

پاراتوبر کولوزیس در نشخوار کنندگان، جستجوی مولکولی بدنبال شواهد وجود مایکوباکتریوم ایویوم زیر گونه پاراتوبر کولوزیس Type I و Type II در ایران

• کیوان تدین (نویسنده مسئول)

دکترای تخصصی، استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی رئیس بخش

• نادر مصوری

دکترای تخصصی، استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی رئیس بخش

• روح اله کشاورز

دانشجوی دکترا مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• امیر حسین شاهمرادی

دکترای دامپزشکی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• رایناک قادری

دکترای تخصصی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی معاون بخش

• محمد سخاوتی

دانشجوی دکترا مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• مریم مهره کش حقیقت

دانش آموخته کارشناسی ارشد، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تاریخ دریافت: شهریور ۹۴ تاریخ پذیرش: مهر ۹۴

Email: k.tadayon@rvsri.ir



چکیده

پاراتوبر کولوزیس یک نوع التهاب گرانولوماتوز مزمن و پیشرونده غیر قابل درمان روده می باشد که توسط مایکوباکتریوم ایویوم زیر گونه پاراتوبر کولوزیس (*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* MAP) ایجاد می گردد. پاراتوبر کولوزیس در تمام جهان در میان نشخوار کنندگان دیده می شود. نخستین گزارشات پاراتوبر کولوزیس در ایران به دهه ۱۹۶۰ میلادی باز می گردد زمانی که بیماری در میان دام های وارداتی گاوداری شرکت نفت آبادان شناسایی گردید. در مطالعه حاضر تعداد ۱۳ جدایه کلینیکی MAP شامل ۴ جدایه گوسفندی و ۳ جدایه بز از استان اصفهان همراه با ۳ جدایه گاوی از استان زنجان و ۳ جدایه گاوی از استان البرز در کنار دو سویه واکسینال MAP ۳۱۶F و MAP III & V توسط آزمایش های مستقل PCR-IS ۹۰۰، PCR-F57 به منظور تعیین هویت و PCR-Collins به منظور تعیین تیپ باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. در نتیجه اجرای این بررسی از نظر تکنیکی امکان اجرای هر سه آزمایش با استفاده از یک پروتکل واحد PCR فراهم گردید و علاوه بر این هویت همه ۱۵ جدایه کلینیکی و سویه واکسینال مورد بررسی به عنوان تیپ های گاوی MAP (Type II) مورد تأیید قرار گرفت. مشاهده انحصاری این تیپ در میان باکتری های تحت بررسی علیرغم بزرگتر بودن جمعیت گله گوسفند و بز کشور در مقایسه با گله گاو از نظر اپیدمیولوژیکی جالب توجه بنظر می رسد.

کلمات کلیدی: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, IS900, F57, Type I, Type II

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 110 pp: 89-95

Paratuberculosis in ruminants, a molecular search for traces of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* type I and type II in Iran

By: Tadayon, K., (Corresponding Author), Assistant Professor of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran. Mosavari, N., Assistant Professor of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran. Keshavarz, R., PhD Student of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran. Shahmoradi, AH., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran. Ghaderi, R., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran.; Sekhavati M., PhD Student of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran. and Mohrekesh Haghighat, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran.

Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Received: August 2015 Accepted: September 2015

Paratuberculosis caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) is a progressive, chronic and non-curable granulomatous enteritis. Paratuberculosis affects ruminants worldwide. The earliest reports on paratuberculosis in Iran date back to 1960's when the disease was diagnosed in imported animals of the Abadan Oil Company's farm. In the work presented here 13 field MAP isolates including 4 ovine and 3 caprine isolates from Isfahan, 6 bovine isolates from Zanjan and Alborz provinces plus 2 vaccinal strains of 316F and III & V were subjected to PCR-IS 900, PCR-F57 for identification and also PCR-Collins for typing. In consequence, while an identical PCR protocol was successfully developed to simultaneously perform all the three experiments, the 15 tested bacteria were all shown to be MAP Type II (cattle type). In epidemiological sense, when the size of national goat, sheep and cattle herds of Iran is taken into account, circulation of MAP Type II is intriguing.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, IS 900, F57, Type I, Type II

مقدمه

مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکولوزیس *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) التهاب مزمن روده نشخوارکنندگان می‌گردد که وقوع آن تدریجی و بدون نشانه‌های کلینیکی می‌باشد (۳۲). پاراتوبرکولوزیس تقریباً در تمام جهان در میان نشخوارکنندگان دیده می‌شود (۳۳، ۱۵) و باعث بروز خسارت اقتصادی از طریق تلفات مستقیم دام‌های آلوده، کاهش میزان بهره‌وری اقتصادی و اعمال محدودیت در تجارت دام زنده می‌گردد. پیشینه شناخت پاراتوبرکولوزیس به سال‌های نخستین قرن نوزدهم میلادی باز می‌گردد (۵). وجود پاراتوبرکولوزیس در ایران برای نخستین بار توسط خلیلی در مؤسسه رازی اهواز در محدوده سال‌های ۱۹۶۲ تا ۱۹۶۵ در میان گاوهای اصیل از نژاد Syndhie و Jersaise موجود در گاوداری شرکت نفت آبادان شناسایی و گزارش گردید. واردات این دام‌ها پیش از این تاریخ از انگلستان صورت پذیرفته بود (۲). جداسازی باکتری عامل بیماری در سال ۱۹۶۲ با موفقیت توسط طلاچیان انجام پذیرفت (۲۸). بهارصفت در سال ۱۹۷۲ پاراتوبرکولوزیس را در گله بز (نژاد نجدی) و گوسفند (نژاد آواسی) موسسه دامپروری حیدرآباد کرج که از اسرائیل وارد شده بودند گزارش و موفق به جداسازی عامل بیماری گردید (۲). برخی از پژوهشگران ایرانی منشاء پاراتوبرکولوزیس در ایران را واردات دام‌های آلوده و انتقال عامل بیماری از

این طریق می‌دانند (۲).

در طول یکصد سال گذشته نقش MAP در ایجاد بیماری کرون (Crohn) در انسان همواره مورد مناقشه علمی قرار داشته است (۱۸). بیش از ۱۲۸ مقاله علمی در ارتباط با اهمیت این باکتری به عنوان عامل بیماری مشترک انتشار یافته است (۳۱). کرون در انسان شباهت بسیار زیادی با پاراتوبرکولوزیس در نشخوارکنندگان دارد اما در شرایطی که در MAP در دام‌های مبتلا بسادگی قابل ردیابی است شناسایی آن در انسان بسیار مشکل می‌باشد. با این حال یافته‌های حاصل از روش‌های مولکولی در شناسایی MAP نشانه‌های محکمی را در مورد نقش این باکتری در بروز بیماری Crohn نشان داده‌اند. علاوه بر این‌ها در حال حاضر نقش MAP به عنوان یک باکتری عامل ایجاد بیماری مشترک در ایجاد Blau syndrome، Hashimoto thyroiditis، sarcoidosis و همچنین multiple sclerosis مورد توجه قرار گرفته است (۱۸).

در عمل علیرغم ضررهای اقتصادی گسترده پاراتوبرکولوزیس در صنعت دامپروری ایران مبارزه با آن در اولویت برنامه‌های کشوری سازمان دامپزشکی قرار ندارد. با استناد بر گزارشات موجود به نظر می‌رسد در حال حاضر پاراتوبرکولوزیس با درجات مختلفی از نظر فراوانی در تمام و یا بسیاری از مناطق جغرافیایی ایران در میان گله‌های گاو، گوسفند و بز شیوع داشته باشد (۱-۲، ۸، ۱۶، ۲۰، ۲۷).

ژنتیکی بدست آمده بصورت مستقیم برای تمام آزمایش‌های ژنومی استفاده گردید (۱۲).

آزمایش‌های ژنومی: در مجموع ۳ آزمایش مستقل در دو مرحله تعیین هویت و تایپینگ انجام گردید که همه آن‌ها بر اساس سیستم PCR اجرا گردیدند. در مرحله نخست به منظور تعیین هویت جدایه‌ها و سویه‌ها دو مارکر ژنتیکی هم ارز IS ۹۰۰ و F۵۷ که در بین اعضای جنس مایکوباکتریوم تنها در ژنوم باکتری‌های MAP یافت می‌شوند مورد استفاده قرار گرفتند. پروتکل پیشنهادی Dohmann در مورد PCR-IS ۹۰۰ (۹) با تغییرات اندک و در مورد PCR-F۵۷ از روش Schonenbrucher (۱۷) همراه با اصلاحات کلی و از جمله یک زوج پرایمر جدید استفاده گردید. در مرحله دوم به منظور تعیین تیپ ژنتیکی باکتری‌ها (تیپ گوسفندی و یا گاوی) از پروتکل Collins همراه با اعمال تغییرات محدود در پروتکل اجرا استفاده شد. برای طراحی پرایمر برنامه Primer ۳ (۳۰، ۳۶) مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). برای این منظور حدود ۲Kb از ژنوم MAP K1۰ در حریم لوکوس F۵۷ در هر دو پهلوی آن به شکلی انتخاب گردید که لوکوس مورد نظر از نظر موقعیت تقریباً در میانه قرار گرفته باشد.

چهار پروتکل آمپلی فیکاسیون بصورت مستقل برای هر یک از برای هر سه آزمایش PCR پیش بینی و به گونه‌ای تنظیم گردید که در هر پروتکل واکنش PCR با ۶ دمای مختلف annealing (۵۵، ۵۶/۷، ۵۹/۱، ۶۰/۴، ۶۲/۹ و ۶۴/۹ درجه سانتی‌گراد) اجرا گردید. در همین حال در دو پروتکل میزان پرایمر (۱ و یا ۵ پیکومول) و در دو پروتکل میزان کلرید منیزیم (۱mM یا ۲.۵ mM) بعنوان متغیر اعمال گردید. ساخت پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen®, Korea) انجام گردید. در اجرای واکنش‌های PCR از روش master mix استفاده شد. حجم اجزاء در همه پروتکل‌ها به ترتیبی تنظیم گردید که حجم نهایی هر واکنش برابر با ۱۵ μL گردد. برای اجرای تمام آزمون‌های PCR از کیت تجارتي آمپلیکون (Ampliquor®, Denmark) استفاده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل ۱.۵٪ آگاروز (Invitrogen® USA) از درجه مولکولار بیولوژی پیش رنگ شده با Red Safe* استفاده گردید. ژل‌ها پس از بارگذاری، به مدت ۲ ساعت در میدان الکتریکی به قدرت ۲ V/cm رانده شدند. عکسبرداری از ژل در دستگاه ژل داگ (BioRad®, USA) انجام گردید. به عنوان DNA size marker استاندارد از یک محصول استاندارد شده ساخت مؤسسه رازی (۱۹) استفاده گردید تا امکان تعیین اندازه تقریبی محصولات PCR فراهم شود.

انتخاب پروتکل دما و اجزاء ایده آل در واکنش‌های PCR

یافته‌های مربوط به الکتروفورز واکنش‌های طراحی شده چهارگانه مربوط به لوکوس‌ها بصورت انفرادی و همچنین در کنار سایر لوکوس‌ها مورد بازبینی قرار گرفتند و امکان استفاده از یک و یا چند پروتکل جامع قابل اجرا از نظر دما و غلظت اجزاء (منیزیم کلراید و پرایمرها) برای همه لوکوس‌ها بررسی گردید. بدین ترتیب در مجموع از ۲ پروتکل برای اجزای واکنش‌های PCR (پروتکل نخست در مورد IS ۹۰۰ و F۵۷ و پروتکل دوم در مورد آزمایش Collins استفاده شد. میزان master mix و DMSO در هر سه پروتکل به ترتیب برابر با ۷/۵ و ۰/۶ میکرولیتر بود. در پروتکل

دوره انکوباسیون بسیار طولانی و کندی رشد آزمایشگاهی باکتری در جداسازی اولیه به ویژه در مورد جدایه‌های انسانی و گوسفندی که تا بیش از یکسال می‌تواند بطول انجامد (۲۹) در کنار نیاز باکتری به وجود مکمل آهن (mycobactin j) در محیط کشت آزمایشگاهی، امکان بررسی اپیدمیولوژیکی این پاتوژن در مقیاس مولکولی را محدود به تعداد کمتری از آزمایشگاه‌های تخصصی باکتری شناسی می‌نماید.

در سال‌های اخیر به منظور فراهم نمودن امکان تشخیص MAP با استفاده از روش‌های مولکولار بیولوژی، تعدادی پروتکل PCR بر مبنای مارکرهای ژنتیکی اختصاصی MAP معرفی شده‌اند که از میان آن‌ها می‌توان به IS ۹۰۰ (۳۴)، ISMav۲ (۲۶)، F۵۷ (۳۴)، locus ۲۵۵ (۱۴)، HspX (۲۲) و اشاره نمود.

وجود سویه‌های متمایز MAP دارای ویژگی‌های متفاوت فنوتیپیکی از دهه ۱۹۳۰ میلادی مورد توجه قرار گرفته است اما آگاهی از تفاوت‌های ژنتیکی میان سویه‌های این باکتری تنها در سایه دستیابی بر تکنیک‌های جدید امکان‌پذیر شده است (۲۵). بررسی‌های ژنتیکی بین‌المللی وجود دو تیپ اصلی را در میان سویه‌های MAP نشان داده‌اند که بنام تیپ ۱ یا گوسفندی (S= sheep) و تیپ ۲ یا گاوی (C= cattle) شناخته می‌شوند (۱۳). تمایز میان این تیپ‌ها با استفاده از روش‌های ژنتیکی مختلف امکان‌پذیر گردیده است (۴، ۶، ۲۵). تشخیص افتراقی میان این سویه‌ها توسط سه روش IS ۹۰۰-IS۱۳۱۱-PFGE، PCR-REA RFLP، مقصور گردیده است (۲۳) با این حال در سال ۲۰۰۲ امکان تمایز میان سویه‌های تیپ ۱ و تیپ ۲ با استفاده از یک PCR تک مرحله ای امکان‌پذیر گردید (۶).

در مطالعه حاضر با هدف افزایش دانش اپیدمیولوژیک موجود از MAP در ایران، وجود دو مارکر ژنتیکی IS ۹۰۰ و F۵۷ در ژنوم جدایه‌های کلینیکی ایرانی و دو سویه واکسینال MAP موجود در کلکسیون میکروبی مؤسسه رازی مورد بررسی قرار گرفته است ضمن آنکه با استفاده از روش Collins هویت این باکتری‌ها از نظر تیپ ژنتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جدایه‌ها و سویه‌های MAP مورد بررسی در تحقیق

تعداد ۴ جدایه گوسفندی و ۳ جدایه بزی MAP از استان اصفهان همراه با ۳ جدایه گاوی این باکتری از استان زنجان و همچنین ۳ جدایه دیگر گاوی از استان البرز همراه با ۲ سویه آزمایشگاهی واکسینال MAP III&V در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. جدایه‌های حاد کلینیکی پیش از این در طول سال‌های ۳-۱۳۹۱ از مدفوع و نمونه‌های کلینیکی پاتولوژیک در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی مؤسسه رازی جداسازی شده بودند. از دو سویه واکسینال فوق در مؤسسه رازی برای تهیه و تولید پاراتوبرکولین استفاده می‌شود.

کشت باکتری و استخراج ماده ژنتیکی: به منظور تهیه میزان کافی رشد باکتری جهت دستیابی به ماده ژنتیکی مورد نیاز، هر یک از جدایه‌ها و سویه‌های مورد مطالعه بر روی دو لوله کشت فالكون ۵۰ میلی لیتری محتوی محیط کشت Herold's egg-yolk medium غنی شده با mycobactin J تجدید کشت گردید. انکوباسیون به مدت ۸-۱۲ هفته در دمای ۳۷ °C و تا زمان دستیابی به رشد مشهود باکتری صورت پذیرفت. برای استخراج ژنوم باکتری از روش ساده جوشانیدن استفاده شد و ماده

اختصاصی هم ارز IS ۹۰۰ و F۵۷ استفاده گردید. از طرف دیگر بسیاری از پروتکل‌های PCR-IS ۹۰۰ (۲۱) و تقریباً همه پروتکل‌های مربوط به PCR-F۵۷ (۳) موجود به منظور استفاده از آن‌ها در ماشین‌های Real-time PCR طراحی گردیده‌اند که به جهت قیمت تمام شده بالاتر در مقایسه با ماشین‌های PCR متعارف، انجام آن‌ها در بسیاری از آزمایشگاه‌های باکتری شناسی دامپزشکی امکان پذیر نیست. علاوه بر این اندازه قطعات ژنتیکی پیش بینی شده در Real-time PCR در اکثر موارد کوچک و کمتر از bp ۱۰۰ می باشند که عموماً شناسایی و کار با آن‌ها در سیستم ژل الکتروفورز آسان نیست. بر همین اساس در مطالعه حاضر با طراحی یک زوج پرایمر جدید امکان شناسایی مارکر ژنتیکی F۵۷ از طریق تکثیر یک قطعه به طول bp ۷۰۴ با ماشین PCR متعارف فراهم گردید.

اجرای آزمایشات سه گانه تعیین هویت و تعیین تیپ ژنتیکی بر روی ۱۳ جدایه کلینیکی و ۲ سویه واکسینال موجود در مؤسسه رازی ضمن تایید شناسایی آن‌ها به عنوان باکتری‌های MAP نشان داد که همه آن‌ها متعلق به تیپ گاوی (Type II) هستند. جداسدن تیپ گاوی از گوسفند و بز اگرچه در خارج ایران پیش از گزارش گردیده است. به عنوان مثال در یونان (۱۳)، کانادا (۱۱) و اسپانیا (۷) با اینحال جداسدن این تیپ از MAP از هر سه میزبان گاو، گوسفند و بز در مناطق مختلف جغرافیایی ایران (اصفهان، زنجان و البرز) در مطالعه حاضر می‌تواند از نظر اپیدمیولوژی بیماری حائز اهمیت باشد و بدین ترتیب توسعه مطالعه حاضر و استفاده از جدایه‌های کلینیکی بیشتر در مطالعات بعدی توصیه می‌گردد.

یکی دیگر از یافته‌های کاربردی مطالعه حاضر موفقیت در معرفی یک پروتکل واحد جهت اجرای هر سه آزمایش PCR-IS ۹۰۰ و PCR-F۵۷ و Collins بود که می‌تواند از نظر زمان انجام آزمایش و سرعت دستیابی به پاسخ مورد نظر مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه گیری

مارکرهای ژنتیکی اختصاصی مانند F۵۷ و IS ۹۰۰ می‌توانند در شناسایی و تشخیص افتراقی باکتری‌های نظیر MAP که کشت آزمایشگاهی آن‌ها بدلیل نیاز به مکمل‌های رشد و همچنین دوره انکوباسیون طولانی به سادگی امکان پذیر نیست کمک کنند. از دو تیپ اصلی گاوی (Type II) و گوسفندی (Type I) MAP (تیپ گاوی با تنوع میزبانی در ایران وجود دارد اما آگاهی از وجود تیپ گوسفندی منوط به انجام مطالعات دیگر اپیدمیولوژیک می‌باشد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این مطالعه به طور کامل توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۴۱۰۶-۱۸-۱۸-۲ تامین و پرداخت شده است. شانزدهم دی ماه ۱۳۹۴ مصادف با نودمین سالگرد تاسیس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی گرامی داشته می‌شود.

منابع مورد استفاده

1- Ansari-Lari M, Haghkhan M, Bahramy A, and Novin Baهران AM. (2009). Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies

نخست ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از دو پرایمر، ۴ میکرولیتر از نمونه DNA و ۱/۹ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر و در پروتکل دوم با توجه به حضور پرایمر سوم میزان آب مقطر به ۱/۴ میکرولیتر کاهش یافت. در مورد اجرای مراحل واکنش‌های PCR از یک پروتکل واحد استفاده شد. این پروتکل شامل یک مرحله اولیه گرمایش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C و بدنبال آن ۴۰ نوبت از یک چرخه سه مرحله‌ای مشتمل بر گرمایش در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، گرمایش در دمای ۶۱°C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک مرحله گرمایش ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه، گردید.

نتایج

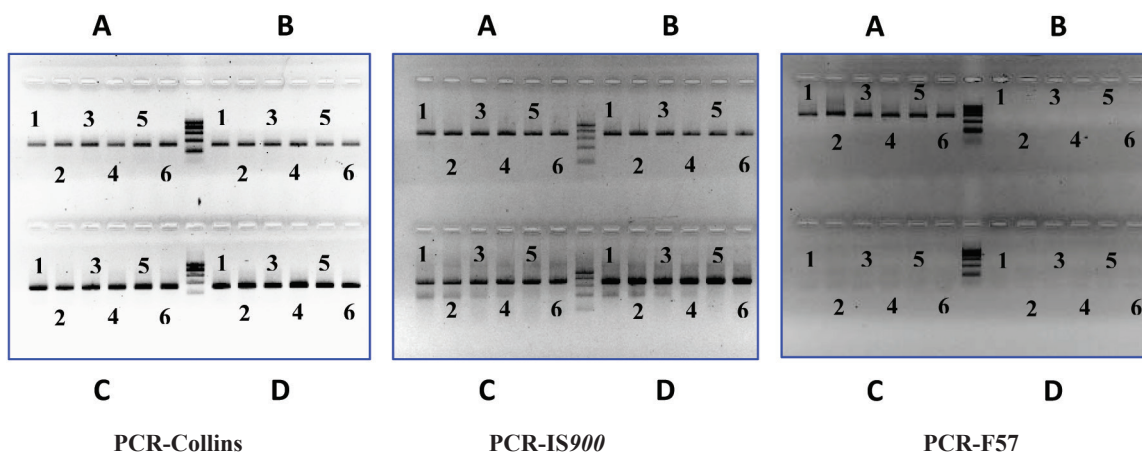
اعمال روش ابتکاری بهینه‌سازی PCR باعث گردید انجام همه آزمایش‌های مولکولی مورد استفاده در این تحقیق اعم از آزمایش‌های تعیین هویت و همچنین آزمایش‌های ژنوتایپینگ Collins با استفاده از بهترین پروتکل اجرایی ممکن از نظر دمای annealing، غلظت کلرید منیزیم و همچنین میزان پرایمر امکان پذیر گردد (شکل ۱). در آزمایش PCR-IS ۹۰۰ و PCR-F۵۷ و PCR-Collins با اجرای پروتکل بهینه شده بر روی ژنوم استخراج شده هر ۱۳ جدایه کلینیکی و هر دو سویه واکسینال قطعاتی به طول به ترتیب bp ۵۶۰ و bp ۷۰۴ و bp ۳۱۰ تولید گردیدند که بدین ترتیب هویت سویه تحت آزمون به عنوان MAP و تیپ آن‌ها به عنوان type ۲ (گاوی) مورد تایید قرار گرفت (شکل ۲).

بحث و نتیجه گیری

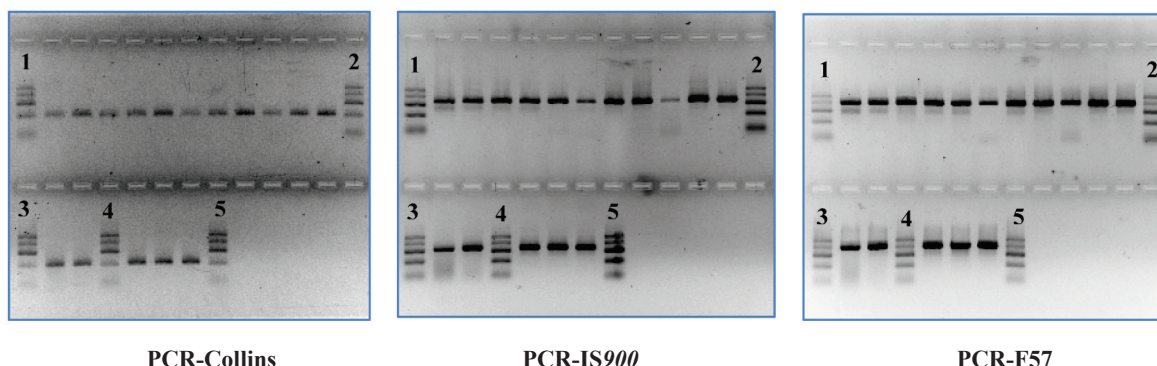
در حال حاضر کشت میکروبی بر روی محیط کشت اختصاصی جامد حساس ترین و اختصاصی ترین روش تشخیص پاراتوبر کولوزیس در دام‌ها می‌باشد و بر همین اساس به عنوان روش مینا (gold standard) در تشخیص این بیماری شناخته می‌شود (۲۴). با این وجود اجرای کشت میکروبی به زمان زیاد و عملیات آزمایشگاهی گسترده نیاز دارد که در برنامه‌های تشخیص با حجم زیاد نمونه کاربردی نخواهد بود. بنابراین روش‌های شناسایی مستقیم باکتری با استفاده از PCR راهکار جایگزین مناسب خواهند بود. توانایی در تعیین هویت دقیق سویه‌ها و جدایه‌های میکروارگانیسم‌ها یکی از مبانی اصلی و الزامات فعالیت و تحقیق در مراکز پژوهشی و تولیدی بیولوژیک می‌باشد. علیرغم اختصاصی بودن مارکر IS ۹۰۰ بدلیل مشابهت زیاد میان این مارکر و واحدهای ژنتیکی شناخته شده مشابه که به عوامل شبه IS ۹۰۰ شهرت دارند (۱۰)، استفاده از این مارکر بصورت انفرادی می‌تواند در برخی موارد سبب بروز نتایج نادرست گردد (۱۰). در سال ۲۰۰۲ جداسازی یک سویه مایکوباکتریوم از یک گاو ماده سالم گزارش گردید که در ژنوم آن یک قطعه ژنتیکی با ۹۴٪ مشابهت با IS ۹۰۰ یافت گردید (۱۰). بر همین اساس تنها در اینگونه موارد انجام آزمون تعیین توالی نوکلئوتیدهای قطعه بدست آمده و یا استفاده از دیگر مارکرهای ژنتیکی اختصاصی MAP امکان احراز هویت واقعی جدایه‌های این باکتری را فراهم خواهد نمود. در مطالعه حاضر با توجه به اهمیت این موضوع و همچنین با در نظر گرفتن پیشینه نسبتاً طولانی حضور سویه‌های واکسینال MAP ۳۱۶F و MAP III&V در کنار سویه آزمایشگاهی مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم D۴ در مؤسسه رازی و نگرانی از بروز احتمالی cross contamination از دو مارکر ژنتیکی

جدول ۱ - جزئیات پرایمرهای مربوط به لوکوس ها و مناطق ژنتیکی مورد استفاده در تحقیق حاضر. موقعیت مکانی نوکلئوتیدها و اندازه محصولات PCR مربوط به هر لوکوس بر اساس ژنوم سویه استاندارد MAP K10 (۳۵) ذکر شده اند.

Locus/primer	($3' \rightarrow 5'$) Nucleotide sequence	Start	Stop	Expected size (bp)	Reference (s)
IS α 00.f	TTC TTG AAG CGT GTT CGG GGC C	۳۹۸۱۵	۳۹۸۳۶	۵۶۰	(۹)
IS α 00.r	GCG ATG ATC GCA GCG TCT TTG G	۴۰۳۵۳	۴۰۳۷۴		
F δ ۷f	ACC GAA TGT TGT TGT CAC CG	۸۸۶۷۷۴	۸۸۶۷۹۳	۷۰۴	مطالعه حاضر
F δ ۷r	GGA CAC CGA AGC ACA CTC TC	۸۸۷۴۵۸	۸۸۷۴۷۷		



شکل ۱- بهینه سازی فرآیند PCR در مورد آزمایش های PCR-F57 و PCR-IS900 و PCR-Collins. نتایج ژل الکتروفورز محصولات آمپلی فیکاسیون مربوط به پروتکل های A, B, C, D. اعداد ۱ تا ۶ گرادیان دمایی مرحله annealing را به ترتیب برابر با، ۵۵/۹، ۷۵/۶، ۰۶/۱، ۱۶/۴، ۳۶/۹ و ۵۶/۹ درجه سانتیگراد نشان می دهند. در هر واکنش PCR در سری A و B یک پیکومول از هر پرایمر وجود دارد و میزان همین پرایمرها در مورد سری های C و D برابر با پنج پیکومول می باشد. در ارتباط با میزان $MgCl_2$ ، غلظت این ترکیب در سری های B و D برابر با یک میلی مولار و غلظت همین ترکیب در واکنش های سری A و C برابر ۲/۵ میلی مولار می باشد، DNA size marker مورد استفاده دارای ۵ باند در محدوده ۱۰۰ الی ۹۰۰ bp (PCR-IS900 & PCR-F57) و یا ۲۰۰ الی ۱۰۰۰ bp (PCR-Collins) می باشد.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR مربوط به لوکوس های PCR-F57 و PCR-IS900 و PCR-Collins بر روی ژل آگاروز ۱٪. ستون های شماره گذاری شده با اعداد ۱-۵ مربوط به DNA size marker بکار رفته می باشند که دارای ۵ باند الکتروفورز به فواصل 200 bp در محدوده 100 الی 900 bp می باشد ستون های ردیف بالا و سه ستون انتهایی پایین مربوط به جدایه های کلینیکی و دو ستون ابتدایی ردیف پایین به ترتیب مربوط به سویه های MAP III & V و MAP 316F مورد بررسی در این تحقیق می باشند.

paratuberculosis in fars province (southern Iran) dairy herds. Tropical animal health and production. 41(4): 553-557.

2- Baharsefat M, Amjadi A, Ahourai P, Yamini B, Entesar F, and Hedayati H. (1972). Paratuberculosis in goats and sheep in Iran, epidemiological, clinical, pathological features and laboratory diagnosis. Archive of Razi Institute. 24(49-61).

3- Bosshard C, Stephan R, and Tasara T. (2006). Application of an f57 sequence-based real-time pcr assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. Journal of food protection. 69(7): 1662-1667.

4- Castellanos E, Aranaz A, Romero B, De Juan L, Alvarez J, Bezos J, Rodriguez S, Stevenson K, Mateos A et al. (2007). Polymorphisms in *gyra* and *gyrb* genes among *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* type I, II, and iii isolates. Journal of clinical microbiology. 45(10): 3439-3442.

Chiodini R. The history of paratuberculosis. in 8ICP 2005. 2005.

6- Collins DM, De Zoete M, and Cavaignac SM. (2002). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a pcr test based on a novel DNA sequence difference. Journal of clinical microbiology. 40(12): 4760-4762.

7- De Juan L, Alvarez J, Aranaz A, Rodriguez A, Romero B, Bezos J, Mateos A, and Dominguez L. (2006). Molecular epidemiology of types i/iii strains of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* isolated from goats and cattle. Veterinary microbiology. 115(1-3): 102-110.

8- Dilmaghani M, Yousefbeygi G, Kazemnia A, and Esmailnejad B. (2012). Detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in cows from Urmia region. Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi). 93): 13-17.

9- Dohmann K, Strommenger B, Stevenson K, De Juan L, Stratmann J, Kapur V, Bull TJ, and Gerlach GF. (2003). Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* type i and type ii isolates. Journal of clinical microbiology. 41(11): 5215-5223.

10- Englund S, Bolske G, and Johansson KE. (2002). An IS900-like sequence found in a mycobacterium sp. Other than *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. FEMS microbiology letters. 209(2): 267-271.

11- Forde T, Kutz S, De Buck J, Warren A, Ruckstuhl K, Pybus M, and Orsel K. (2012). Occurrence, diagnosis, and strain typing of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in rocky mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*) in southwestern Alberta. Journal of wildlife diseases. 48(1): 1-11.

12- Karimnasab N, Tadayon K, Khaki P, Moradi Bidhendi S, Ghaideri R, Sekhavati M, and Asadi F. (2013). An optimized affordable DNA-extraction method from *Salmonella enterica enteritidis* for pcr experiments. Archives of Razi Institute. 68(2): 105-109.

13- Liapi M, Botsaris G, Slana I, Moravkova M, Babak V, Avraam M, Di Provido A, Georgiadou S, and Pavlik I. (2015). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* sheep strains isolated from cyprus sheep and goats. Transboundary and emerging diseases. 62(2): 223-227.

14- Mobius P., Hotzel H., Rassbach A., and Kohler H. (2008). Comparison of 13 single-round and nested pcr assays targeting IS900, *ismav2*, *f57* and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Veterinary microbiology. 126(4): 324-333.

15- Momotani E. (2012). Epidemiological situation and control

- strategies for paratuberculosis in japan. The Japanese journal of veterinary research. 60 Suppl (S19-29).
- 16- Sadati R, Jafarpour M, Mirinargesi M, Nazemi A, and Barghi A. (2012). Prevalence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dairy cattle bred in northern Iran by nested pcr. Global Vet. 8(3): 259-263.
- 17- Schonenbrucher H, Abdulmawjood A, Failing K, and Bulte M. (2008). New triplex real-time pcr assay for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in bovine feces. Applied and environmental microbiology. 74(9): 2751-2758.
- 18- Sechi LA and Dow CT. (2015). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* zoonosis - the hundred year war - beyond crohn's disease. Frontiers in immunology. 6(96).
- 19- Sekhavati M, Tadayon K, Ghaderi R, Banihashemi R, Jabbari AH, Shokri GH and Karimnasab N. (2015). "In-house" production of DNA size marker from a vaccinal *Bacillus anthracis* strain. Iranian Journal of Microbiology. 7(1): 45-49.
- 20- Shahmoradi AH, Arefpajohi R, Tadayon K, and Mosavari N. (2008). Paratuberculosis in holstein-friesian cattle farms in central Iran. Tropical animal health and production. 40(3): 169-173.
- 21- Sidoti F, Banche G, Astegiano S, Allizond V, Cuffini AM, and Bergallo M. (2011). Validation and standardization of IS900 and f57 real-time quantitative pcr assays for the specific detection and quantification of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Canadian journal of microbiology. 57(5): 347-354.
- 22- Singh AV, Chauhan DS, Singh A, Singh PK, Sohal JS, and Singh SV. (2015). Application of is1311 locus 2 pcr-rea assay for the specific detection of 'bison type' *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* isolates of indian origin. The Indian journal of medical research. 141(1): 55-61.
- 23- Sohal JS, Singh SV, Singh AV, and Singh PK. (2010). Strain diversity within *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* - a review. Indian journal of experimental biology. 48(1): 7-16.
- 24- Stabel JR. (1997). An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. 9(4): 375-380.
- 25- Stevenson K. (2015). Genetic diversity of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: A review. Veterinary research. 46: 64.
- 26- Sting R, Hrubenja M, Mandl J, Seemann G, Salditt A, and Waibel S. (2014). Detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in faeces using different procedures of pre-treatment for real-time pcr in comparison to culture. Veterinary journal (London, England : 1997). 199(1): 138-142.
- 27- Taddei S, Robbi C, Cesena C, Rossi I, Schiano E, Arrigoni N, Vicenzoni G, and Cavarani S. (2004). Detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in bovine fecal samples: Comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic tests with a conventional culture method. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. 16(6): 503-508.
- 28- Talatchian M. (1965). First report of johne's disease in iran. Bulletin - Office international des epizooties. 64: 779-782.
- 29- Thibault VC, Grayon M, Boschiroli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, Gutierrez MC, Supply P, and Biet F. (2007). New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and m. Avium strains: Comparison with IS900 and is1245 restriction fragment length polymorphism typing. Journal of clinical microbiology. 45(8): 2404-2410.
- 30- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, and Rozen SG. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic acids research. 40(15): e115.
- 31- Waddell LA, Rajic A, Stark KD, and Mc ES. (2015). The zoonotic potential of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*: A systematic review and meta-analyses of the evidence. Epidemiology and infection. 1-23.
- 32- Windsor PA. (2015). Paratuberculosis in sheep and goats. Veterinary microbiology.
- 33- Wolf R, Barkema HW, De Buck J, Slomp M, Flaig J, Hauptstein D, Pickel C, and Orsel K. (2014). High herd-level prevalence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in western canadian dairy farms, based on environmental sampling. Journal of dairy science. 97(10): 6250-6259.
- 34- Wolf R, Orsel K, De Buck J, and Barkema HW. (2015). Calves shedding *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* are common on infected dairy farms. Veterinary research. 46: 71.
- 35- Wynne JW, Seemann T, Bulach DM, Coutts SA, Talaat AM, and Michalski WP. (2010). Resequencing the *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* k10 genome: Improved annotation and revised genome sequence. Journal of bacteriology. 192(23): 6319-6320.
- 36- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, and Madden TL. (2012). Primer-blast: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 13: 134.

