

شناسایی و تعیین سویه مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس (MAP) به روش PCR و REA بر اساس
قطعات درون جایگیر IS900 و IS1311

محمد رضا نصیری^{1,2}، محمد حسن جهاندار^{3*}، مهدی سلطانی³، مرتضی مهدوی³، محمد دوستی³

¹دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

²دانشیار، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی و دامی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد

³دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: 1391/01/05، تاریخ پذیرش: 1391/02/20

چکیده

هدف از این مطالعه شناسایی مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*M. avium paratuberculosis*)، بررسی درصد شیوع آلودگی به آن و همچنین بهینه سازی یک روش سریع، دقیق و ساده به کمک PCR برای تشخیص این زیرگونه و جدایه های آن بود. مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (MAP)، از لحاظ اقتصادی عامل یکی از مهمترین بیماری ها در صنعت دامپروری به نام بیماری یون (Johne's Disease) می باشد، که یکی از عفونت های مزمن نشخوارکنندگان به شمار می رود. به منظور شناسایی این زیرگونه 243 نمونه مدفوع و 56 نمونه شیر خام از دام های مشکوک گاوداری های اطراف مشهد جمع آوری شد. پس از استخراج DNA به منظور شناسایی نمونه های آلوده، قطعه درون جایگیر اختصاصی MAP به نام IS900 به طول 413 جفت باز، با استفاده از پرایمرهای P90 و P91 تکثیر شد. سپس به منظور تعیین جدایه گاوی و گوسفندی MAP، نسبت به تکثیر قطعه درون جایگیر IS1311 با طول 268 جفت باز به کمک دو پرایمر M56 و M94 اقدام شد. قطعات حاصله به کمک آنزیم *HinfI* هضم شدند. تعداد 107 نمونه از 243 نمونه مدفوع (44%) و 10 نمونه از 56 نمونه شیر خام (18%) مورد مطالعه، آلوده به MAP بودند. از بین 56 نمونه شیر و مدفوع که از دام های یکسانی گرفته شده بودند 19 نمونه مدفوع و 10 نمونه شیر، آلوده شناسایی شدند (18% در مقابل 34%). نتایج هضم آنزیمی نیز نشان داد که تمامی MAP های شناسایی شده از جدایه گاوی می باشند.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس، بیماری یون، IS900، IS1311، PCR-REA.

مورد توجه در مورد MAP ارتباط آن با بیماری کرون (Crohn's Disease) است که یک بیماری مزمن و مشابه یون در انسان می باشد. با توجه به جداسازی MAP از بافت های روده ای برخی بیماران مبتلا به کرون، تصور می شود یکی از عوامل ایجاد کرون *M. paratuberculosis* باشد (Grant, 2005). با توجه به گزارشاتی که در زمینه انتقال MAP از طریق شیر پاستوریزه (Ellingson et al., 2005; Grant et al., 2002) و گوشت (Mutharia et al., 2010) به انسان ارائه شده است، شناسایی دام های آلوده به آن اهمیت ویژه ای پیدا می کند. از زمان شناسایی MAP، گستره زیادی از روش ها برای شناسایی آن در حیوانات آلوده به کار رفته است که شامل تشخیص سنتی بر اساس علائم بالینی، استفاده از روش های ایمنی سنجی (ELISA) (Jorgensen & Jensen, 1978)، روش های مبتنی بر PCR مانند PCR ساده (Vary et al., 1990)، PCR آشیانه ای Real-Time PCR، (Stable et al., 2002) (O'Mahony & Hill, 2002, 2004) و روش کمی Real-Time (Slana et al., 2008a) می باشد. همچنین روش RFLP همراه با روش PCR یا به اختصار PCR-REA² نیز از مدت ها قبل برای این کار پیشنهاد شده است (Eriks et al., 1996). حتی بدین منظور در یک گزارش استفاده از روش سلول سنجی فاز جامد³ استفاده و بهینه سازی شده است (D'Haese et al., 2005). البته باید توجه داشت که هنوز هم روش کشت سلولی

بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس (Paratuberculosis) یک بیماری مسری و از عفونت های مزمن نشخوارکنندگان می باشد، که از لحاظ همه گیری در رده B تقسیم بندی سازمان جهانی سلامت حیوانات¹ قرار گرفته است (Collins, 2003). این بیماری از جنبه شیوع از گسترده ترین و از لحاظ اهمیت اقتصادی از مهمترین بیماری ها در صنعت دامپروری محسوب می شود (Douarre et al., 2010). عامل این بیماری زیرگونه ای از باکتری *Mycobacterium avium* به نام *M. avium paratuberculosis* یا به اختصار MAP می باشد. بیماری یون در ایران برای اولین بار در سال 1960 توسط خلیلی و طلاچیان شناسایی شد. آنها عامل بیماری را از مدفوع گاوهای نژاد جرسی وارداتی شرکت نفت آبادان جدا کردند و منشأ عفونت را دام های وارداتی گزارش نمودند. پس از آنها مقامی و هدایتی در سال 1961 این بیماری را در یک راس گاو هلشتاین گزارش کردند (Hasani tabatabai & Firozi, 2005). این بیماری باعث اسهال شدید و پرتابی، کم خونی پیشرونده، لاغری مفرط و سرانجام مرگ می شود (Olsen et al., 2002). کاهش تولید، افزایش حساسیت به سایر بیماریها، از دست رفتن ارزش ژنتیکی، حذف پیش از موعد، افزایش فاصله بین گوساله زایی از پیامدهای اقتصادی این بیماری است (Gonda et al., 2007). یکی از جنبه های

²PCR Restriction Endonuclease Analysis

³Solid Phase Cytometry (SPC)

¹World Organisation for Animal Health

شیر نیز به میزان مساوی از هر چهار پستانک هر گاو داخل ظروف استریل شده جمع آوری شدند. نمونه ها تا زمان شروع ادامه کار در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA به کمک کیت AccuPrep (شرکت Bioneer، کره جنوبی) با اندکی تغییر صورت گرفت. برای استخراج DNA از نمونه شیر ابتدا نمونه ها در دور 3000rpm سانتریفوژ شده و سپس از فاز پایینی آن برای استخراج DNA استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND 2000 شرکت THERMO آمریکا مشخص شد.

واکنش PCR برای تشخیص ناقلین MAP

جهت شناسایی حیوانات مبتلا به یون از واکنش زنجیره ای پلیمرز به منظور تکثیر توالی درون جایگیر IS900 به طول 413 جفت باز استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده عبارت بودند از P90 (GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG) و P91 (GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC) (Corti & Stephan, 2002). واکنش PCR به کمک کیت لئوفلیزه Genepak Universal PCR (شرکت IsoGene، روسیه) و در حجم نهایی 25 میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal انجام شد. ترکیبات مورد استفاده در واکنش عبارت بود از یک واحد آنزیم Taq Polymerase، 20 میکرومول از هر dNTP، 200 میلی مول $MgCl_2$ ، 10-20 پیکومول مخلوط

به عنوان روش اصلی در آزمایشگاه ها به منظور تشخیص MAP مورد استفاده قرار می گیرد (Douarre *et al.*, 2010). در بین روش های مذکور روش های مبتنی بر PCR به لحاظ سرعت بالا، هزینه کم و حساسیت زیاد جایگاه ویژه ای دارند. امروزه بیشتر روش هایی که از PCR برای تشخیص MAP بهره می برند، مبتنی بر شناسایی قطعه DNA درون جایگیر IS900 هستند (Slana *et al.*, 2008a). این قطعه به طول 1141 جفت باز متعلق به خانواده IS116 و مختص MAP می-باشد. هدف از این مطالعه شناسایی و تشخیص گونه مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس، بررسی درصد شیوع بیماری یون و همچنین بهینه سازی یک روش سریع، دقیق و ساده به کمک PCR برای تشخیص این زیرگونه بیماریزا، در نمونه های مدفوع و شیر خام برخی گاوداری های مشهد بود.

مواد و روش ها

نمونه گیری و استخراج DNA

تعداد 243 نمونه مدفوع و 56 نمونه شیر خام، از گاوداری های اطراف مشهد مورد استفاده قرار گرفت. این نمونه ها از گاوهای بدست آمده بودند که توسط دامپزشک بر اساس علائم بالینی، مشکوک به بیماری یون تشخیص داده شده و به منظور تشخیص قطعی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد ارجاع داده شده بودند. نمونه های مدفوع به روش توشه رکتال جمع آوری شدند. نمونه های

به مدت 35 ثانیه، اتصال در دمای 62 درجه سانتیگراد به مدت 25 ثانیه و بسط در دمای 72 درجه به مدت 1 دقیقه صورت پذیرفت. همچنین واسرشت سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 3 دقیقه و بسط نهایی در دمای 72 درجه سانتیگراد و در مدت 5 دقیقه انجام شد. برای بررسی محصول واکنش از ژل آگارز 2% همراه با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید به مدت 20 دقیقه با ولتاژ 100 ولت استفاده شد. وجود قطعه 268 جفت بازی پس از PCR نمایانگر آلوده بودن نمونه مورد نظر به MAP بود.

هضم اندونوکلازی¹ محصولات PCR

وجود یک جهش از نوع Transition که منجر به جایگزینی باز سیتوزین (C) به تیمیدین (T) در موقعیت 223 توالی IS1311 سویه گاوی شده است، موجب ایجاد یک جایگاه برشی اضافی برای آنزیم *HinfI* می شود که از این ویژگی جهت شناسایی و تمایز سویه های گاوی و گوسفندی MAP استفاده می گردد. جهت انجام واکنش هضم 10 میکرولیتر از محصولات PCR، 2 میکرولیتر بافر 10X، 8 میکرولیتر dH₂O و 2 واحد آنزیم *HinfI* (شرکت Sibenzyme، روسیه) درون هر میکروتیوب ریخته و به مدت 2 ساعت در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتیگراد قرار داده شد. شناسایی قطعات حاصل از هضم به کمک ژل آگارز 4% با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید صورت پذیرفت.

پرایمرها، 100-50 نانوگرم DNA و بافر استاندارد. واکنش PCR در 40 سیکل با واسرشت سازی در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 40 ثانیه، اتصال در دمای 62 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه و بسط در دمای 72 درجه به مدت 1 دقیقه صورت پذیرفت. همچنین واسرشت سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 3 دقیقه و بسط نهایی در دمای 72 درجه سانتیگراد و به مدت 5 دقیقه انجام شد. برای بررسی محصول واکنش از ژل آگارز 2% همراه با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید به مدت 20 دقیقه با ولتاژ 100 ولت استفاده شد. در صورت وجود قطعه 413 جفت بازی پس از PCR، نمونه مورد نظر به عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شد و عدم وجود قطعه تکثیر شده نمایانگر سالم بودن نمونه بود.

تعیین سویه MAP با استفاده از روش PCR-

REA روی توالی IS1311

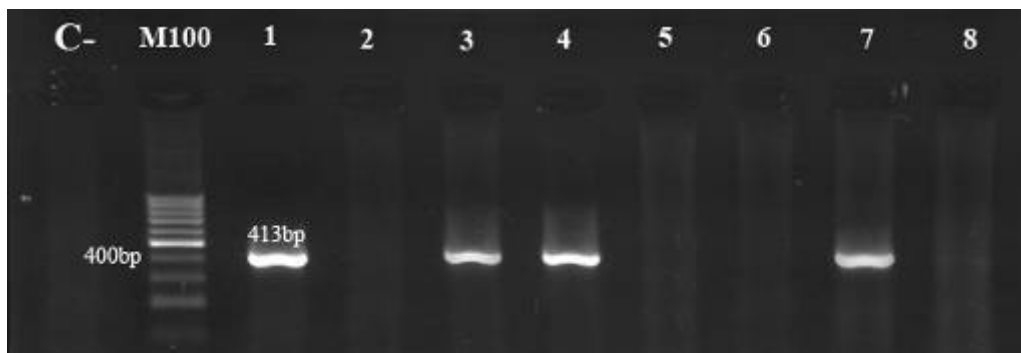
جهت شناسایی سویه MAP از واکنش زنجیره ای پلیمرز به منظور تکثیر توالی درون جایگیر IS1311 به طول 268 جفت باز و به کمک آغازگرهای M56 (GCG TGA GGC TCT GTG GTG AA) و M94 (CAG CGA TCG TCG ACA GTG TG) (Marsh *et al.*, 1999) و هضم آنزیمی متعاقب آن استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از کیت لئوفلیزه Genepak Universal PCR با روشی که قبلاً ذکر شد صورت پذیرفت. واکنش PCR در 40 سیکل با واسرشت سازی در دمای 94 درجه سانتیگراد

¹ Restriction Endonuclease Analysis

نتایج و بحث

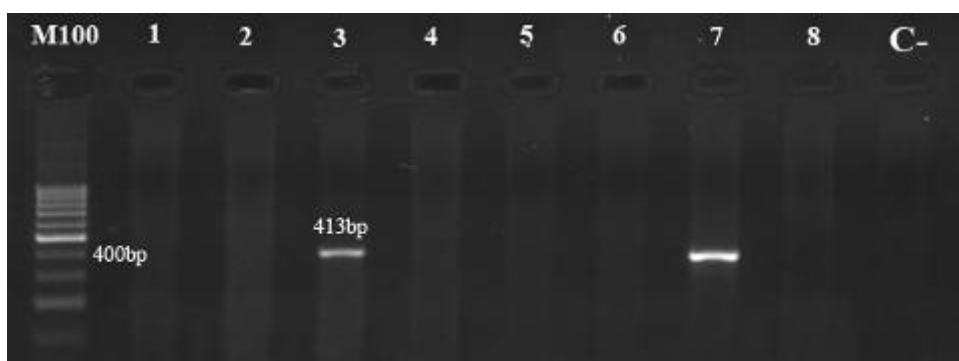
مدفوع و 10 مورد بر اساس بررسی نمونه شیر، آلوده تشخیص داده شدند. این بدان مفهوم است که تشخیص بر اساس شیر میزان شیوع کمتری را نسبت به تشخیص بر اساس نمونه مدفوع نشان می دهد (18% در مقابل 34%). تعداد کم این باکتری در شیر در مقایسه با مدفوع می تواند توجیه این اختلاف باشد. در تحقیقی نشان داده شده است که وقتی فراوانی عامل بیماری یون در نمونه شیر کمتر از 10 CFU/ml باشد، اثبات حضور آن توسط روش PCR مشکل است (Pillai *et al.*, 2001) همچنین وجود آنتی متابولیت هایی مانند یون کلسیم در شیر می تواند واکنش PCR را مهار کند (Singh *et al.*, 2007).

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی قطعه IS900 نشان داد که 107 نمونه از 243 نمونه مدفوع (44%) و 10 نمونه از 56 نمونه شیر خام (18%) مورد مطالعه حاوی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس بودند. این نتیجه گیری بر اساس وجود باند 413 جفت بازی بر روی ژل آگاروز صورت پذیرفت، که نشان دهنده وجود قطعه IS900 به عنوان شاخص حضور MAP در نمونه های آلوده می باشد (شکل 1 و 2). البته از بین 56 گاو که هر دو نمونه شیر و مدفوع از آنها گرفته شده بود 19 مورد بر اساس نتایج حاصل از بررسی نمونه



شکل 1- الکتروفورز محصولا PCR توالی IS900 روی نمونه های مدفوع. در این تصویر قطعه 413 جفت بازی تکثیر شده توسط آغازگرهای P90 و P91 مشاهده می شود. نمونه 1، 3، 4 و 7 آلوده و بقیه پاک هستند (M100: سایزمارکر 100 جفت بازی، C-: کنترل منفی).

Figure 1- Electrophoresis of IS900 PCR products from stool samples. The 413bp fragment amplified by primers P90 and P91 can be observed. Samples 1, 3, 4 and 7 are infected and other is clear. (M100: 100bp size marker, C-: control -).



شکل 2- الکتروفورز محصولات PCR توالی IS900 روی نمونه های شیر. در این تصویر قطعه 413 جفت بازی تکثیر شده توسط آغازگرهای P90 و P91 مشاهده می شود. نمونه 3 و 7 آلوده و بقیه پاک هستند (M100: سایز مارکر 100 جفت بازی، C-: کنترل منفی).

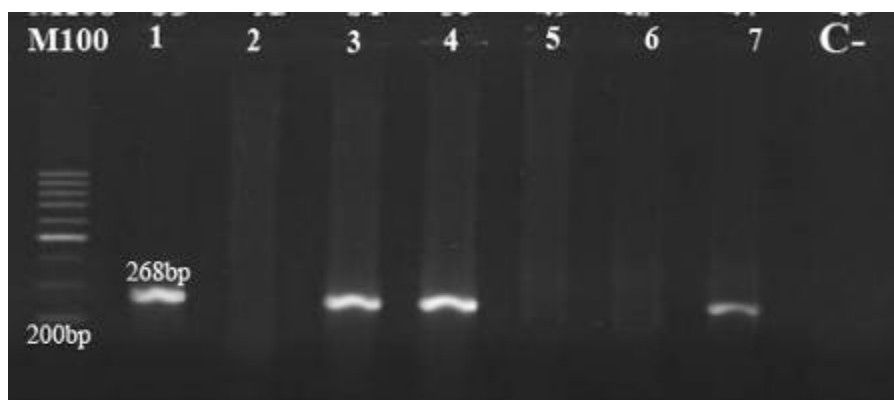
Figure 2- Electrophoresis of IS900 PCR products from Milk samples. The 413bp fragments amplified by primers P90 and P91 can be observed. Samples 3 and 7 are infected and other is clear. (M100: 100bp size marker, C-: control -).

دانمارک 55%، فرانسه 68% و هلند 54% گزارش شده است (Nielsen & Toft, 2009). همچنین میزان شیوع در ایرلند 21% (Good *et al.*, 2009) و در هند 6% (Sharma *et al.*, 2008) گزارش شده است. تفاوتی که میان مطالعه حاضر و با سایر مطالعات وجود دارد ممکن است ناشی از اختلاف بین روشهای مختلف و تفاوت کیت های تجاری باشد (Van Weering *et al.*, 2007). همچنین مرحله شیرواری (Nielsen *et al.*, 2002) زمان شیردوشی (Wells *et al.*, 2006) و مرحله بیماری دام (Wells *et al.*, 2006) و سن گاو (Diéguez *et al.*, 2007) در نتیجه آزمایش ها موثر است. شناسایی MAP در شیر گاوهای بیمار برای اولین بار در سال 1935 صورت گرفت (Taylor *et al.*, 1981) و بسیاری از مطالعات امروزه بر روی شناسایی MAP در شیر خام و فرآورده های آن تمرکز یافته است (Slana *et al.*, 2008b).

نکته دیگری که باید به آن توجه داشت این است که مطالعه حاضر بر روی دام های مشکوک به یون انجام شده است، به همین لحاظ میزان فراوانی دام های آلوده بسیار بالاست. این یافته ها مطابق یافته های (Soltani *et al.* 2008) در مشهد می باشد که مطالعه ای بر روی نمونه های مشکوک، به کمک تکثیر قطعه IS900 انجام داده بودند و درصد آلودگی در مدفوع و شیر را به ترتیب 28% و 18% گزارش نمودند. همچنین گزارشات مختلف، میزان شیوع را در نواحی مختلف بسیار متفاوت ارزیابی نموده اند. به عنوان مثال میزان شیوع در اصفهان 11% (Shahmoradi, 2009)، شهر کرد 3% (Chaleshtari, 2009)، اهواز 2% (Haji Hajikolaei *et al.*, 2006)، تهران 3/7% (Sadeghi-Garmarodi, 1993)، ارومیه 1/9% (Yousof-beygi *et al.*, 2003)، فارس 6/8 تا 23% (Haghkhan *et al.*, 2008) گزارش شده است. میزان شیوع بیماری در

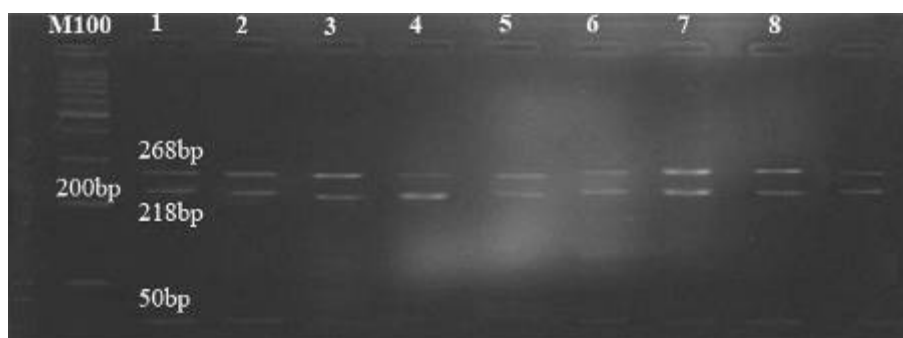
با بررسی Real-Time qPCR بر روی MAP در شیر گاوهای یک دامداری می توان میزان شیوع این باکتری را در سطح گله ها با دقت 94% مشخص نمود (Slana *et al.*, 2012). این روش به جای آزمون تک تک گاوها می تواند برای بدست آوردن شیوع این پاتوژن در دامداری با هزینه بسیار کم استفاده گردد. الکتروفورز محصولات PCR توالی IS1311 روی نمونه های مدفوع در شکل 3 نشان داده شده است. در این تصویر قطعات 268 جفت بازی توالی تکثیر شده توسط آغازگرهای M56 و M94 مشاهده می شود. نمونه هایی که واکنش PCR در آنها به تولید قطعه مورد نظر منتهی شده است به عنوان نمونه های آلوده در نظر گرفته می شوند.

MAP در شیر وجود دارد اهمیت آن از لحاظ تاثیر بر سلامتی انسان و ارتباط آن با بیماری کرون است. راه اصلی انتشار MAP از طریق مدفوع و راه اصلی انتقال آن به دام های مستعد از طریق دهانی (مصرف شیر و آب آلوده و یا بلع مستقیم مدفوع) می باشد (Ayele *et al.*, 2001). ولی این باکتری در منی و بافت های دیگر حیوانات مبتلا از جمله شیر وجود دارد (Ayele *et al.*, 2010; Khol *et al.*, 2004). این امر از لحاظ انتقال بیماری به گوساله ها و یا انسان حائز اهمیت می باشد. شواهدی مبنی بر وجود این باکتری به صورت فعال در شیر پاستوریزه (Ellingson *et al.*, 2005 ; Grant *et al.*, 2002) و گوشت (Mutharia *et al.*, 2010) نیز گزارش شده است. همچنین مطالعات جدید نشان داده که



شکل 3- الکتروفورز محصولات PCR توالی IS1311 روی نمونه های مدفوع. در این تصویر قطعات 268 جفت بازی توالی تکثیر شده توسط آغازگرهای M56 و M94 مشاهده می شود. نمونه 1، 3، 4 و 7 آلوده و بقیه پاک هستند (M100: سایز مارکر 100 جفت بازی، C-: کنترل منفی).

Figure 3- Electrophoresis of IS1311 PCR products on stool samples. In this picture 268bp fragments amplified by primers M56 and M94 are present. Samples 1, 3, 4 and 7 are infected and other is clear. (M100: 100bp size marker, C-: control -).



شکل 4- نتایج آنالیز هضم اندونوکلئاز (REA) روی محصولات PCR توالی IS1311. قطعات 268، 218 و 50 جفت بازی در تمامی نمونه ها قابل مشاهده می باشند (M100: سایزمارکر 100 جفت بازی، C-: کنترل منفی).

Figure 4- Results of digestion with restriction endonucleases analysis (REA) of IS1311 PCR products. 268, 218 and 50 bp fragment in all lines are visible (M100: 100bp size marker, C-: control -).

باشد چرا که نسبت به آن کم هزینه تر، سریعتر، ساده تر و دقیق تر است. یافته های حاصل از این تحقیق با این فرضیه که سویه گوسفندی نقشی در ایجاد بیماری یون در دیگر گونه ها ندارد، در حالیکه سویه گاوی را می توان به عنوان عامل مشترک بیماری یون در بین بسیاری از گونه ها در نظر گرفت، مطابقت دارد (Whittington *et al.*, 2000). هر چند که شواهدی دال بر رد این فرضیه ارائه شده است (Whittington *et al.*, 2001). همانطور که قبلاً گفته شد روش های متعددی برای شناسایی MAP وجود دارد، اما در بین آنها روش های مبتنی بر PCR جایگاه ویژه ای دارند. شناسایی به کمک علائم بالینی ساده ترین روش است اما بعد از ورود باسیل یون به بدن دام و پیدایش عفونت اولیه، حیوان ظاهراً سالم به نظر می رسد و ممکن است این حالت ماه ها و یا سال ها ادامه یابد. در طول این مدت دام ناقل باعث آلودگی دیگر دام ها خواهد شد

در کل در 107 نمونه از 243 نمونه مورد بررسی توالی 268 جفت بازی مورد نظر تکثیر شد که مطابق یافته های مرحله قبل بود. نتایج آنالیز هضم اندونوکلئاز (REA) روی 19 نمونه مثبت نشان داد که همگی آنها مربوط به سویه گاوی میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس هستند (شکل 4). این یافته ها مشابه نتایج (Soltani *et al.*, 2010) می باشد. مشخص کردن گونه یک ارگانسیم برای دستیابی به اطلاعات دقیق برای مطالعات اپیدمیولوژیک ضروری است (De Juan *et al.*, 2005). در اغلب آزمایشگاه ها از روش PCR-RFLP روی IS900 برای تعیین سویه گاوی و گوسفندی Map استفاده می شود. توان تشخیصی این روش به سبب تعداد نسخه محدود IS900 در ژنوم کم است. همچنین در برخی از کشورها یک الگوی RFLP خاص غالب است (Pavlik *et al.*, 2000). روش PCR-REA روی IS1311 جایگزین مناسبی برای این روش می-

جایگاه های اختصاصی دیگری نیز برای شناسایی MAP به کمک PCR پیشنهاد شده اند. قطعات درون جایگیر تک نسخه ای مانند *f57* و *HspX* (Ellingson *et al.*, 1998) و قطعه درون جایگیر سه نسخه ای *ISMav2* (Strommenger *et al.*, 2001) از این دسته می باشند. شناسایی بر اساس این قطعات به خاطر تعداد نسخه کمتر نسبت به IS900 که نسخه های متعددی از آن در ژنوم MAP وجود دارد، دارای حساسیت کمتری خواهد بود ولی امکان تولید نتایج مثبت کاذب کاهش خواهد یافت. با توجه به گسترش روش Real Time qPCR به منظور بررسی کمی MAP و این نکته که قطعه IS900 به دلیل چندین نسخه ای بودن گزینه مناسبی در مطالعات کمی نمی باشد، استفاده از قطعات تک نسخه ای مانند *f57* جایگاه ویژه ای دارد (Slana *et al.*, 2008b). همچنین برای افزایش دقت، استفاده از قطعات دیگری مانند *ISMAP02* نیز پیشنهاد شده است. قابلیت اطمینان در استفاده از هر دو قطعه IS900 و *ISMAP02* با هم برابر می باشد (Stabel & Bannantine, 2005). ولی با استفاده از روش nested PCR می توان حساسیت آزمون را تا 10% افزایش داد. یعنی اینکه مقادیر کمتری از MAP قابل تشخیص خواهد بود، هر چند که احتمال ایجاد نتایج مثبت کاذب افزایش می یابد (Douarre *et al.*, 2010). جدای از محدودیت هایی که روش کشت دارد این روش نسبت به روش مولکولی دارای برتری هایی نیز می باشد (Douarre *et al.*, 2010). همچنین در انتها

(Whittington & Sergeant, 2001). روش کشت میکروبی (Rademaker *et al.*, 2007) بسیار اختصاصی و دقیق عمل می کند، ولی نقطه ضعف آن زمانبری بالای آنست که حدود شش هفته و یا بیشتر برای نتیجه گیری به زمان نیاز دارد. علاوه بر آن، کار با این زیرگونه بیماریزا خطرات خود را نیز دارا می باشد (Ayele *et al.*, 2005; Slana *et al.*, 2008b). روش های مبتنی بر تشخیص آنتی بادی اختصاصی نیز محدودیت هایی دارند. واکنش بدن به MAP بستگی به مرحله ای دارد که باکتری از دیدگاه بیماریزایی در آن قرار دارد. باکتری در اوایل ورود به بدن در فاز Tuberculoid stage قرار دارد در این مرحله بدن واکنش ایمنی سلولی نشان می دهد. ولی تا زمانی که باکتری وارد فاز Leproid stage نشود ایمنی خونی بر علیه آن فعال نمی شود. به همین دلیل بر اساس تیتراژ آنتی بادی خون نمی توان وجود این پاتوژن در بدن را در اوایل آلودگی به آن شناسایی نمود (Chiodini *et al.*, 1984). روش PCR امروزه به عنوان یک روش مدرن و سریع در تشخیص MAP استفاده می شود، ولی اطلاعات درباره حساسیت و ویژگی PCR در مقالات مختلف متفاوت است (Wells *et al.*, 2006). شواهدی ارائه شده که نشان می دهد بسیاری از پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه IS900 می توانند یک قطعه مشابه مربوط به یک زیر گونه دیگر مایکروباکتریوم آویوم را نیز تکثیر نمایند (Englund *et al.*, 2002). این امر استفاده از این جایگاه را با تردید مواجه می کند.

بایستی به این نکته اشاره کرد که روش توالی یابی روش استاندارد طلایی برای تعیین سویه است (Bhide *et al.*, 2006)، اما به سبب گران بودن این روش امکان استفاده گسترده از آن در سطح عملی وجود ندارد.

منابع

- Ayele WY, Bartos M, Svastova P, Pavlik I (2004). Distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology* 103: 209-217.
- Ayele WY, Machackova M, Pavlik I (2001). The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinary Medicine (Czech)* 46: 205-224.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I (2005). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1210-1214.
- Bhide M, Chakurkar E, Tkacikova L, Barbuddhe S, Novak M, Mikula I (2006). IS900-PCR-based detection and characterization of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from buffy coat of cattle and sheep. *Veterinary Microbiology* 112: 33-41.
- Chaleshtari RS (2009). Detection of Mycobacterium paratuberculosis in Raw Milk Samples from Holstein Dairy Cows of Shahre kord by PCR. *Medical Laboratory Journal* 3: 15-19.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS (1984). Ruminant paratuberculosis Johne's disease: the current status and future prospects. *Cornell Vet* 74: 218-262.
- Collins M (2003). Update on paratuberculosis: Epidemiology of Johne's disease and the biology of Mycobacterium paratuberculosis. *Veterinary Ireland Journal* 56: 565-574.
- Corti S, Stephan R (2002). Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiol* 2: 15-22.
- D'Haese E, Dumon I, Werbrouck H, J.V D, Herman L (2005). Improved detection of Mycobacterium paratuberculosis in milk. *The Journal of Dairy Research* 72: 125-128.
- De Juan L, Mateos A, Dominguez L, Sharp JM, Stevenson K (2005). Genetic diversity of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology* 106: 249-257.
- Diéguez F, Arnaiz I, Sanjuán M, Vilar M, López M, Yus E (2007). Prevalence of serum antibodies to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cattle in Galatia (north west Spain). *Preventive Veterinary Medicine* 82: 321-326.
- Douarre PE, Cashman W, Buckley J, Coffey A, O'Mahony JM (2010). Isolation and detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. *Gut Pathogens* 2: 11.
- Ellingson JLE, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, Sullivan NM (2005). Detection of Viable Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Retail Pasteurized Whole Milk by Two Culture Methods and PCR *Journal of Food Protection* 68:966-972.
- Ellingson JLE, Bolin CA, Stabel JR (1998). Identification of a gene unique to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and application to diagnosis of paratuberculosis. *Molecular and Cellular Probes* 12: 133-142.
- Englund S, Bolske G, Johansson K-E (2002). An IS900-like sequence found in a Mycobacterium sp. other than Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *FEMS Microbiology Letters* 209: 267-271.

- Eriks IS, Munck KT, Besser TE, Cantor GH, Kapur V (1996). Rapid differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. paratuberculosis* by PCR and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 734-737.
- Gonda M, Chang Y, Shook G, Collins M, Kirkpatrick B (2007). Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Preventive Veterinary Medicine* 80: 103-119.
- Good M, Clegg T, Sheridan H, Yearsely D, O' Brien T, Egan J, Mullooney P (2009). Prevalence and distribution of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle herds in Ireland. *Irish Veterinary Journal* 62: 597-606.
- Grant I, Ball H, Rowe M (2002). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in Bulk Raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2428-2435.
- Grant IR (2005). Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: the current position. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1282-1293.
- Haghkhah M, Ansari-Lari M, Novin-Baheran A, Bahramy A (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.
- Haji Hajikolaei MR, Ghorbanpoor M, Solaymani M (2006). The prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ileocecal valve of cattle slaughtered in Ahvaz abattoir, southern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* 7: 77-80.
- Hasani tabatabai A, Firozi R (2005) *Animal bacterial disease* vol 1, 3edn. Tehran university pub, Tehran.
- Jorgensen JB, Jensen PT (1978). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica* 19: 310-312.
- Khol JL, Kralik P, Slana I, Beran V, Aurich C, Baumgartner W, Pavlik I (2010). Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *Journal of Veterinary Medical Science* 72: 1283-1288.
- Mutharia L, K lassen M, Fairles J, Barbut S, Gill C (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease. *International Journal of Food Microbiology* 136: 340-344.
- Nielsen S, Enevoldsen C, Gröhn Y (2002). The *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* ELISA response by parity and stage of lactation. *Preventive Veterinary Medicine* 54: 1-10.
- Nielsen S, Toft N (2009). A review of prevalence of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine* 88: 1-14.
- O'Mahony J, Hill C (2002). Real times PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *Journal of Microbiological Methods* 51: 283-293.
- O'Mahony J, Hill C (2004). Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4561-4568.
- Olsen I, Sigurgardottir G, Djonne B (2002). Paratuberculosis with special reference to cattle. *Veterinary Quarterly* 24: 12-28.
- Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du MR, Machackova M, Yayo AW (2000). Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Veterinary Microbiology* 77: 231-251.

- Pillai SR, Jayarao BM, Gummo JD, Hue EC, Tiwari D, Stabel JR, Whitlock RH (2001). Identification and subtyping of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* by randomly amplified polymorphic DNA. *Veterinary Microbiology* 79: 275-284.
- Rademaker JL, Vissers MM, Te Giffel MC (2007). Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4185-4190.
- Sadeghi-Garmarodi F (1993). An abattoir study of mycobacterium *paratuberculosis* infection in cattle and buffalo. Doctorate Veterinary Medicine. Tehran, Tehran.
- Shahmoradi AH (2009). Study of John's disease in industrial & semi industrial cattle husbandry of Esfahan province. *Veterinary Researches in Pajouhesh & Sazandegi* 6: 13-17.
- Sharma G, Singh S, Sevilla I, Singh A, Whittington R, Juste R (2008). Evaluation of indigenous milk ELISA with m-culture and m-PCR for the diagnosis of Bovine Johne's disease (BJD) in lactating Indian dairy cattle. *Research in Veterinary Science* 84: 30-37.
- Singh S, Singh A, Singh R, Sandhu K, Singh P, Sohal J (2007). Evaluation of highly sensitive indigenous milk ELISA kit with fecal culture, milk culture and fecal-PCR for the diagnosis of bovine Johne's disease (BJD) in India *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 30: 175-186.
- Slana I, Kralik P, Kralova A, Babak V, Pavlik I (2012). Examination of milk filters by real-time PCR as a herd-level indicator of the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds. *Journal of Dairy Science* 95: 1162-1165.
- Slana I, Kralik P, Kralova A, Pavlik I (2008a). 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* 128: 250-257.
- Slana I, Paolicchi F, Janstova B, Navratilova P, Pavlik I (2008b). Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinari Medicina* 53: 283-306.
- Soltani M, Nassiry MR, Eftekhari Shahroudi F, Bassami MR (2008). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Feces and Milk Samples from Holstein Dairy Cows by PCR. *Biotechnology* 7: 582-585.
- Soltani M, Nassiry MR, Eftekhari Shahroudi F, Bassami MR (2010). PCR-Restriction Endonuclease Analysis for strain Typing of *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* based on Polymorphisms in IS 1311. *Middle east journal of scientific research* 5: 311-315.
- Stabel J, Bannantine J (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 4744-4750.
- Stable J, Wells S, Wagner B (2002). Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk-tank milk test results for john's disease in US dairy herds. *Journal of Dairy Science* 85: 525-533.
- Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF (2001). Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters* 196: 31-37.
- Taylor TK, Wilks CR, McQueen DS (1981). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *The Veterinary Record* 109: 532-533.
- Van Weering H, Van Schaik G, Van der Meulen A, Waal M, Franken P, van Maanen K (2007). Diagnostic performance of pourquier ELISA for detection antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Veterinary Microbiology* 125: 49-58.

- Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, Mc-Fadden JJ (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 933-937.
- Wells S, Collins M, Faaberg K, Wees C, Tavoranpanich S, Petrini K (2006). Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 13: 1125-1130.
- Whittington R, Sergeant E (2001). Progress towards understanding the spread, distribution and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Australian Veterinary Journal* 79: 267-278.
- Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V (2001). Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Veterinary Microbiology* 79: 311-322.
- Yousof-beygi G, Ramin AG, Faraji-vand AR (2003). Study on the Prevalence of Subclinical Cattle Johne's Disease in the Urmia Abattoir Archives of Razi Institute 55: 63-70.

Identification and strain determination of *M. paratuberculosis* (MAP) by PCR and REA methods based on IS900 and IS1311 insertion segments

Nassiri M.R.^{1,2}, Jahandar M.H.*³, Soltani M.³, Mahdavi M.³, Doosti M.³

¹Associate Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

²Associate Professor, Department of Agricultural and Animal Biotechnology, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

³PhD Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Abstract

The purpose of this study was to identifying the *M. avium paratuberculosis* (MAP), investigating its outbreaks and optimizing a fast, accurate and simple method based on PCR and RFLP for detection of this subspecies and their strains. This pathogen cause a chronic infection called Johne's disease. Johne's disease a ruminant chronic infection and economically, is one of the most important disease in livestock industry. 243 fecal samples and 56 raw milk samples of suspected cattle, from some farms of Mashhad were gathered. After DNA extraction, in order to identifying contaminated samples, a specific MAP insertion segment called IS900, with length of 413bp was amplified with PCR using P90 and P91 primers. Then, in order to determining the cow and sheep strains of MAP, 268bp fragment of insertion segment IS1311 was amplified with PCR using M56 and M94 primers. The resulting fragments were digested with *HinfI* restriction enzyme. 107 of 243 stool samples (44%) and 10 of 56 raw milk samples (18%) were identified as infected with MAP. Among 56 Milk and feces samples taken from the same animal, 19 stools and 10 milk samples were identified as infected (18% vs. 34%). Results of enzymatic digestion also showed that all detected MAP were from bovine isolates.

Keywords: *M. paratuberculosis*, Johne's disease, IS900, IS1311, REA-PCR.

* Corresponding Author: Jahandar M.H.

Tel: 09155005780

Email: msjahandar@yahoo.com