

## آنالیز فیلوژنتیک مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس جدا شده از گاوداری‌های استان تهران

بهبود جعفری<sup>۱</sup>، محمود جمشیدیان<sup>۲</sup>، فرهاد موسی‌خانی<sup>۳\*</sup>

۱- دانش‌آموخته، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاذ، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: Farhadmoosakhani@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۳/۷/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۳/۱۱/۱۸)

### چکیده

بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس نوعی التهاب روده شدید، مزمن و پیش‌رونده در نشخوارکنندگان با عامل مسبب مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس می‌باشد که خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت دامپروری به‌ویژه گاوداری‌های شیری وارد می‌کند. از سوی دیگر آن را عامل ایجادکننده بیماری کرون در انسان می‌شناسند. این مطالعه با هدف آنالیز فیلوژنتیک مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس جدا شده از گاوداری‌های استان تهران انجام گردید. در این مطالعه از تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع گاوهای مشکوک به بیماری یون، استخراج DNA انجام شد سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن IS900 واکنش Nested PCR صورت گرفت و از موارد مثبت جدا شده، ۱۴ نمونه به‌طور تصادفی برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. در این مطالعه در مجموع ۲۸ نمونه از ۱۰۰ نمونه مدفوعی از نظر وجود باکتری مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس مثبت بود. بعد از توالی‌یابی نمونه‌های مثبت ملاحظه گردید که بیش از ۹۹ درصد با توالی‌های موجود در بانک ژن شباهت وجود دارد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سویه‌های KJ629114 و AE016958 بیشترین شباهت و سویه CP000325 بیشترین تفاوت را با جدایه‌های حاصل از این مطالعه در ژن GyrA دارند. در مورد ژن GyrB نیز بیشترین شباهت مربوط به سویه‌های AE016985، CP005928 و CP009614 و بیشترین تفاوت هم مربوط به سویه GU143884 می‌باشد. نتایج مطالعه نشان داد که تکنیک Nested PCR می‌تواند روش ارزشمندی برای شناسایی مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس در حیوانات باشد.

کلیدواژه‌ها: مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس، آنالیز فیلوژنتیک، تهران.

## مقدمه

بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس یک بیماری مسری و از عفونت‌های مزمن نشخوارکنندگان می‌باشد که از لحاظ همه‌گیری در رده B تقسیم‌بندی سازمان جهانی حیوانات قرار گرفته است (Vasnich *et al.*, 2005). این بیماری از جنبه شیوع گسترده‌ترین و از لحاظ اقتصادی از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت دامپروری محسوب می‌شود (Douarre *et al.*, 2010). عامل بیماری باسیلی است که در راسته اکتینومایستال و در خانواده مایکوباکتریاسه و جنس مایکوباکتریوم به نام *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* یا به اختصار MAP قرار دارد (Jagdeep *et al.*, 2009; Alexander *et al.*, 2009). وجود دیواره‌های غنی از لیپید، مایکوباکتریوم‌ها را به صورت باکتری‌های آب‌گریز (هیدروفوب) درآورده و نسبت به عوامل محیطی مقاوم می‌نماید. مایکوباکتریوم‌های محیطی در خاک روی نباتات و در آب یافت می‌شوند. مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زای اجباری توسط حیوانات مبتلا دفع می‌شوند و هم‌چنین می‌توانند در محیط برای مدتی طولانی باقی بمانند (Quinn, 2002). تکثیر جرم در مخاط باعث تحریک پاسخ گرانولوماتوزی در ناحیه ایلئوم شده و سپس ناحیه سکوم و انتهای قولون درگیر می‌شود و در موارد پیشرفته بیماری، ضایعات در سراسر روده و عقده‌های لنفوی ناحیه‌ای مشاهده می‌شود. هم‌چنین از علائم بارز مشاهده شده در کالبدگشایی دام‌های مبتلا به بیماری مذکور می‌توان ضخیم شدن دیواره روده به میزان ۳ تا ۴ برابر ضخامت طبیعی همراه با چین‌خوردگی مخاط آن اشاره نمود که ناشی از افزایش سلول‌های اپی‌تلیوئیدی

در لایه‌های زیرین مخاط می‌باشد (حسینی طباطبایی و فیروزی، ۱۳۸۰; De Meneghi *et al.*, 2006). بیماری یون در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۳۹-۱۳۴۰ توسط خلیلی و طلاچیان شناسایی شد آن‌ها عامل بیماری را از مدفوع گاوهای نژاد جرسی وارداتی شرکت نفت آبادان جدا کردند و منشا عفونت را دام‌های وارداتی گزارش نمودند. پس از آن‌ها مقامی و هدایتی در سال ۱۳۴۰ این بیماری را در یک راس گاو هلستاین گزارش کردند (حسینی طباطبایی و فیروزی، ۱۳۸۰). کاهش تولید، افزایش حساسیت به سایر بیماری‌ها، از دست رفتن ارزش ژنتیکی، حذف پیش از موعد، افزایش فاصله بین گوساله‌زایی از پیامدهای اقتصادی این بیماری است. هم‌چنین بیماری مذکور به علت تاثیر روی ترکیبات شیر باعث کاهش چربی، پروتئین و افزایش سلول‌های سوماتیک در آن می‌شود. به طوری که در مطالعه‌ای کاهش تولید شیر بین ۱/۵۸ تا ۷/۲ کیلوگرم در روز بوده است. هم‌چنین با توجه به این‌که دوره کمون بیماری یون در گاو بسیار طولانی است و در طی این زمان حیوانات آلوده قادرند که تعداد زیادی از باکتری عامل این بیماری را دفع کرده و موجب آلودگی محیط شوند بنابراین کنترل بیماری یون بدون در نظر گرفتن آزمون‌هایی که بتواند ناقلین بدون علائم بالینی بیماری مذکور (تحت بالینی) را شناسایی کند امکان‌پذیر نیست (Beaudeau *et al.*, 2007).

از طرف دیگر یکی از جنبه‌های مورد توجه در مورد MAP ارتباط احتمالی آن با بیماری کرون (Crohn's Disease) است که یک بیماری مزمن و مشابه یون در انسان می‌باشد که با توجه به جداسازی باکتری مذکور از بافت روده برخی بیماران مبتلا به بیماری کرون تصور

دارند. امروزه بیشتر روش‌هایی که از PCR برای تشخیص MAP بهره می‌برند مبتنی بر شناسایی قطعه DNA درون جایگیر IS900 هستند (Slana *et al.*, 2008). هدف از انجام این مطالعه آنالیز فیلوژنتیک مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس جدا شده از گاوداری‌های استان تهران می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت توصیفی-مقطعی روی ۱۰۰ نمونه مدفوع گاوهای مشکوک به بیماری یون (واجد علائم بالینی) در استان تهران انجام شد. برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن (DNA Purification DNP TMKIT) استفاده شد و DNAهای استخراج شده تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰-درجه سلسیوس نگهداری شدند. البته با توجه به غلظت بالای عوامل بازدارنده PCR در مدفوع، قبل از استخراج DNA نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق‌سازی شدند. برای انجام آزمایش Nested PCR از جفت پرایمرهای طراحی شده برای شناسایی ژن IS900 به روش دی‌منگی در سال ۲۰۰۵ استفاده شد (De Meneghi *et al.*, 2006). در تمامی آزمایشات PCR از شاهد مثبت و منفی استفاده گردید. نمونه‌ای از MAP که قبلاً با IS900 توالی‌یابی و تایید شده بود، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. کنترل منفی دارای کلیه واکنش‌گرهای PCR به جز DNA الگو بود که هم حجم آن آب مقطر اضافه شد.

**PCR مرحله اول:** برای انجام مرحله اول PCR از پرایمرهای

می‌شود که یکی از عوامل دخیل در ایجاد بیماری مذکور باکتری MAP باشد (Verlain *et al.*, 2011; Elena *et al.*, 2012). عده‌ای از محققان نیز بیان می‌کنند که حتی ممکن است بعد از پاستوریزاسیون شیر نیز این جرم بیماری‌زا در شیر زنده باقی بماند و از این طریق به عنوان یک عامل تهدیدکننده سلامتی در سطح جامعه مطرح بشود. عقیده بر این است که می‌تواند از طریق شیر خام و پاستوریزه و هم‌چنین گوشت و محیط به عنوان یک منبع فرعی، در معرض مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس قرار گیرد (Donaghy *et al.*, 2008). از زمان شناسایی MAP گستره زیادی از روش‌ها برای شناسایی آن در حیوانات آلوده به کار رفته است که شامل تشخیص سنتی بر اساس علائم بالینی، استفاده از روش‌های ایمنی‌سنجی نظیر ELISA (Jorgensen and Jensen, 1978) و روش‌های مولکولی مرتبط با PCR مانند PCR ساده (Vary *et al.*, 1990)، PCR آشیانه‌ای (Stable *et al.*, 2002) و Real-Time PCR (O'mahony and Hill, 2004) و روش کمی Real-Time PCR-REA (Slana *et al.*, 2008) می‌باشد. هم‌چنین روش RFLP همراه با روش PCR یا به اختصار PCR-REA نیز از مدت‌ها قبل برای این کار پیشنهاد شده است (Eriks *et al.*, 1996). حتی بدین منظور در یک گزارش استفاده از روش سلول‌سنجی فاز جامد استفاده و بهینه‌سازی شده است (D' Haese *et al.*, 2005). البته باید توجه داشت که هنوز هم روش کشت سلولی به عنوان روش اصلی در آزمایشگاه‌ها به منظور تشخیص MAP مورد استفاده قرار می‌گیرد (Douarre *et al.*, 2010) در بین روش‌های مذکور روش‌های مبتنی بر PCR به لحاظ سرعت بالا، هزینه کم و حساسیت زیاد جایگاه ویژه‌ای

میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول بود که به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق و به مخلوط واکنش اضافه گردید. سپس با انجام الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد توسط اتیدیوم برمایند رنگ‌آمیزی شد و با استفاده از نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های حاصل از استخراج از روی ژل، همراه با پرایمرهای مربوط جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. ابتدا نوکلئوتیدهای قطعه مربوطه از ژن IS900 که مسئول کد کردن پروتئین فرضی Transposase می‌باشد به وسیله تطبیق توالی نوکلئوتیدی دو رشته Forward و Reverse و توالی پرایمرهای مورد استفاده، به دست آمد (Franck *et al.*, 2012). توالی‌های به دست آمده در بانک ژن ثبت و با انجام آزمون BLAST به وسیله نرم‌افزارهای Bioedit و DNASTAR آنالیز فیلوژنتیک انجام شد و با یافته‌های سایر کشورها مقایسه و نتایج تحلیل و تفسیر گردید.

#### GyrA locus 34 Primer

F: TGGTCTTCACCCAGGGCCGGG  
۴۳bp

R: TTGAGCGACAGCAGGTAGTCGTCGGCG

#### GyrB locus 45 Primer

F: TTGGTGCGCCGCAAGAGCGCAACCG  
۴۱۷bp

R: ATTCAGCTTGTACAGCGGTGGC

### یافته‌ها

کیفیت DNAهای استخراج شده پس از الکتروفورز روی ژل آگارز مشاهده و مورد تایید قرار گرفت و برای انجام Nested-PCR مناسب تشخیص داده شد. از ۱۰۰ نمونه مورد مطالعه با روش PCR، ۲۸ نمونه مثبت شد و از آن ۱۴ نمونه به توالی‌یابی ارسال گردید (شکل ۱).

S1: 5'-

GGGTTGATCTGGACAATGACGGTTA-3'  
572 bp

R3: 5'-AGCGCGGCACGGCTCTTGTT-3'

استفاده شد که محصول جفت پرایمر مذکور پس از انجام آزمایش PCR قطعه‌ای به اندازه ۵۷۲ bp می‌باشد و واکنش‌گرهای مربوط به PCR مرحله اول در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر باهم مخلوط گردیدند. این مخلوط شامل ۲/۵ میکرولیتر از DNA الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول dNTPMix، ۱/۵ میکرومول MgCl<sub>2</sub> و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۲/۵ واحد از آنزیم Tag DNA Polymerase بود که همگی از شرکت سیناژن ایران تهیه شده بودند. واکنش‌گرهای PCR روی یخ مخلوط گردیده و بلافاصله نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) قرار گرفته سپس برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده شامل: ۹۴ درجه سلسیوس ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۷ دقیقه تنظیم و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سلسیوس ۷ دقیقه تنظیم گردید (De Meneghi *et al.*, 2006).

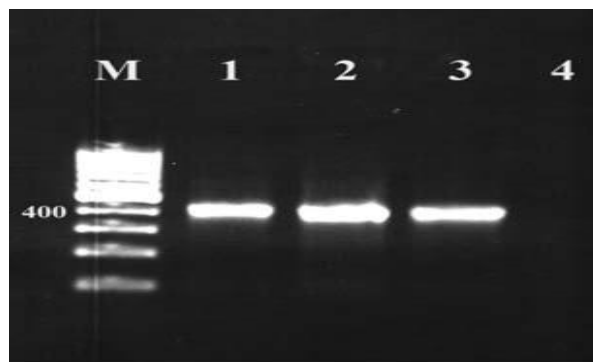
**PCR مرحله دوم:** برای انجام مرحله دوم PCR از پرایمرهای

S2: 5'-

GGAGGTGGTTGTGGCACAACCTGT-3'  
432 bp

R1: 5'-CGATCAGCCACCAGATCGGAA-3'

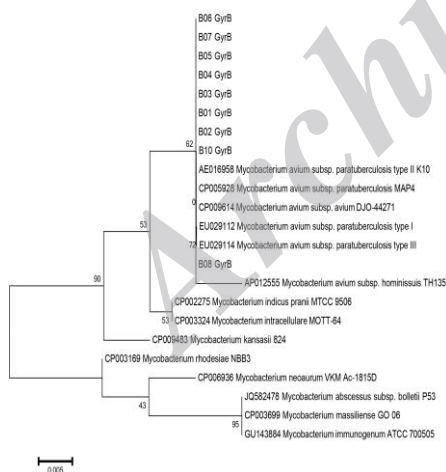
استفاده شد که محصول جفت پرایمر مذکور پس از انجام آزمایش PCR قطعه‌ای به اندازه ۴۳۲ bp می‌باشد. در این مرحله همه شرایط مانند مخلوط واکنش‌گرهای PCR و برنامه زمانی و دمایی مطابق مرحله اول بود با این تفاوت که DNA الگوی مورد استفاده شامل ۲/۵



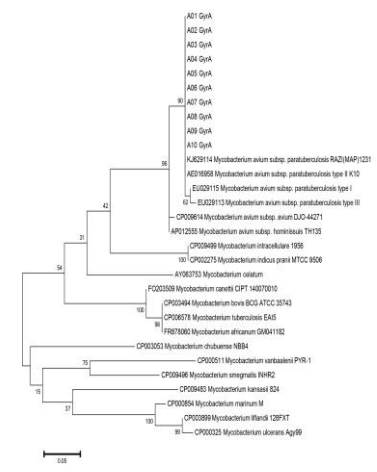
شکل ۱- نتایج حاصل از Nested PCR برای تشخیص MAP شماره‌های ۱ و ۲ نمونه‌های آلوده و شماره‌های ۳ کنترل مثبت و ۴ کنترل منفی می‌باشد (مارکر ۵۰bp شرکت فرماتاز)

شده در NCBI ترسیم درخت شباهت به صورت زیر انجام شد (شکل‌های ۳ و ۲). توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های ثبت شده در NCBI بالای ۹۹ درصد شباهت را نشان داد (جداول ۱ و ۲).

**بررسی و مقایسه توالی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی**  
نتیجه توالی‌یابی‌ها پس از بلاست در دیتابانک NCBI با یکدیگر و جدایه‌های موجود در Gene Bank مقایسه شد و توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Bioedit و DNASTAR آنالیز فیلوژنتیک انجام شد. پس از Alignment توالی مورد هدف با دیگر توالی‌های ثبت



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه ژن GyrB با جدایه‌های سایر نقاط مختلف جهان بر اساس توالی نوکلئوتیدی



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه ژن GyrA در مقایسه با جدایه‌های سایر نقاط مختلف جهان بر اساس توالی نوکلئوتیدی

جدول ۱- درصد شباهت‌ها و تفاوت‌های موجود در توالی‌های جدا شده ژن GyrA با جدایه‌های سایر نقاط مختلف جهان

Percent Identity														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	1	A01_GyrA	
2	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	2	A02_GyrA	
3	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	3	A03_GyrA	
4	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	4	A04_GyrA	
5	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	5	A05_GyrA	
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	6	A06_GyrA	
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	7	A07_GyrA	
8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	99.8	100.0	99.5	8	A08_GyrA	
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	99.8	100.0	99.5	9	A09_GyrA
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	99.8	100.0	99.5	10	A10_GyrA
11	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	99.8	99.8	11	EU029115_MAP_type_I	
12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	99.5	12	AEO16958_MAP_type_II_K10	
13	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2	0.5	13	EU029113_MAP_type_III

جدول ۲- درصد شباهت‌ها و تفاوت‌های موجود در توالی‌های جدا شده ژن GyrB با جدایه‌های سایر نقاط مختلف جهان

Percent Identity													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	1	B01_GyrB
2	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	2	B02_GyrB
3	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	3	B03_GyrB
4	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	4	B04_GyrB
5	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	5	B05_GyrB
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	6	B06_GyrB
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	99.8	100.0	99.5	7	B07_GyrB
8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	99.8	100.0	99.5	8	B08_GyrB
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	99.8	100.0	99.5	9	B10_GyrB
10	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	99.8	99.8	10	EU029112_MAP_type_I	
11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	99.5	11	AEO16958_MAP_type_II_K10	
12	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2	0.5	12	EU029114_MAP_type_III

## بحث و نتیجه‌گیری

موفقیت برنامه‌های کنترل بیماری یون به وجود یک روش تشخیصی سریع و دقیق نیاز دارد که به وسیله آن بتوان حیوانات ناقل این عامل عفونی را تشخیص و کنترل نمود. با وجود ابداع روش‌های گوناگون تشخیص مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در حیوانات، به کارگیری بسیاری از این تکنیک‌ها مستلزم صرف وقت و هزینه‌های گزافی می‌باشد. با کشف واکنش زنجیره‌ای پلیمرز محققان نسبت به کاربرد این روش ارزشمند در تشخیص عوامل عفونی به ویژه میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت و یا دیررشد تشویق شدند. بیماری یون یک بیماری روده‌ای گرانولوماتوز و مزمن است که در طیف وسیعی از نشخوارکنندگان ممکن است ایجاد شود. این بیماری غالباً به صورت دهانی-مدفوعی و هم‌چنین از طریق شیر و جفت آلوده انتقال می‌یابد (Berghaus *et al.*, 2005) و به علت بیماری‌زایی مشترک بین انسان و حیوان و خسارت ناشی از کاهش

تولید در گله‌های درگیر از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. ژنوم این باکتری از حدود ۵ میلیون جفت باز در یک کروموزوم حلقوی با بیش از ۴۵۰۰ ژن تشکیل شده است و طول متوسط هر ژن در آن ۱۰۱۵ جفت باز می‌باشد. ژن‌های بیماری‌زای مرتبط با این باکتری شامل *hspx*، *F57* و *IS900* هستند که ما در این تحقیق از توالی درون جایگیر *IS900* برای شناسایی پاراتوبرکلوزیس استفاده کردیم. به منظور حصول اطمینان از وجود DNA باکتری MAP در نمونه‌ها با کمک پرایمرهای تحت‌ژنوتیپ‌های ژن‌های *GyrB* و *GyrA* مجدداً برای افزایش دقت شناسایی پی‌سی‌آر شدند. نتایج حاصل از این مقایسه قرابت بیش از ۹۹ درصدی جدایه‌ها را تایید نمود. البته توالی سکانس شده از ژن *IS900* مربوط به MAP می‌باشد که یک ژن حفاظت شده است. دلیل انتخاب این ژن کسب اطمینان صددرصدی از MAP بودن جدایه‌ها و عدم وجود خطا در مراحل مختلف آزمایش بود. هم‌چنین باکتری

دقت برای رسم درخت فیلوژنتیک از تعداد بیشتری نمونه استفاده گردید که ضمن تایید نتایج فوق، تطابق نتایج با گزارش قبلی از کشور ایران را نشان می‌دهد. طوری که جدایه (KJ629114) از کشور ایران با جدایه‌های حاصل از تحقیق حاضر خویشاوندی نزدیک‌تر و بیشتری دارد. علاوه بر این، نتایج حاصل از تحقیق حاضر با سایر نتایج گزارش شده در مورد MAP از سایر کشورها اختلاف را نشان می‌دهد که این اختلافات در جدایه‌های (CP009614)، (AP012555)، (CP009499)، (CP002275)، (AY063753)، (CP000325)، (CP003899) و (FO203509) در درختچه فیلوژنتیکی (شکل ۲) به‌طور واضح مشاهده می‌شود. نتایج مشابهی در مورد ژن GyrB نیز مشاهده گردید که جدایه‌های به‌دست‌آمده از این تحقیق (۱۰) جدایه GYRB1 الی GYRB10 بسیار مشابه هم بوده به‌طوری‌که، اختلافی بین نمونه‌های تعیین توالی شده وجود ندارد. هم‌چنین، با توجه به دندروگرام ژن GyrB نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با جدایه (AE 016958) از کشور آمریکا کاملاً مشابهت داشته ولی با جدایه‌های حاصل از کشور اسپانیا (EU 029112) ۹۹/۸ درصد و جدایه (EU 029114) ۹۹/۵ درصد شباهت دارند (شکل ۳)، که این تفاوت مربوط به تغییر نوکلئوتیدی T→C در توالی جایگاه شماره ۷۴ در هر دو نمونه و تغییر نوکلئوتیدی C→T در جایگاه شماره ۳۴۷ در نمونه (EU 029114) است. هم‌چنین با توجه به درختچه فیلوژنتیکی، جدایه‌های حاصل از تحقیق حاضر با جدایه‌های (CP009614) و (CP005928) خویشاوندی بیشتری دارد.

مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس دارای ژن‌های GyrA و GyrB می‌باشد. A و B دو تحت‌واحد آنزیم DNA Gyrase می‌باشند که از طریق هیدرولیز ATP منجر به باز شدن مولکول DNA (کاهش فشار داخلی DNA از طریق تبدیل سوپرکویل‌های منفی و مثبت به حالت استراحت) می‌شود که در ضمن این عملکرد میزان Linking number (عدد پیچش) را به مقدار دو عدد تغییر می‌دهد. در این مطالعه با پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مذکور توانستیم آنالیز فیلوژنتیک مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس را انجام دهیم. نتایج تعیین توالی برای ژن GyrA نشان‌داد که بین نمونه‌ها تفاوت نوکلئوتیدی وجود ندارد. به عبارتی، با توجه به دندروگرام ژن GyrA مشخص گردید که جدایه‌های حاصل از تحقیق حاضر (۱۰) جدایه GYRA1 الی GYRA10 (EU 029113) و (EU 029115) کشور اسپانیا جدایه‌های (EU 029113) و (EU 029115) و کشور آمریکا جدایه (AE 016958) مورد مقایسه قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد که نتایج این تحقیق با نتایج گزارش شده از کشور آمریکا کاملاً مطابقت دارد و با نتایج گزارش شده با توجه به درختچه‌ها از کشور اسپانیا به ترتیب برای جدایه‌های (EU 029115) و (EU029113) ۹۹/۸ و ۹۹/۵ درصد شباهت نشان می‌دهد و تفاوت مشاهده‌شده مربوط به تبدیل نوکلئوتیدی C→A در جایگاه شماره ۱۱۸ در هر دو جدایه و تبدیل نوکلئوتیدی C→T در جایگاه شماره ۲۸۲ در جدایه (EU029113) می‌باشد. جهت افزایش

سینگ و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ بررسی حساسیت Milk-ELISA و PCR IS900 مدفوعی و کشت مدفوع و کشت شیر در گوسفندا و بزها نشان دادند که حساسیت کشت مدفوع ۸۴/۶٪، کشت شیر ۹۶/۱٪، Milk-ELISA ۸۸/۴٪ و PCR مدفوعی ۲۳٪ بود (Singh, 2007). ولز و همکاران، در بررسی دیگری برای تشخیص شیوع مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس توسط PCR مدفوعی و Milk-ELISA در ۱۸۰۸ نمونه در گاوهای شیری، PCR مدفوعی ۲۳٪ و Milk-ELISA ۲۵/۷٪ موارد مثبت را نشان دادند (Wells, 2006). در مطالعه دیگری که توسط حق خواه و همکارانش در سال ۱۳۸۷ در کشور ایران، در استان فارس، برای تعیین شیوع بیماری به وسیله PCR شیر بالک تانک انجام شد، از ۱۱۰ گله در سه منطقه استان فارس (شیراز، مرودشت و سپیدان) نمونه‌گیری انجام شد که از این تعداد ۱۲ گله (۱۱٪) بر اساس تست IS900-PCR مثبت بوده‌اند. شیوع بیماری در مناطق مختلف تفاوتی از ۸/۶٪ تا ۲۳٪ نشان می‌دهد. آمار پایین آلودگی گله‌ها در استان فارس با آمار به دست آمده در استان تهران در این تحقیق، تفاوت فاحشی دارد. البته در این مطالعه حجم نمونه شیر بالک تانک برای استخراج DNA، ۰/۵ میلی‌لیتر شیر بوده‌است. استفاده از مقادیر پایین نمونه شانس جداسازی باکتری را کاهش می‌دهد (حق خواه و همکاران، ۱۳۸۷). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲، استابل و همکارانش در ۶۱ گله از ۱۰ ایالت کشور آمریکا انجام داده‌اند، نتایج حاصل از الیزا و کشت مدفوع انفرادی گاوها را با نتایج حاصل از PCR و کشت شیر بالک تانک گله‌ها، مورد مقایسه قرار داده‌اند. تمام گله‌های انتخاب شده، حداقل یک مورد گاو الیزا

با توجه به دندروگرام ژن GyrB سایر نمونه‌های گزارش شده از سایر کشورها تفاوت بیشتری را نشان می‌دهند که این تفاوت‌ها در بخش نتایج (شکل ۳) در نمونه‌های (JQ582478)، (CP003324)، (GU143884)، (CP006936) و (CP002275) مشاهده می‌شود. دلیل تفاوت‌های مشاهده شده بین نمونه‌ها ممکن است به دلیل تفاوت‌های منطقه‌ای باشد.

بنابراین، با بررسی این تفاوت‌ها و شباهت‌ها مشخص شد که جدایه‌های حاصل از ژن‌های GyrA و GyrB با همدیگر کاملاً مطابقت داشته و شباهت صددرصدی دارند. به طور کلی توالی‌های به دست آمده بیش از ۹۹ درصد با توالی‌های موجود در بانک ژنی (Gene Bank) شباهت داشت. جیمز و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای نشان دادند که بین بیماری کرون در انسان و بیماری یون در حیوان شباهت‌هایی وجود دارد است. هم‌چنین، با روش PCR از تعداد ۳۰ نمونه MAP تایید کردند که VGI-17 و VGI-18 در ایزوله‌های حاصل از این بیماری مشترک می‌باشند (James *et al.*, 2011). هم‌چنین فرانک و همکاران، در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای مشخص کردند که با تکنیک‌های IS900-RFLP و PFGE می‌توان سویه‌های MAP را به دو نوع بزرگ اغلب با نام گوسفندی (S-type) و یا گاوی (C-type) تقسیم کرد که این‌ها دارای یک سری تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی بین ایزوله‌ها هستند (et al., 2012). در سال ۲۰۱۲ تحقیقی که توسط جان و همکارانش صورت گرفت، نشان دادند که بین سویه‌های مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس گاو و گوسفند ارتباط وجود داشته و این آنالیز می‌تواند در تشخیص افتراقی فنوتیپی مختلف کمک کند (John, 2012).



مایکوباکتین جی و یا دارای مایکوباکتین جی دریافتند که از میان نمونه‌های مدفوع دارای علائم بالینی به ترتیب ۸۱/۳٪ درصد و ۸۷/۱۵٪ به ترتیب با روش‌های کشت و مولکولی مثبت شدند، در حالی که بررسی نمونه‌های مدفوع دام‌های فاقد علائم بالینی نشان داد که ۱۱/۷٪ و ۹/۷٪ به ترتیب با روش‌های کشت و مولکولی مثبت بودند (سیدین و همکاران، ۱۳۸۹). هم‌چنین در تحقیق دیگری که توسط نصیری و همکاران انجام شد، از ۲۴۳ نمونه مدفوع و ۵۶ نمونه شیر خام از دام‌های مشکوک گاوداری‌های اطراف مشهد پس از استخراج DNA به منظور شناسایی نمونه‌های آلوده، تکثیر قطعه درون جای گیر اختصاصی MAP به نام IS900 و جهت تعیین جدایه گاوی و گوسفندی MAP تکثیر قطعه درون جای گیر IS1311 صورت گرفت، سپس قطعات حاصله به کمک آنزیم HinfI هضم شدند. در مطالعه ایشان مشخص گردید که تعداد ۱۰۷ نمونه از ۲۴۳ نمونه مدفوع (۴۴٪) و ۱۰ نمونه از ۵۶ نمونه شیرخام (۱۸٪) مورد مطالعه، آلوده به MAP بودند. هم‌چنین، با هضم آنزیمی نشان دادند که تمامی MAP‌های شناسایی شده از جدایه گاوی می‌باشند (نصیری و همکاران، ۱۳۹۱). در مطالعه دیگری دیلمقانی و همکاران از تعداد ۴۰۰ رأس گاو در منطقه ارومیه، با استفاده از کشت مدفوع مشخص کردند که باکتری جدا شده MAP است و در بین نمونه‌ها نتیجه کشت در ۱۲٪ (n=۴۸) مثبت و در بقیه موارد منفی بود (دیلمقانی و همکاران، ۱۳۹۰). شرافتی چالشتی و همکاران در تحقیقی از ۱۰۰ نمونه شیر خام گاوهای گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی شهرکرد با انجام روش PCR، ۳٪ را مثبت به دست آوردند (شرافتی چالشتی و همکاران، ۱۳۸۸) برخی از

مثبت داشتند. از هرکدام از گله‌های تحت بررسی در این مطالعه، علاوه بر نمونه‌گیری شیر بالک تانک برای PCR، متناسب با سایز گله تعدادی گاو انتخاب شده و از آن‌ها کشت مدفوع به عمل آمد (در مجموع ۷۱۲ گاو که به صورت اتفاقی از ۶۱ گله انتخاب شده بودند). در این مطالعه ۳۵ فارم (۶۸٪) در تست IS900 Nested-PCR مثبت بودند. جالب توجه اینکه ۱۱ گله (۵۲/۴٪) از گله‌هایی که هیچ مورد مثبتی در کشت مدفوع نداشتند، در تست PCR مثبت بودند و بقیه موارد مثبت از ۲۴ گله‌ای بود که حداقل ۱ مورد کشت مثبت مدفوع داشتند. ولی در ۷ گله که حداقل یک مورد کشت مثبت داشتند، جواب PCR شیر منفی بوده است. هم‌چنین، ۷۹٪ گله‌هایی که حداقل سه رأس گاو الیزا مثبت داشتند، کشت شیر بالک تانک مثبت داشته‌اند. این درصد در گله‌هایی که یک یا دو رأس گاو الیزا مثبت داشته‌اند، برابر با ۴۹٪ است. این محققان بر این نکته تاکید داشتند که حتی در گله‌های الیزا مثبتی که کشت مدفوع گاوها منفی می‌باشد، امکان آلودگی شیر به باکتری MAP وجود دارد (Stable et al., 2002). دوستی و مشکلائی در مطالعه‌ای از تعداد ۱۲۰ نمونه مدفوع گاوهای مشکوک به یون با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن IS900 و آزمون Nested PCR مشخص کردند که از مجموع ۱۲۰ نمونه مورد بررسی، ۲۲ مورد (۱۸/۳۳٪) به مایکوباکتریوم پارتویرکلوزیس آلوده بودند که در آزمون PCR مثبت تشخیص داده بودند (دوستی و مشکلائی، ۱۳۸۸) در مطالعه‌ی دیگری سیدین و همکاران از دام‌های با و بدون علائم بالینی یون به ترتیب ۱۶ و ۱۰۳ نمونه مدفوع را با استفاده از روش Nested PCR و کشت در محیط‌های هرولد فاقد

لذا تکثیر ژن مذکور با PCR توان تشخیص بیماری یون را حتی در مراحل اولیه بیماری که تعداد میکروارگانیسم‌ها ناچیز است، دارا می‌باشد. هم‌چنین در تعیین توالی‌یابی و بررسی تحت‌ژنوتیپ‌های ژن‌های GyrA و GyrB مشاهده شد که سویه‌های ما ۹۹ درصد با سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی NCBI هم‌خوانی دارد. با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده شد جدایه‌های KJ629114 و AE016958 بیشترین شباهت و جدایه CP000325 بیشترین تفاوت را با جدایه‌های حاصل از این تحقیق در ژن GyrA دارند. در مورد ژن GyrB نیز بیشترین شباهت مربوط به جدایه AE016985، CP005928 و CP009614 و بیشترین تفاوت مربوط به جدایه GU143884 می‌باشد که نتایج تحقیقات قبلی با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد.

پیشنهاد می‌شود توالی مناطق دیگری از ژنوم مربوط به جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق و مقایسه آنها با یکدیگر به منظور شناخت بیشتر قرابت و تفاوت‌های فیلوژنتیکی موجود در جدایه‌های انسانی و دامی صورت پذیرد. همچنین توصیه می‌شود، بررسی مولکولی اپیدمیولوژی جدایه‌های دامی در سایر مناطق ایران انجام گیرد.

### سپاسگزاری

نگارندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از پرسنل آزمایشگاه مبنا که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند، اعلام می‌دارند.

مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر نشان داده‌است که روش PCR ساده و یک مرحله‌ای در برخی از موارد قادر به تشخیص دقیق عامل عفونی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به‌ویژه در شرایط مقدار کم DNA الگو نیست به همین دلیل، برای تشخیص این عامل عفونی در این تحقیق از روش مطمئن‌تر و حساس‌تر Nested-PCR به دلیل توانایی جستجو و تکثیر مقادیر بسیار اندک DNA استفاده شد. از طرفی تشخیص مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس در مدفوع، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا، مهم‌ترین راه انتشار این باکتری پخش مدفوع حیوانات آلوده در محیط می‌باشد. یکی از مزایای روش به‌کار رفته در این مطالعه این است که به صورت مستقیم و بدون نیاز به کشت و یا اطلاع از وضعیت بالینی و کلینیکی دام می‌توان به بررسی نمونه‌های مدفوعی گرفته‌شده از دام پرداخت و با اطمینان زیادی سلامت و یا آلودگی دام مربوط را نسبت به مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس گزارش نمود. با توجه به اینکه حیوان آلوده علائم بالینی خاصی از خود بروز نمی‌دهد و از سوی دیگر به دلیل بقای مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس در طول پاستوریزاسیون، بنابراین تشخیص سریع و دقیق این باکتری با استفاده از روش Nested-PCR اهمیت زیادی دارد. (دوستی و مشکلائی، ۱۳۸۸). نتایج تحقیق حاضر نمایانگر توانایی و دقت آزمایش طراحی شده برای تشخیص و تکثیر مناسب ژن IS900 در مخلوط واکنش می‌باشد. به دلیل آن‌که مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس دارای ۱۰ کپی از ژن IS900 می‌باشد،

## منابع

- حسنی طباطبایی، ع. و فیروزی، ر. (۱۳۸۰). بیماری‌های باکتریایی دام. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۴۱۴.
- حق‌خواه، م.، انصاری لاری، م.، نوین باهران، ا. و بهرامی، ا. (۱۳۸۷). تعیین میزان شیوع میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس بر روی نمونه‌های تانک شیر به‌روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در استان فارس. شماره ۸۸، صفحات: ۸-۱۳.
- دوستی، ع. و مشکلائی، س. (۱۳۸۸). تشخیص میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای در گاوهای شیری مشکوک به بیماری یون. مجله دنیای میکروب‌ها، سال دوم، شماره ۱، صفحات: ۲۲-۱۹.
- دیلمقانی، م.، یوسف بیگی، ق.، کاظم نیا، ع. و اسمعیل نژاد، ب. (۱۳۹۰). جداسازی MAP از گاوان منطقه ارومیه. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۹۳، صفحات: ۱۷-۱۳.
- سیدین، س.، تاجبخش، ح. و زهرایی صالحی، ت. (۱۳۸۹). شناسایی میکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه‌های مدفوع گاوهای نژاد هلشتاین-فریزین با استفاده از روش‌های کشت و مولکولی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۵، شماره ۲، صفحات: ۱۴۰-۱۳۵.
- شرافتی چالشتی، ر.، شاکریان، ا.، ممتاز، ح. و شرافتی چالشتی، ف. (۱۳۸۸). شناسایی میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به‌روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در نمونه‌های شیر خام گاوهای شهرکرد. مجله علوم آزمایشگاهی، دوره ۳، شماره ۱، صفحات: ۲۰-۱۵.
- نصیری، م.، جهاندار، م.، سلطانی، م.، مهدوی، م. و دوستی، م. (۱۳۹۱). شناسایی و تعیین سویه میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به‌روش PCR و REA بر اساس قطعات درون جای‌گیر IS900 و IS1311. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۴، شماره ۱، صفحات: ۹۶-۸۳.
- Alexander, D.C., Turenne, C.Y. and Behr, Ma. (2009). Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 19(3): 1018-1025.
- Beaudreau, F., Belliard, M., Joly, A. and Seegers, H. (2007). Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection in dairy Cows. *Veterinary Research*, 38(4): 625-634.
- Berghaus, R.D., Lombard, J.E., Gardner, I.A. and Farver, T.B. (2005). Factor analysis of a Johne's disease risk assessment questionnaire with evaluation of factor scores and a subset of original questions as predictors of observed clinical paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 12: 291-309.
- D' Haese, E., Dumon, I., werbrouck, H.J. and Heman, L. (2005). Improved detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *The Journal of Dairy Research*, 72: 125-128.

- De Meneghi, D., Nebbia, P., Robino, P. and zoppi, S. (2006). detection and excretion pattern of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis of milk of asymptomatic sheep and goats by nested-PCR. *Small Ruminant Research*, 6: 116-120.
- Donaghy, J.A., Rowe, M.T., Rademaker, J.L., Hammer, P., Herman. L. and De Jonghe, V. (2008). An inter-Laboratory ring trial for the detection and isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. *Journal of Food Microbiology*, 25(1): 128-135.
- Douarre, P.E., Cashman, W., Buckley, J., Coffey, A. and O'Mahony, J.M. (2010). Isolation and detection of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. *Gut Pathogens*, 2: 110.
- Elena, C., Lucia, D.J., Lucas, D. and Alicia, A. (2012). Progress in molecular typing of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis; *Research in Veterinary Science*, 92: 169-179.
- Eriks, I.S., Munck, K.T., Besser, T.E., Cator, G.H. and Kapur, V. (1996). Rapid differentiation of Mycobacterium avium and Mycobacterium paratuberculosis by PCR and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 734-737.
- Franck, B., Iker, A.S., Thierry, C., Joseba, M., Ramón, A. and Karen, S. (2012). Inter- and Intra-subtype genotypic differences that differentiate Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis strains. *Biet et al., BMC Microbiology*, 12: 1471-2180.
- Jagdeep, S.A., Neelam, S., Krishnamoorthy, N., Vani, B., Shoorvir, S. and Swati, S. (2009). Genomic analysis of local isolate of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 134: 375-382.
- James, W., Torsten, S., Dieter, M., Josef, W. and Wojtek, P. (2011). Exploring the zoonotic potential of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis through comparative genomics. *PLoS ONE*, www.plosone.org. 6(7): 221-171.
- John, P. (2012). Genome sequencing of ovine isolates of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis offers insights into host association. *Bannantine et al., BMC Genomics*, 13(89): 1471-2164.
- Jorgensen, J.B. and Jensen, P.T. (1978). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibody-ies to Mycobacterium paratuberculosis in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 19: 310-312.
- O'Mahony, J. and Hill, C. (2004). Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DNA in artificially contaminated milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4561-4568.
- Quinn, P.J. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 1st ed., USA: Blackwell Science Company, pp: 97-105.
- Stable, J., Wells, S. and Wagner, B. (2002). Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for John's disease in us dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 85: 525-533.

- 
- Singh, S.V. (2007). Evaluation of highly sensitive indigenous milk ELISA kit with fecal culture, milk culture and fecal- PCR for the diagnosis of bovine Johne's disease (BJD) in India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30(3): 175-186.
  - Slana, I., Kralik, P., Karalova, A. and Pavlik, I. (2008). On-farm spread of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 250-257.
  - Vary, P.H., Andersen, P.R., Green, E., Hermon-Taylor, J. and Mc Fadden, J.J. (1990). Use of highly specific DNA probe and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Jone's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 933-937.
  - Vasnick, E., Vercammen, F., Bauwens, L., D'Haese, E., Nelis, H. and Geysen, D. (2005). A survey for *Mycobacterium avium* subspecies *partuberculosis* in the Royal zoological society of Abtwerp. *Veterinary Journal*, 170: 249-256.
  - Verlaine, J., Michelle, M., Gehringer, M., Mitchell, G. and Brett, A. (2011). How accurately can we detect *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection? *Journal of Microbiological Methods*, 85: 1-8.
  - Wells, S.J. (2006). Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13(10): 123-125.