

بررسی و مقایسه ژنتیکی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس جدا شده از دام های استان های تهران و البرز توسط روش های PCR و SSR

امید غفاری^۱، فاطمه فروھی^{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 روش ها: این مطالعه بر روی ۳۰ جدایه که از لحاظ موقعیت جغرافیایی منطقه جداسازی (استان های 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.

یافته ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جدایه های مورد بررسی از نظر ساختار دو لوکوس SSR1 و SSR2 هم با یکدیگر و هم با سویه های استاندارد دارای تفاوت ژنتیکی است. در این لوکوس ها به علت وجود Insertion و یا Deletion توالی های تکرار شده پشت سر هم، الگوهای ژنتیکی متفاوتی مشاهده می شود که امکان تمایز بین سویه ها را میسر می سازد.

نتیجه گیری: با در نظر گرفتن دو آلل مربوط به هر کدام از ژن ها، باکتری های مورد مطالعه در دو تیپ ژنتیکی جای گرفتند.

واژه های کلیدی: بیماری یون، مایکوباکتریوم /اویوم، پاراتوبرکلوزیس، SSR2، SSR1

مقدمه

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Johne's) نقش ایجاد کنندگی بیماری کرون disease را در انسان بازی می کند (۱۲). این بیماری در دهه اخیر با تمام وجود در دامپروری های ایران به ویژه گاوداری های صنعتی که به شکل متراکم پرورش می یابند دیده شده و باعث پیامدهای شدیدی در ارتباط با کاهش تولید به ویژه 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 عفونت های دامی و انسانی می گردد. آن ها از نظر سروولوژی و توسط روش های مولکولی قابل تفرقی هستند اما از نظر فنوتیپی از هم قابل تشخیص نیستند. گونه های ذکر شده در بالا جزو در مورد گونه های MAC، انگل های اجباری هستند (۲۰).

از زمان شناسایی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پارا توبرکلوزیس (MAP)، روش های گوناگونی برای شناسایی آن در

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

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

بیماری یون گاوی به چند دلیل بیماری مهم به شمار می رود: اول بیماری باعث ضرر های اقتصادی شدید در نتیجه کاهش تولید می شود. دوم تعداد حیوانات کشتاری و حذف شده افزایش می یابد هم چنین هزینه های مربوط به روش های آزمایش و کنترل بیماری بالاست و علاوه بر آن اعتقاد بر این است که مایکوباکتریوم آویوم 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

¹ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

در شرایط مناسب و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه- گذاری شدند. رشد باکتری ها هر هفته کنترل شد. نمونه های کلینیکی از طریق رکتوم با دستکش مخصوص استریل جمع- آوری شده در ظروف استریل نمونه برداری به آزمایشگاه انتقال یافت.

روش جداسازی بر مبنای کشت مدفوع بود، به این صورت که: ۱۰ گرم مدفوع در ۴۰ میلی لیتر آب م قطر حل شده، سپس به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از مایع رویی به میزان ۵ میلی لیتر برداشته شده و در ۳۰ میلی لیتر آب م قطر حاوی زفیران ۰/۳ درصد افزوده گردید تا آلدگی زدایی 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 مایکروبکتین به آن اضافه شده بود و ۱ لوله بدون مایکروبکتین، در ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شد و به صورت هفتگی مورد بررسی قرار گرفت.

البته برای کنترل وجود قارچ ۲ میلی لیتر رسوب با ۴ قطره آمفوتربیسین B (۵ میکرو گرم در میلی لیتر) مخلوط شده و به هر لوله قبل از کشت ۴ قطره افزوده گردید. در ۳ لوله حاوی مایکروبکتین به طور عمده بعد از ۸ هفته پر گنه ها ظاهر گردید. با توجه به مورفولوژی کلني، رنگ آمیزی اسید فست، مقایسه کلني با کلني سوش رفننس و با توجه به اختصاصي بودن محیط کشت به خاطر وجود گليسيرين و مایکروبکتین، مشخص می شود که باکتری جدا شده مایکروبکتريوم تحت گونه پاراتوبرکلوزيس است.

استخراج DNA

به منظور فراهم نمودن ماده ژنتيکي باکترى با كيفيت مناسب قابل استفاده در آزمون های PCR و همچنان مورد نياز برای انجام آزمون تعیین توالى نوكليوتيد های محصول های PCR، DNA تمام جدایه های مورد مطالعه به روش جوشاندن استخراج شد. كيفيت و كميت DNA استخراج شده با الکتروفورز مشخص گردید و DNA تا زمان PCR در فريزر ۰-۲۰ نگهداري شد.

آزمون های PCR

در اين مطالعه جهت شناسائی ژنوتاپ های مختلف بین جدایه های مورد مطالعه، از دو لوکوس SSR شامل: SSR1، SSR2 استفاده گردید. در آزمون های PCR، پرایمر های مورد استفاده

حيوانات آلدوه به کار رفته است که شامل تشخيص سنتی بر اساس علائم باليني، استفاده از روش های ايمني سنجي، روش های مبتنی بر PCR مانند PCR ساده (۲۰)، PCR آشيانه ای (۱۸) و Real-time PCR است (۱۴، ۵). همچنان روش RFLP همراه با روش PCR يا به اختصار PCR-REA نيز از مدت ها قبل برای اين کار پيشنهاد شده است (۱۷). از روش RDA PCR برای متماييز ساختن سويه های مایکروبکتريوم پاراتوبرکلوزيس به دو تipe اصلی I و II استفاده می شود. تipe I- RDA10، pig-pig-RDA20، pig-RDA30 نمي شود (۱۴). باید توجه داشت که هنوز هم روش کشت به عنوان روش اصلی در آزمایشگاهها به منظور تشخيص MAP مورد استفاده قرار مي گيرد (۲۳). در بين روش های مذکور روش های مبتنی بر PCR به لحاظ سرعت بالا، هزينه کم و حساسيت زياد، جايگاه، جايگاه، ويژه ای دارند. امروزه بيش تر روش هایی که از PCR برای تشخيص MAP بهره می برنند، مبتنی بر شناسايي قطعه DNA درون IS900 هستند (۱۷).

در مطالعه حاضر تلاش شد با استفاده از نوع خاصی از تکرارهای ژنتيکي که به Short Sequence Repeats (SSR) معروف هستند نوع ژنتيکي جمعیت اين باکتری در میان جدایه های موجود در آرشيو باكتريالي مؤسس سرمه سازی رازی و باكتري های جذاشه از مدفوع دام ها تعیین و با نمونه خارجي اين باكتري مقایسه گردید. يافته های اين تحقیق بر دانش موجود از اپیدمیولوژی پاراتوبرکلوزيس در ایران خواهد افزود.

مواد و روش ها

جمع آوري نمونه

اين مطالعه بر روی ۳۰ جدایه کلینيکي مایکروبکتريوم آويوم تحت گونه پاراتوبرکلوزيس که تعداد ۵ سويه آن موجود در كلکسيون ميكروبی مؤسس رازی، باهوش مشخص و ۲۵ سويه جدا شده از مدفوع گاو و گوسفند و بز اجرا گردید. علاوه بر اين، سويه مرجع مورد استفاده در اين مطالعه شامل سويه استاندارد Razi Type Culture Collection در آرشيو ميكروبی RTCC: 2375 نيز به کار گرفته شد. باكتري های موجود در آرشيو ميكروبی مؤسس رازی در محیط کشت هرولد اگ غني شده با مایکروبکتین J و همچنان هرولد اگ فاقد مایکروبکتین J (۲ ميلى گرم به ازاي هر ميلى لiter محیط) کشت داده شد و لوله های کشت به صورت مورب به مدت ۱ هفته گرم خانه گذاري شدند. پس از ۱ هفته لوله ها به صورت عمودي و به مدت ۸ هفته

همچنین شرایط دمایی در جداول ۱، ۲ و ۳ آمده است.

جهت SSR1 و SSR2، ترکیب‌های مورد استفاده در PCR و

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 GCC 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

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

نتایج:

با استفاده از برنامه گرادیانت دمایی دستگاه ترموسایکلر، دمای مناسب جهت مرحله Annealing، پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. مناسب‌ترین دما برای پرایمرهای SSR1 و SSR2 تعیین شد. همچنین علاوه بر تعیین دمای مناسب جهت مرحله Annealing با استفاده از گرادیانت 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 به علت وجود Insertion و Deletion یا گروه‌های ژنتیکی متفاوتی مشاهده می‌شود که امکان تمایز بین سویه‌ها را میسر می‌سازد. شمارش تکرارهای یک لوکوس در

ژل الکتروفورز محصول‌های PCR از ژل آگاروز به همراه Safe Red 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 ژل‌داس (Bio Rad USA) انجام گردید. به عنوان 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، به صورت 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 به دست آمده از آزمون‌های تعیین توالی، استفاده شد. بدین منظور جهت مشاهده فایل‌های گرافیکی توالی نوکلئوتیدها (به صورت کروماتوگرام) از برنامه

اساس تصاویر به دست آمده از ژل الکتروفورز جدایه های تحت آزمون، ۲ آلل در بین جدایه ها مشاهده شد. سایز واحد تکراری 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 توالی های نوکلئوتید های این لوکوس در ژنوم ۳۰ جدایه تحت آزمون که تعیین توالی شدند، یافته های ژل الکتروفورز را مورد تأیید قرار داد. استفاده از معادله گاستون و هانتر 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 تصویر های به دست آمده ۲ آلل در بین نمونه ها مشخص گردید. جدایه ها تعیین توالی شدند تا از اندازه دقیق هر لوکوس اطلاع حاصل گردد. مقایسه توالی نوکلئوتید های این لوکوس در ژنوم ۳۰ جدایه تحت آزمون که تعیین توالی شدند، سایز واحد تکراری برای این لوکوس ۳ زوج باز در ۲۴ جدایه ۱۱۵۲ زوج باز، و در ۶ جدایه ۱۱۵۸ زوج باز و تعداد ۳۰ کپی از این توالی مشاهده شد. استفاده از معادله گاستون و هانتر عدد شاخص HGDI را معادل ۰/۹۳ نشان داد.

نتایج تجمعی ژنوتایپینگ لوکوس ها:

این مطالعه بر روی ۲۵ جدایه کلینیکی با هویت نامشخص و نیز ۵ سویه مرجع با هویت معلوم انجام شد. نمونه های 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 آلل ها در هر دو لوکوس، نمونه های مورد مطالعه در دو تیپ ژنتیکی جای گرفتند. نتایج حاصل از تعیین توالی و تیپ بندی جدایه ها بر اساس ۲ تیپ ژنتیکی به دست آمد. جهت مشاهده آلل ها در کنار هم، از هر تیپ ژنتیکی یک نمونه به عنوان شاخص انتخاب، و برای هر سه لوکوس تحت PCR قرار گرفت.

یک فرآیند دو مرحله ای صورت می گیرد: ابتدا انجام آزمون PCR برای هر لوکوس، که بدین منظور به ازای هر لوکوس از یک جفت پرایمر استفاده می شود که در نهایت منجر به تکثیر محل مورد نظر می شود. در مرحله بعد تعیین اندازه لوکوس و محاسبه تعداد تکرارها است. این مرحله به وسیله الکتروفورز کردن محصول های 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 نوکلئوتید های قطعه های تکراری، در لوکوس های به کار رفته در این مطالعه محدود است لذا تشخیص آلل ها از روی تصاویر ژل الکتروفورز دشوار بوده، بنابراین جهت تأیید نتایج حاصل از ژل الکتروفورز، محصول های PCR تعیین توالی شدند.

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

- میزان پرایمر (μL) ۰/۰۵ از محلول کار (۵ pmol)
- میزان DNA (μL) ۰/۴ از محلول غلیظ (μL) ۰/۳۶ $MgCl_2$ از محلول غلیظ (μL) ۰/۳۶

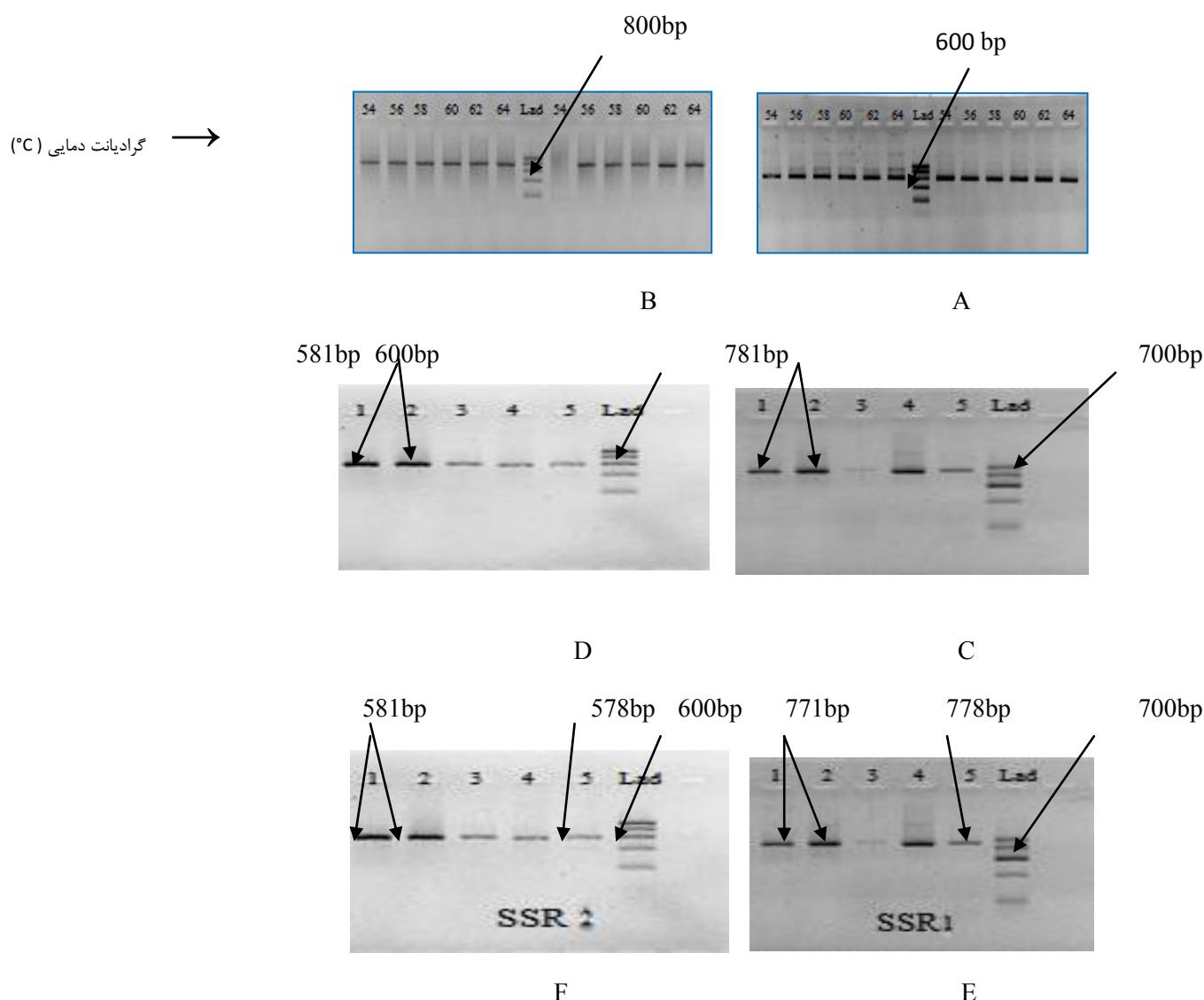
غلظت بهینه پرایمر برای هر دو مورد μL ۰/۲۵ تعیین شد. با توجه به این که از مخلوط آماده مصرف PCR استفاده می شود، این مخلوط حاوی میزان معینی $MgCl_2$ است، لذا در اکثر موارد لزومی به افزودن آن نیست. نتایج نشان داد که در ارتباط با پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه افزودن $MgCl_2$ تأثیر مثبتی بر واکنش ها 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 جدایه های تحت مطالعه اعمال شد که دو لوکوس مورد مطالعه شامل SSR2, SSR1 هستند. تمام نمونه های مورد مطالعه در آزمون های PCR دو گانه MLSSR به صورت موفقیت آمیز محصول هایی را تولید نمودند که به دنبال انجام ژل الکتروفورز، موجودیت و حدود اندازه آن ها نشان داده شد. با استناد به ژل الکتروفورز محصول های 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 محصول های PCR گردید برای هر جدایه دو تکرار از لوکوس SSR1 گذاشته شد، که بر



شکل ۱- تصویرهای A و B- الکتروفورز حاصل از انجام آزمون گرادیانت دمایی به ترتیب مربوط به لوکوس‌های SSR1، SSR2 تصویرهای C و D- آمپلی‌فیکاسیون لوکوس‌های به ترتیب SSR1، SSR2، تصویرهای E و F- آمپلی‌فیکاسیون شاخص‌های تیپ

جدول ۴- نتایج حاصل از تعیین توالی و تیپ بندی جدایه ها

Isolate ID	SSR1	SSR2	SSR type
MAP01911	778	578	I
MAPRAZI01450	781	581	II
MAPRAZIII&V	781	581	II
MAPRAZI316F	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	778	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 name	locus	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

بحث

در همه آزمایشگاه های تشخیصی دامپزشکی امکان پذیر نیست. از طرف دیگر طول قطعه های ژنتیکی پیش بینی شده برای Real-time PCR کوچکتر از ۱۰۰ bp هستند که سازگار مناسب برای کار با ماشین های PCR متعارف نیستند (۱۳، ۲۴). 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 ۷۰ 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 گوسفندي 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 گوسفندي 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 316 MAP 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 گوسفندي 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 تحت سویه از MAP 316F مورد بررسی مقایسه ای ژنتیکی بر اساس روش استاندارد MLVA-VNTR typing قرار

در حال حاضر روش کشت روى محيط جامد اختصاصی به عنوان حساس ترین و اختصاصی ترین روش جهت تشخیص پاراتوبرکلوزیس در دامها شناخته شده است. اما روش های مبتنی بر کشت برای این باکتری زمان بر بوده و از لحاظ آزمایشگاهی مشکل است. بر همین اساس روش های 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 (۲۲، ۱۵). پروتکل های متعددی برای استفاده از PCR در انواع معمولی (۲، ۲۳) و Real-time (۱۱، ۱۶) 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 مایکروب اکترویوم پاراتوبرکلوزیس مورد تأیید قرار گرفت.

على رغم اختصاصی بودن وجود مارکر IS900 در ژنوم MAP به دلیل مشابهت ژنتیکی زیاد مشاهده شده میان این Insertion Sequence و واحد های 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 (۱۰، ۷). به همین دلیل استفاده از مارکرهای ژنتیکی همارز می تواند بر دقت و درستی آزمون های تعیین هویت اضافه نماید. بر همین اساس در تحقیق حاضر در کنار آزمایش PCR-F57 از آزمایش PCR-IS900 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 تنظیم گردیده اند (۴، ۸، ۹) که دسترسی به آن

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 ۱۱۵۲ زوج باز، و در ۶ جدایه ۱۱۵۸ زوج بازو تعداد ۳۰ کپی از این توالی مشاهده شد.

گرفتند (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 Merial ۲ کپی MAP 316F Merial از واحد تکرار شونده و در ژنوم تحت سویه انگلیسی MAP ۱۶F Weybridge 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 پاسازهای 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 می‌باشد. آمپلی-فیکاسیون این لوکوس در تمام ۳۰ جدایه تحت آزمون با موفقیت انجام شد و منجر به تولید محصول های PCR گردید سایز 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 سایز 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. Veterinary microbiology. Blackwell science company, First edition pp.1999. 104-108.
- 9- Muhammad Tanveer Munir,Anum Rafia-munirMurtaz 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.johnei* 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.