DOI: 10.22092/vj.2018.122701.1475
شماره ۱۲۲ بهار ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

استفاده از آنالیز به روش Single Nucleotide Polymorphism (SNP) به عنوان یک راهبرد بررسی ژنتیکی در مطالعات پاراتوبرکولوزیس در ایران

• محمد جانمحمدلو
دپارتمان میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
• کیوان تدین (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی،سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
• اسماعیل اصلی دلفانی
دپارتمان میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی،سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۲۹-۰۴-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۲۰-۰۶-۱۳۹۷
Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

چکیده

ژنوتایپینگ مایکوباکتریوم ایویوم زیرگونه پاراتوبرکولوزیس (MAP) حتی با وجود دسترسی به تکنیک‌های مولکولی متعارفی نظیر PFGE, RFLP, SSR and MIRU-VNTR همچنان به عنوان یک چالش محسوب می‌گردد بدان سبب که این باکتری از نظر ژنتیکی بسیار یکنواخت و همگن می‌باشد. به نظر می‌رسد که در شرایط امروزی پاراتوبرکولوزیس در سراسر ایران انتشار یافته است چرا که گزارشات مربوط به وقوع بیماری در گله‌های گاو گوسفند و بز بصورت فزاینده در هر سال انتشار می‌یابند. میزان اطلاعات موجود از ساختار جمعیت این باکتری در ایران محدود می‌باشد. یافته‌های موجود حاکی از فعالیت جدایه‌های متعلق به تیپ معروف به گاوی می‌باشند و این در حالی است که تاکنون نشانه‌ای از وجود تیپ گوسفندی در ایران یافت نشده است. در این تحقیق یک سیستم ژنوتایپینگ Single Nucleotide Polymorphism (SNP) متشکل از ۱۳ لوکوس و با اتکا به PCR بر روی یک جدایه بومی MAP اجرا گردید. آزمون به گونه‌ای انجام گردید که از یک پروتکل واحد PCR برای همه لوکوس‌ها استفاده شد. محصولات تکثیر DNA به روش Sanger تعیین توالی شدند. نوکلئوتیدهای هدف تعیین و شناسایی گردیدند. این نوکلئوتیدها بطور کامل با نوکلئوتیدهای هم ارز در ژنوم سویه آزمایشگاهی MAP K۱۰ مطابقت داشتند و هویت جدایه ایرانی را به عنوان جدایه تیپ گاوی نشان دادند. ما معتقدیم اگر روش SNP معرفی شده توسط Leao در مقیاس گسترده در ایران بکار گرفته شود امکان دستیابی به دانش جامع‌تر از اتفاقات و جریانات تکاملی که وقوع آنها وضعیت اپیدمیولوژیک امروز پاراتوبرکولوزیس در ایران را شکل داده‌اند، فراهم گردید.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم ایویوم زیرگونه پاراتوبرکولوزیس، SNP ، جدایه، اپیدمیولوژی

Veterinary Researches & Biological Products No 122 pp: 48-54

Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis, a practical means of genomic interrogation for paratuberculosis studies in Iran

By: Janmohammdlou, M., Microbiology Department, College of Science, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. Tadayon, K., (Corresponding Author) Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Asli Delfani, E., Microbiology Department, College of Science, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran; Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2018-07-20 **Accepted: 2018-09-11**

Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Genotyping of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) remains a challenge in epidemiology of paratuberculosis even with availability of the traidional molecular techinques such as PFGE, RFLP, SSR and MIRU-VNTR assays as MAPs are genetically monomorphic bacteria. In the Iranian environment MAP seems to have extensively scatterd across the country as reports indicating frequent occurrence of the disease in bovine, caprine and ovine populations are now on rise. However, only little is known on population structure of MAP in this country. The few conducted observations are in support of existence of cattle (C) type of MAP with no trace of sheep (S) type isolates ever found. In this work, a recently-developed PCR-based Single Nucleotide Polymorphism (SNP) assay concentrating on 13 individual loci across the MAP genome was conducted on a single endogenous Iranian MAP isolate of caprine origin. PCRs were conducted using universal protocol with all amplicons Sanger sequenced in search for target SNPs. An identical pattern of SNPs with that of the MAP K10 laboratory strain was revealed to confirm the identity of this local strain as a cattle type. The Leao's SNP analysis is a simple, straightforward assay that if used extensively, we might expect a better understanding of evolutionary scenario behind todays' epidemiology of paratuberculosis in Iran.

Key words: *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, SNP, isolate, epidemiology

مقدمه

گستردگی انتشار جغرافیایی، حجم خسارات اقتصادی و تنوع میزبان‌های مایکوباکتریوم ایویوم زیرگونه پاراتوبرکولوزیس عامل بیماری پاراتوبرکولوزیس در مقیاس جهانی، سازمان بهداشت جهانی دام را به معرفی این بیماری به عنوان یک چالش مهم در بهداشت واداشته است به‌طوری‌که همه کشورهای عضو مکلف به اعمال برنامه‌های نظارتی و ارائه گزارش موارد وقوع بیماری گردیده‌اند (۱۳). در اروپا MAP از جمله مهم‌ترین پاتوژن‌های دامی و هم ارز با عامل اسکرپی (Scrapie) شناخته شده است (۱۳، ۱۸). اگرچه در حال حاضر پاراتوبرکولوزیس در ایران تحت پوشش برنامه کشوری کنترل بیماری قرار ندارد اما بر اساس اطلاعات موجود فعالیت MAP در بسیاری از گله‌های گاو، گوسفند، بز و شتر در تقریباً همه نقاط کشور نشان داده شده است (۱۲, ۱۴, ۲۵). همراه با افزایش شواهد مبتنی بر فعالیت MAP (۳، ۱۰، ۱۱، ۱۹) به عنوان یک پاتوژن زئونوز اهمیت انجام مطالعات همه‌گیرشناسی جامع پاراتوبرکولوزیس در ایران و تجدید نظر در ضرورت اعمال برنامه‌های کنترل بیماری رو به افزایش خواهد بود.

جدایه‌های MAP از نظر ژنتیکی سطح محدودی از تنوع را از خود نشان می‌دهند به‌طوری که بسیاری از روش‌های متعارف ژنوتایپینگ مولکولی نیز در افتراق میان آن‌ها دچار چالش می‌شوند. با فراهم شدن امکان تعیین توالی کامل کروموزوم MAP و مقایسه اطلاعات بدست آمده از ۱۳۳ جدایه MAP از سرتاسر جهان در سال ۲۰۱۶ میلادی تعداد ۲۸۴۰۲ مورد (Single Nucleotide Polymorphism (SNP شناسایی گردید. پردازش رایانه‌ای این مجموعه بزرگ SNP نشان داد که با بکارگیری ۱۴ مورد از آن‌ها در قالب یک الگوریتم می‌توان همه جدایه‌های MAP را شناسایی و در یکی از دو گروه بزرگ فیلوژنی شناخته شده قرار داد (۱۶). توانایی این پروتکل در تشخیص افتراقی جدایه‌های MAP حتی از روش قدرتمند mycobacterial interspersed repetitive unit–variable number tandem repeat (MLVA) نیز بالاتر گزارش گردیده است (۱۶).

در مطالعه حاضر با هدف امکان‌سنجی اجرای روش SNP ابداعی Leao این روش بر روی یک جدایه کلینیکی حاد بومی ایران MAP۱۹۱۱ بکار گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری

جدایه MAP۱۹۱۱ در سال ۱۳۹۲ از یک رأس بز مبتلا به پاراتوبرکولوزیس در استان اصفهان جدا گردید (۲۲) و از آن پس در آرشیو باکتری موسسه رازی کرج نگهداری می‌گردد. از محتویات یک لوله کشت جدایه MAP۱۹۱۱ برای تلقیح یک لوله کشت ۵۰ ml محیط تازه Herrold's Egg Yolk استفاده شد. گرم‌خانه گذاری به مدت ۱۰ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا هنگام رویت پرگنه‌های شاخص رشد باکتری ادامه یافت. برای اطمینان از رشد خالص باکتری، گسترش میکروسکوپی از توده باکتری رشد یافته تهیه و به‌روش زیل-نیلسن (Ziehl-Neelsen) رنگ‌آمیزی گردید.

استخراج ژنوم باکتری

برای غیر فعال کردن باکتری در یک میکروتیوب دارای واشر ضد نشت (O-ring) محتوی ۴۰۰ µl بافر TB-lysis، یك لوپ (۱۰ µl) از پرگنه باکتری اضافه شد. میکروتیوب به بن ماری محتوی آب جوشان (۹۵ درجه سانتی‌گراد) انتقال و با استفاده از وزنه فلزی به مدت نیم ساعت در کف بن ماری نگهداری گردید. پس از خنک شدن، میکروتیوب سانتریفیوژ (۱۰,۰۰۰/۱۰m g) گردید. قسمت شناور مایع بالایی محتوی ژنوم باکتری برداشت و از فیلتر سرسرنگی ۰,۲ µl عبور داده شد. این مایع محتوی ژنوم باکتری به صورت مستقیم در واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفت.

بیواینفورماتیک

تعداد ۱۴ زوج پرایمر متناسب با ۱۴ لوکوس حامل SNPs پیشنهادی Leao انتخاب گردیدند. با توجه به توان مشابه لوکوس SNP۲ در تفریق میان انواع I و III تیپ گوسفندی با لوکوس SNP۱ (۱۶)، این لوکوس کنار گذاشته شد. برای شناسایی موقعیت مکانی پرایمرها، تعیین مکان لوکوس‌های ۱۳ گانه SNP و همچنین مشخص کردن اندازه مورد انتظار محصولات PCR، بررسی کامپیوتری (in silico analysis) با استفاده از نرم‌افزار Artemis اجرا گردید و ژنوم سویه آزمایشگاهی MAP K۱۰ (GenBank accession number AE۰۱۶۹۵۸,۱) مورد استناد قرار گرفت (جدول۱).

آزمایش‌های PCR

با هدف فراهم نمودن امکان اجرای ۱۳ آزمایش PCR مستقل از طریق اجرای یك پروتکل انفرادی مشترك، در مورد هر لوکوس ۲۴ واکنش PCR در ۴ گروه ۶ عددی به گونه‌ای تنظیم گردید که در هر گروه ۶ دمای annealing (۵۵، ۵۶/۷، ۵۹/۱، ۶۰/۴ ، ۶۲/۹ و ۶۴/۹ درجه سانتی‌گراد) انتخاب گردید. در عین حال در دو گروه تغییر میزان کلرید منیزیوم (۱ mM یا ۲,۵ mM) و در دو گروه تفاوت در میزان پرایمر (۱ pmol/µl و یا ۵) (ماکروژن، کره جنوبی) مورد بررسی قرار گرفت. در آماده‌سازی ترکیبات مورد نیاز واکنش‌های PCR (به‌جز پرایمرها و DNA template) از محلول تجاری آماده مصرف آمپلیکور (Ampliquor®, Denmark) استفاده شد. حجم واکنش‌های PCR µL ۱۲ تنظیم و به عنوان کنترل منفی از Double Distilled PCR water استفاده گردید. در اجرای همه ۱۴ واکنش PCR یک پروتکل شامل یك مرحله Initial denaturation (۹۵/۳۰۰ s درجه سانتی‌گراد) و به دنبال آن ۳۰ نوبت چرخه‌های متوالی (Denaturation ۹۵/۳۰ s درجه سانتی‌گراد)، annealing به مدت ۳۰s ، (Extension ۷۲/۳۰ s درجه سانتی‌گراد) و یک مرحله نهائی تکمیلی (Final extension) ۷۲/۶۰۰ s درجه سانتی‌گراد) اجرا گردید.

الکتروفورز محصولات PCR و تصویر نگاری: از ژل آگاروز درجه مولکولی ۱,۵٪ (Invitrogen® , USA) استفاده شد. برای تعیین حدود اندازه محصولات در جریان الکتروفورز (۲ V/cm ، ۲ ساعت) از مارکر بومی استاندارد (۲۰) استفاده شد.

بهینه‌سازی شرایط اجرای: PCR نتایج آزمون‌های چهارگانه هر لوکوس در مورد همه ۱۳ لوکوس بازنگری و یک پروتکل واحد دما و غلظت اجزاء سازنده (منیزیوم کلراید و پرایمر) قابل اجرا در مورد همه لوکوس‌ها انتخاب و اجرا گردید.

تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR و شناسایی نوکلئوتید هدف در لوکوس SNP: همه محصولات PCR جهت تعیین توالی نوکلئوتیدها به آزمایشگاه همکار (Macrogen, South Korea) ارسال گردیدند. درستی و دقت اطلاعات موجود در فایل‌های کروماتوگراف دریافتی توسط نرم‌افزار Chromas بازنگری و در صورت لزوم اصلاح پردازش و به کمک نرم‌افزار AliView (۱۵) با مناطق هم ارز از ژنوم سویه MAP K۱۰ مقایسه و نوکلئوتید هدف در هر منطقه SNP شناسایی گردید.

نتایج

امکان استفاده از یک پروتکل انفرادی مشترک PCR برای تکثیر همزمان هر ۱۳ لوکوس SNP در عمل با موفقیت حاصل گردید. بدین ترتیب ۱۳ محصول PCR تکثیر و همه آن‌ها با موفقیت تعیین توالی نوکلئوتیدی گردیدند. همه نوکلئوتیدهای هدف در ژنوم جدایه شناسایی و تعیین گردیدند (جدول ۲).

بحث

توسعه و فراگیری تکنیک‌های مولکولی در چند دهه اخیر حجم زیادی از اطلاعات فنی و تکنیکی را راجع به ویژگی‌های کاربردی این روش‌ها فراهم نموده است. در ارتباط با MAP دو روش مبنای PFGE و RFLP به‌رغم اتکاء بر کل ژنوم باکتری، اجرای آن‌ها متکی بر کشت باکتری و تهیه مقادیر قابل توجه و با کیفیت بالا از ژنوم باکتری می‌باشد که انجام آن می‌تواند زمان بر، پر هزینه و البته در استانداردسازی با اشکال همراه باشد. این دو روش به‌خوبی تیپ‌های گاوی و گوسفندی MAP را تفکیک می‌نمایند اما توان افتراقی آن‌ها در هر گروه برای اهداف اپیدمیولوژیک کافی نمی‌باشد (۶). روش‌هایی نظیر AFLP و RAPD از طرف دیگر به دلیل اتکاء بر PCR ساده تر به‌نظر می‌رسند اما تکرار پذیری و استانداردسازی آن‌ها محل اشکال می‌باشد ضمن آن‌که از قدرت

جدول ۱- جزئیات لوکوس های SNP مورد استفاده در این تحقیق. اعداد بر اساس ژنوم سویه آزمایشگاهی MAP K۱۰ (GenBank accession number AE۰۱۶۹۵۸,۱) مشخص و تعیین شده‌اند.

(Locus (primer	Alias	('۳ →'۵) Nucleotide sequence	Start	Stop	The target SNP location	Expected size (bp)
۱f SNP	Snp۳۸۴۲۳۵۹b	CAC CTG GCC AAG TAC TAC CA	۳۶۸۳۹۹	۳۶۸۹۲۶	۳۶۸۶۲۶	۵۲۸
۱r SNP		GCG ATG TCA TGA TGC TGC TG				
SNP ۳f	Snp۵۰۱۷۳	GGA CGA TTA CTC GGT TCC AG	۴۱۶۰۵۵۵	۴۱۶۱۰۲۳	۴۱۶۰۷۹۴	۴۶۹
۳r SNP		ACC CGT GTT CGG CTA CCT				
۴f SNP	Snp۴۱۱۱۲۰۲	GTC AGA AAC ATC CCG CCT TC	۹۹۶۰۲	۱۰۰۰۶۲	۹۹۷۸۲	۴۶۱
۴r SNP		GTA TTG AGT GAG GCA AGC GG				
۵f SNP	Snp۳۸۷۹۲۴۷	GTT GAT CGA CAG CGA GTG C	۳۳۱۴۹۶	۳۳۱۹۶۰	۳۳۱۷۳۸	۴۶۵
۵r SNP		GTG GTG TCC GAG GTG AAC TT				
۶f SNP	Snp۲۹۳۹۹۷۷	TAT CTC CAA GGA CGC ATT CC	۱۲۷۰۷۱۵	۱۲۷۱۲۳۰	۱۲۷۱۰۱۰	۵۱۶
۶r SNP		CTG CCA TGT CCG TCC TTA AT				
۷f SNP	Snp۱۹۳۲۰۵۸	GGC TTG AAA CTC CAA CTG CT	۲۲۷۸۶۸۱	۲۲۷۹۱۳۲	۲۲۷۸۹۳۶	۴۵۲
۷r SNP		CGT CGT ACA TCC TCG TGG T				
۸f SNP	Snp۱۳۲۷۸۷۲	GCG CTT GTT GTA CAG GTT GA	۲۸۸۲۷۹۱	۲۸۸۳۳۱۸	۲۸۸۳۰۸۵	۵۲۸
۸r SNP		TAC GAC GAA GAC CCC GAC TA				
۹f SNP	Snp۳۸۴۴۶۳۲	GAT CGA TGC GGA GCT CGT	۳۶۶۱۳۶	۳۶۶۵۹۲	۳۶۶۳۵۳	۴۵۷
۹r SNP		TGA CAG GAA GGT CCA TAG CC				
۱۰f SNP	Snp۱۹۶۶۰۲۸	GTC GAG GGC TTC CAG GTT	۲۲۴۴۷۷۸	۲۲۴۵۲۰۵	۲۲۴۴۹۶۶	۴۲۸
۱۰r SNP		GTC TGA GGC CAG CGA CAC				
۱۱f SNP	Snp۳۰۵۲۷۷d	CCA TCC CGA GTT CAA CAA GT	۳۹۰۵۵۲۵	۳۹۰۵۹۸۵	۳۹۰۵۶۸۷	۴۶۱
۱۱r SNP		ACT TGT CGG GGT TGT AGC TG				
۱۲f SNP	Snp۴۳۳۹۹۴۶	AAC CGC TCA AGG CGA AAG	۴۳۳۶۹۵۸	۴۳۳۷۴۲۱	۴۳۳۷۱۳۱	۴۶۴
۱۲r SNP		TCC CTT ATC TGC GAA GTG CT				
۱۳f SNP	Snp۲۰۸۷۲۷۴	CAG ACC GAG CAC CTC CTG	۲۱۲۳۴۸۷	۲۱۲۳۹۳۹	۲۱۲۳۷۲۰	۴۵۳
۱۳r SNP		CCG CGT TGA AGG ATC TCA AG				
۱۴f SNP	Snp۱۶۸۶۱۵۴	GAA TCC CCG GAA CTG GTG	۲۵۲۴۵۵۸	۲۵۲۵۰۸۲	۲۵۲۴۸۰۱	۵۲۵
۱۴r SNP						

جدول ۲- نوکلئوتیدهای هدف در لوکوس های SNP تحت مطالعه در سویه MAP K۱۰ و جدایه ایرانی MAP ۱۹۱۱. گروه (Clade) هر دو باکتری بر اساس روش Leao (۱) مشخص گردیده است.

MAP Isolate ID	۱ SNP	۳ SNP	۴ SNP	۵ SNP	۶ SNP	۷ SNP	۸ SNP	۹ SNP	۱۰ SNP	۱۱ SNP	۱۲ SNP	۱۳ SNP	۱۴ SNP	Clade
1911	A	G	G	C	G	G	G	G	A	G	T	C	A	10
K10	A	G	G	C	G	G	G	G	A	G	T	C	A	10

تمایز اندک برخوردار می‌باشند (۴). دیگر روش‌های معاصر متکی بر عوامل تکرار شونده ژنتیکی نظیر SSR و MIRU-VNTR در حال حاضر فراگیرتر می‌باشند اما همچنان در تمایز ژنتیکی میان جدایه‌های دو تیپ گاوی و گوسفندی MAP دارای محدودیت می باشند. محدودیت بزرگ‌تر این روش‌ها ناتوانی آن‌ها در ارائه تصویر درست ارتباطات فیلوژنی میان جدایه‌های تحت بررسی می‌باشد (۲, ۷, ۸, ۲۱). این محدودیت در کشورهایی نظیر ایران که منشأ معرفی MAP و بومی یا غیر بومی بودن آن محل مناقشه می‌باشد (۵، ۲۳) می‌تواند از اهمیت کاربردی ویژه در مطالعه پیشینه جمعیت MAP برخوردار گردد. کارایی سیستم‌های ژنوتایپینگ متکی بر SNPs در ارائه تصویر دقیق و قابل اعتماد فرآیندهای تکاملی در جمعیت باکتری‌های هموژن کلونال نظیر باسیلوس آنتراسیس (۱۷) و همچنین مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (۹) پیش از این با معرفی الگوریتم‌های بین‌المللی نشان داده شده است. به‌نظر می‌رسد اجرای پروتکل پیشنهادی Leao بر روی جدایه ایرانی MAP با در نظر گرفتن ملاحظات این روش که با هدف جلوگیری از بروز پدیده خطا در شناخت مسیر تکاملی (phylogenetic discovery bias) از طریق انتخاب مناسب‌ترین لوکوس‌های SNPs صورت پذیرفته است (۱, ۱۶)، می‌تواند شناخت بهتری از ژنتیک جمعیت این مایکوباکتریوم در فضای جغرافیای ایران فراهم نماید. علاوه بر این با توجه به کمبود اطلاعات ژنتیکی در مورد جدایه‌های MAP بومی منطقه خاورمیانه شاید شمول این جدایه‌ها بتواند در ترمیم و بهینه‌سازی این پروتکل جهت کاربرد آن در مقیاس بین‌المللی سودمند باشد (۱۶).

اعمال روش SNP typing بر روی جدایه بز MAP ۱۹۱۱ نشان داد که این جدایه از گروه جدایه‌های گاوی MAP و در ساختار ژنتیکی هدف این مطالعه کاملا در مشابهت با سویه شناخته شده MAP K۱۰ می‌باشد (جدول ۲) که پیش از این در امریکا از گاو جدا شده است (۲۴). هویت جدایه فوق به عنوان یک جدایه تیپ گاوی پیش از این با استفاده از روش Collins نشان داده شده است (۲۲) با این‌حال تعلق جدایه فوق به گروه (clade) ۱۰ از گروه بزرگ تیپ گاوی (جدول ۲) از نظر تکاملی می‌تواند جالب توجه باشد. انتظار می‌رود با اعمال SNP typing بر روی جدایه‌های بیشتر MAP در ایران بتوان شناخت دقیق‌تری از اپیدمیولوژی این پاتوژن در کشور فراهم نمود.

تشکر و سپاسگزاری

مواد مصرفی، فضا و تجهیزات آزمایشگاهی، جدایه(های) باکتریایی و مواد مصرفی این تحقیق بطور کامل توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج و در قالب فعالیت‌ها و اعتبارات پژوهشی تامین گردیده است. نویسندگان این مقاله تأیید نموده‌اند که بین آن‌ها از نظر منافع معنوی و مادی مترتب بر این اثر اختلاف نظر وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1- Achtman M. 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annual review of microbiology* 62,53-70.

2- Ahlstrom C., H.W. Barkema, K. Stevenson, R.N. Zadoks, R.

Biek, R. Kao, H. Trewby, D. Haupstein, D.F. Kelton, G. Fecteau, O. Labrecque, G.P. Keefe, S.L. McKenna and J. De Buck. 2015. Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on a national and herd level. *BMC genomics* 16,161.

3- Azimi T., M.J. Nasiri, A.S. Chirani, R. Pouriran and H. Dabiri. 2018. The role of bacteria in the inflammatory bowel disease development: a narrative review. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 126,275-283.

4- Babu K.N., M.K. Rajesh, K. Samsudeen, D. Minoo, E.J. Suraby, K. Anupama and P. Ritto. 2014. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 1115,191-209.

5- Baharsefat M., A. Amjadi, P. Ahourai, B. Yamini, F. Entessar and H. Hedayati. 1972. Paratuberculosis in goats and sheep in Iran. Epidemiological, clinical, pathological features and laboratory diagnosis. *Archive of Razi Institute* 24,49-61.

6- Biet F., I.A. Sevilla, T. Cochard, L.H. Lefrancois, J.M. Garrido, I. Heron, R.A. Juste, J. McLuckie, V.C. Thibault, P. Supply, D.M. Collins, M.A. Behr and K. Stevenson. 2012. Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis strains. *BMC microbiology* 12,264.

7- Bryant J.M., V.C. Thibault, D.G. Smith, J. McLuckie, I. Heron, I.A. Sevilla, F. Biet, S.R. Harris, D.J. Maskell, S.D. Bentley, J. Parkhill and K. Stevenson. 2016. Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *BMC genomics* 17,79.

8- Castellanos E., L. de Juan, L. Dominguez and A. Aranaz. 2012. Progress in molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Research in veterinary science* 92,169-179.

9- Filliol I., A.S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M.H. Hazbon, M. Bobadilla del Valle, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, N. Rastogi, C. Sola, T. Zozio, M.I. Guerrero, C.I. Leon, J. Crabtree, S. Angiuoli, K.D. Eisenach, R. Durmaz, M.L. Joloba, A. Rendon, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce de Leon, M.D. Cave, R. Fleischmann, T.S. Whittam and D. Alland. 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *Journal of bacteriology* 188,759-772.

10- Garvey M. 2018. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: A possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. *Open veterinary journal* 8,172-181.

11- Gerrard Z.E., B.M.C. Swift, G. Botsaris, R.S. Davidson, M.R. Hutchings, J.N. Huxley and C.E.D. Rees. 2018. Survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in retail pasteurised milk. *Food microbiology* 74,57-63.

12- Haghkhah M., A. Derakhshandeh, R. Jamshidi, A. Moghiseh, N. Karimaghaei, M. Ayaseh and M. Mostafaei. 2015. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in two different camel species by conventional and molecular techniques. *Veterinary research forum : an international quarterly journal* 6,337-341.

13- Juste R.A., P. Vazquez, O. Ruiz-Larranaga, M. Iriondo, C. Manzano, M. Agirre, A. Estonba, M.V. Geijo, E. Molina, I.A. Sevilla, M. Alonso-Hearn, N. Gomez, V. Perez, A. Cortes and J.M. Garrido. 2018. Association between combinations of genetic polymorphisms and epidemiopathogenic forms of bovine paratuberculosis. Heliyon 4,e00535.

14- Keshavarz R., N. Mosavari, K. Tadayon and M. Haghkhah. 2018. Effectiveness of an inactivated paratuberculosis vaccine in Iranian sheep flocks using the *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis 316F strain. *Iranian Journal of Microbiology* 10,117-122.

15- Larsson A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* (Oxford, England) 30,3276-3278.

16- Leão C., R.J. Goldstone, J. Bryant, J. McLuckie, J. Inácio, D.G.E. Smith and K. Stevenson. 2016. Novel Single Nucleotide Polymorphism-Based Assay for Genotyping *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Journal of Clinical Nicrobiology* 54,556-564.

17- Lekota K.E., A. Hassim, P. Rogers, E.H. Dekker, R. Last, L. de Klerk-Lorist and H. van Heerden. 2018. The reporting of a Bacillus anthracis B-clade strain in South Africa after more than 20 years. BMC research notes 11,264.

18- McIntyre K.M., C. Setzkorn, P.J. Hepworth, S. Morand, A.P. Morse and M. Baylis. 2014. A quantitative prioritisation of human and domestic animal pathogens in Europe. *PloS one* 9,e103529.

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

20- Sekhavati M., K. Tadayon, R. Ghaderi, R. Banihashemi, A.R. Jabbari, G. Shokri and N. Karimnasab. 2015. “In-house” production of DNA size marker from a vaccinal Bacillus anthracis strain. *Iranian journal of microbiology* 7,45-49.

21- Sevilla I., J.M. Garrido, M. Geijo and R.A. Juste. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolates from cattle and heterogene-

ity of those from sheep and goats. *BMC microbiology* 7,18.
22- Tadayon K., N. Mosavari, R. Keshavarz, A. Shahmoradi, R. Ghaderi, M. Sekhavati and M.H. M. 2016. Paratuberculosis in ruminants, a molecular search for traces of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis type i and type ii in iran. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)* 29,89-95.
23- Talatchian M. 1965. First report of Johne's disease in Iran. Bulletin-Office international des epizooties 64,779.
24- Wynne J.W., T. Seemann, D.M. Bulach, S.A. Coutts, A.M. Talaat and W.P. Michalski. 2010. Resequencing the *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis K10 genome: improved annotation and revised genome sequence. *Journal of bacteriology* 192,6319-6320.
25- Zarei Kordshouli F., A. Khodakaram Tafti and M. Haghkhah. 2016. Pathological, bacteriological, and molecular characteristics of natural outbreaks of Johne's disease in goats of Fars Province, Iran. *International journal of mycobacteriology 5 Suppl* 1,S202.