

بررسی و مقایسه ژنتیکی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس جدا شده از دام‌های استان‌های

تهران و البرز توسط روش‌های PCR و SSR

امید غفاری^۱، فاطمه فروهی^{۲*}، فهیمه نعمتی^۱

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مایکوباکتریوم/اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (MAP) عامل بیماری یون است. این بیماری گستره جهانی داشته و از لحاظ ایجاد خسارت اقتصادی به صنعت دامپروری از اهمیت زیادی برخوردار است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۳۰ جدایه که از لحاظ موقعیت جغرافیایی منطقه جداسازی (استان‌های تهران و البرز) و هم-چنین میزبان (گاو، گوسفند و بز) متفاوت بودند، اجرا گردید. از روش PCR جهت تکثیر دو لوکوس SSR1 و SSR2 استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی از نظر ساختار دو لوکوس SSR1 و SSR2 هم با یکدیگر و هم با سویه‌های استاندارد دارای تفاوت ژنتیکی است. در این لوکوس‌ها به علت وجود Insertion و یا Deletion توالی‌های تکرار شده پشت سر هم، الگوهای ژنتیکی متفاوتی مشاهده می‌شود که امکان تمایز بین سویه‌ها را میسر می‌سازد.

نتیجه‌گیری: با در نظر گرفتن دو آلل مربوط به هر کدام از ژن‌ها، باکتری‌های مورد مطالعه در دو تیپ ژنتیکی جای گرفتند.

واژه‌های کلیدی: بیماری یون، مایکوباکتریوم/اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس، SSR1، SSR2

مقدمه

بیماری یون یک بیماری عفونی غیر قابل درمان در نشخوارکنندگان سراسر جهان است.

از خصوصیت‌های این بیماری آنتروکولیت گرانولوماتوز، تورم عروق لنفاوی موضعی و لنفادنیت است که منجر به بروز علامت شاخص بیماری یعنی کاهش وزن پیشرونده می‌شود (۲۲).

بیماری یون گاو به چند دلیل بیماری مهم به شمار می‌رود: اول بیماری باعث ضررهای اقتصادی شدید در نتیجه کاهش تولید می‌شود. دوم تعداد حیوانات کشتاری و حذف شده افزایش می‌یابد هم‌چنین هزینه‌های مربوط به روش‌های آزمایش و کنترل بیماری بالاست و علاوه بر آن اعتقاد بر این است که مایکوباکتریوم/اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد

شهر قدس، تهران، ایران

پست الکترونیکی: f_foroohi@ymail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۷

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) نقش ایجادکنندگی بیماری کرون (Johne's disease) را در انسان بازی می‌کند (۱۲). این بیماری در دهه اخیر با تمام وجود در دامپروری‌های ایران به‌ویژه گاوداری‌های صنعتی که به شکل متراکم پرورش می‌یابند دیده شده و باعث پیامدهای شدیدی در ارتباط با کاهش تولید به‌ویژه شیر، حذف دام از گله و اشاعه آلودگی توسط گاوها به شکل بالینی و نیز غیر بالینی شده است (۱).

کمپلکس مایکوباکتریوم اویوم (MAC) شامل مایکوباکتریوم اویوم و مایکوباکتریوم اینتراسلولار هست، که هر یک موجب عفونت‌های دامی و انسانی می‌گردند. آن‌ها از نظر سرولوژی و توسط روش‌های مولکولی قابل تفریق هستند اما از نظر فنوتیپی از هم قابل تشخیص نیستند. گونه‌های ذکر شده در بالا جزء در مورد گونه‌های MAC، انگل‌های اجباری هستند (۲۰).

از زمان شناسایی مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (MAP)، روش‌های گوناگونی برای شناسایی آن در

^۱ *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*

در شرایط مناسب و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. رشد باکتری‌ها هر هفته کنترل شد. نمونه‌های کلینیکی از طریق رکتوم با دستکش مخصوص استریل جمع‌آوری شده در ظروف استریل نمونه‌برداری به آزمایشگاه انتقال یافت.

روش جداسازی بر مبنای کشت مدفوع بود، به این صورت که: ۱۰ گرم مدفوع در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده، سپس به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از مایع رویی به میزان ۵ میلی‌لیتر برداشته شده و در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی زفیران ۰/۳ درصد افزوده گردید تا آلودگی‌زدایی گردد. این محلول در درجه حرارت اتاق به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده و دوباره محلول رویی جدا گردید. از رسوب حاصل در محیط میدلبروک (Difco.US) کشت گردید.

۳ لوله که مایکوباکتین به آن اضافه شده بود و ۱ لوله بدون مایکوباکتین، در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد و به صورت هفتگی مورد بررسی قرار گرفت.

البته برای کنترل وجود قارچ ۲ میلی‌لیتر رسوب با ۴ قطره آمفوتریسین B (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) مخلوط شده و به هر لوله قبل از کشت ۴ قطره افزوده گردید. در ۳ لوله حاوی مایکوباکتین به‌طور عمده بعد از ۸ هفته پرگنه‌ها ظاهر گردید. با توجه به مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی اسیدفست، مقایسه کلنی با کلنی سوش رفرنس و با توجه به اختصاصی بودن محیط کشت به‌خاطر وجود گلیسیرین و مایکوباکتین، مشخص می‌شود که باکتری جدا شده مایکوباکتریوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس است.

استخراج DNA

به‌منظور فراهم نمودن ماده ژنتیکی باکتری با کیفیت مناسب قابل استفاده در آزمون‌های PCR و هم‌چنین مورد نیاز برای انجام آزمون تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصول‌های PCR، تمام جدایه‌های مورد مطالعه به‌روش جوشاندن استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با الکتروفورز مشخص گردید و DNA تا زمان PCR در فریزر ۲۰°C نگهداری شد.

آزمون‌های PCR

در این مطالعه جهت شناسایی ژنوتایپ‌های متفاوت بین جدایه‌های مورد مطالعه، از دو لوکوس SSR شامل: SSR1، SSR2 استفاده گردید. در آزمون‌های PCR، پرابرهای مورد استفاده

حیوانات آلوده به‌کار رفته است که شامل تشخیص سنتی بر اساس علائم بالینی، استفاده از روش‌های ایمنی‌سنجی، روش‌های مبتنی بر PCR مانند PCR ساده (۲۰)، PCR آشیانه‌ای (۱۸) و Real-time PCR است (۱۴،۵). هم‌چنین روش RFLP همراه با روش PCR یا به اختصار PCR-REA نیز از مدت‌ها قبل برای این کار پیشنهاد شده است (۱۷). از روش RDA PCR برای متمایز ساختن سویه‌های مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به دو تیپ اصلی I و II استفاده می‌شود. تیپ I پاراتوبرکلوزیس دارای سه لوکس اختصاصی شامل RDA10، pig-pig-RDA20، pig-RDA30 است که در تیپ II دیده نمی‌شود (۱۴). باید توجه داشت که هنوز هم روش کشت به‌عنوان روش اصلی در آزمایشگاه‌ها به‌منظور تشخیص MAP مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳). در بین روش‌های مذکور روش‌های مبتنی بر PCR به‌لحاظ سرعت بالا، هزینه کم و حساسیت زیاد، جایگاه ویژه‌ای دارند. امروزه بیش‌تر روش‌هایی که از PCR برای تشخیص MAP بهره می‌برند، مبتنی بر شناسایی قطعه DNA درون IS900 هستند (۱۷).

در مطالعه حاضر تلاش شد با استفاده از نوع خاصی از تکرارهای ژنتیکی که به Short Sequence Repeats (SSR) معروف هستند تنوع ژنتیکی جمعیت این باکتری در میان جدایه‌های موجود در آرشیو باکتریایی مؤسسه سرم‌سازی رازی و باکتری‌های جدا شده از مدفوع دام‌ها تعیین و با نمونه خارجی این باکتری مقایسه گردید. یافته‌های این تحقیق بر دانش موجود از اپیدمیولوژی پاراتوبرکلوزیس در ایران خواهد افزود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

این مطالعه بر روی ۳۰ جدایه کلینیکی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس که تعداد ۵ سویه آن موجود در کلکسیون میکروبی مؤسسه رازی، با هویت مشخص و ۲۵ سویه جدا شده از مدفوع گاو و گوسفند و بز اجرا گردید. علاوه بر این، سویه مرجع مورد استفاده در این مطالعه شامل سویه استاندارد Razi Type Culture Collection 2375 (RTCC) نیز به‌کار گرفته شد. باکتری‌های موجود در آرشیو میکروبی مؤسسه رازی در محیط کشت هرولداگ غنی شده با مایکوباکتین J و هم‌چنین هرولداگ فاقد مایکوباکتین J (۲ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر محیط) کشت داده شد و لوله‌های کشت به‌صورت مورب به‌مدت ۱ هفته گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از ۱ هفته لوله‌ها به‌صورت عمودی و به‌مدت ۸ هفته

جهت SSR1 و SSR2، ترکیب‌های مورد استفاده در PCR و همچنین شرایط دمایی در جداول ۱، ۲ و ۳ آمده است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Locus	Primer Name	Primer Sequence (5' -3')	Reference
SSR1	SSR1 -F	CTG GAA GGA CCT GGG CCT	9
	SSR1 -R	CCG CAC ATA CAA GAA GC	
SSR2	SSR2 -F	CCG AGT TCC TCG ACC CAG T	9
	SSR2 -R	GAT GGC GCC GAA CAC GAT T	

جدول ۲- جزئیات واکنش PCR

Loci	PCR Master mix (μl)	Primer forward (5pmol/ μl)	Primer reverse (5pmol/μl)	DNA Template (μl)	DMSO	PCR Water (μl)	TOTAL Vol (μl)
SSR1	7.5	0.25	0.25	4.0	0.6	2.4	15
SSR2	7.5	0.25	0.25	4.0	0.6	2.4	15

جدول ۳- شرایط دمایی PCR

Loci	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extention	No.of complete cycles
SSR1, SSR2	95°C/1min	95°C/1min	62°C/45sec	72°C/45sec	72°C/10min	35

تعیین توالی محصول‌های PCR و مقایسه گرافیکی و تعیین اندازه این قطعه‌هایی از برنامه Clustal X (ver 2.0.11) محصول The European Bioinformatics Institute و برای تعیین تعداد تکرارها در ژنوم از برنامه Tandem repeat finder (ver 4.04) استفاده گردید. همچنین جهت استخراج و موقعیت‌یابی لوکوس‌های ژنتیکی مورد مطالعه در ژنوم سویه-های استاندارد از نرم افزار Artemis استفاده شد.

نتایج:

با استفاده از برنامه گرادینت دمائی دستگاه ترموسایکلر، دمای مناسب جهت مرحله Annealing، پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. مناسب‌ترین دما برای پرایمرهای SSR1 و SSR2 ۶۲°C تعیین شد. همچنین علاوه بر تعیین دمای مناسب جهت مرحله Annealing با استفاده از گرادینت دمایی، فاکتورهای دیگر نظیر دما و زمان در مرحله Extension و نیز تعداد سیکل‌ها مورد بررسی قرار گرفت و بهترین حالت انتخاب گردید. در این لوکوس‌ها به‌علت وجود Insertion و یا Deletion توالی‌های تکرار شده پشت‌سر هم، الگوهای ژنتیکی متفاوتی مشاهده می‌شود که امکان تمایز بین سویه‌ها را میسر می‌سازد. شمارش تکرارهای یک لوکوس در یک فرآیند دو مرحله‌ای صورت می‌گیرد: ابتدا انجام آزمون PCR برای هر لوکوس، که بدین‌منظور به ازای هر لوکوس از یک جفت پرایمر استفاده می‌شود که در نهایت منجر به تکثیر

ژل الکتروفورز محصول‌های PCR و ثبت اطلاعات برای الکتروفورز محصول‌های PCR از ژل ۱٪/۵ آگاروز به‌همراه Red Safe استفاده گردید. ژل‌ها پس از بارگذاری، به مدت ۱ ساعت در میدان الکتریکی ۹۰ ولت و در بافر TBE رانده شدند. عکس‌برداری از ژل در دستگاه ژل‌داک (Bio Rad USA) انجام گردید. به‌عنوان DNA size marker استاندارد از یک محصول استاندارد شده ساخت مؤسسه رازی استفاده گردید تا امکان تعیین اندازه تقریبی محصول‌های PCR فراهم شود.

آزمایش‌های مربوط به تعیین توالی

آزمون‌های مربوط به تعیین توالی نوکلئوتیدها، توسط آزمایشگاه ماکروژن (Macrogen) کره جنوبی انجام گردید. انتقال محصول‌های PCR جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق به محل آزمایشگاه تعیین توالی نوکلئوتیدها در کره جنوبی با همکاری، نمایندگی شرکت حمل و نقل بین‌المللی دی‌اچ‌ال (DHL) در ایران صورت پذیرفت. نتایج آزمون‌های تعیین توالی، به‌صورت فایل‌های فشرده، از درگاه الکترونیکی شرکت استخراج و نگهداری شد.

قرائت نتایج تعیین توالی محصول‌های PCR و تجزیه و

تحلیل یافته‌ها

برای مشاهده، قرائت و تحلیل نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های تعیین توالی، استفاده شد. بدین‌منظور جهت مشاهده فایل‌های گرافیکی توالی نوکلئوتیدها (به‌صورت کروماتوگرام) از برنامه Chromas Lite (ver 2.01)، برای تلفیق توالی‌های حاصل از

برای لوکوس ۶ زوج باز SSR1 در ۲۴ جدایه ۴۶۰۸ زوج باز و در ۶ جدایه ۱۰۴۴ زوج باز و تعداد ۱۹ کپی از این توالی در ۳۰ جدایه مشاهده شد. مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدهای این لوکوس در ژنوم ۳۰ جدایه تحت آزمون که تعیین توالی شدند، یافته‌های ژل الکتروفورز را مورد تأیید قرار داد. استفاده از معادله گاستون و هانتز عدد شاخص HGDI را معادل ۰/۹۲ نشان داد.

لوکوس SSR2

این لوکوس با سایز واحد تکراری ۳ زوج باز در ۳۰ جدایه مورد بررسی این مطالعه مثبت بوده و منجر به تولید محصول PCR گردید. پس از آنالیز تصویرهای به دست آمده ۲ آلل در بین نمونه‌ها مشخص گردید. جدایه‌ها تعیین توالی شدند تا از اندازه دقیق هر لوکوس اطلاع حاصل گردد. مقایسه توالی نوکلئوتیدهای این لوکوس در ژنوم ۳۰ جدایه تحت آزمون که تعیین توالی شدند، سایز واحد تکراری برای این لوکوس ۳ زوج باز در ۲۴ جدایه ۱۵۲ زوج باز، و در ۶ جدایه ۱۱۵۸ زوج باز و تعداد ۳۰ کپی از این توالی مشاهده شد. استفاده از معادله گاستون و هانتز عدد شاخص HGDI را معادل ۰/۹۳ نشان داد.

نتایج تجمیعی ژنوتایپینگ لوکوس‌ها:

این مطالعه بر روی ۲۵ جدایه کلینیکی با هویت نامشخص و نیز ۵ سویه مرجع با هویت معلوم انجام شد. نمونه‌های موجود برای هر دو لوکوس تحت مطالعه تعیین توالی شدند. از بررسی دو لوکوس مورد نظر، هر دو لوکوس SSR1, SSR2 دارای ۲ آلل است، که با در نظر گرفتن آلل‌ها در هر دو لوکوس، نمونه‌های مورد مطالعه در دو تیپ ژنتیکی جای گرفتند. نتایج حاصل از تعیین توالی و تیپ‌بندی جدایه‌ها بر اساس ۲ تیپ ژنتیکی به دست آمد. جهت مشاهده آلل‌ها در کنار هم، از هر تیپ ژنتیکی یک نمونه به‌عنوان شاخص انتخاب، و برای هر سه لوکوس تحت PCR قرار گرفت.

محل مورد نظر می‌شود. در مرحله بعد تعیین اندازه لوکوس و محاسبه تعداد تکرارها است. این مرحله به‌وسیله الکتروفورز کردن محصول‌های به دست آمده از PCR انجام پذیرفت که اندازه هر لوکوس با توجه به سایز مارکر استاندارد bp plus ۲۰۰ قرائت شد. با توجه به این که تعداد نوکلئوتیدهای قطعه‌های تکراری، در لوکوس‌های به کار رفته در این مطالعه محدود است لذا تشخیص آلل‌ها از روی تصاویر ژل الکتروفورز دشوار بوده، بنابراین جهت تأیید نتایج حاصل از ژل الکتروفورز، محصول‌های PCR تعیین توالی شدند.

سه فاکتور: میزان پرایمر، میزان DNA و میزان $MgCl_2$ با مقادیر زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

میزان پرایمر (۱ μ و ۰/۲۵ از محلول کار ۵ pmol)

میزان DNA (۴ μ)

میزان $MgCl_2$ (۳۶/۰ μ از محلول غلیظ)

غلظت بهینه پرایمر برای هر دو مورد ۲۵/۰ μ تعیین شد.

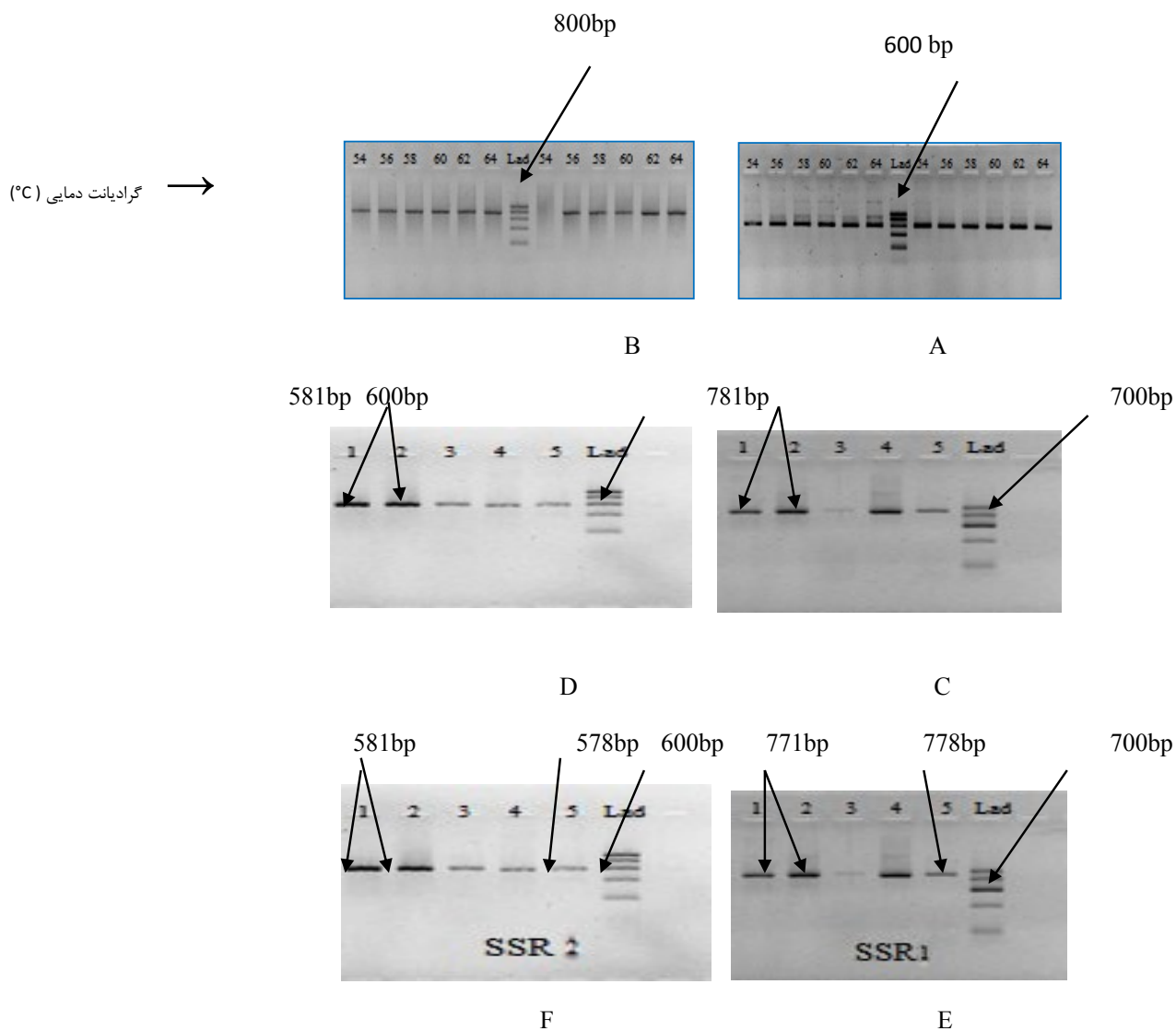
با توجه به این که از مخلوط آماده مصرف PCR استفاده می‌شود، این مخلوط حاوی میزان معینی $MgCl_2$ است، لذا در اکثر موارد لزومی به افزودن آن نیست. نتایج نشان داد که در ارتباط با پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه افزودن $MgCl_2$ تأثیر مثبتی بر واکنش‌ها ندارد. لذا به میزان موجود در مخلوط آماده مصرف PCR اکتفا شد.

آزمون MLSSR

این آزمون وابسته به PCR در عمل از دو آزمون مستقل تشکیل گردید که بر تمام جدایه‌های تحت مطالعه اعمال شد که دو لوکوس مورد مطالعه شامل SSR1, SSR2 هستند. تمام نمونه‌های مورد مطالعه در آزمون‌های PCR دو گانه MLSSR به‌صورت موفقیت‌آمیز محصول‌هایی را تولید نمودند که به دنبال انجام ژل الکتروفورز، موجودیت و حدود اندازه آن‌ها نشان داده شد. با استناد به ژل الکتروفورز محصول‌های PCR تعیین توالی گردیدند تا اندازه دقیق هر لوکوس حاصل گردد.

لوکوس SSR1

طول واحد تکراری این لوکوس برابر ۶ زوج باز است. آمپلی-فیکاسیون این لوکوس در تمام ۳۰ جدایه تحت آزمون با موفقیت انجام شد و منجر به تولید محصول‌های PCR گردید برای هر جدایه دو تکرار از لوکوس SSR1 گذاشته شد، که بر اساس تصاویر به دست آمده از ژل الکتروفورز جدایه‌های تحت آزمون، ۲ آلل در بین جدایه‌ها مشاهده شد. سایز واحد تکراری



شکل ۱- تصویرهای A و B-الکتروفورز حاصل از انجام آزمون گرادیانت دمایی به ترتیب مربوط به لوکوس های SSR1، SSR2 تصویرهای C و D- آمپلی فیکاسیون لوکوس های به ترتیب SSR1، SSR2، تصویرهای E و F- آمپلی فیکاسیون شاخص های تیپ

جدول ۴- نتایج حاصل از تعیین توالی و تیپ‌بندی جدایه‌ها

Isolate ID	SSR1	SSR2	SSR type
MAP01911	778	578	I
MAPRAZI01450	781	581	II
MAPRAZI01450	781	581	II
MAPRAZI01450	781	581	II
MAPRAZI01231	781	581	II
سویه کلینیکال ۱	781	581	II
سویه کلینیکال ۲	778	578	I
سویه کلینیکال ۳	778	578	I
سویه کلینیکال ۴	781	581	II
سویه کلینیکال ۵	781	581	II
سویه کلینیکال ۶	781	581	II
سویه کلینیکال ۷	781	581	II
سویه کلینیکال ۸	781	581	II
سویه کلینیکال ۹	781	581	II
سویه کلینیکال ۱۰	778	578	I
سویه کلینیکال ۱۱	781	581	II
سویه کلینیکال ۱۲	781	581	II
سویه کلینیکال ۱۳	781	581	II
سویه کلینیکال ۱۴	781	581	II
سویه کلینیکال ۱۵	۷۷۸	578	I
سویه کلینیکال ۱۶	781	581	II
سویه کلینیکال ۱۷	781	581	II
سویه کلینیکال ۱۸	781	581	II
سویه کلینیکال ۱۹	781	581	II
سویه کلینیکال ۲۰	781	581	II
سویه کلینیکال ۲۱	781	581	II
سویه کلینیکال ۲۲	778	578	I
سویه کلینیکال ۲۳	781	581	II
سویه کلینیکال ۲۴	781	581	II
سویه کلینیکال ۲۵	781	581	II

SSR locus name	Indices	Priod size	Copy Number	Consensus Repeat Sequence	Percent matches
1911-SSR1	18-27	3	3.3	TGG	100
1911-SSR1	355-368	6	2.3	GGTGGT	100
1911-SSR2	291-304	3	4.7	CAG	100
1450-SSR1	18-27	3	3.3	TGG	100
1450-SSR1	355-371	6	2.8	GGTGGT	100
1450-SSR2	291-307	3	5.7	CAG	100
III&V-SSR1	18-27	3	3.3	TGG	100
III&V-SSR1	355-371	6	2.8	GGTGGT	100
III&V-SSR2	291-307	3	5.7	CAG	100
316F-SSR1	18-27	3	3.3	TGG	100
316F-SSR1	355-371	6	2.8	GGTGGT	100
316F-SSR2	291-307	3	5.7	CAG	100
1231-SSR2	291-307	3	5.7	CAG	100
1450-SSR1	355-370	6	2,7	GGTGTT	100
1911-SSR2	291-300	3	4,7	CAGG	100
316F-SSR1	356-371	6	2,8	GGTGGT	100

بحث

در حال حاضر روش کشت روی محیط جامد اختصاصی به- عنوان حساس ترین و اختصاصی ترین روش جهت تشخیص پاراتوبرکلوزیس در دامها شناخته شده است. اما روشهای مبتنی بر کشت برای این باکتری زمان بر بوده و از لحاظ آزمایشگاهی مشکل است. بر همین اساس روشهای جدید مولکولی مبنی بر PCR به عنوان یک روش جایگزین و مناسب جهت تشخیص باکتری مورد استفاده قرار می گیرد (۲۱). یکی از عمومی ترین و شناخته شده ترین مارکرهای ژنتیکی مورد استفاده در تأیید هویت سویه های MAP، IS900 است (۱۵،۲۳). پروتکل های متعددی برای استفاده از PCR در انواع معمولی (۲۳،۲) و Real-time (۱۶،۱۱) بر مبنای این مارکر طراحی شده است. در مطالعه حاضر از زوج پرایمر پیشنهادی در مطالعه Overduin و همکاران استفاده گردید (۱۵) که در نتیجه انجام آن بر روی سویه های MAP یک قطعه به طول ۵۶۰ bp حاصل شد. بدین ترتیب با تولید این قطعه در جریان انجام آزمون PCR-IS900 بر روی هر دو سویه MAP 316F و MAP III&V هویت آن ها به عنوان سویه های مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس مورد تأیید قرار گرفت.

علی رغم اختصاصی بودن وجود مارکر IS900 در ژنوم MAP به دلیل مشابهت ژنتیکی زیاد مشاهده شده میان این Insertion Sequence و واحدهای ژنتیکی مشابه آن که به نام عوامل شبه IS900 (IS900-like) نامیده می شوند، بسته به نوع پرایمرهای انتخاب شده، احتمال مشاهده نتایج غیر واقعی وجود دارد و گزارش هایی از بروز این حالت موجود است (۷، ۱۰). به همین دلیل استفاده از مارکرهای ژنتیکی هم ارز می تواند بر دقت و درستی آزمون های تعیین هویت اضافه نماید. بر همین اساس در تحقیق حاضر در کنار آزمایش-PCR IS900 از آزمایش PCR-F57 نیز استفاده گردید. F57 یکی دیگر از مارکرهای اختصاصی شناخته شده در ژنوم MAP است. کمابیش همه پروتکل های پیشنهاد شده حال حاضر موجود برای استفاده از این مارکر ژنتیکی برای سیستم های Real-time تنظیم گردیده اند (۴، ۸، ۹) که دسترسی به آن در

همه آزمایشگاه های تشخیصی دامپزشکی امکان پذیر نیست. از طرف دیگر طول قطعه های ژنتیکی پیش بینی شده برای Real-time PCR کوچک تر از ۱۰۰ bp هستند که سازگار مناسب برای کار با ماشین های PCR متعارف نیستند (۲۴،۱۳). به همین دلیل در جریان مطالعه حاضر با طراحی یک زوج پرایمر اختصاصی و تنظیم شرایط اجرا از نظر دما و زمان، یک پروتکل ابداعی مناسب برای ماشین های کلاسیک فراهم گردید. با اجرای این پروتکل بر روی هر دو سویه MAP 316F و MAP III&V در آزمایش PCR-F57 یک قطعه به طول ۷۰۴ bp تولید گردید که بدین ترتیب هویت آن ها به عنوان MAP مورد تأیید قرار گرفت.

در سال ۲۰۰۲ کالینز یک روش وابسته به PCR را طراحی و معرفی نمود که با استفاده از ۳ پرایمر امکان تشخیص میان دو تیپ گوسفندی و گاوی را فراهم می نماید به گونه ای که با اجرای این آزمایش در مورد سویه های گاوی یک قطعه به طول ۳۱۰ bp و در مورد سویه های گوسفندی یک قطعه به طول ۱۶۲ bp تولید خواهد گردید (۱۹). در مطالعه حاضر در نتیجه انجام آزمایش کالینز بر روی هر دو سویه MAP 316F و MAP III&V یک قطعه ژنومی به طول ۳۱۰ bp تولید گردید. بدین ترتیب هویت این سویه ها به عنوان سویه های تیپ گاوی نشان داده شد. سویه MAP 316 یک سویه انگلیسی است که بیش از پنجاه سال قبل، از گاو جدا شده است (۳) و تحت سویه های آن نظیر MAP 316F به عنوان سویه واکسینال مورد استفاده بین المللی قرار دارند (۱۲). انجام این آزمایش از یک دیدگاه دیگر نیز حائز اهمیت است. تاکنون هیچ گزارشی از وجود تیپ های گوسفندی و گاوی MAP در ایران وجود ندارد و اعمال این روش بر روی جدایه های بیماری زای ایرانی می- تواند سطح اطلاعات موجود در ارتباط با جمعیت این پاتوژن در ایران را افزایش دهد. ترتیب یکی دیگر از یافته های کاربردی این مطالعه کمک به آگاهی از ساختار ژنومی این سویه های مولد است. در سال ۲۰۰۷ و در جریان مطالعه Thibault دو تحت سویه از MAP 316F مورد بررسی مقایسه ای ژنتیکی بر اساس روش استاندارد MLVA-VNTR typing قرار گرفتند

جدایه‌ها تعیین توالی شدند تا از اندازه دقیق هر لوکوس حاصل گردد. مقایسه توالی نوکلئوتیدهای این لوکوس ۳۰ جدایه تحت آزمون که تعیین توالی شدند، سایر تکراری برای این لوکوس ۳ زوج باز در ۲۴ جدایه ۵۲ باز، و در ۶ جدایه ۱۱۵۸ زوج بازو تعداد ۳۰ کپی از ایر مشاهده شد.

(۶). این مطالعه مشابهت دو تحت سویه در ۵ لوکوس از شش لوکوس مورد استفاده (که در مطالعه حاضر نیز از آنها استفاده شده است) را نشان داد به طوری که به جزء لوکوس X3 که در ژنوم تحت سویه فرانسوی MAP 316F Merial ۲ کپی از واحد تکرار شونده و در ژنوم تحت سویه انگلیسی MAP 16F Weybridge فقط یک کپی از واحد تکرار شونده مشاهده گردید، تفاوتی در بین این تحت سویه‌ها در ارتباط با سایر لوکوس‌ها دیده نشد. در مطالعه حاضر تعداد کپی‌ها در لوکوس X3 ژنوم تحت سویه MAP 316F Razi برابر با ۲ و مانند MAP 316F Merial تعیین گردیده است. ضمن آن که اندازه سایر لوکوس‌های مورد استفاده در این تحقیق برابر با اندازه لوکوس‌های هم‌ارز در مطالعه Thibault بودند. بر اساس مستندات موجود سویه‌های غیر ایرانی MAP برای نخستین بار توسط دکتر هدایتی در سال ۱۳۴۳ و به دنبال بازدید نام‌برده از مؤسسه Weybridge انگلستان به ایران وارد گردیدند. Thibault بروز تفاوت میان دو تحت سویه انگلیسی و فرانسوی MAP 316F در مورد تعداد کپی‌ها در لوکوس X3 را در نتیجه بروز تغییرهای ژنتیکی ناشی از اجرای پاساژهای مستقل و متعدد بر روی سویه اجدادی (انگلیسی) این تحت سویه‌ها می‌داند که در طول چند دهه گذشته در این دو مرکز اتفاق افتاده است (۶).

نتیجه‌گیری

طول واحد تکراری SSR1 برابر ۶ زوج باز است. آمپلی-فیکاسیون این لوکوس در تمام ۳۰ جدایه تحت آزمون با موفقیت انجام شد و منجر به تولید محصول‌های PCR گردید. سائز واحد تکراری برای لوکوس SSR1 ۶ زوج باز، در ۲۴ جدایه ۴۶۰۸ زوج باز و در ۶ جدایه ۱۰۴۴ زوج باز و تعداد ۱۹ کپی از این توالی در ۳۰ جدایه مشاهده شد. لوکوس SSR2 با سائز واحد تکراری ۳ زوج باز در ۳۰ جدایه مورد بررسی این مطالعه مثبت بوده و منجر به تولید محصول PCR گردید.

منابع

- 1- Baharsefat, M., Amjadi, A., Ahourai, P., Yamini, B., Entesar, F. and Hedayati, H. Paratuberculosis in goats and sheep in Iran, epidemiological, clinical, pathological features and laboratory diagnosis. Archive of Razi Institute. 1972. 24, 49-61.
- 2- Castellanos, E., Juan, L.d., Domínguez, L., Aranaz, A. Progress in molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Research in veterinary science. 2012. 92(2):169-79.
- 3- Cetinkaya, B., Egan, K., Harbour, D.A., Morgan, K.L. An abattoir –based study os the prevalence of subclinical john`s disease in adult cattle in southwest England, Epidemiology and infection. 1996. 116 : 373-379.
- 4- Chiodini, R.j.,Van kruiningen, H.J., Merkal, R.S. Journal of comparative pathology.1984.116 : 217-261. Ruminant *paratuberculosis* (John`s disease) : the current status and future prospects, Cornell veterinarian 74 : 218-262.
- 5- Eriks, I.S., Munck, K.T., Besser, T.E., Cantor, G.H., Kapur, V. Rapid differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. paratuberculosis* by PCR and restriction enzyme analysis. Journal of Clinical Microbiology. 1996. 34: 734-737
- 6- Gill, C., Saucier, L., Meadus, W. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. Journal of Food Protection®. 2011.74(3):480-99.
- 7- Hancox, M., *Transmission of bovine TB in cattle: a critical reappraisal*. Lett Appl Microbiol.1999. 28(3): p. 242-4.
- 8- Hirsh, D.C., Zee, U.c. Vterinary microbiology. Blackwell science company, First edition pp.1999. 104-108.
- 9- Muhammad Tanveer Munir, Anum Rafia-munir Murtaz UI Hassan, Muhammad Abubakr Detection of Mycobacterium Avium subsp paratuberculosis in faeces using different producers of pre-treatment for Real time PCR in comparison to culture, September 2013
- 10- Khavari, Khorasani, I., *Research in Bovine Tuberculosis in Iran*. 1st ed. 1999. Iran-Tehran: Iranian Veterinary Organisation
- 11- Li, L., Bannantine, J.P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B.J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., Kapur, V. The complete genome sequence of *M. avium subsp. paratuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005. 102, 12344– 12349.
- 12- Nackmoon, S. and Michael, T. Collins* Variation in Resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to Acid Environments as a Function of Culture Medium. 2003. Nov; 69(11): 6833–6840.
- 13- Okuni, J.B. Occurrence of *Paratuberculosis* in African Countries: a Review. J Vet Adv. 2013. 3(1):1-8.
- 14- O`Mahony, J., Hill, C. Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. Applied and Environmental Microbiology. 2004. 70: 4561-4568
- 15- Overduin, P., Schouls, L., Roholl, P., Van Der Zanden, A., Mahmmod, N., Herrewegh, A., & Van Soolingen, D. Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Journal of clinical microbiology. 2004. 42(11), 5022-5028.
- 16- Ricchi, M., Barbieri, G., Taddei, R., Belletti, G.L., Carra, E., Cammi, G., et al. Effectiveness of combination of Mini-and Microsatellite loci to sub-type *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* Italian type C isolates. BMC veterinary research. 2011. 7(1):54.
- 17- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I. 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. 2008. 128: 250-257
- 18- Stable, J., Wells, S., Wagner, B. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk- tank milk test results for john`s disease in US dairy herds. Journal of Dairy Science. 2002. 85: .525-533 Real-time PCR
- 19- Tylor, A.W. Observation on the incidence of infection with *M.johneii* in cattle, Veterinary record. 1949. 61 : 539-540.

- 20-Vary, PH., Andersen, P.R., Green, E., Hermon-Taylor, J., Mc-Fadden, J.J. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*.1990. 28: 933-937
- 21-Waddell, L.A., Rajic, A., Stark, K.D. and Mc, E.S. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*: A systematic review and meta analyses of the evidence. *Epidemiology and infection*. 2015.1-23.
- 22- Windsor, P.A. Paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary microbiology*. 2015. 181(1), 161-169.
- 23-Windahl, U., Reimegård, E., Holst, B.S., Egenvall, A., Fernström, L., Fredriksson, M., et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs-alongitudinal study. *BMC Vet Res*. 2012. 8:34.
- 24- Withers, F.W. Incidence of the disease, *Veterinary record*. 1959. 71 : 1150-1153.