

## پروفایل ژنتیکی جدایه‌های مایکوباکتریوم ایویوم زیرگونه پاراتوبرکولوزیس جمع‌آوری شده از مدفوع و شیر گاو، گوسفند و بز در ایران، فقدان خارج از انتظار سویه‌های تیپ گوسفندی پاراتوبرکولوزیس در ایران

لیدا عبدالمحمیدی‌خیوا<sup>۱</sup>، مسعود حق‌خواه<sup>۲</sup>، نادر مصوری<sup>۳</sup> و کیوان تدین<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته‌ی دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زای دام، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۷

### چکیده

مایکوباکتریوم ایویوم زیرگونه‌ی پاراتوبرکولوزیس (MAP) عامل ایجاد پاراتوبرکولوزیس (Ptب) در جهان شناخته می‌شود. پاراتوبرکولوزیس یک بیماری مزمن بدون درمان در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان می‌باشد. اپیدمیولوژی پیچیده MAP همراه با پتانسیل آن در ایجاد بیماری در انسان همچنان به عنوان یک چالش جهانی دامپزشکان محسوب می‌گردد. تقریباً نیم قرن پس از شناسایی اولین موارد این بیماری، هنوز گزارش وقوع پاراتوبرکولوزیس در ایران الزامی نمی‌باشد و این امر زمینه‌ی فقدان یک برنامه‌ی جامع کشوری کنترل بیماری را فراهم نموده است. مطالعه‌ی حاضر به منظور افزایش دانش موجود از ژنتیک جمعیت MAP در میزبان‌های مختلف در ایران انجام پذیرفته است. در مدت هفت ماه تعداد ۳۵ جدایه از شیر و مدفوع گوسفند، بز و گاو در ۸ استان کشور همراه با ۱۱ جدایه آرشیو شده MAP بررسی گردیدند. استراتژی کالینز برای تشخیص افتراقی میان تیپ‌های گاوی این باکتری‌ها استفاده شد. مطالعه با بکارگیری RFLP-IS900 با استفاده از آنزیم *PstI* گسترده‌تر گردید. استراتژی کالینز نشان داد همه‌ی دام‌های تحت بررسی فقط با سویه‌های تیپ گاوی آلوده شده بودند. در تایپینگ ژنتیکی یافته‌های RFLP-IS900 نشان دهنده‌ی وجود ۱۰ تیپ با شباهت زیاد بود که در ۵ مورد میزبان‌های مختلف را آلوده نموده بودند. در عین حال نشانه‌ای از وجود بیش از یک سویه در یک فارم و یا در یک میزبان مشاهده نگردید. یافته‌های این مطالعه در کنار مشاهدات گزارش شده توسط دیگران این سوال را بر می‌انگیزند که چرا در ایران سویه‌های تیپ گوسفندی مشاهده نمی‌شوند. گردش سویه‌های بسیار مشابه MAP در میان نشخوارکنندگان اهلی ایران می‌تواند نشانه‌ای از وجود یک جمعیت یکنواخت ژنتیکی این پاتوژن باشد که اخیراً محتمل تحولات ایجاد کننده تنوع ژنتیکی شده است. دامنه‌ی مکانی و زمانی این گونه تغییرات در حال حاضر نامشخص و آگاهی از آن‌ها نیازمند مطالعات آتی خواهد بود.

کلمات کلیدی: پاراتوبرکولوزیس، مایکوباکتریوم ایویوم، سویه تیپ گوسفندی

\*نویسنده مسئول: کیوان تدین، دانشیار آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زای دام، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

E-mail: Mmb093@gmail.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

## مقدمه

می باشد (Castellanos et al, 2010; Collins et al, 1990). با استفاده از روش های IS900-RFLP, PFGE, IS1311 (Sohal et al, 2010) PCR-REA و نیز یک پروتکل یک مرحله ای PCR می توان میان این سویه ها تمایز قایل شد (Collins et al, 2002).

این تحقیق به منظور شناخت بهتر جمعیت MAP در ایران و همچنین شناسایی ویژگی های ژنتیکی دو سویه MAP 316F و MAP III & V وارداتی از مؤسسه Weybridge انگلستان صورت پذیرفته است. از یک الگوریتم تلفیقی مشتمل بر سه مارکر ژنتیکی 16srRNA, IS900 و F57 به عنوان مارکرهای تعیین هویت و روش Collins به منظور تعیین تیپ گاوی یا گوسفندی و روش RFLP-IS900 به منظور تعیین تیپ ژنتیکی این سویه ها استفاده شد.

## مواد و روش کار

جدایه های جمع آوری شده از دامداری ها: در مدت زمان ۷ ماه از مهر ۱۳۹۴ تا پایان فروردین ۱۳۹۵ با مراجعه به ۳۵ واحد دامداری در ۹ استان اصفهان، البرز، تهران، خراسان شمالی، زنجان، فارس، قزوین، کرمان و گلستان مراجعه و در مجموع از ۱۴۰ رأس گاو، گوسفند و بز نمونه ای مدفوع و یا شیر جمع آوری گردید و به آزمایشگاه میکوباکتریولوژی مؤسسه رازی کرج انتقال یافت.

کشت باکتریایی نمونه بر روی محیط اختصاصی: در آزمایشگاه برای آلودگی زدایی در مورد نمونه های مدفوع، حدود یک گرم از آن به یک لوله ی فالکن یونیورسال محتوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل انتقال و محتویات آن به خوبی توسط مخلوط کن یکنواخت گردید. سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه بر روی سکوی آزمایشگاه بدون حرکت نگهداری و ۵ میلی لیتر از مایع فوقانی توسط پیپت به یک لوله ی یونیورسال حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول هگزا دسیل پیرینیدیوم کلراید (HPC)

کمپلکس میکوباکتریوم ایویوم شامل *Mycobacterium avium*، *Mycobacterium paratuberculosis*، *chimaera*، *Mycobacterium paraintracellulare* می باشد (Zikovitz et al, 2018). در میان این باکتری ها *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) پاراتوبرکولوزیس می باشد (Galiero et al, 2016). این پاتوژن در بدن میزبان بیماری با پیشرفت کند و بدون نشانه های کلینیکی ایجاد می نماید (Windsor, 2015) که در میان نشخوارکنندگان تقریباً تمام جهان گزارش می گردد (Momotani et al, 2012; Wolf et al, 2015a).

نخستین موارد پاراتوبرکولوزیس در کشور در اوایل دهه شصت میلادی در گاوداری شرکت نفت آبادان و در اوایل دهه ی هفتاد میلادی در گله ی بز و گوسفند مؤسسه ی دامپروری حیدرآباد کرج گزارش گردید. (Baharsefat et al, 1972) در حال حاضر این بیماری تقریباً در همه ی استان های کشور دیده می شود. دوره ی انکوباسیون MAP بسیار طولانی است و رشد آزمایشگاهی باکتری در جداسازی اولیه وابسته به وجود مکمل آهن (mycobactin j) می باشد و به ویژه در مورد جدایه های انسانی و گوسفندی می تواند بیش از یکسال به طول انجامد (Dimareli-Malli et al, 2013) در سال های اخیر به منظور فراهم نمودن امکان تشخیص MAP با استفاده از روش های مولکولار بیولوژی، تعدادی پروتکل PCR بر مبنای مارکرهای ژنتیکی اختصاصی MAP معرفی شده اند که از میان آن ها می توان به IS900 (Wolf et al, 2015b)، ISMav2 (Sting et al, 2014)، f57 (Wolf et al, 2015a) و locus 255 (Möbius et al, 2008) و HspX (Singh et al, 2015) اشاره نمود. تا کنون سه تیپ MAP بر اساس خصوصیات فنوتیپیک، ژنوتیپیک و همچنین میزبان، مورد شناسایی قرار گرفته است که شامل Type I (Sheep/S) و Type II (Cattle/C type) و Type III (Intermediate)

مرحله‌ی نخست به منظور تعیین هویت سه مارکر ژنتیکی شامل 16SrRNA به عنوان شناساگر جنس مایکوباکتریوم و دو مارکر هم ارز IS900 و F57 که در بین اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم/ایریوم تنها در ژنوم باکتری‌های زیرگونه MAP یافت می‌شوند، مورد استفاده قرار گرفتند. پروتکل پیشنهادی Dohmann PCR-IS900 در مورد (Dohmann et al, 2003) با تغییرات اندک و در مورد PCR-F57 از Schonenbrucher et al, 2008) روش همراه با اصلاحات کلی و از جمله یک زوج پرایمر جدید استفاده گردید (Abdolmohammadi Khiav et al, 2018; Mohrekehsh Haghghat et al, 2017). در مرحله‌ی دوم به منظور تعیین تیپ ژنتیکی باکتری‌ها (تیپ گوسفندی و یا گاوی) از استراتژی Collins استفاده شد (Collins et al, 2002; Abdolmohammadi Khiav et al, 2018; Mohrekehsh Haghghat et al, 2017). در مرحله‌ی نهایی ژنوتایپینگ بر مبنای RFLP-IS900 با استفاده از آنزیم *PstI* اجرا شد (Cousins et al, 2000).

#### آزمون RFLP-IS900

برای تهیه پروب نشان‌دار (دیجوکسی ژنین) مورد نیاز، پرایمرهای شناخته شده 5'-ACG GTG GGT ACT P90 (5'-ACG GTG GGT ACT) و 3'-TCT GCG و AGG TGT GGG TTT C P91 (5'-TCT GCG و AGG TGT GGG TTT C-3') ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A -3') (O'Mahony and Hill, 2002) توسط ماشین PCR تکثیر گردیدند و پس از تخلیص توسط کیت تجاری نشان‌دار گردیدند. یک میکروگرم از ماده‌ی ژنتیکی هر جدایه در داخل یک میکروتیوب توسط ۳-۲ واحد آنزیم *PstI* در کنار بافر آنزیم (10X) و آب مقطر در طول شب در بن ماری ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری و هضم گردید. محصولات حاصل از فعالیت آنزیمی به مدت ۲۴ ساعت در میدان الکتریکی به قدرت ۱۰ v/cm در ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردیدند و قطعات هضمی تفکیک شده به روش ساترن بلات از ژل به غشاء نایلونی با شارژ مثبت انتقال یافتند. برای تثبیت موقعیت باندهای انتقال یافته، غشاء به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت

۰/۷۵ درصد انتقال یافت. محتویات این لوله به خوبی هم زده و هم‌گن گردید و پس از آن به مدت ۱۸ ساعت در محیط آزمایشگاه بدون حرکت نگهداری و سپس ۲۰ دقیقه در ۱۵۲۰ g سانتی‌فیوژ گردید. رسوبات سانتی‌فیوژ طی سه نوبت با سرم فیزیولوژی استریل شستشو گردید و در نهایت از حدود نیم میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی باقی‌مانده در لوله همراه رسوبات موجود جهت تلقیح دو لوله‌ی محیط کشت اختصاصی هرالدز محتوی زرده تخم‌مرغ و مکمل رشد مایکوباکتین J (Mycobactin J supplemented Herold's J Egg Yolk medium = HEY-Mycobactin J) استفاده شد. در مورد نمونه‌های شیر ۵۰ میلی‌لیتر از آن در ۱۵۲۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتی‌فیوژ گردید و رسوب به دست آمده پس از آلودگی‌زدایی با HPC مانند نمونه‌های مدفوع کشت گردید.

علاوه بر این جدایه‌ها، تعداد ۱۱ جدایه MAP موجود در آرشیو میکروبی مؤسسه‌ی رازی در این مطالعه اضافه گردیدند. برای بازیافت باکتری پس از انتقال مرحله‌ای میکروبیوژ تیوب جدایه‌ها از فریزر به یخچال و سپس به محیط آزمایشگاه، از ۱ میلی‌لیتر محتویات آن برای تلقیح دو لوله محیط کشت نظیر مرحله‌ی قبل استفاده شد.

از دو سویه MAP 316F و MAP III & V به عنوان سویه‌های استاندارد آزمایشگاهی استفاده شد.

همه‌ی لوله‌های کشت به مدت ۱۲-۸ هفته در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و تا زمان مشاهده پرگنه‌ها، نگهداری شدند. اطمینان از رشد مایکوباکتریایی از طریق تهیه‌ی لام میکروسکوپی از لوله‌های کشت و مشاهده باکتری‌های اسید فست انجام پذیرفت.

در اجرای آزمایشات متکی بر PCR از روش ساده‌ی جوشانیدن برای دستیابی به ماده‌ی ژنتیکی باکتری استفاده شد. در مورد RFLP-IS900 برای دستیابی به ماده‌ی ژنتیکی با کیفیت و به میزان مورد نیاز از روش استاندارد ون سولینگن استفاده گردید (Castro et al, 2009).

در مجموع ۵ آزمایش مستقل در سه مرحله تعیین هویت، تعیین تیپ و ژنوتایپینگ سویه‌ها انجام گردید. در

تولید نمودند که هویت آن‌ها به عنوان مایکوباکتریوم/ایویوم زیر گونه پاراتوبرکلوزیس را تأیید نمود. از طرف دیگر در آزمایش PCR-Collins همی باکتری‌های تحت آزمون یک قطعه به طول ۳۱۰ زوج باز تولید نمودند و بدین ترتیب تعلق آن‌ها به type 2 (تیپ گاوی) نشان داده شد (Fig. 1).

در جریان اجرای RFLP-IS900 که بر روی ۳۵ جدایه‌ی کلینیکی، ۱۱ جدایه‌ی آرشیوی و دو سویه‌ی استاندارد آزمایشگاهی اجرا گردید در مجموع ۱۰ تیپ ژنتیکی شامل سه تیپ انفرادی (Orphan) و ۷ تیپ مشترک (Clustered) شناسایی گردید. از این تعداد ۹ تیپ مربوط به جدایه‌های ایرانی و یک تیپ اختصاص به سویه‌های استاندارد آزمایشگاهی داشت. فراوانترین پروفایل (I) به صورت مشترک توسط ۲۲ جدایه در استان‌های البرز، فارس، قزوین و اصفهان و زنجان نشان داده شد. دومین تیپ شایع (II) نیز در میان ۱۱ جدایه در پنج استان فوق و همچنین استان تهران شناسایی گردید (Table 1).

بیش‌ترین میزان تنوع ژنتیکی در استان البرز مشاهده گردید که از ۹ تیپ ژنتیکی ایران میزبان ۴ نمونه آن‌ها بود.

داده شد. مراحل پیش هیبریدیزاسیون و هیبریدیزاسیون در آون و در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از شستشو و افزودن محلول بلاکینگ، با آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین کونژوگه شده با آلکالن فسفاتاز، شناسایی توسط NBT و BCIP انجام پذیرفت تا امکان مشاهده و شناسایی باندها فراهم گردد. تصویر نهایی از طریق اسکن غشاء برداشت و آنالیز تصاویر به صورت چشمی توسط اپراتور و بر اساس تعداد و موقعیت مکانی باندهای مشهود انجام گردید.

## نتایج

کشت باکتریایی ۱۴۰ نمونه‌ی مدفوع و شیر جمع‌آوری شده در ۴۷ مورد منجر به رشد باسیل‌های اسید فست گردید. تجلید کشت ۱۱ جدایه موجود در آرشیو و همچنین دو سویه آزمایشگاهی بر روی محیط اختصاصی موفقیت‌آمیز بود. همی جدایه‌های جمع‌آوری شده کلینیکی و آرشیو شده و همچنین سویه‌های استاندارد در آزمایشات PCR-F57 و PCR-IS900 و PCR-16s rRNA باندهایی به اندازه به ترتیب ۵۴۳ و ۵۶۰ و ۷۰۴ زوج باز

**Table 1: The IS900-RFLP genetic pattern (type), source and province (No.) of studied Iranian isolates and vaccine strains in this study**

Genetic pattern (type)	Source	Province (No.)	Total
I	Bovine, Caprine	Qazvin (7), Fars (1), Alborz (4), Isfahan (9), Zanjan (1)	22
II	Bovine, Ovine, Caprine	Isfahan (3), Qazvin (1), Alborz (3), Zanjan (2), Fars (1), Tehran (1)	11
III	Bovine	Tehran (1), Alborz (1), Zanjan (1)	3
IV	Bovine, Ovine	Isfahan (1), Alborz (2)	3
V	Bovine, Ovine	Zanjan (1), Fars (1)	2
VI	Bovine, Ovine	Isfahan (2)	2
VII	Bovine	Tehran (1)	1
VIII	Bovine	Qazvin (1)	1
IX	Bovine	Qazvin (1)	1
X	Vaccine strains	MAP 316F, MAP III & V	2

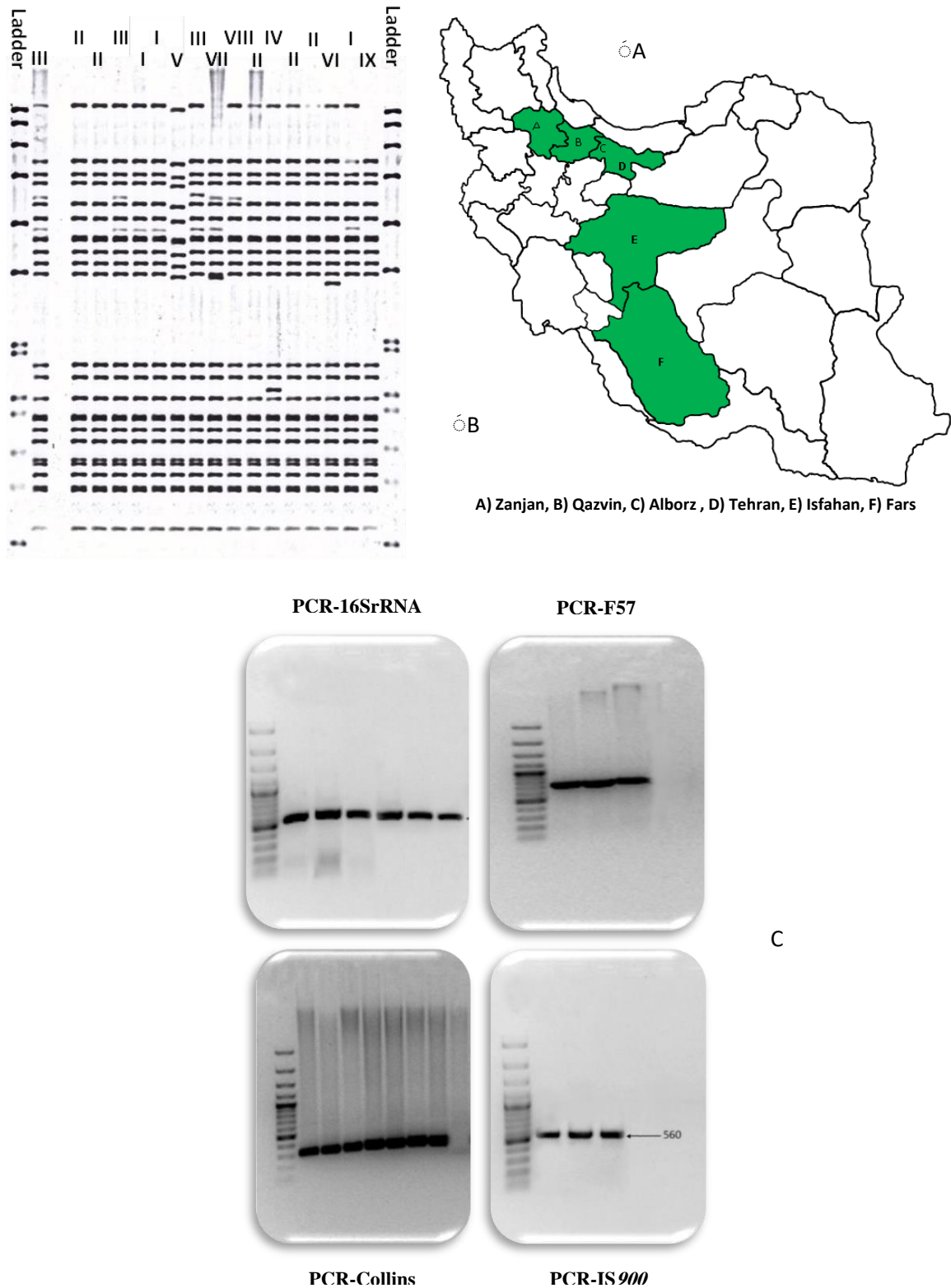


Figure 1: (A) Geographical origin of the Iranian MAP isolates in this study. (B) RFLP-IS900 genotyping of MAP, using *Pst*I among Iranian isolates and vaccine strains. (C) PCR amplification products of 16S rRNA and F57, IS900, and Collins loci. The agarose gel (Invitrogen®Multi-purpose agarose) was prepared at concentration of 1.2% and DNA size marker 100 bp was used.

## بحث

در مطالعه‌ی حاضر از مارکر IS900 به عنوان پروب استفاده گردید. وجود این واحد تکرار شونده ژنتیکی به تعداد ۱۵ تا ۲۰ کپی در ژنوم MAP گزارش می‌گردد (Sohal et al, 2010; Bannantine et al, 2012). به عنوان یک قاعده کلی در اجرای سیستم ژنوتایپینگ RFLP استفاده از مارک‌های با تعداد تکرار بیش‌تر در ژنوم ارگانیزم هدف، بر قدرت تفریقی سیستم می‌افزاید. علاوه بر این IS900 یک مارکر پایدار و از نظر ژنتیکی اختصاصی برای زیر گونه‌ی MAP می‌باشد (Whipple et al, 1990). از طرف دیگر در داخل این لوکوس یک محل برش برای آنزیم *PstI* قرار گرفته است که آن را تبدیل به هدف مناسبی برای ژنوتایپینگ با استفاده از سیستم RFLP-IS900 با استفاده از آنزیم *PstI* نموده است (Djonne et al, 2005; VLA, 2008; Mobius et al, 2008). با این حال به نظر می‌رسد در برخی از مناطق جغرافیایی خاص جهان نظیر استرالیا این مارکر فاقد قدرت تفریقی مورد انتظار می‌باشد. شناسایی ۹ تیپ ژنتیکی توسط این مارکر در میان ۴۶ جدایه‌ی ایرانی که در میان آن‌ها ۲۲ جدایه در یک تیپ ژنتیکی مشترک قرار گرفتند برای ارزیابی توان تفریقی این سیستم تایپینگ چندان قدرتمند به نظر نمی‌رسند و به انجام مطالعات بیش‌تر و مقایسه‌ی یافته‌ها با روش‌های مشابه دارد.

به طور کلی شباهت زیادی میان ۹ پروفایل یافت شده در میان جدایه‌های ایرانی مورد آزمون در این تحقیق مشاهده گردید به طوری که اغلب این تیپ‌ها فقط در وجود یک باند اضافه با یکدیگر اختلاف داشتند (Fig. 1). وجود این سطح از تشابه می‌تواند به وجود کلون یا کلون‌های اجدادی از MAP در جغرافیای ایران نسبت داده شود که در سایه‌ی فقدان اقدامات سازمان یافته مربوط به کنترل پاراتوبرکولوزیس در ایران فرصت کافی برای توسعه و موجودیت سویه‌های جدید را یافته و همچنان در جغرافیای ایران فعال می‌باشند.

از مجموع ۹ پروفایل یافت شده در این تحقیق ۵ تیپ (I, II, IV, V, VI) مربوط به سویه‌هایی بود که به صورت مشترک از میزبان‌های مختلف جمع‌آوری گردیدند. این مشاهده که پیش از این در مناطق دیگر جهان نیز گزارش گردیده است نشان‌دهنده‌ی حضور سویه‌هایی است که توان آلودگی میزبان‌های متعدد را دارا می‌باشند و در مطالعات مربوط به تهیه‌ی واکسن پاراتوبرکولوزیس از طریق انتخاب سویه‌های بومی می‌توانند مورد مطالعه بیش‌تر قرار گیرند.

پروفایل یکسان هر دو سویه III&V و 316F و واکسن (IX) در مقایسه با همه‌ی تیپ‌های ژنتیکی سویه‌های بومی ایران در مطالعه‌ی حاضر متفاوت ظاهر گردید. این سویه‌ها بومی ایران نیستند و اختلاف مشاهده شده می‌تواند به واسطه همین تفاوت توضیح داده شود.

هیچ کدام از جدایه‌های ایرانی الگوی یکسان با سویه‌های واکسینال نداشتند در حالی که دو سویه واکسینال III&V و 316F دارای الگوی ژنتیکی یکسان بودند.

اجرای استراتژی PCR-Collins در مطالعه‌ی موجود نشان داد همه جدایه‌های بومی مورد بررسی حتی سویه‌هایی که از گوسفند و بز جداسازی گردیده‌اند از تیپ گاوی می‌باشند. این مشاهده از نظر اپیدمیولوژی دارای اهمیت می‌باشد. از نظر پیشینه‌ی تاریخی ایرانیان جزو اولین اقوام در اهلی‌سازی و پرورش نشخوارکنندگان کوچک شناخته می‌شوند (Bohrer, 1972; Walton, 1917). فقدان سویه‌های متعلق به تیپ گوسفندی در مطالعه‌ی حاضر که پیش از این نیز مورد توجه قرار گرفته است می‌تواند نشانه‌ای از فقدان این پاتوژن در گذشته در میان نشخوارکنندگان ایران باشد. بر همین اساس نویسندگان این مقاله تعیین تیپ پاتوژن در مطالعات اپیدمیولوژی پاراتوبرکولوزیس در ایران را حایز اهمیت می‌دانند.

## تشکر و قدردانی

میزان مسئولیت و مشارکت کیوان تدین و نادر مصوری در تهیه و نگارش این مقاله یکسان می‌باشد. مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تأمین کننده‌ی کامل منابع مالی و امکانات آزمایشگاهی مورد نیاز برای انجام این مطالعه در قالب پروژه تحقیقاتی ثبت شده شماره ۹۰۰۶۰-۱۸-۱۸-۲ است. لیدا عبدالمحمدی خیابو دانش آموخته‌ی دکترای تخصصی دامپزشکی از دانشگاه شیراز می‌باشد.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌نمایند که در ارتباط با این مقاله هیچگونه تعارض منافی میان آنها وجود ندارد.

## منابع مالی

در این مقاله بخشی از یافته‌های پایان‌نامه دکترای تخصصی لیدا عبدالمحمدی خیابو دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز ارایه شده است. فضای آزمایشگاهی و همه هزینه‌های انجام این تحقیق توسط مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی فراهم و پرداخت شده است.

## منابع

- Abdolmohammadi Khiav, L., Haghkhan, M., Tadayon, K., & Mosavari, N. (2018). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and confirmation of cases by Nested-PCR. *Veterinary Researches & Biological Products*, 32(1), 41-47.
- Baharsefat, M., Amjadi, A. R., Ahourai, P., Yamini, B., Entessar, F., & Hedayati, H. (1972). Paratuberculosis in goats and sheep in Iran. Epidemiological, clinical, pathological features and laboratory diagnosis. *Archives of Razi Institute*, 24(1), 49-61.
- Bannantine, J. P., Wu, C. W., Hsu, C., Zhou, S., Schwartz, D. C., Bayles, D. O., et al. (2012). Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. *BioMed Central Genomics*, 13, 89.
- Bohrer, V. L. (1972). On the relation of harvest methods to early agriculture in the Near East. *Economic Botany*, 26(2), 145-155.
- Castellanos, E., Aranaz, A., & De Buck, J. (2010). Rapid identification and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* types by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis of the MAP1506 locus. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1474-7.
- Castro, C., González, L., Roza, J. C., Puerto, G., & Ribón, W. (2009). Biosafety evaluation of the DNA extraction protocol for *Mycobacterium tuberculosis* complex species, as implemented at the Instituto Nacional de Salud, Colombia. *Biomedica*, 29(4), 561-566.
- Collins, D. M., De Zoete, M., & Cavaignac, S. M. (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.
- Collins, M. T., Kenefick, K. B., Sockett, D. C., Lambrecht, R. S., McDonald, J., & Jorgensen, J. B. (1990). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(11), 2514-2519.
- Cousins, D. V., Williams, S. N., Hope, A., & Eamens, G. J. (2000). DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Australian Veterinary Journal*, 78(3), 184-90.
- Dimareli-Malli, Z., Mazaraki, K., Stevenson, K., Tsakos, P., Zdragas, A., Giantzi, V. et al. (2013). Culture phenotypes and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants. *Research in Veterinary Science*, 95(1), 49-53.

- Djonne, B., Pavlik, I., Svastova, P., Bartos, M., & Holstad, G. (2005). IS900 restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats and cattle in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46(1-2), 13-8.
- Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., De Juan, L., Stratmann, J., Kapur, V. et al. (2003). Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5215-5223.
- Galiero, A., Fratini, F., Mataragka, A., Turchi, B., Nuvoloni, R., Ikonomopoulos, J., & Cerri, D. (2016). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cheeses from small ruminants in Tuscany. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 195-9.
- Mobius, P., Hotzel, H., Rassbach, A., & 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), 324-33.
- Mobius, P., Luyven, G., Hotzel, H., & Kohler, H. (2008). High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 972-81.
- Mohrekesh Haghghat, M., Shahmoradi, A. H., Tadayon, K., Keshavarz, R., Ghaderi, R., Sekhavati, M., & Mosavari, N. (2017). Molecular identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 316 F and III & V strains by a multi-approach strategy. *Veterinary Researches and Biological Products*, 30(2), 89-100.
- Momotani, E., Ozaki, H., Hori, M., Yamamoto, S., Kuribayashi, T., Eda, S., & Ikegami, M. (2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in mice. *SpringerPlus*, 1(47), 1-10.
- O'Mahony, J. & Hill, C. (2002). A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *Journal of Microbiological Methods*, 51(3), 283-293.
- Schonenbrucher, H., Abdulmawjood, A., Failing, K., & 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.
- Singh, A. V., Chauhan, D. S., Singh, A., Singh, P. K., Sohal, J. S., & Singh, S. V. (2015). Application of IS1311 locus 2 PCR-REA assay for the specific detection of 'Bison type' *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates of Indian origin. *Indian Journal of Medical Research*, 141(1), 55-61.
- Sohal, J. S., Singh, S. V., Singh, A. V., & Singh, P. K. (2010). Strain diversity within *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*--a review. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(1), 7-16.
- Sting, R., Hrubenja, M., Mandl, J., Seemann, G., Salditt, A., & 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*, 199(1), 138-142.
- VLA. (2008). Johne's disease continues to be the most common cause of bovine enteric disease. *Veterinary Record*, 163(6), 171-174.
- Walton, C. L. (1917). Some geographical aspects of the sheep industry. *Scottish Geographical Magazine*, 33(7), 303-315.
- Whipple, D., Kapke, P., & Vary, C. (1990). Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(11), 2561-2564.
- Windsor, P. A. (2015). Paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2), 161-169.
- Wolf, R., Barkema, H. W., De Buck, J., & Orsel, K. (2015a). Factors affecting management changes on farms participating in a Johne's disease control program. *Journal of Dairy Sciences*, 98(11), 7784-96.
- Wolf, R., Barkema, H. W., De Buck, J., & Orsel, K. (2015b). Sampling location, herd size, and season influence *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* environmental culture results. *Journal of Dairy Sciences*, 98(1), 275-87.
- Zikovitz, A. E., Stalis, I. H., Bicknese, E. J., Rideout, B. A., & Pye, G. W. (2018). Resolution of a Localized Granuloma Caused by *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex on the Cere of a Bruce's Green Pigeon (Treron waalia). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 32(4), 322-327.



## Genotype profiling of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates recovered from feces and milk of Iranian bovine, ovine and caprine hosts, are the sheep (S) type strains mysteriously overlooked in Iran

Lida Abdolmohammadi Khiav<sup>1</sup>, Masoud Haghkhah<sup>2</sup>, Nader Mosavari<sup>3</sup> and Keyvan Tadayon<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> PhD Graduated of bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 07.06.2019

Accepted: 0.9.10.2019

### Abstract

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) is known worldwide for its role in causing paratuberculosis (Ptb), a chronic incurable intestinal tract infection of ruminants. Concerns remain in place as the elusive MAP epidemiology and its potential zoonotic nature continue to challenge veterinarians across the world. Almost half a century since its initial reports, Ptb is still not a notifiable disease in Iran leading to the unfortunate lack of a public-funded control scheme. We undertook this study to extend our knowledge of the MAP population genetic in diverse hosts in Iran. During seven months, 35 MAP isolates collected from milk and feces obtained from sheep, goat and cattle originating 8 provinces plus a further eleven archived MAP isolates were genetically interrogated. The Collins strategy was conducted on examined isolates to differentiate between cattle and sheep types of MAP bacteria. The study was further expanded by RFLP-IS900 analysis using *Pst*I in search for genetic diversity. The findings of Collins strategy showed that all animal species covered by the study were exclusively infected by 'cattle' strains. In genotyping, on the other hand, RFLP-IS900 analysis yielded 10 largely similar genotypes with five of them infecting multiple hosts. Nevertheless, no trace of varying profiles was detected in individual farms and conspecifics. These data, taken together with earlier observations by others, raise the question of the mysterious absence of sheep-type strains in Iran. Circulation of highly similar strains in Iranian farm ruminants might be an indication of a homogenic MAP population with a tendency for diversification started only recently. The extent of temporal and spatial characteristics of such diversification is still unclear and left for future works.

**Key words:** Paratuberculosis, *Mycobacterium avium*, Sheep type strain

---

\* **Corresponding Author:** Keyvan Tadayon, Associate Professor, Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, E-mail: mmb093@gmail.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).