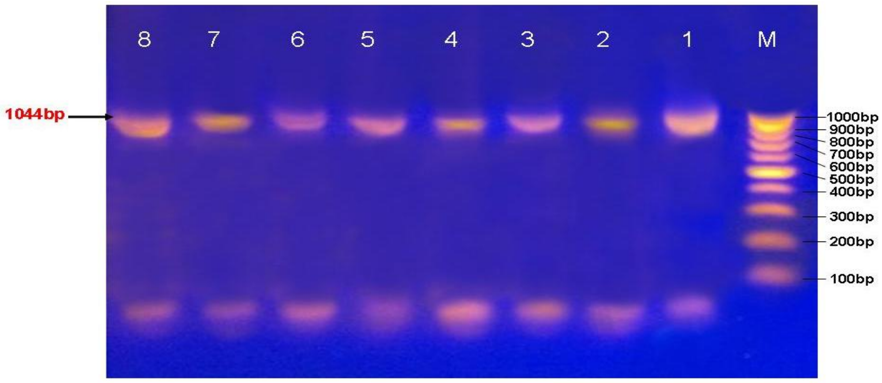
الشكل (5) نواتج تضخيم الجينKMT-1 النوعي لجرثومة ال*P. multocida* المعزولة من الأبقار والمرحلة كهربائيا على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة،الأعمدة M يمثل (DNA ladder) والسلالة المرجعية (1-10) العينات الموجبة لفحص (460) زوج قاعدي



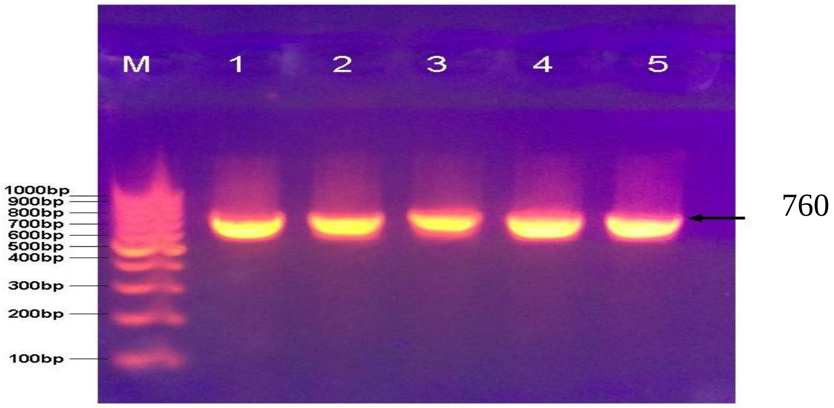
الشكل (6) نواتج تضخيم الجينKMT-1 النوعي لجرثومة ال*P. multocida* المعزولة من الأغنام والمرحلة كهربائيا على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة،الأعمدة M يمثل (DNA ladder) والسلالة المرجعية (1-9) العينات الموجبة لفحص (460) زوج قاعدي.

3-2 تنميط عـزلات ال *P. multocida* بأسـتخدام تقنية تضاعف السلسلة المتبلمر

بينت نتائج تضخيم البادئات النوعية للأنماط المصلية لجرثومة ال *P. multocida* والمتمثلة بالجينات (CAPA,CAPB,CAPD,CAPE, وCAPF) ، والتي تشفر النمط المصلي للمحفظة حيث اعطت العزلات المختبرة من الأغنام نتيجة موجبة للنمط المصلي للمحفظة من نوع (A) من خلال ظهور حزمة واضحة ومفردة وذات وزن جزيئي 1044 زوج قاعدي الشكل (7) ، في حين كانت النتيجة سالبة للأنماط المصلية للمحفظة من نوع (B,D,F,E) بعد ترحيلها على هلام الأكاروز (1.5%) وفحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية بأستخدام صبغة الأثيديوم برومايد أذ استخرج حجم الجين المضخم من خلال مقارنتها ب (DNA marker) القياسي.بينما كانت نتيجة الترحيل الكهربائي للعينات المستخلصة من الأبقار والمضخمة بأستخدام نفس البادئات للأغنام موجبة للنمط المصلي من نوع (B) من خلال ظهور حزمة واضحة ومفردة وذات وزن جزيئي 760 زوج قاعدي الشكل (8) في حين كانت النتيجة السالبة لأنماط المصلية (B,E,F,D).



الشكل (7) نواتج تضخيم الجينCAPA لجرثومة ال *P. multocida* المعزولة من الأغنام والمرحلة كهربائيا على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة،الأعمدة M يمثل (DNA ladder) والسلالة المرجعية (1- 8) العينات الموجبة لفحص (1044) زوج قاعدي.



الشكل(8) نواتج تضخيم الجينCAPB لجرثومة ال *P. multocida* المعزولة من الأبقار والمرحلة كهربائيا على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة،الأعمدة M يمثل (DNA ladder) والسلالة المرجعية (1- 5) العينات الموجبة للفحص (760) زوج قاعدي.

إمتازت تقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة بمستوى عالي من الخصوصية والحساسية حيث كانت نسبة الحساسية والخصوصية في الأغنام (97.1% و78.4%)على التوالي بينما كانت نسبة الحساسية والخصوصية في الأبقار (96.9% و85.7%)على التوالي مقارنة بالفحوصات المظهرية والزرعية.والجدول(4) يوضح نواتج الكشف عن البادئات التي استخدمت في توكيد تشخيص جرثومة الباستوريلا ملتوسيدا الى جانب البادئات المستخدمة في تنميط المصلي للجرثومة في كل من الأبقار والأغنام بأستخدام تقنية تفاعل السلسلة المتبلمر بحسب حجوم البادئات المضخمة المقاسة بوحدات زوج قاعدي.

الجدول (4) قيم نواتج ال (PCR) لتضخيم البادئات النوعية المستخدمة لتشخيص وتنميط عزلات الباستوريلا ملتوسيدا في الأبقار والأغنام .

البادئات	الأبقار	الأغنام	نواتج الPCR (زوج قاعدي)
KMT-1	+	+	460bp
CAPA	-	+	1044bp
CAPB	+	-	760bp
CAPD	-	-	657bp
CAPE	-	-	511bp
CAPF	-	-	851bp

المناقشة

1- العزل والتشخيص

أظهرت نتيجة التشخيص الجرثومي للمستعمرات النامية على وسط اكار الدم نمو مستعمرات رمادية الى بيضاء ، مخاطية نتيجة وجود المحفظة ،عصوية او عصوية بيضوية وهذا مطابق لما أشار اليه(12) في حين لم تظهر العزلات أي نمو على وسط اكار الماكونكي مما يدل على عدم قدرتها على النمو على الأوساط الحاوية على أملاح الصفراء وهذا جاء مطابقا لما ذكره (13,14,15) أظهرت نتائج العزل الى ان الجرثومة هوائية أو هوائية اختيارية لاتنمو عند 50 م°وتعد درجة 37 م° الدرجة المثلى للنمو وهذا جاء متفقا مع ماذكره (16,17) ، وجد أن الزرع المتكرر للعزلات الجرثومية يؤدي الى ميل المستعمرة الى الّانكماش في حجمها أو فقدها خاصية التصبيغ القطبي وتصبح دائرية تقريباً وهذا ماأكده (18) , بعد عمل المسحات من العزلات الجرثومية وتصبيغها بصبغتي كرام وازرق المثيل اظهرت النتائج أن الخلايا عصوية أو عصوية بيضوية الشكل سالبة لصبغة كرام تمتلك خاصية التصبيغ القطبي (لوجود الأجسام الكروماتينية حيث تتركز الصبغة عند الأقطاب) وهذا يتفق مع ماذكره كل من (14,17) ، في حين كانت نتائج الفحوصات الكيموحيوية مطابقة لما ذكره (16,19) فيما يتعلق بكونها موجبة لفحص الكاتليز ،الأوكسيديز والأندول في حين لم تكن مطابقة لما ذكره (20) فيما يخص فحص الأوكسيديز إ ذ أشارا الى أن العزلات لم تعطي جميعها نتيجة موجبة للفحص ، كانت النتيجة سالبة لفحص الحركة من خلال عدم ملاحظة أي أنتشار للنمو على الوسط وهذا جاء مطابقاً لما أشار اليه (19) في حين أظهرت العزلات نتيجة سالبة لفحص إفراز الأنزيم المحلل لليوريا وهذا مطابق لما ذكره (21). كانت الجرثومة منتجة لكبريتيد الهيدروجين وهذا يتفق مع مأأشار اليه (14,22) حيث أكدوا أن جميع العزلات موجبة لهذا الفحص في حين أن النتيجة مغايرة لما أشار اليه كل من (23,24) حيث ذكروا أن العزلات تنتج حامض لكن لاتنتج غاز كبريتيد الهيدروجين .

2- تفاعل السلسلة المتبلمرة Polymerase chain reaction

تعد جرثومة ال *Pasteurella multocida* في الوقت الحاضر من الممرضات البكتيرية الأنتهازية المهمة والتي تسبب أمراض تنفسية حادة في الأغنام والأبقار (25) 0 وخلال السنوات الأخيرة اعتمدت الطرائق الجينية (genotypic method) وخصوصا الأختبارات المعتمدة على الأحماض النووية (DNAو RNA) في الكشف عن الأحياء المجهرية لكونها ذات حساسية ونوعية عالية فضلاً عن أنها تقلل من الوقت اللازم لتصنيف البكتريا(26).أن الصعوبة في التمييز بين الأجناس التي تعود الى عائلة (Pasteurellaceae) يعود الى التشابه الكبير في الصفات المظهرية والمصلية فضلاً عن بعض التشابه في محددات المستضدات .(27)تعد طريقة تفاعل السلسلة المتبلمر واحدة من الطرائق الجزيئية المهمة في تصنيف الجراثيم في الأونة الأخيرة، حيث تتصف هذه التقنية بالخصوصية (Specificity.) والحساسية (Sensitivety) والدقة (accuracy) العالية ، إذ استخدمت هذه التقنية في التشخيص التوكيدي للعزلات بعد تشخيصها مظهرياً و زرعياً والكيموحيوية من خلال استخدام بادئات نوعية بالجرثومة وهي (KMT-1SP6 و KMT1T1) والذي يميزها عن باقي أجناس عائلة ال(Pasteurellaceae) حيث أظهرت النتائج دقة هذه التقنية في تشخيص العزلات وبنسبة 0حساسية (97%) وخصوصية (82.05%) وهذا يدلل على أن البادئات المستخدمة هي تمثل هوية اوبصمة ال DNA لهذه الجرثومة وبالتالي تعد وسيلة تشخيصية توكيدية مهمة وخصوصا في الحالات السريرية وهذا مأأشار اليه أيضاً (28) حيث اُستخدم نفس البادئات ولكن حور في درجة ال(Annealing) (48 م°) بدلاً من الدرجة التي استخدمت في دراستنا وهي (55) م°والتي اعتمدت على تصميم الباحث (29) حيث ظهرت نتيجة التضخيم عند هذه الدرجة ولم تظهر عند اُستخدام الدرجة (48) م° ، بعد ترحيل الDNA المضخم تم التحري عن ناتج التضخيم من خلال فحص الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية ومقارنتها بالسلم القياسي حيث وجد تكون حزمة واحدة مفردة ذات وزن جزيئي (460) زوج قاعدي وهذه النتيجة مطابقة لما ذكره (29,30) بينما العزلات السالبة لم تعطي أي ناتج.اما نتائج التنميط المصلي للمحفظة للعزلات التي تم توكيدها بأستخدام تقنية (PCR) والتحري عنها بأستخدام البادئات النوعية (CAPA , CAPB , CAPD , CAPE , CAPF) حيث وجد ان نتيجة تضخيم الDNA المستخلص من عزلات الأبقار بأستخدام البادئات أعلاه ان النمط المصلي من نوع (B) هو الشائع حيث وجد أن الوزن الجزيئي لناتج التضخيم هو(760) زوجاً قاعدياً وهذه النتيجة مطابقة لما ذكره (10)في حين لم تظهر العزلات أي حزمة عند تنميطها بأستخدام البادئات من نوع (A,D,E,F) مما يدل على ان النمط الشائع في الأبقار هو (B) وهذا يتفق مع مأأشار اليه (26) حيث أكد أن كل من النمط ال (A) يصيب الأبقار لكن الدراسة لم تشير الى أن النمط (A)يصيب الأبقار مثلما أشار اليه (26) وهذا قد يدل على أن

النمط فعلاً لايصيب الأبقار و قد يعزى سبب عدم ظهور النمط (A) الى أن حجم العينات قيد الدراسة غير كافية أو نتيجة جمع العينات من حيوانات مصابة بإنتان دموي و ليست مصابة بحمى النقل حيث ان هذا النمط يسبب حمى النقل في الأبقار.اما عدم ظهور الأنماط الأخرى جاء أيضاً مطابقاً لما أشار اليه (22) حيث أشار الى أن النمط (D) يصيب الخنازير ولايصيب الأبقار والنمط (F) يصيب الديك الرومي بشكل رئيسي ، أما النمط (E) فهو يصيب الأبقار والجاموس في أفريقيا فقط.في حين كان ناتج التنميط المصلي للمحفظة للعزلات التي تم توكيدها بأستخدام تقنية (PCR) بالنسبة للأغنام والتحري عنها بأستخدام نفس البادئات النوعية المستخدمة لغرض التنميط في الأبقار والتحري عن الناتج بعد ترحيلها وفحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية أن الوزن الجزيئي للحزمة المفردة الظاهرة (1044) زوجاً قاعدياً وهذا يعني أن النمط المصلي الموجود في الأغنام هو من نوع (A) والنتيجة مطابقة لما أشار اليه كل من (31,32) في حين لم تظهر أي نتيجة بالنسبة ل DNA المضخم بأستخدام البادئات للنمط(E , D , F, B) وهذه النتيجة مطابقة لما أشار اليه (27) حيث ذكر أن النمط (D) يصيب الخنازير ولايصيب الأغنام والنمط (F) يصيب الديك الرومي اما النمط (E) فهو يصيب الأبقار والجاموس في أفريقيا فقط ، أما النمط (B) لايصيب الأغنام وبالتالي النتيجة مطابقة لما أشارت اليه الدراسة .

المصادر

1. Chen, H.I.; Hulten, K. and Clarridge, J.E., (2002). Taxonomic subgroups of Pmultocida. correlate with clinical presentation. Journal of Clinical Microbiology, 40: 3438–3441
2. Carter, G.R.& Wise, D. (2003) Essentials of veterinary Bacteriology and Mycology. 6th Ed., Iowa State,USA
3. Casolari, C. and Fabio, U. (1988). Isolation of pasteurella multocida from human clinical specimens: first report in Italy. European Journal of epidemiology. 4 (3): 389-390.
4. AL-Sultan,I.I and Attken, I.D. (1985)"The tonsilar carriage of P.haemolytica in lamb"Journal of Comparative pathology, 95:193-201.
5. Dennis, M. J. (1986). The effect of temprature and humidity on some animal diseases a review British veterinary J. , 142. 472 – 484.
6. Bain ,R.V.S. ;(1963). Hemorrhagic septicemia-F.A.O. Agricultural Studies,62:1-77
7. Timony, J. F., J. H. Gillesie, F. W. Scott, and J. E. Barlough. 1988. The Genus Pasteurella. In Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals, 8th Edition, Comstock Publishing Associates,Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 104–116.
8. Ali, Z.; Muhammed, K.; Hussain, I. and Hameed, E.(2000). Antibody response of buffaloes of haemorrhagic septicemia vaccine. Inter.J.of Agric. and Biol., P:183-186.
9. Radostits, O. M.; Gay, C. C.; Blood, D. C.& Hinchcliff, K. W. (2000). Veterinary medicin, 9th ed. London: W. B.saunders company.
10. Townsend, K.M.; Boyce, J.D.; Chung, J.Y.; Frost, A.J. and Alder, B. (2001).Genetic organization of Pasteurella multocida caploci and development of multiplex capsular PCR typing system. Journal clinical microbiology 39 :924-929.
11. Sambrook, J.; Fritsh, E.F., and Maniatis, (1989). Molecular cloning ، laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
12. Chandrasekaren, S.; Yeap, P.C. and Chuink, B. H.(1981). Biochemical and serolo - gical studies of Pasteurella multocida isolated from cattle and buffaloes in Malasiya. Br. Vet.J. 137 :361-367.
13. Karaivanov, L. (1984). Biochemical tests for identifying Pasteurella multocida. Vet. Med Nauki. 21:38-44.

14. Verma, N.D. (1991). Type B:2 P. multocida in an outbreak of primary swine pasteurellosis. Indian J. Anim. Sci. 61:158-160.
15. Rajini, R.; Sesnagiri, R.A.; Dhanalakshmi, K. and Sharma, B.J.R.(1995). Studies on avian pasteurellosis in Andhra Pradesh. Indian Vet.J. 72:115-118.
16. Chawak, M.M.; verma, K.C.; Kataria, J.M. and Kumar, A.A.(2000). Characterization of indigenous isolates of avian pasteurella multocida. Indian . J. comp. Microbiol. Immunol. Infec.Dis. 21:111-114.
17. Anupama, M.; Venkatesha, M.D.; Yasmeen, N. and Gowda ,R.N.S .(2003).Evaluation of polymerase chain reaction (PCR)for Identification of virulent pasteurella multocida and it's comparison with animal inoculation test. Indian J.Anim .Sci,73 : 166-167.
18. Kumar, A.A.; Harbela, P.C.; Rimler, R.B. and Kumar, P.N. (1996). Studies on Pasteurella multocida isolates of animal and avian origin from India. Indian J.Comp.Microbio.Immunol.Infec. Dis. 17:120-124.
19. Rutkowska, J.I. and Borkowska, O.B. (2000). Biochemical properties of Pasteurella multocida strains isolated from poultry. Bulletin-of-the-Veterinary-Institutein Pulawy. 44:161-167.
20. Waltman, W.D. and Horne, A.M. (1993). Characteristics of fowl cholera diagnosed in Georgia, 1989-1991. Avian Dis. 37:616-621.
21. Butt, I.A.; Kausar, T. Raza asad; and Gol, Z.J. (2003). Biochemical, serological and immunological properties of Pasteurella multocida strains isolated from natural outbreaks of haemorrhageic septicaemia Pakistan . J. Vet.Res. 1:1-4.
22. Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Narkey, B.K. and Carter, G.R. (2004). Clinical Veterinary microbiology. Wlfe publishing, mosby-year Book Inc. Europe limited .6th edition. P.250.
23. De Alwis, M.C.L. (1996). Haemorrhagic septicaemia : Clinical and epidemiolog-ical features of the disease. Int.Workshop on diagnosis and control of H.S. Bali.Indonesia, May 28-30
24. Carter, G. R.; and Chengappa, M. M. (1991). Rabid Presumptive identification of type B Pasteurella multocida. From haemorrhagic septicaemi. Vet. Res., 128: 526.
25. Derosa, D.C.; Mechor, G.D.; Staats ,J.J. ;Chengappa, M.M.& Shryock T.R.(2000)" Comparison of Pasteurella species simultaneously isolated from nasal and tracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease". J. Clin. Microbiol., 38(1) :327-332
26. McPherson, M.J.& Moller S.G. (2000), Polymerase Chain Reaction. BI-OS Scientific Publishers Ltd., Oxford, 1-18.
27. Quinn, P. J. B. K. ;Markey, M. E.; Carter, W. J. Donnelly & Leonard, F. C , 2002.Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Black well Science, pp:137- 143.
28. Derosa, A. Y. ;Asfaw,B. ;Lubke,M. W. ;Kyule,G.;TeferaK.-H. & Zessin 2010."Molecular Detection of Pasteurella multocida and Mannheimia haemolytica in Sheep Respiratory Infections in Ethiopia" Intern J Appl Res Vet Med • Vol. 8, No. 2,
29. 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 identify- cation of P.multocida isolates Journal of

Clinical Microbiology, 36:1096-1100.

30. Prabhakar, TG. (2010) "Molecular characterization of Pasteurella multocida isolated from an incidence of sheep pasteurellosis in Kara Madai hill tract of Tamil nadu" Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences 6 (2): 81-87.

31. Chung, Y.J. Zhang , Y. and Adler, B. 1998. The capsule biosynthetic locus of Pasteurella multocida A:1 FEMS microbiology letters 166: 289 -296.

32. Jaglic, Z.; Z.Kucerova, K. ;Nedbalcover, I.; Pavlik, P. Alexa and Barbs M.2005. Characterization and comparison of Pasteurella multocida isolated from different species in the Czech Republic : Capsular PCR typing, ribotyping and dermonecrotoxin production. Veterinary Medicine Czech. 50 :345-354.

Molecular identification of *Pasteurella multocida* and their serotypes isolated from cattle and sheep in Diwanyia city

Abstract

Due to the multi-similarities in phenotypic and biochemical characteristics among genera belong to pasteurellaceae , this study was aimed to isolate and diagnosis of (*Pasteurella multocida*) that cause respiratory infection in cattle and sheep by using routine methods (culture and biochemical) , then used of molecular method as a diagnostic confirmatory, in addition to conduct the serotyping by using polymerase chain reaction , The study included acollection of (150) samples of infected lungs and smears of nasal , tonsils swabs of cattle and sheep for the period 1-11-2010 and up to 1- 4-2011 of farm animals and various massacres in the city of Diwaniya.Samples were cultured on the blood agar and MacConkey agar and Trypticase Soya agar then diagnosed after pure isolation of colonies using phenotypic and biochemical methods.The results of polymerase chain reaction (PCR) as confirmatory test isolates after extraction of DNA from isolates and amplification of specific known as KMT-1the presence of asingle band for the amount of amplified DNA with amolecular weight of 460bp.For the purpose serotyping of isolates germ of *Pasteurella multocida* using PCR, the capsule specific primer (CAPA, CAPB, CAPD, CAPE, CAPF)were used showed that the serotype (B) was the dominat in cattle , with molecular weight (760pb) while type (A) the dominat in sheep with molecular weight (1044pb).The Coclusion , the result of molecular level of identification and serotyping gave ahigh sensitivity (97) % and specificity (82.05) % when compared with its routine diagnostic in cattle and sheep.