چکیده
انواع سروتایپ‌های مختلف و سویه‌های تایپ نشده باکتری *P. haemolytica* که از گاو و گوسفند جدا شده بود جهت تولید سم مورد آزمایش قرار گرفت. باکتری حداکثر سم را پس از رشد در محیط (BHIB)[1] در انتهای فاز لگاریتمی در محیط کشت ترشح کرد. فعالیت سم توسط Chemiluminescence inhibition assay (CL) و با استفاده از نوتروفیل‌های گاو و گوسفند مورد مطالعه قرار گرفت. سم تولید شده توسط سویه‌های مختلف دارای فعالیت متفاوت بود. با استفاده از SDS-PAGE و ایمینوبلات و الیزا مشخص گردید که سویه‌های این باکتری تولید سم پروتئینی می‌نمایند که مقدار سم و نیز اندازه مولکولی آن با یکدیگر متفاوت می‌باشد. بعضی از سویه‌ها به مقدار معمولی تولید سم نموده ولی این سم فعالیت پایین را نشان داد. بیشتر سویه‌ها تولید پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰۵ کیلو دالتون می‌کردند در حالی که چهار سویه تولید پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰۸ کیلو دالتون کرده‌اند. بنابراین سویه‌های جدا شده *P. haemolytica* تولید سم با وزن مولکولی و فعالیت متفاوت نموده‌اند.

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۷، زمستان ۱۳۷۶

مطالعه سم تولید شده توسط *Pasteurella haemolytica*

●مجتبی سعادتی، عضو هیأت علمی دانشگاه امام حسین (ع)-گروه علوم زیستی
●محمدرضا پورشفیع، انستیتو پاستور، بخش میکروب شناسی

مقدمه

یکی از عوامل ایجادکننده ذات‌الریه پاستورلوزی در نشخوارکنندگان *P. haemolytica* می‌باشد (۱، ۲). این باکتری براساس تخمیر کربوهیدراتها به ۲ بیوتایپ A و T تقسیم شده که اخیراً بیوتایپ T را *P. trehalosi* نامگذاری نموده‌اند (۳). تعداد کم این باکتری به عنوان فلور طبیعی ناحیه قدامی دستگاه تنفسی در حیوانات سالم مطرح می‌باشد. عوامل ایجادکننده استرس مانند عوامل محیطی و عفونی و نیز سوء مدیریت می‌توانند در ایجاد بیماری نقش مهمی را ایفاء نمایند. در این شرایط مکانیسم دفاعی ریه تخریب و باکتری قادر است در ریه مستقر شده و ایجاد بیماری نماید.

علائم درمانگاهی متفاوتی از دامهای آلوده به سروتایپ‌های مختلف این باکتری گزارش شده است. برای مثال سروتایپ A1 غالباً از گاو جدا شده و ایجاد ذات‌الریه در حیوان می‌نماید و بیوتایپ T در بره‌های بالغ ایجاد عفونت عمومی بدن می‌نماید. تقریباً تیپ ۱۰٪ سویه‌های جدا شده از گاو و گوسفند تعیین نشده‌اند.

استفاده از باکتریهای زنده و یا کشته شده و یا قسمت‌های مختلف باکتری به عنوان واکسن بر علیه ذات‌الریه پاستورلوزی در حیوان ایجاد ایمنی دائمی نمی‌کنند. ولی دامهایی که به طور طبیعی مبتلا به بیماری شده‌اند مقاومت خوبی در مقابل بیماری مجدد از خود نشان داده‌اند. *P. haemolytica* تولید پادگن‌های متفاوتی می‌نماید که شامل لوکوتوکسین[2]، کپسول، فیمبریا و نیز انواع مختلف پروتئین‌های غشاء خارجی می‌باشد (۴) و نظر به اینکه لوکوتوکسین در ایجاد بیماری نقش مهمی را ایفا می‌نماید در تهیه واکسن بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. هر چند سم به تنهایی قادر به محافظت دام در مقابل بیماری نبوده است (۵).

سم لوکوتوکسین جزء گروهی از سموم پروتئینی است که دارای وزن مولکولی بالا می‌باشد و فعالیت این سم وابسته به حضور کلسیم می‌باشد. این سم قادر است در سلولهای هدف سوراخ ایجاد نماید و بدینوسیله باعث تخریب آنها گردد. وزن مولکولی سم بوسیله SDS-PAGE و ایمینوبلاتینگ حدود ۱۰۵ کیلو دالتون تخمین زده شده‌است (۶) و این در حالی است که با استفاده از ردیف‌های نوکلوتیدی ژن سم، وزن آنرا ۱۰۲ کیلو دالتون پیش‌بینی نموده‌اند (۷). این سم از لحاظ ساختمانی و پادگنی مشابه همولیزین مترشحه از باکتری *E. coli* می‌باشد و به لحاظ داشتن واحدهای تکراری در انتهای کربوکسیل آن به نام (RTX)[3] نامیده شده‌اند (۸).

سموم RTX در اثرگذاری بر روی سلولهای هدف دارای اختلافاتی می‌باشند. بعضی از این سموم بروی انواع سلولهای یوکاریوتیک موثر بوده ولی بعضی دیگر اختصاصی‌تر عمل می‌کنند. سم لوکوتوکسین به طور اختصاصی روی گلبولهای سفید نشخوار کننده اثر می‌گذارد (۹). اثر سم روی گلبولهای سفید که باعث تخریب سلولهای دفاعی می‌شود منجر به رها شدن لیزوزیم و رادیکالهای آزاد سمی شده و به دنبال آن واکنشهای التهابی و ضایعات ریوی ایجاد می‌گردد. یکی از اثرات این سم در بیماری‌زائی و ایمن‌سازی در ذات‌الریه پاستورلوزی می‌باشد. در این تحقیق تمام سروتایپ‌های این باکتری و تعدادی از سویه‌های تایپ نشده جهت تولید سم مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

باکتری‌ها

در تحقیقات قبلی بسیاری از این سویه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۸-۱۳) و به طور خلاصه مهمترین مشخصه آنها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. سویه‌هایی که با ۵ عدد شماره‌گذاری شده است از سویه‌های NCTC می‌باشند. سویه‌هایی که با pH و UT مشخص شده‌اند از نقاط مختلف انگلیس جمع‌آوری شده‌اند.

باکتری‌ها در دمای منهای ۷۰ درجه سانتیگراد در محیط BHIB[4] حاوی ۵۰٪ گلیسرول نگهداری شده بود. باکتری به طور معمول در (BHIA)[5] که دارای ۵٪ خون گوسفند بود در ۳۷ درجه به مدت ۱۲ ساعت رشد داده شد. تمام سویه‌ها بوسیله API 20 شناسایی شده و از هماگلوتیناسیون غیر مستقیم جهت تشخیص قطعی سروتایپ‌های A1، A2 و T استفاده شد.

تهیه لوکوتوکسین

مایع روی محیط کشت که به عنوان سم مورد استفاده قرار گرفت در طی رشد سویه‌های مختلف باکتری در زمانهای متفاوت تهیه گردید. باکتری پس از رشد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با استفاده از تامپون فسفات سالینه (PBS) از روی محیط کشت BHIA جدا و سپس جذب نوری آن در طول موج ۶۴۰ به مقدار ۰/۴ تنظیم شد. یک میلی‌لیتر از این محیط به ۵۰ میلی‌لیتر از BHIB در یک فلاکس ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه و در حرارت ۳۷ درجه جهت رشد باکتری قرار داده شد. تغییرات رشد باکتری با اندازه‌گیری تغییر جذب نوری دنبال شد. در انتهای فاز لگاریتمی، باکتری از محیط کشت بوسیله سانتریفوژ با دور xg ۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد جدا گردید. محیط کشت فاقد باکتری از صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده و در منهای ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت تهیه سم، باکتری در شرایط هوادهی متفاوتی که توسط Davis و همکاران (۱۸) گزارش شده بود رد داده شد (هوادهی بسیار زیاد - هوادهی زیاد - هوادهی کم و عدم هوادهی و در حضور CO2).

ارزیابی فعالیت سم به روش کمولومینسانس (CL) Chemilominescnce

خون حاوی هپارین از گاو و گوسفند سالم تهیه گردید. جهت تهیه نوتروفیل، ۱۰ میلی‌لیتر از خون با هم حجم خود PBS (pH=۷/۳۸) رقیق گردید و به دقت روی سطح ۵ میلی‌لیتر از (Sigma) Histiopaqe با دانسیته ۱/۰۷۷ گرم در میلی‌لیتر قرار داده و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق با دور ۸۳۰xg سانتریفوژ شد. لایه بالایی که شامل پلاکت، سلولهای تک هسته‌ای و Histiopaqe بود جدا و گلبولهای قرمز که در لایه زیرین قرار داشت لیز گردید. جهت لیز گلبولهای قرمز لایه زیرین در سه برابر حجم آن در محیط سرد کلراید آمونیم (۱۰ میلی‌مولار NH_4Cl، ۱۰ میلی مولار $KHCO_3$ و ۰/۱ میلی‌مولار EDTA) قرار داده شد. بعد از ۵ تا ۷ دقیقه رنگ آن از قرمز به سیاه تغییر یافت که نشان دهنده تخریب گلبولهای قرمز بود. این مخلوط در مدت ۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه با دور ۴۰۰ xg سانتریفوژ شد. این کار تا تخریب کامل گلبول قرمز ادامه یافت و سپس سلولهای باقی مانده ۲ بار با PBS شستشو و سرانجام در محلول Hanks HEPES (HH) قرار داده شد. نتیجه این کار به دست آوردن ۹۵٪ نوتروفیل که بیش از ۹۸٪ آن سلولها زنده بودند، انجامید.

تهیه Opsonised Zymosan (OZ)

- ۱۰۰ میلی‌گرم از زیموزان (Sigma, from A *Saccharomyces cerevisiae*) را به ۵ میلی‌لیتر PBS که ۱۰٪ حجم در حجم آن دارای سرم طبیعی گاو بوده اضافه شد و این مخلوط در ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه و با دور ۳۰ rpm که به طور مرتب تکان داده می‌شد قرار داده شد. مخلوط فوق دوبار با PBS سرد شستشو داده و سرانجام در ۱۰ میلی‌لیتر PBS ریخته و در منهای ۲۰ درجه سانتیگراد تا زمان مصرف نگهداری شد.

- dicarbonic acid hydrazide; (7-dimethylamino-naphthalene-1, 2 (DNDH Boerhinger در dimethyl sulphoxide به غلظت ۰/۰۱ مولار به عنوان پایه تهیه و جهت استفاده رقت ۰/۰۰۰۱ مولار در محلول HH رقیق گردید.

جهت انجام آزمایشهای CL، ۱۵ میکرولیتر از سم با ۸۸۵ میکرولیتر از محلول HH حاوی نوتروفیل و DNDH به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد سپس نوتروفیل بوسیله ۱۰۰ میکرولیتر OZ تحریک و نتیجه با لومینرمتر که به یک دستگاه کامپیوتر متصل بود اندازه‌گیری شد هر نمونه به صورت دوتایی و شامل نوتروفیل (۵×۱۰^{۵})، DNDH (۰/۵) OZ ($۱۰^{-۵}$) میلی‌گرم) HH (pH=۷/۳۸) در حجم نهایی یک میلی‌لیتر بود. نتایج فعالیت نوتروفیل به صورت مهار مقدار پیک CL به OZ با میانگین ۵ آزمایش مستقل می‌باشد.

تهیه پادتن

جهت تهیه پادتن بر علیه لوکوتوکسین، سم به دست آمده از طریق نو ترکیبی که با انتقال ژن lktA و lktC در باکتری *E. coli* صورت پذیرفته بود بوسیله به خرگوش سفید نیوزیلند به صورت داخل عضلانی تزریق گردید. قبل از تزریق نمونه فوق از خرگوش خون‌گیری به عمل آمد. بعد از چهار تزریق نمونه فوق که به طور ماهیانه انجام گرفت خون‌گیری نهایی صورت پذیرفت.

رانـدن SDS-PAGE بـا ژل آکـریلامید ۷/۵٪ از پروتئین‌های دیگر جدا گردید و ژل بوسیله کوماسی بلو ۰/۱٪ وزن در حجم به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی و به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌زدایی شد باند ۱۰۵ کیلو دالتون به دقت بریده و در PBS شستشو داده شد. این باند خورد و ریز ریز گردید و در PBS استریل مخلوط و به مدت ۱۸ ساعت در حرارت ۴ درجه در مقابل سرم فیزیولوژی دیالیز گردید. مایع کیسه دیالیز با حجم مساوی با (Sigma) Freund's incomplet adjuvant بـه صورت امولسیون درآورده و ۲ میلی‌لیتر از محلول فوق

مونو کلونال پادتن بر علیه سم نو ترکیب توسط دکتر W. Danaki تهیه گردیده بود.

SDS-PAGE و ایـمنوبلاتینگ بـراسـاس روش Laem li (۹) در دسـتگاه ژل عـمودی (Protean II, BioRad) انجام شد.

نمونه‌ها به حجم مساوی با تامپون نمونه مخلوط و در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شـد بـعد از انـجام SDS-PAGE، پروتئین‌ها به نـیتروسلوز (Hybond-C Super Amersham) بـا روش Towbin و هـمکاران (۲۰) انـتقال داده شـد.از

جدول شماره ۱- مشخصه سویه‌های استفاده شده در این مطالعه

فعالیت لوکوتوکسین، درصد ممانعت از پاسخ CL و نتروفیل SD		مدت زمان کشت	وضعیت بیمار	محل	منشا	سروتایپ	مرحله
گاو	گوسفند	(ساعت)	میزبان	جداشدن	گونه‌ها		آزمایشگاهی
۹۷ (۰/۵)	۹۷ (۰/۲)	۶/۰	پنومونی	LRT	گاو	A1	ph 2
۹۶ (۰/۳)	۹۵ (۰/۶)	۶/۰	پنومونی	LRT	گاو	A1	ph 10
۹۰ (۰/۷)	۸۳ (۲/۴)	۸/۰	پنومونی	LRT	گاو	A1	ph 12
۲۰ (۲/۷)	۶ (۰/۶)	۸/۰	پنومونی	LRT	گاو	A1	ph 14
۹۰ (۰/۴)	۸۴ (۱/۶)	۸/۰	سالم	NP	گاو	A1	ph 26
۷۵ (۱/۵)	۵۰ (۰/۴)	۵/۳	سالم	NP	گاو	A1	ph 30
۰ (۰/۱)	۰ (۰/۱)	۶/۰	سالم	NP	گاو	A1	ph 6
۸۹ (۰/۶)	۶۷ (۱/۶)	۶/۰	پنومونی	ریه	گوسفند	A1	V 965B
۸۵ (۰/۹)	۷۸ (۱/۰)	۷/۳	پنومونی	ریه	گوسفند	A1	FA 1
۲۶ (۱/۵)	۶ (۱/۲)	۸/۰	پنومونی	ریه	گاو	A2	ph 42
۲۶ (۲/۷)	۴۲ (۱/۱)	۸/۳	سالم	NP	گاو	A2	ph 44
۲۲ (۱/۷)	۵ (۲/۰)	۸/۰	پنومونی	ریه	گوسفند	A2	B664
۸۵ (۰/۸)	۶۱ (۲/۵)	۸/۰	پنومونی	ریه	گوسفند	A2	T884
۸۵ (۰/۵)	۱۸ (۱/۸)	۸/۰	پنومونی	ریه	گوسفند	A2	ph 142
۹۷ (۰/۲)	۹۵ (۰/۶)	۶/۳	پنومونی	ریه	گوسفند	A5	10630
۹۵ (۰/۴)	۹۴ (۰/۸)	۶/۳	پنومونی	ریه	گوسفند	A6	10632
۹۵ (۰/۴)	۹۵ (۰/۴)	۶/۳	پنومونی	ریه	گوسفند	A7	10634
۹۴ (۰/۳)	۹۳ (۰/۳)	۷/۰	پنومونی	ریه	گوسفند	A8	10636
۹۷ (۰/۴)	۹۶ (۰/۲)	۶/۳	پنومونی	ریه	گوسفند	A9	10639
۶۰ (۲/۶)	۴۵ (۱/۲)	۵/۰	سالم	NP	گوسفند	A11	10642
۹۲ (۰/۹)	۹۰ (۰/۴)	۴/۳	سالم	NP	گوسفند	A12	* 10644
۹۴ (۰/۴)	۹۱ (۰/۴)	۶/۳	پنومونی	ریه	گوسفند	A13	11302
۹۰ (۰/۵)	۹۰ (۰/۳)	۵/۳	سالم	NP	گوسفند	A14	10640
۹۴ (۰/۷)	۹۱ (۰/۶)	۵/۳	پنومونی	ریه	گوسفند	A16	11303
۹۴ (۰/۶)	۹۲ (۰/۵)	۶/۰	n/k	n/k	گوسفند	T3	ph 706
۳۲ (۲/۰)	۱۵ (۲/۱)	۶/۰	n/k	کبد/طحال	گوسفند	T4	Fr 3
۴۰ (۱/۶)	۳۶ (۱/۱)	۴/۳	پنومونی	ریه	گوسفند	T10	Fr 4
۳۵ (۰/۹)	۲۰ (۱/۰)	۴/۳	n/k	ریه	گوسفند	T15	ph 252
۳۹ (۲/۴)	۲۵ (۱/۷)	۴/۳	n/k	ریه	گوسفند	UT	10641
۸۲ (۰/۵)	۷۵ (۰/۴)	۳/۳	پنومونی	ریه	گاو	UT	UT 2
۱۰۰	۱۰۰	۵/۳	پنومونی	ریه	گاو	UT	UT 3
۳۹ (۰/۶)	۳۰ (۱/۰)	۴/۳	پنومونی	ریه	گاو	UT	UT 23
۸۵ (۰/۹)	۸۳ (۳/۹)	۵/۰	پنومونی	ریه	گاو	UT	UT 27

UT: سویه تایپ نشده LRT: ناحیه پایین دستگاه تنفسی NP: بینی - حلقی - n/k: نامشخص زمان جداسازی باکتری از محیط کشت (انتهای فاز لگاریتمی) جهت ارزیابی فعالیت سم * درصد مهار عکس‌العمل CL طبیعی نوتروفیل به OZ (که نتیجه ۵ آزمایش مستقل می‌باشد).

پادتن مونوکلونال که بر علیه لوکوتوکسین تهیه شده بودند نیز Anti-mouse IgG-HRP conjugate جهت ادامه کار استفاده شد.

الیزا

حفره‌های پلیت (Dynatech Immulon TM)

بوسیله ۳۵۰ میکرولیتر از مونوکلونال پادتن که بر علیه rLkt تهیه شده بود و در یک به صد در ۰/۰۵ مولار تامپون کربنات با pH=۹/۶ رقیق شده بود پر شد. پلیت در حرارت ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت در جعبه مرطوب نگهداری شد و سپس ۲ بار بوسیله تامپون شستشو دهنده [حاوی ژلاتین (۰/۵٪ وزن به حجم) و توئین ۲۰ (۰/۱٪ حجم در حجم) در PBS] شستشو داده شد. مایع رویی محیط کشت باکتری *P. haemolytica* و یا سم نو ترکیب تهیه شده، در تامپون شستشو دهنده رقیق شده و ۳۰۰ میکرولیتر به هر حفره اضافه گردید. پلیت به مدت ۲ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در جعبه مرطوب قرار داده و سپس پلیت مانند فوق شسته شد. بعد از شستشو به هر حفره ۲۵۰ میکرون از Anti-rabbit IgG-HRP conjugate که در تامپون شستشو رقیق شده بود ریخته و پلیت در حرارت ۴ درجه سانتیگراد مانند قبل قرار داده و پلیت پس از ۲ ساعت شسته شده بود ریخته و پلیت در حرارت ۴ درجه سانتیگراد مانند قبل قرار داده و پلیت پس از ۲ ساعت شسته شد. واکنش آنزیمی با اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر از O-phenylendiamine (۳۵ میلی‌گرم در هر میلی لیتر) و پراکسید هیدروژن (۲۰ میکرون) در ۱۰۰ میلی‌لیتر از ۰/۱۵ مولار تامپون سیترات - فسفات (pH=۵) که تازه تهیه شده بود آغاز گردید. پلیت برای ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اطاق و در محل تاریک جهت تغییر رنگ قرار داده شد. این واکنش با اضافه نمودن ۵۰ میکرون اسید سولفوریک ۱۲/۵٪ حجم در حجم به هر حفره متوقف گردید. تغییر رنگ بوسیله ELISA reader anthos 2001 در طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تخمین پروتئین

مقدار پروتئین هر نمونه به روش برادفورد (۲۱) تخمین زده شد. در این روش آلبومین سرم گاو به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

شرایط مناسب جهت تهیه سم لوکوتوکسین

سی و سه باکتری جدا شده که شامل همه سروتایپ‌ها و همچنین بعضی از سویه‌های تایپ نشده جهت تولید سم مورد مطالعه قرار گرفت. در آزمایش‌های اولیه مشخص گردید که BHIB محیطی مناسب برای رشد باکتری و تولید سم می‌باشد. رشد سویه‌های ph2 و ph30 تحت شرایط متفاوت مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که بیشترین تولید سم در انتهای مرحله لگاریتمی می‌باشد. تولید سم بوسیله SDS-APAGE و ایمینوبلات و همچنین فعالیت آن بوسیله کمولومینسانس مورد ارزیابی قرار گرفت. زمانیکه شرایط متفاوت هوادهی [بسیار زیاد، زیاد، متوسط، کم هوادهی و عدم هوادهی و ۵٪ دی اکسید کربن (۱۸)] مورد آزمایش قرار گرفت باکتری بیشترین رشد خود را در شرایط هوادهی زیاد داشت.

رشد باکتری در درجه حرارت‌های متفاوت (۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۳ درجه سانتیگراد) مورد ارزیابی قرار گرفت. مناسب‌ترین دما جهت حداکثر رشد، ۳۷ درجه سانتیگراد بود. علاوه بر آن حداکثر تولید سم نیز در همین درجه به دست آمد.

زمان فاز لگاریتمی در سویه‌های باکتری *P. haemolytica* متفاوت بود (جدول شماره ۱). مراحل رشد باکتری در تولید سم اثر مهمی دارد همچنانکه در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود فعالیت سم سویه ph 2 زمانی که باکتری روی BHIB رشد نموده است موازی با رشد باکتری و حداکثر فعالیت سم در انتهای فاز لگاریتمی می‌باشد. چنانچه باکتری بیشتر در محیط باقی می‌ماند و وارد فاز ثابت می‌شد فعالیت سم نیز کاهش می‌یافت همین نتایج با دیگر سویه‌های *P. haemolytica* به دست آمد.

لذا جهت مطالعه فعالیت سم سویه‌های مختلف باکتری *P. haemolytica*، باکتری در BHIB و در دمای ۳۷ درجه و با حداکثر هوادهی رشد داده شد و مایع رویی به عنوان سم در انتهای فاز لگاریتمی گرفته و با یکدیگر مقایسه شد.

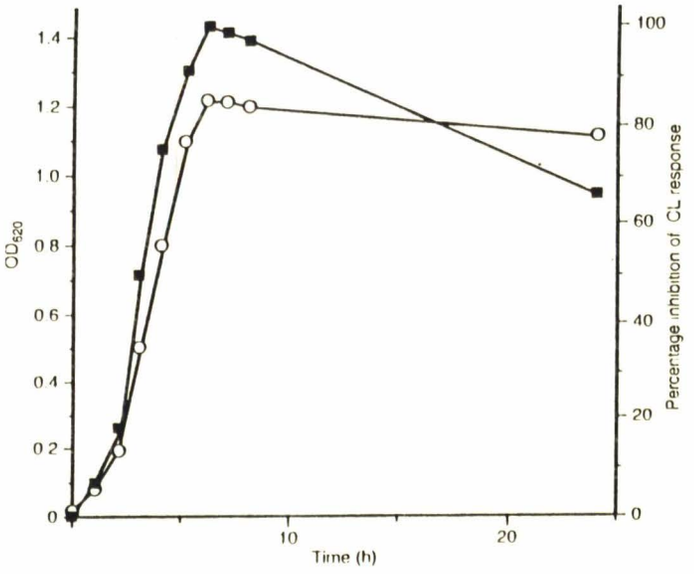
نگهداری سم در حرارت اطاق باعث کاهش فعالیت آن می‌شد و این کاهش در درجه حرارت ۴ درجه و حتی در حرارت منهای ۷۰ درجه نیز مشاهده شد. لذا جهت مقایسه سم این سویه‌ها تمام باکتریها همزمان رشد داده و سم به دست آمده در یک زمان مورد آزمایش قرار می‌گرفت. سویه ph2 به عنوان کنترل و استاندارد داخلی بین هر آزمایش مورد استفاده قرار گرفته است.

مهار CL بوسیله سم تولید شده

نتایج اثر سم سویه باکتری بر روی نوتروفیل‌های گاو در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. توکسین تولید شده توسط سویه ph2 بسیار سمی بوده به طوریکه تقریباً باعث مهار کامل CL شده است ولی سم تولید شده توسط سویه ph30 حدوداً ۵۰٪ CL را مهار کرده و سم سویه B664 مقدار بسیار کمی روی مهار CL اثر داشته است. در مجموع توکسین بیشتر سویه‌ها (۲۱ از ۳۳) بسیار سمی بودند و بیش از ۸۰٪ مهار CL طبیعی را باعث شده‌اند (جدول شماره ۱).

بیشترین قدرت سمیت را نمونه‌های سویه UT3 داشته و ۱۰۰٪ مهار CL را باعث شد. توکسین ۳ سویه دارای قدرت سمی متوسط بوده (۸۱٪ - ۴۱٪ مهار) و توکسین ۸ سویه دارای قدرت سمیت کمی بوده‌اند (مهار کمتر از ۴۰٪) که آنها شامل یک سروتایپ A1 دو تا از A2 چهار تا از بیوتایپ T (*P. trehalosi*) و یک سویه تایپ نشده می‌باشند. تنها یک سویه ph6 که از گاو جدا شده و جزء سروتایپ A1 می‌باشد تولید سم ننموده است. در تمام سویه‌ها، سمیت بیشتری قبل و یا بعد از انتهای فاز لگاریتمی مشاهده نشد. پاساژهای متوالی سویه‌های ph2 و ph10 (۴۰ بار) در تولید و فعالیت سم اثر نداشت. آنالیز واریانس ارقام به دست آمده از سم تولید شده توسط سویه‌هایی که از گاو جدا شده‌اند به مقدار کمتری سمیت برای نوتروفیل داشته‌اند تا سمی که از سویه‌های جدا شده از گوسفند ($p=0/018$) تهیه شده بود. درصد میانگین مهار CL برای گاو ۶۱/۹۱ (SEM=۳/۰۴ ,n=۱۳۰) و برای سویه‌های گوسفندی ۷۰/۳۶ (SEM=۲/۱۱ ,n=۲۰۰) می‌باشد. نوتروفیل‌های گوسفندی در مقایسه با نوتروفیل‌های گاوی به طور مشخص ($p=0/009$) حساسیت بیشتری را به سم تولید شده توسط باکتری *P. haemolytica* نشان داده‌اند. میانگین مهار CL ۷۱/۸۶ (SEM=۲۷/۲n= ,۱۶۵) برای گوسفند و ۶۲/۲ (SEM=۲/۶۶ ,n=۱۶۵) برای نوتروفیل گاو می‌باشد.

شکل شماره ۱- فعالیت سم lkt (■-) در طی رشد (○-) باکتری *P. haemolytica* سویه ph۲ در محیط BHIB می‌باشد. فعالیت سم بوسیله مهار عکس‌العمل CL نتروفیل‌های گاو به OZ اندازه‌گیری شده است.



اختصاصی بودن CL برای سم لوکوتوکسین

اختصاصی بودن CL برای سم لوکوتوکسین به روش‌های مختلف مورد آزمایش قرار گرفت

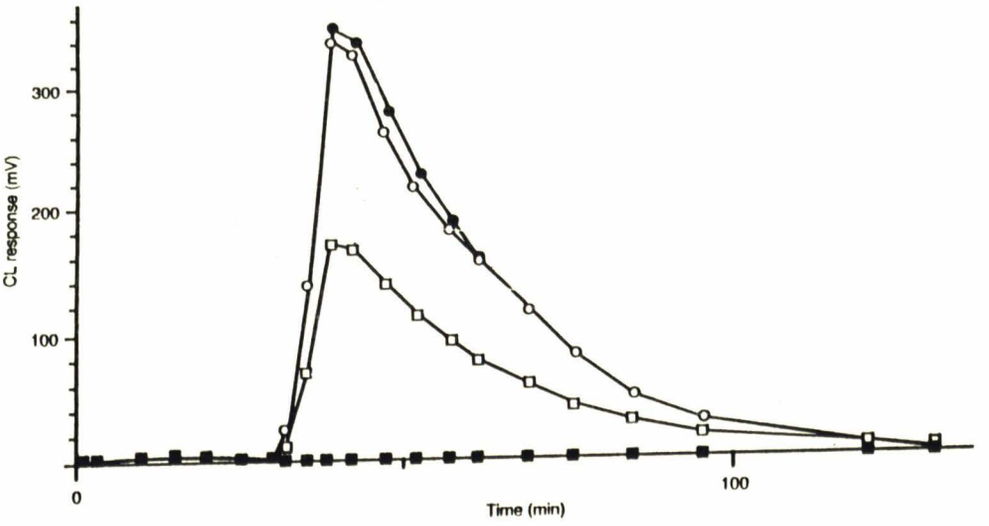
۱- محیط کشت باکتری NCTC 10322 *P. multocida* احتمالاً در گونه‌های پاستورلا مشترک بوده ولی قادر به مهار CL ایجاد شده توسط نوتروفیل‌های گاوی نبوده‌اند.

قادر به کشتن نوتروفیل‌های گاو نبوده است.

۳- در نهایت فعالیت CL بوسیله پادتن اختصاصی بر علیه لوکوتوکسین مهار شده است. محیط کشت باکتری *P. haemolytica* و همچنین سم نوترکیب rlkt (۱ در ۱۰۰۰ رقیق شده) با پلی‌کلونال اختصاصی بر علیه rlkt به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت یکدیگر قرار داده و پس از آن مشاهده شد که سم قدرت خود را از دست داده است و آنتی سرم به طور کامل اثر هر دو نوع سم را بر روی نوتروفیل خنثی نموده است.

ظاهراً دارای پروتئین بیشتری در مقایسه با نمونه‌هایی که قدرت سمیت بیشتری دارند می‌باشند. این مطلب بوسیله الیزا نیز مورد تایید قرار گرفته است. برای مثال ph42 دارای مقدار بیشتری پروتئین در مقایسه با سویه ph2 می‌باشد جدول شماره ۲ (به ترتیب ۱۵۰ واحد و ۱۰۰ واحد پادگن در هر میلی لیتر) اما اولی دارای فعالیت کم ولی دومی دارای فعالیت زیاد بر روی نوتروفیل‌های گاوی و گوسفندی داشته‌اند. همچنانکه در شکل ۳ ردیف ۷ و ۸ مشاهده می‌شود باندهای

شکل شماره ۲- اثر سم سویه‌های مختلف باکتری *P. haemolytica* روی عکس‌العمل نتروفیل‌های گاو به OZ (-●-) کنترل عکس‌العمل CL که هیچ سمی به آن اضافه نشده است. عکس‌العمل CL نتروفیل زمانی که سم سویه ph2 (-■-) سویه و سویه ph30 (-□-) و سویه B664 (-○-) به آن اضافه شده است.



سم نوترکیب فعال (rlkt) که از انتقال ژن lktA و lktA با باکتری *E. coli* تولید گردیده بود به طور کامل CL ایجاد شده توسط نتروفیل گاوی را مهار می‌کرد در حالی که سم غیر فعال که در حضور ژن lktA ایجاد شده و فاقد ژن lktC می‌باشد قادر به مهار CL نبوده است.

۲- باکتری *P. haemolytica* تولید LPS در محیط کشت می‌نماید و وجود آن بوسیله وسترن بلات و با استفاده از پلی‌کلونال تهیه شده در خرگوش بر علیه LPS نشان داده شده است. سمیت محیط کشت زمانیکه باکتری در آن رشد نماید می‌تواند به علت وجود LPS در آن یا آلودگی محیط کشت به LPS باشد بدین جهت آزمایشهائی مورد نیاز بود تا مشخص نماید که این اثر مهاری مربوط به LPS نمی‌باشد. فعالیت مهاری CL بوسیله جوشانیدن نمونه از بین می‌رفت و این در حالی است که LPS مقاوم به حرارت می‌باشد و با این حرارت هنوز فعالیت خود را از دست نمی‌داد. به علاوه LPS خالص باکتری *P. haemolytica* (خشن و صاف) و LPS خالص از باکتری *E. coli* تا غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر مهاری روی CL نداشته است و

اختلاف در مقدار وزن مولکولی سم تولید شده توسط سویه‌های مختلف باکتری *P. haemolytica*

تمام سویه‌های مورد مطالعه بجز ph6 که قادر به تولید سم نبوده (با SDS-PAGE و ایمیونوبلات مشخص گردید) قادر بودند که سم تولید نمایند. تعدادی از سویه‌های باکتری *P. haemolytica* تولید سم با وزن مولکولی متفاوت با دیگر سویه‌ها کرده‌اند. بیشتر سویه‌های جدا شده (۲۸ از ۳۲) تولید سم با وزن مولکولی ۱۰۵ کیلو دالتون نموده‌اند. (همچنانکه در شکل ۳ ردیف‌های ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ دیده می‌شود) چهار سویه UT23, 10634, ph44, ph42 در ردیف‌های ۲ و ۴ و ۶ و ۸ تولید سم با وزن مولکولی تقریبی ۱۰۸ کیلو دالتون نموده‌اند.

مقایسه شکل ۳ و جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که رابطه مشخصی بین وزن مولکولی و مقدار سم تولید شده توسط این سویه‌ها وجود ندارد. سم به دست آمده از نمونه‌های ۱، ۵، ۶ و ۷ با فعالیت بسیار زیاد و نمونه ردیف ۴ با فعالیت متوسط و نمونه‌های ردیف ۲، ۳ و ۸ دارای فعالیت ضعیف بر روی نوتروفیل بوده‌اند ولی مشخصی از سویه‌های UT3, UT23 مشاهده می‌شود در حالی که مقدار بسیار کمی پادگن به روش الیزا قابل اندازه‌گیری بوده است.

بحث

اساس این تحقیق بر این بود که با توجه به مطالعات قبلی که نشان می‌داد سویه‌های باکتری *P. haemolytica* که دارای اختلاف در تولید LPS و پروتئین‌های غشاء خارجی می‌باشند (۱۵-۱۴) آیا به یک مقدار سم تولید می‌نمایند. جهت مقایسه تولید سم در سویه‌های متفاوت، اولین کار آن بود که شرایط رشد، درجه حرارت، pH، ترکیبات محیط کشت و مقایسه میزان رشد و نیز زمان جمع‌آوری سم از محیط کشت که قبلاً گزارش شده بود که روی فعالیت سم مؤثر است (۲۲ و ۲۳) مورد مطالعه قرار گیرد.

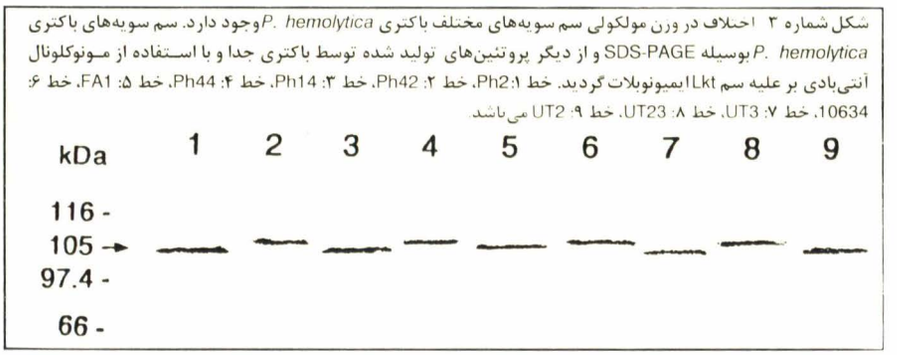
در تحقیقات قبلی نشان داده شده بود که سم زمانی تولید می‌گردد که باکتری در مرحله رشد و حداکثر تولید آن زمانی است که باکتری در انتهای فاز لگاریتمی باشد (۲۴ و ۲۵). در این مطالعه محیط BHIB به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت جهت رشد باکتری مورد

استفاده قرار گرفته است. بین سویه‌های متفاوت روند رشد باکتری متفاوت بوده ولی تمام سویه‌ها حداکثر فعالیت سم خود را در انتهای فاز لگاریتمی نشان داده و پس از وارد شدن باکتری به فاز ثابت فعالیت سم تولید شده کاهش یافته و کاهش فعالیت سم در فاز ثابت با ظهور باندهایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۵ کیلو دالتون که با پادتن تولید شده بر علیه سم لوکوتوکسین واکنش متقاطع داشت مطابقت می‌نماید. نگهداری سم به مدت طولانی نیز باعث کاهش فعالیت آن شده لذا سم تهیه شده سریعاً جهت آزمایش مورد استفاده قرار می‌گرفت.

در مطالعات انجام شده قبلی مشخص شده است که سویه‌های سروتایپ A1 تا A12 باکتری *P. haemolytica* تولید سم فعال نموده اگر چه بعضی از این سویه‌ها دارای فعالیت کم می‌باشند (۲۶-۲۹). بعضی از سویه‌های ثابت نشده تولید سم ننموده اما این سویه‌ها از جوجه جدا شده‌اند لذا تعیین هویت آنها مورد شک می‌باشد (۲۷). در این مطالعه مشاهده شد که ۱۶ سروتایپ و ۴ سویه تایپ نشده تولید سم می‌نمایند. از سم این ۳۳ سویه مورد آزمایش، بیشتر آنها (۲۳) دارای فعالیت زیاد و متوسط می‌باشند. تمام ۴ سویه بیوتایپ T تولید سم با قدرت ضعیف نموده‌اند که قبلاً فعالیت کم سویه T3 گزارش شده بود (۳۰). در این تحقیق ۹ سویه A1 و ۵ سویه A2 مورد آزمایش قرار گرفت که هر دو سروتایپ دارای سویه‌هایی با تولید سم با قدرت زیاد، متوسط و کم می‌باشند. این اختلاف در تولید سم فعال در بین یک سروتایپ نیز در پروتئینهای غشاء خارجی و LPS یک سروتایپ نیز مشاهده شده است (۱۵-۱۲). تنها یک سویه ph6 تولید سم فعال نکرده بود اگر چه ساترن بلات این سویه نشان داده است که این سویه دارای ژن لوکوتوکسین می‌باشد. این سویه جزء سروتایپ A1 بوده لیکن از لحاظ بیوشیمیایی، پروتئین‌های غشاء خارجی و LPS (۱۴) و پروفایل پلاسمید (۱۶) مشابه دیگر سویه‌های این سروتایپ نمی‌باشد. جالبترین نتیجه این مطالعه آن است که رابطه‌های بین مقدار پروتئین لوکوتوکسین (سم) در محیط کشت باکتری و فعالیت این سم بر علیه سلولهای هدف مشاهده نشد. برای مثال محیط کشت ph14 و ph42 دارای مقدار مساوی سم پروتئین در مقایسه با سویه ph2 دارند لیکن فعالیت سمی آنها ضعیف بوده و قادر به از بین بردن سلولهای هدف نبوده‌اند. این اختلاف در سمیت بین سویه‌های متفاوت ممکن است به علت اختلافات در ساختمان سم و یا اختلافات دیگر محصولات پاستورلا مانند پروتئین LktC و یا LPS باشد برای مثال مشخص شده است که LPS باکتری *E. coli* در فعالیت همولیتیک آن نقش مهمی را دارا می‌باشد (۳۱) و با موتاسیون در بیوسنتز LPS مشاهده گردید که قدرت همولیتیک باکتری کاهش یافته است (۳۲). در باکتری *P. haemolytica* نیز اختلاف در بین LPS سویه‌های این باکتری مشاهده شد (۱۳) اما هیچ رابطه‌ای بین فعالیت لوکوتوکسین و تایپ LPS مشاهده نگردید علاوه بر این نه LPS صاف و نه LPS پرگنه‌های خشن به تنهایی قادر به مهار CL نبوده‌اند هر چند اثر همراهی آن را نمی‌توان نادیده گرفت.

بیشتر سویه‌ها تولید پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰۵ کیلو دالتون کرده‌اند اما چهار سویه (UT23, ph44, 10634, ph42) پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰۸ کیلو دالتون تولید نموده‌اند هر چند رابطه واضحی بین فعالیت این سموم و وزن مولکولی آن مشاهده نشد. اگر چه ph42 نیز از گاو جدا شده است و سروتایپ آن A2 می‌باشد اما باکتری از محل بینی - حلقی جدا شده و سم تولید شده دارای قدرت متوسط می‌باشد. 10634 با سروتایپ A7 از گوسفند جدا شده و سم آن دارای فعالیت زیاد می‌باشد. UT23 جزء سویه‌های تایپ نشده بوده و از گاو جدا و سم آن دارای فعالیت کم می‌باشد.

اختلاف در وزن مولکولی و فعالیت سم از سروتایپ‌های متفاوت قبلاً گزارش شده بود اگر چه در بیشتر آن تحقیقات تنها یک سویه از هر سروتایپ مورد مطالعه قرار گرفته بود. (۳۴، ۳۳، ۲۹ و ۲۸). سم تولید شده بوسیله سروتایپ T3 دارای سمیت کمتر در مقایسه با سم تولید شده توسط سروتایپ A1 بوده و وزن مولکولی آن کمی بیشتر از ۱۰۵ کیلو دالتون بوده است (۳۰). اخیراً Burrows و همکاران (۳۴) نشان داده‌اند که سم تولید شده توسط ۱۶ سروتایپ از لحاظ پادگن‌زائی رابطه دارند و مشابه یکدیگر می‌باشند اما از لحاظ وزن مولکولی مشابه همدیگر نمی‌باشند. دیگر محققین نشان داده‌اند که سروتایپ‌های مشخص دارای تفاوت‌هایی از لحاظ پادگن‌زائی می‌باشند (۲۹ و ۲۶). اختلاف پادگن در سم می‌تواند مقدار سم به دست آمده به روش ایمینوبلاتینگ و الیزا را توجیه می‌نماید برای مثال در ایمیوبلاتینگ سم تولید شده توسط UT3 و UT23 باندهای آن براحتی قابل مشاهده است. لیکن مقدار پادگن آنها توسط سیستم الیزا بسیار کم قابل اندازه‌گیری بود. این ممکن است به دلیل آن باشد که سیستم الیزا وابسته به دو پادتن بوده که هیچکدام از آنها مشابه همدیگر نبوده هر چند دو پادتن نتایج مشابه در ایمینوبلات نشان داده‌اند.



شکل شماره ۳ اختلاف در وزن مولکولی سم سویه‌های مختلف باکتری *P. hemolytica* وجود دارد. سم سویه‌های باکتری *P. hemolytica* بوسیله SDS-PAGE و از دیگر پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری جدا و با استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی بر علیه سم LktA ایمیونوبلات گردید. خط ۱: Ph2، خط ۲: Ph42، خط ۳: Ph14، خط ۴: Ph44، خط ۵: FA1، خط ۶: 10634، خط ۷: UT3، خط ۸: UT23، خط ۹: UT2 می‌باشد.

پاورقی‌ها

1- Brain hearth infusion broth
2- Leukotoxin
3- Repeat in toxin
4- BHIB Oxoid
5- Brain Heart Infusion agar

منابع مورد استفاده

1- Frank G.H., 1989. Pasteurellosis of cattle. In pasteurella and pasteurellosis. PP. 197-222 Edited by C. Adlam and J.M. Rutter. London: Academic Press.

2- Gilmour, N.J.L. & Gilmour, J.S. 1989. Pasteurellosis of sheep. In pasteurella and pasteurellosis, PP. 223-262. Edited by C. Adlam & J.M. Rutter. London: Academic Press.

3- Sneath P.H. & Stevens M. 1990. *Actinobacillus rosii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. International Journal of Systemic Bactriology 40, 188-153.

4- Confer A.W., 1993. Immunogens of pasteurella. Veterinary microbiology 37, 353-368.

5- Conlon, J.A., Shewen, P.E. & Lo, R.Y.C. 1991. Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonia challenge with live *Pasteurella haemolytica* AI. Infection and Immunity 59, 587-591.

6- Chang Y.F., Young R., Post D. & Struck D.K., 1987b. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infection and Immunity 55, 2348-2354.

7- LO R.Y.C., Strathdee C.A. & Shewen P. E., 1987. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* AI. Infection and Immunity 55, 1987-1996.

8- Coote J.G. 1996. The RTX toxins of

Research 46, 1212-1214.
25- Confer A.W. & Durham J.A., 1992. Sequential development of antigens and toxins of *Pasteurella haemolytica* serotype A1 grown in cell culture medium. American Journal Veterinary Research 53, 646-652.
26- Shewen P.E. & Wilkie B.N., 1993. Cytotoxin neutralising activity in sera from ontario beef cattle. Canadian journal of comparative medicine 47, 497-498.
27- Chang Y.F., Renshaw H.W. & Young R. 1987a. Pneumonic pasteurellosis: Examination of typable and untypable *Pasteurella haemolytica* strains for leukotoxin production, plasmid content, and animicrobial susceptibility. American Journal of Veterinary Research 48, 378-384.
28- Gentry, M.J., Confer, A.W. & Holland, S.G. 1988. Comparison of the toxic and antigenic properties of single bovine isolates of *Pasteurella haemolytica* representing five serotypes and an untypable strain. Veterinary microbiology 16, 351- Characterization of a neutralizing monoclonal antibody to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infection and immunity 60, 1734-1739.
30- Winfield E.O. & Lo R.Y.C., 1991. Analysis of the *Pasteurella haemolytica* T3 leukotoxin determinant. Abstracts of the general meeting. PP. 33.
31- Welch R.A., 1994. Holistic perspective on the *Escherichia coli* hemolysin. In Molecular genetics of bacterial pathogenesis pp 351-363. Edited by V.L. Miller, J.B. Kaper, D.A. Portnoy & R.R. Isberg. Washington DC: American Society for Microbiology.
32- Stanley P.L.D., Diaz P., Bailey M.J.A., Gygi D., Juarez A. & Hughes C., 1993. Loss of activity in the secreted form of *Escherichia coli* haemolysin caused by an *rfaP* lesion in core lipopolysaccharide assembly. Molecular microbiolgy 10, 781-787.
33- Lo R.Y.C., 1988. Molecular characterisation of the leukotoxin determinants of *Pasterurella haemolytica* serotypes 1-12. Annual meeting of the American Society for Microbiology, Miami, Florida. B-60 (Abstract).
34- Burrows L.L., Olah-Winfield E. & Lo R.Y.C., 1993. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. Infect immune 61, 5001-5007.
16- Azad A.K., Coote J.G. & Parton R., 1992. Distinct plasmid profiles of *Pasteurella haemolytica* serotypes and the characterization and amplification in *Escherichia coli* of ampicillin-resistance plasmids encoding ROB-15-latamase. Journal of General Microbiology 138, 1185-1196.

جدول شماره ۲- اندازه گیری سم Lkt بوسیله ELISA

سم تهیه شده توسط سویه‌ها	مقدار سم پادگن Elisa units ml^{-1}	فعالیت سم درصد مهار CL عکس‌العمل نوتروفیل	
		گاو	گوسفند
ph2	۱۰۰	۹۷	۹۷
ph42	۱۵۰	۶	۲۶
ph14	۸۴	۶	۲۰
FA1	۷۴	۷۸	۸۵
10634	۸۱	۹۵	۹۵
UT3	<۱۰	۱۰۰	۱۰۰
UT23	۱۲	۳۰	۳۹

17- Davies R.I., Ali Q., Parton, Coote J.G., Gibbs H.A. & Freer J.H., 1992. Outer-membrane protein and lipopoly-sacchride variation in *Pasteurella haemolytica* serotype A1 under different growth conditions. Journal of general microbiology 138, 909-922.
19- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature (London) 227, 680-685.
20- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedures and some applicatiions. Proceedings of the National Academy of Science USA 76, 4350-4354.
21- Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, using the principle of protein dye binding. Anal Biochem 72, 248-257.
22- Strathdee C.A. & LO R.Y.C., 1986. Regulation of expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. Journal of Bacteriology 171, 5955-5962.
23- Gatewood D.M., Fenwich B.W. & Chengappa M.M., 1994. Growth condition dependent expression of *Pasteurella haemolytica* A1 outer membrane proteins, capsule, and leukotoxin.
24- Shewen P.E. & Wilkie B.N., 1985. Evidence for *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. American Journal of Veterinary immunity 35, 91-94.
10- Maheswaran S.K., Kannan M.S., LEE B.W. & Whiteley L.O., 1993. Enhancement of neutrophil-mediated injury to bovine pulmonary endothelial cells by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infection and Immunity 61, 2618-2625.
11- Chang Y.F. & Renshaw H.W., 1986. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin: comparison of 51 chromium-release, trypan blue dye exclusion and luminol-dependent chemiluminescence assays for sensitvity in detecting leukotoxin activity. American Journal of Veterinary Research 47, 134-138.
12- Czuprynski C.J. & Noel E.J., 1990. Influence of *Pasteurella haemolytica* A1 crude leukotoxin of bovine neutropil chemiluminescence. Infection and Immunity 58, 1485-1487.
13- Ali Q., Davies R.L., Parton R., Coote J.G. & Gibbs H.A., 1992. Lipopoly-saccharide heterogencity in *Pasteurella haemoltica* isolates from cattle and sheep. J Gen Microbiol 138, 2185-2195.
14- Ali Q., 1993. Characterisation of virulence-related properties of *Pasteurella haemolytica* isolates. Ph.D. thesis, Glasgow university.
15- Mccluskey J., Gibbs H.A. & Davies R.L., 1994. Comparison of outer membrane protein and lipopolysacchiride profiles of *Pasteurella haemolytica* isolates of serotypes A1 and A2 obtained from pneumonic and healthy cattle. Microbiology 140, 807-814.