

## جداسازی مایکوباکتریوم ایویوم زیر گونه پاراتوبر کولوزیس از نمونه‌های مشکوک و تأیید آن به روش Nested-PCR

• لیدا عبدالمحمدی خیاو

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

• مسعود حق خواه

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

• کیوان تدین (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

• نادر مصوری

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران



تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۵-۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۶-۲۰

Email: k.tadayon@rvsri.ir

### چکیده

پاراتوبرکلوزیس (بیماری یون) بیماری مزمن گرانولوماتوزی روده باریک توسط مایکوباکتریوم ایویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (MAP) ایجاد می‌شود. در کنترل بیماری، مهم‌ترین اقدام تشخیص و جداسازی حیوانات آلوده می‌باشد لذا هدف این بررسی جداسازی عامل این بیماری از دام‌های مشکوک و در ادامه تأیید جدایه‌ها با استفاده از تست‌های مولکولی بود. برای این منظور ۱۴۲ نمونه مشکوک ارسالی از استان‌های اصفهان، البرز، تهران، خراسان شمالی، خوزستان، زنجان، فارس، قزوین، کرمان و گلستان پس از آلودگی‌زدایی بر روی محیط کشت هرالد آگ حاوی مایکوباکتین و بدون مایکوباکتین کشت داده شدند. پس از استخراج DNA، rRNA PCR-<sup>۱۶S</sup> و سپس از نمونه‌های مثبت Nested-PCR انجام شد. در مجموع از ۱۴۲ نمونه مشکوک ۴۷ جدایه بدست آمد. در گسترش میکروسکوپی همه جدایه‌های مثبت در رنگ‌آمیزی زیل نلسون با سیل اسید فاست مشاهده گردید و در ۸۳ نمونه از مجموع ۱۴۲ نمونه مورد آزمایش و همچنین از سویه‌های مایکوباکتریایی در جواب rRNA PCR<sup>۱۶S</sup> باندی در ناحیه ۵۴۳ bp مشاهده شد که نشان‌دهنده حضور مایکوباکتریوم در نمونه‌های فوق بود. از تمامی جدایه‌ها و سویه‌های کنترل مثبت و منفی Nested-PCR انجام پذیرفت که در مرحله اول باند ۳۹۸ bp توسط پرایمرهای P<sub>۹۰</sub> و P<sub>۹۱</sub> و در مرحله بعد قطعه‌ای به طول ۲۹۸ bp توسط پرایمرهای AV<sub>۱</sub> و AV<sub>۲</sub> حاصل گردید که نشان‌دهنده وجود مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در نمونه‌ها بود. بر اساس این مطالعه Nested-PCR به عنوان روش مناسب تشخیص سریع قطعی موارد بیماری پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس، یون، ایران، Nested-PCR، rRNA<sup>۱۶S</sup>

- Veterinary Researches & Biological Products No 122 pp: 41-47

#### Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and confirmation of cases by Nested-PCR

By: Abdolmohammadi Khiav, L., Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Haghkhah, M., Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. Tadayon, K., (Corresponding Author) Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Mosavari, N., Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2018-07-28 Accepted: 2018-09-11

Email: k.tadayon@rvsri.ir

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic granulomatous disease of the small intestine that is caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). The aim of this study was to determine the status of this disease in suspected animals and finally confirmation of isolates identity by molecular tests. For this purpose, 142 suspicious samples were cultured on plain and mycobactin J-supplemented Herrold's egg-yolk slants from Isfahan, Alborz, Tehran, North Khorasan, Khuzestan, Zanjan, Fars, Qazvin, Kerman and Golestan provinces. Forty seven isolates were obtained out of 142 suspicious samples. All specimens that were grown on mycobactin J-supplemented Herrold's egg-yolk slants were detected by Ziehl-Neelsen staining as acid Fast bacilia, and in 83 samples of the total, as well as mycobacterial strains, a 543 bp fragment was amplified using PCR-16s rRNA. Nested PCR was done on isolates and positive and negative controls. At the first stage, a 398 bp fragment was obtained by P90 and P91 primers, and in the next step, a 298 bp fragment was obtained using AV1 and AV2 primers, which indicates the presence of *Mycobacterium paratuberculosis* in the samples. Based on this study, Nested-PCR is suggested as a suitable rapid diagnostic method for disease cases.

**Keywords:** *Mycobacterium paratuberculosis*, Johne's, Iran, 16s rRNA-PCR, Nested-PCR

ابداع و معرفی شده‌اند (۱). در کنترل پاراتوبرکولوزیس شناسایی و جداسازی MAP در دام‌های آلوده بدون تظاهرات بالینی در گله که با پخش باکتری از طریق مدفوع موجبات انتشار بیماری می‌گردند، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۱۷). از میان مجموعه بزرگی از انواع مارکرهای ژنتیکی اختصاصی MAP نظیر F57، Locus 255 و ISMav<sub>2</sub> (۱۵) که در پروتکل‌های Real-time PCR و Traditional PCR به کار گرفته شده‌اند لوکوس IS۹۰۰ همچنان یکی از بهترین مارکرهای ژنتیکی مرسوم در تعیین هویت MAP می‌باشد (۱۵). در مطالعه حاضر در جستجو بدنبال جدایه‌های MAP در میان نمونه‌های مدفوع، شیر، روده و عقده لنفاوی پس از اقدام به کشت نمونه‌ها بر روی محیط‌های اختصاصی از پلت فرم Nested-PCR با تمرکز بر IS۹۰۰ استفاده گردید.

#### مواد و روش کار

##### نمونه‌گیری و جداسازی باکتری

۱۴۲ نمونه مشکوک از سراسر کشور از مهر ماه سال ۱۳۹۴ تا فروردین ماه سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری گردید که شامل ۲۰ نمونه شیر، ۱۱۹ نمونه مدفوع، دو نمونه روده و یک نمونه عقده لنفاوی بود. نمونه‌ها از شیر، مدفوع (توسط تخریش مخاط رکتوم)، مخاط روده و عقده لنفاوی مزانتریک اخذ

#### مقدمه

مایکوباکتریوم ایویوم زیر گونه پاراتوبرکولوزیس *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) شناخته شده پاراتوبرکولوزیس در نشخوارکنندگان می‌باشد. بر اساس شواهد موجود این مایکوباکتریوم یکی از عوامل اصلی ایجاد بیماری کرون در انسان نیز شناخته شده است (۱۸). بنظر می‌رسد در آسیا به جهت فقدان منابع مالی و لجستیکی، پاراتوبرکولوزیس علیرغم ایجاد خسارت‌های گسترده اقتصادی در دامپروری به جهت کاهش تولید شیر، تولید مثل، وزن گیری و همچنین کشتار پیش‌رس دام و علاوه بر اینها ایجاد ریسک بهداشتی برای انسان، به یک بیماری فراموش شده تبدیل شده است (۲). ایران همچون سایر کشورهای منطقه نظیر پاکستان (۲۵) در طول شش دهه گذشته از هنگام شناسایی نخستین موارد بیماری در کشور (۲۳) در نتیجه فقدان یک برنامه ملی کنترل شاهد حضور اندمیک بیماری تقریباً در تمام مناطق جغرافیایی دامپروری کشور می‌باشد (۲۰). جداسازی MAP از محیط بدلیل ماهیت کند رشد باکتری، تعداد معمولاً کم آن و همچنین فراوانی سایر میکرو ارگانیسم‌ها بسادگی امکان‌پذیر و موفقیت‌آمیز نیست. بر همین اساس پروتکل‌های متنوعی نظیر فیلتراسیون، آلودگی‌زدایی و ایلوژن به منظور بازیافت باکتری از محیط

### کشت شیر

برای آلودگی‌زدایی نمونه‌های شیر، ۵۰ ml از هر یک از ۲۰ نمونه شیر در لوله فالكون استریل ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰-۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب بدست آمده پس از آلودگی‌زدایی با HPC مانند نمونه‌های مدفوع کشت گردید.

### کشت روده و عقده لنفاوی

ابتدا سطح مخاط روده و عقده با تیغ اسکالپل استریل تراشیده و داخل هاون استریل ریخته شد. ۵۰ ml تریپسین ۲/۵٪ روی نمونه ریخته و با دسته هاون صلایه گردید. سپس مایع صلایه شده به مدت ۳۰ دقیقه شیکر شد تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید. به وسیله گاز استریل سوسپانسیون صاف گردید و درون فالكون استریل ریخته شد. فالكون به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب، HPC ۷۵٪ اضافه گردید، بقیه مراحل شبیه نمونه مدفوع انجام پذیرفت. همچنین از باقیمانده رسوبات DNA استخراج و لام جهت رنگ‌آمیزی زیل نلسون تهیه و هم چنین DNA برای انجام PCR استخراج شد. از رسوب و همچنین از کلی‌های رشدیافته بر روی محیط کشت، گسترش تهیه، به روش زیل نلسون رنگ‌آمیزی و سپس مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. به منظور تامین ماده ژنتیکی مورد نیاز هر

و پس از ثبت کد دام و دامداری و تاریخ، در ظروف درپوش‌دار استریل جمع‌آوری گردید و در کنار یخ به آزمایشگاه میکوباکتریولوژی موسسه رازی منتقل گردید و تا زمان کشت در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین دو سویه آزمایشگاهی (واکسن) MAP III&V و MAP ۳۱۶F به عنوان کنترل مثبت، و دو سویه میکوباکتریوم ایویوم تحت گونه ایویوم *Mycobacterium avium subspecies avium* (MAA) و AN۵ میکوباکتریوم بویس *Mycobacterium bovis* AN۵ به عنوان کنترل منفی وارد مطالعه شدند (جدول ۱).

### کشت مدفوع

برای آلودگی‌زدایی از ۱۱۹ نمونه مدفوع، یک گرم مدفوع به یک لوله فالكون ۵۰ ml محتوی آب مقطر استریل انتقال و محتویات آن یکنواخت گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار گرفت و سپس ۵ ml از مایع فوقانی توسط پمپ به لوله حاوی ml ۲۰ محلول هگزا دسیل پیرینیدیوم کلراید (HPC) ۷۵٪ انتقال یافت. محتویات این لوله پس از مخلوط شدن به مدت ۱۸ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰-۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوبات سانتریفوژ طی سه نوبت با سرم فیزیولوژی استریل شستشو گردید و در نوبت آخر ۰/۵ ml سرم فیزیولوژی باقیمانده همراه رسوبات در دو لوله محیط کشت هرالد اگ حاوی میکوباکترین J تلقیح گردید (۲۱).

جدول ۱- اطلاعات اپیدمیولوژیک نمونه های مشکوک به آلودگی با MAP جمع آوری شده از مهرماه سال ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ مورد استفاده در این تحقیق.

استان	شهر (تعداد دامداری/تعداد نمونه)	میزبان (تعداد)	نوع نمونه (تعداد)	تعداد موارد کشت مثبت
اصفهان	اصفهان (۴۰/۱)	گاو (۴۰)	مدفوع (۲۴)، شیر (۱۶)	۱۳
البرز	کرج (۱۹/۲)، سهیلیه (۵/۱)، کردان (۱/۱)، ماهدشت (۲/۱)	گاو (۲۷)	مدفوع (۲۷)	۱۱
تهران	اسلامشهر (۲/۲) ورامین (۱۲/۱)	گاو (۱۴)	مدفوع (۱۴)	۵
خراسان شمالی	بیرجند (۱۳/۱)	بز (۱۱) گوسفند (۱) گاو (۱)	مدفوع (۱۱)، شیر (۲)	۱
خوزستان	اهواز (۲/۱)	گوسفند (۲)	روده (۱)، عقده لنفاوی (۱)	۰
زنجان	ابهر (۳/۱)	گاو (۳)	مدفوع (۳)	۲
فارس	خرامه (۱۹/۱۵)	گوسفند (۱۷)، بز (۲)	مدفوع (۱۷)، شیر (۲)	۴
قزوین	قزوین (۱۰/۶) آبیک (۸/۲)	گاو (۱۸)	مدفوع (۱۸)	۱۱
کرمان	کرمان (۳/۱)	گوسفند (۳)	روده (۱)، مدفوع (۲)	۰
گلستان	گلستان (۳/۱)	گوزن (۱)، آهو (۱)، گوسفند (۱)	مدفوع (۳)	۰
جمع	(۱۴۲/۴۰)	گاو (۱۰۳) گوسفند (۲۴) بز (۱۳) گوزن (۱)، آهو (۱)	مدفوع (۱۱۹)، شیر (۲۰) روده (۲)، عقده لنفاوی (۱)	۴۷

آمد (جدول ۱). در تمام نمونه‌هایی که روی محیط هیرالد آگ حاوی مایکوباکتین J رشد کرده بودند با رنگ‌آمیزی زیل نلسون باسیل اسید فاست مشاهده گردید و در ۸۳ نمونه از مجموع ۱۴۲ نمونه و همچنین در سویه‌های کنترل مثبت و منفی PCR-16s rRNA مثبت که با تولید یک قطعه بطول ۵۴۳ bp در 16s rRNA-PCR هویت آنها بعنوان جنس مایکوباکتریوم احراز گردید. سپس با انجام Nested PCR هویت مایکوباکتریوم ایویوم تحت گونه پاراتوبرکولوزیس در ۴۷ جدایه تأیید گردید (شکل ۱). برای این منظور توسط پرایمرهای P۹۰ و P۹۱ قطعه‌ای بطول ۳۹۸ جفت باز تولید و در مرحله بعد توسط پرایمرهای AV۱ و AV۲ قطعه‌ای بطول ۲۹۸ جفت باز حاصل گردید که نشان‌دهنده وجود مایکوباکتریوم تحت گونه پاراتوبرکولوزیس در نمونه‌ها بود (۹). همچنین سویه‌های واکسینال پاراتوبرکلوز III&V MAP و MAP Nested PCR ۳۱۶F<sup>+</sup> مثبت و سویه‌های D۴ (وارد شده از ویبریج و ترک) و AN۵ منفی شدند که تأییدکننده موارد فوق‌الذکر بود.

### بحث و نتیجه‌گیری

میزان خسارت‌های اقتصادی ناشی از پاراتوبرکولوزیس در بخش دامپروری ایران گسترده اما میزان دقیق آن نامشخص می‌باشد به همین دلیل شناسایی و کنترل بیماری در گله‌های نشخوارکنندگان از اهمیت خاصی برخوردار است. عوامل متعددی مانند مرحله عفونت در حیوانات در نوع تکنیک تشخیصی موثرند. همچنین نحوه دامپروری (سنتی یا مکانیزه بودن دامداری) در نوع تکنیک تشخیصی موثرند. کشت نمونه بر روی محیط‌های اختصاصی از اعتبار فراگیر در تشخیص بیماری برخوردار می‌باشد (۱). انتخاب محیط کشت بر اساس فاکتورهای متفاوت صورت خواهد گرفت. همچنین به دلیل زمان طولانی انکوباسیون، آلودگی‌زدایی نمونه‌ها برای حذف باکتری‌های سریع‌الرشد و قارچ‌ها قبل از کشت انجام می‌شود. راجیو و همکاران محیط هیرالد آگ حاوی مایکوباکتین (۱) و برادرز هگزادسیل پیرییدینیوم کلراید را به عنوان ماده مناسب آلودگی‌زدا پیشنهاد نمودند (۴). در این تحقیق نیز از کشت در محیط‌های هیرالد آگ حاوی مایکوباکتین J و هرولد آگ بدون مایکوباکتین (محیط کشت کنترل) برای جداسازی مایکوباکتریوم از نمونه‌های مشکوک استفاده گردید.

اگرچه کشت به عنوان قابل اعتمادترین روش برای تأیید عفونت‌های مایکوباکتریومی محسوب می‌شود، ولی دستیابی به نتیجه مطلوب در جریان انجام این روش ممکن است به علت دوره انکوباسیون طولانی باکتری تا چند ماه به طول انجامد (۱). از طرف دیگر علیرغم بهره‌وری از روش‌های آلودگی‌زدایی، امکان از دست دادن جدایه به دلیل چیرگی آلودگی‌های ثانویه و یا حتی انهدام باکتری در جریان اهمال فرآیند آلودگی‌زدایی وجود دارد (۱۹). علاوه بر این در جریان دوره‌های انکوباسیون طولانی، امکان آلودگی ثانویه و خشک شدن محیط کشت نیز وجود دارد که می‌تواند منجر به نتایج منفی کاذب بگردد. توجه به اینکه تکنیک‌های مولکولی معایب اشاره شده در بالا برای کشت را نداشته لذا مناسب‌تر به نظر می‌رسند.

در این تحقیق برای استخراج DNA از مایکوباکتریوم‌ها از روش آنزیمی CTAB استفاده گردید. این روش برای جداسازی DNA مایکوباکتریوم‌ها

یک از سویه‌های باکتری کنترل مثبت و منفی نیز متناسب با نوع خود در دو لوله محیط کشت هیرالد آگ حاوی مایکوباکتین J یا لون اشتاین جانسون کشت داده شدند.

محیط‌های کشت طی ۱۸ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و بصورت هفتگی از نظر رشد و وقوع احتمالی آلودگی مورد بررسی قرار گرفتند.

در پایان دوره انکوباسیون از سطح محیط کشت یک لوپ کامل از توده رشد باکتری برداشت و به درون میکروتیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر TE ۱٪ انتقال داده شد و با استفاده از آنس یک سوسپانسیون یکنواخت ایجاد گردید. سپس میکروتیوب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد در بن ماری محتوی آب در حال جوش استقرار یافت تا باکتری غیر فعال گردد. در مرحله بعد DNA باکتریایی به روش ایزوآمیل‌الکل-کلروفرم استخراج شد (۱۲). در ادامه برای تمامی نمونه‌ها rRNA-۱۶s PCR انجام پذیرفت و سپس Nested-PCR برای نمونه‌های مثبت با پرایمرهای P۹۰ و P۹۱ و AV۱ و AV۲ انجام شد (۱۶).

### تست PCR

حجم نهایی هر کدام از واکنش‌های PCR بر روی ۱۲/۵ μl تنظیم گردید که شامل بافر PCR به میزان ۱/۲۵ μl، ۲ μl از محلول MgCl<sub>2</sub> (۵mM)، ۰/۲۵ μl از مخلوط ۱۰ mM dNTP، ۱ μl از هر پرایمر جلو بر و پس ران (۵ pmol/μl)، ۰/۳ μl Taq DNA polymerase واحدی، و ۴/۵ μl آب مقطر استریل بود. به مخلوط هر میکروتیوب به طور جداگانه ۳ μl از نمونه DNA استخراج شده (۲۰۰-۱۰۰۰ ng) اضافه گردید. از سه زوج پرایمر استفاده گردید که شامل:

3' (ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C) 5' rRNAf 16S و  
3' (TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A) 5' rRNAr 16S  
معرفی شده توسط هوارد و همکاران (۹) و زوج‌های 5' (GTT CGG) و 3' (GAG GTC GAT) IS900-P90  
و همچنین 5' (ATG TGG TTG) و 3' (CGC CCA CGT GA) IS900-P91  
و 3' (CTG TGT TGG ATG G) و 5' (CCG CCG CAA) IS900-AV1  
و 3' (TCA ACT CCA G) IS900-AV2 هر دو معرفی شده توسط ناصر و همکاران (۱۶) بودند.

در این تحقیق علاوه بر نمونه‌های DNA مثبت و منفی مایکوباکتریایی از یک میکروتیوب آب مقطر حاوی تمام اجزای PCR به جزء DNA نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سپس میکروتیوب‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. برنامه دمایی دستگاه PCR شامل ۱۰ دقیقه ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ سیکل شامل ۶۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۹۰ ثانیه ۵۸ درجه سانتی‌گراد، ۹۰ ثانیه ۷۲ درجه و در انتها تمامی میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محصولات PCR داخل ژل آگاروز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید ریخته و الکتروفورز گردید و در نهایت در دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

در این مطالعه از ۱۴۲ نمونه مشکوک، ۴۷ جدایه کشت مثبت بدست

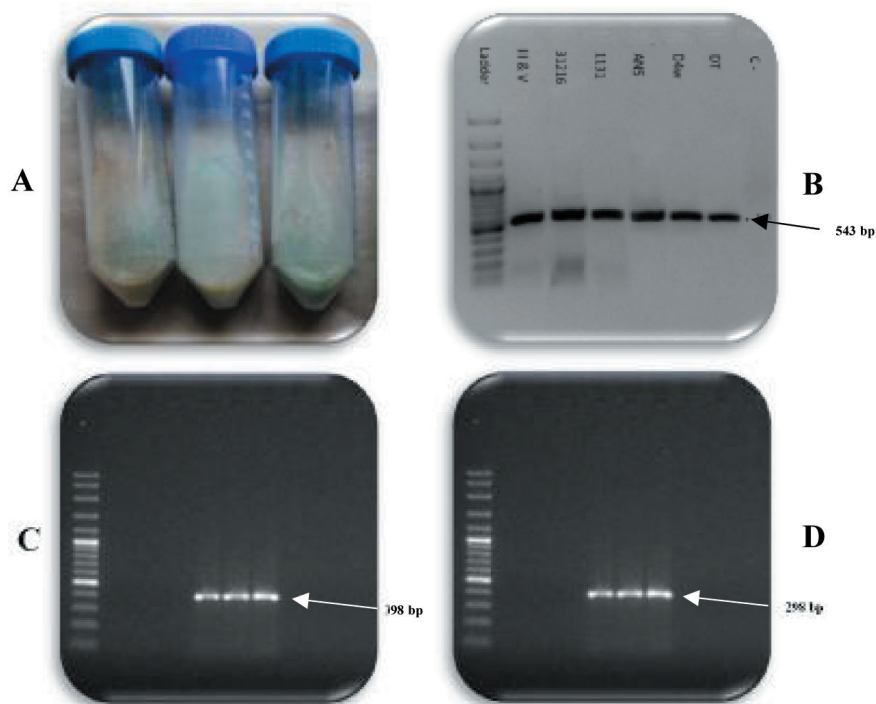
در سال‌های گذشته مطالعات مختلفی در این زمینه انجام پذیرفت که گاه حساسیت بالاتر آن نسبت به بعضی تکنیک‌ها گزارش شده است. کورتی و استفان (۵) و حق‌خواه و همکاران (۸) با کمک این تکنیک موارد آلوده به مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکولوزیس را در شیر خام شناسایی نمود. همچنین از این تکنیک برای تشخیص نمونه‌های بافت در حیوانات باغ وحش استفاده گردید (۷). در مطالعات محققان ایرانی از جمله جعفری (۱۱) دوستی و مشکاتی (۶) نیز این تکنیک برای تشخیص این باکتری استفاده گردید. در مطالعه سیدین و همکاران سه جفت پرایمر در توالی IS۹۰۰ به نام‌های Para<sup>۲</sup>F، Para<sup>۱</sup>F، Para<sup>۴</sup>R و Para<sup>۳</sup>R و P<sup>۹۱</sup>F، P<sup>۹۱</sup>R و P<sup>۹۱</sup>F طراحی شد که ایجاد قطعه‌ای ۲۱۰ جفت بازی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که تمامی موارد کشت مثبت بجز یک مورد با تست Nested PCR کاملاً مطابقت دارد (۲۰). سومیا و همکاران روش Nested PCR را دارای حساسیت بالاتری در مقایسه با کشت و الایزا گزارش نمودند (۲۲).

در نهایت طبق پروتکل USDA، الایزا نمونه‌های سرم یا شیر می‌تواند در ارزیابی وضعیت آن‌ها و نظارت بر پیشرفت برنامه‌های کنترل بیماری بسیار مفید باشد که به عنوان روش غربالگری یون توصیه می‌شود. ولی

مناسب بوده و DNA حاصله از نظر کمی و کیفی برای انجام تکنیک‌های مولکولی مناسب می‌باشد. تکنیک‌های مولکولی زیادی بر پایه PCR به وسیله محققین پیشنهاد شده که دارای حساسیت و ویژگی بالایی می‌باشد و در زمان کوتاهی باکتری را شناسایی می‌نماید ولی با توجه به اینکه حساسیت single PCR نسبت به Nested PCR کمتر (۲۲) است. لذا در این بررسی از تکنیک Nested PCR برای تایید جدایه‌ها استفاده گردید.

توالی IS۹۰۰ قطعه‌ای بطول ۱۴۵۱ bp جفت باز می‌باشد که پرایمرهای مختلفی از این مارکر طراحی شده است (۱۴). به دلیل اختصاصی بودن و حساسیت بالا و تعداد زیاد کپی‌های آن (۱۵-۲۰) از این توالی بصورت وسیع در شناسایی باکتری استفاده می‌شود (۱۳).

در مطالعه اخیر از جفت پرایمر P<sup>۹۱</sup>/P<sup>۹۰</sup> (۱۰) و جفت پرایمر AV<sup>۱</sup>/AV<sup>۲</sup> برای تایید جدایه‌ها استفاده گردید (۳). نتایج این مطالعه بر روی سویه‌های مولد پاراتوبرکلوز مشابه نتایج بارتوس و همکاران (۳) و در مورد سویه‌های D<sup>۴</sup> مایکوباکتریوم اویوم زیر گونه اویوم (وارد شده از ویبریج و ترک) و AN<sup>۵</sup> مایکوباکتریوم بویس مشابه نتیجه تورن و همکاران می‌باشد (۲۴).



شکل ۱- A: رشد پرگنه های MAP در لوله کشت محتوی محیط کشت Herrold's egg yolk همراه با مایکوباکتین ز. B: تولید یک قطعه به طول ۵۴۳ bp در آزمایش PCR-rRNA ۱۶S توسط جدایه‌های MAP. C: تولید یک قطعه به طول ۳۹۸ bp در آزمایش PCR-IS۹۰۰-۹۱/P<sup>۹۰</sup> توسط جدایه‌های MAP. D: تولید یک قطعه به طول ۲۹۸ bp در آزمایش PCR-IS۹۰۰-AV<sup>۲</sup>/AV<sup>۱</sup> توسط جدایه‌های MAP. چیدمان چاهک‌ها در C و D به ترتیب راست به چپ چاهک شماره ۱ سایز مارکر، چاهک شماره ۲ Blank، چاهک شماره ۳ کنترل منفی، چاهک شماره ۴ سویه مایکوباکتریوم اویوم زیر گونه اویوم و چاهک شماره ۵ تا ۷ سویه‌های واکسن پاراتوبرکلوز MAP III&V و MAP ۲۱۶F و جدایه ۲۴۸۸۳.

john's disease. *Journal of Microbial World* 2:19-22.

7- Erume J., J. Sperser and R. Rosengarten. 2001. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *African health sciences* 1:83-89.

8- Haghkhhah M., M. Ansari-Lari, A.M. Novin-Baheran and A. Bahramy. 2008. Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by bulk-tank milk PCR in Fars province (southern Iran) dairy herds. *Preventive veterinary medicine* 86:8-13.

9- Huard R.C., L.C. Lazzarini, W.R. Butler, D. van Soolingen and J.L. Ho. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *Journal of clinical microbiology* 41:1637-1650.

10- Inglis N.F., K. Stevenson, R.C. Davies, D.G. Heaslip and J.M. Sharp. 2001. Unique expression of a highly conserved mycobacterial gene in IS901(+) *Mycobacterium avium*. *Microbiology* (Reading, England) 147:1557-1564.

11- Jafari B., F. Moosakhani and M. Jamshidian. 2015. Subtype genotyping characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from dairy cattle of Tehran province. *Advances in Bioreserach* 6:60-64.

12- Johansen T.B., I. Olsen, M.R. Jensen, U.R. Dahle, G. Holstad and B. Djonne. 2007. New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. *BMC microbiology* 7:14.

13- Kumanan V., S.R. Nugen, A.J. Baeumner and Y.F. Chang. 2009. A biosensor assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *Journal of veterinary science* 10:35-42.

14- McFadden J.J., P.D. Butcher, J. Thompson, R. Chiodini and J. Hermon-Taylor. 1987. The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Molecular microbiology* 1:283-291.

15- Mobius P., H. Hotzel, A. Rassbach and H. Kohler. 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* 126:324-333.

16- Naser S.A., G. Ghobrial, C. Romero and J.F. Valentine. 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* (London, England) 364:1039-1044.

17- Park H.T., M.K. Shin, H.E. Park, Y.I. Cho and H.S. Yoo. 2016. PCR-based detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuber-*

این تست، می‌تواند نتایج مثبت و منفی کاذب داشته باشد. بنابراین برای شناسایی قطعی موارد بیماری پس از شناسایی موارد آلوده با الیزا از کشت یا PCR مدفوع یا بافت‌های حیوانی استفاده می‌شود. با توجه به طولانی بودن کشت، امکان از بین رفتن باکتری به دلیل آلودگی‌زدایی و تعداد کم باکتری، Nested PCR به عنوان تکنیک مناسب برای تشخیص سریع وجود ژنوم باکتری در نمونه و شناسایی موارد بیماری استفاده می‌شود.

### پیشنهادات

پیشنهاد می‌شود از این روش برای تشخیص سریع و پیشگیری از بروز خسارات مالی استفاده گردد. همچنین با انجام مطالعات تکمیلی بر روی مارکرهای ژنتیکی زمینه توسعه این تکنیک تشخیصی فراهم گردد.

### تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدرشناسی خود را از مجموعه معاونت پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به جهت تامین کامل مالی و لجستیکی این مطالعه اعلام می‌نمایند. نویسندگان ضمن اعلام توافقی بر پذیرش تساوی حقوق معنوی مترتب بر این اثر در بین خود اظهار می‌نمایند در ارتباط با این امر هیچ گونه مناقشه‌ای در میان آن‌ها وجود ندارد.

### منابع مورد استفاده

- 1- Aboagye G. and M.T. Rowe. 2018. Optimisation of decontamination method and influence of culture media on the recovery of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from spiked water sediments. *Journal of microbiological methods* 150:24-28.
- 2- Bakker D., P.T. Willemsen and F.G. van Zijderveld. 2000. Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review. *The Veterinary quarterly* 22:200-204.
- 3- Bartos M., P. Hlozek, P. Svastova, L. Dvorska, T. Bull, L. Matlova, I. Parmova, I. Kuhn, J. Stubbs, M. Moravkova, J. Kintz, V. Beran, I. Melicharek, M. Ocepek and I. Pavlik. 2006. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *Journal of microbiological methods* 64:333-345.
- 4- Bradner L., S. Robbe-Austerman, D.C. Beitz and J.R. Stabel. 2013. Optimization of hexadecylpyridinium chloride decontamination for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Journal of clinical microbiology* 51:1575-1577.
- 5- Corti S. and R. Stephan. 2002. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC microbiology* 2:15.
- 6- Doosti A. and S. Moshkelani. 2009. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by Nested PCR in dairy cattles suspected to

culosis infection in cattle in South Korea using fecal samples. *The Journal of veterinary medical science* 78:1537-1540.

18- Pierce E.S. 2018. Could *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease, ulcerative colitis...and colorectal cancer? *Infectious agents and cancer* 13:1.

19- Reddacliff L.A., A. Vadali and R.J. Whittington. 2003. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from tissues and faeces. *Veterinary microbiology* 95:271-282.

20- Seyyedini M., H. Tadjbakhsh and T. Salehi. 2010. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fecal samples of Holstein-Friesian cattle using molecular and cultivation methods. *Journal of Veterinary Research* 65:135-171.

21- Sonawane G.G. and B.N. Tripathi. 2016. Comparative evaluation of diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the tissues of sheep affected with distinct pathology of paratuberculosis. *International journal of mycobacteriology 5 Suppl 1*:S88-S89.

22- Soumya M.P., R.M. Pillai, P.X. Antony, H.K. Mukhopadhyay and V.N. Rao. 2009. Comparison of faecal culture and IS900 PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine faecal samples. *Veterinary research communications* 33:781-791.

23- Talatchian M. 1965. First report of Johne's disease in Iran. *Bulletin-Office international des epizooties* 64:779.

24- Turenne C.Y., D.M. Collins, D.C. Alexander and M.A. Behr. 2008. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and *M. avium* subsp. avium are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *Journal of bacteriology* 190:2479-2487.

25- Vir Singh S., K. Dhama, K.K. Chaubey, N. Kumar, P.K. Singh, J.S. Sohal, S. Gupta, A. Vir Singh, A.K. Verma, R. Tiwari, Mahima, S. Chakraborty and R. Deb. 2013. Impact of host genetics on susceptibility and resistance to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in domestic ruminants. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 16:251-266.

