نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۰ بهار ۱۳۹۵
DOI: 10.22034/vj.2016.105750

بررسی اپیدمیولوژی مولکولی جدایه‌های گاوی گوسفندی و بزی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس موجود در بانک میکروبی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی با استفاده از روش Short Sequence Repeats (SSR) sequencing

• **زهرا زمانی**
کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران
• **احمدرضا جباری (نویسنده مسئول)**
دانشیار میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: مرداد ۹۴ تاریخ پذیرش: مهر ۹۴
Email: a.jabbari@rvsri.ac.ir

چکیده

مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکولوزیس (MAP) در نشـــخوارکنندگان عامل ایجاد پاراتوبرکولوزیس می‌باشد که بدلیل تحمیل خسارت‌های اقتصادی گســـترده از اهمیت اقتصادی زیاد برخوردار می‌باشد. در ســـال‌های اخیر استفاده از توالی‌های تکراری کوتاه در ژنوتایپینگ این باکتری مورد توجه قرار گرفته اســـت. در مطالعه حاضر نتایج حاصل از کاربرد این روش با اتکا بر روی ۲ لوکوس SSR۸ و SSR۹ بر روی ۳ جدایه کلینیکی و ۱ ســـویه مرجع مورد بررســـی قرار گرفته است. سه جدایه ایرانی گاوی، گوسفندی و بزی همراه با یک سویه آزمایشگاهی به نام MAP III & V در بررسی وارد شدند. از آزمایش‌های PCR-F۵۷ و PCR-IS۹۰۰ برای تعیین هویت همه باکتری‌های تحت بررسی استفاده شد. بر اساس روش پیشنهادی Amonsin همه باکتری ها با تمرکز بر دو لوکوس SSR۸ و SSR۹ ژنوتایپینگ SSR گردیدند. در هر یک از دو لوکوس SSR۸ و SSR۹ در میان باکتری‌های تحت بررسی دو الل شناسایی گردید بطوریکه که در SSR۸ آلل بزرگتر بطول bp۷۸۱ و الل کوچکتر با bp۷۷۸ و در SSR۹ دو الل bp۵۸۱ و bp۵۷۸ شناســـایی گردیدند. دو جدایه گاوی و گوسفندی MAP همراه با سویه آزمایشگاهی دارای یک الگوی مشابه بودند در حالیکه سومین جدایه (بزی) یک تیپ منفرد متفاوت از خود نشان داد. مشاهده دو سویه در بین سه جدایه ایرانی تحت بررسی احتمالا می‌تواند نشانه وجود ســـطح قابل توجهی از تنوع ژنتیکی این باکتری در ایران باشد اما اثبات این فرضیه نیازمند انجام مطالعات تکمیلی خواهد بود.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم آویوم زیر گونه پاراتوبرکولوزیس۸, SSR۹ F۵۷ ،SSR، IS ۹۰۰

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 110 pp: 96-101

Molecular epidemiology of bovine, ovine and caprine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* field isolates archived at Razi Vaccine & Serum Research Institute by Short Sequence Repeats (SSR) analysis

By: Zamani, Z., Msc Microbiology of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran. and Jabari, AR., (Corresponding Author) Asistant Perofessor Microbiology of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran.

Email: a.jabbari@rvsri.ac.ir

Received: July 2015 **Accepted: September 2015**

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) is the ethiological agent of paratuberculosis in ruminants leading to exensive economical loss. Recently, application of Short Sequence Repeat (SSR) anylsis in genotyping of MAP, has come to attention. In the present work results from application of a two-locus (SSR8 & SSR9) SSR typing system on three Iranian field and one laboratory strain have been addressed. Three Iranian field and one laboratory strain were incorporated in the study. Identification of these as MAP was achieved through F57-PCR and IS*900*-PCR. The Amonsin version of SSR typyng system was conducted on the bacteria under study using SSR8 and SSR9 loci. Either of the SSR8 and SSR9 produced two alleles. A larger allel of 781 bp and a smaller allele of 778 bp at SSR8 and two alleles of 581 and 578 bp long at SSR9. A single SSR8/SSR9 pattern was shared by the bovine and ovine MAP isolates plus the laboratory strain while the caprine isolate represented a different type. If Iran holds a heterogenous MAP population , we assume detection of at least two SSR types in this work is a likely reflection of such diversity but how extensive such diversity might be further studies are required.

Key words: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), SSR8, SSR9, F57, IS*900*, strain

مقدمه

در ایران بدنبال شناسایی نخستین موارد پاراتوبرکولوزیس در دهه ۴۰ (۱)، اکنون بیماری در تقریبا تمام قطب‌های پرورش نشخوارکنندگان کشور دیده می‌شود (۲-۴). در حال حاضر پاراتوبرکولوزیس در برنامه کشوری کنترل و ریشه کنی بیماری‌های (مشترک) دامی ایران قرار ندارد و واکسیناسیون دام‌ها بر علیه آن نیز مورد اقبال متولیان دامپزشکی و دامپروران ایرانی قرار نگرفته است.

بر اساس خصوصیات فنوتیپیکی، ژنوتیپیکی و همچنین میزبان، تاکنون سه تیپ MAP شناسایی شده است که شامل Type I) Sheep/S type) و Type II) Cattle/C type) و Type III) Intermediate) می‌باشد (۵، ۶). علیرغم گزارشات وجود بیماری در گله‌های گاو، گوسفند و بز ایران، مطالعات اخیر انجام پذیرفته در مؤسسه رازی نقش اصلی سویه‌های نوع گاوی و فقدان سویه‌های تیپ گوسفندی را در این گله‌ها نشان داده‌اند (تدین، اطلاعات منتشر نشده).

در بررسی‌های اپیدمیولوژی پاراتوبرکولوزیس از روش‌های بیولوژی مولکولی که شامل روش‌های ژنوتایپینگ مقدماتی (Primary genotyping methods) و روش‌های ژنوتایپینگ با قدرت تفریق بالا (Subtyping methods) می‌گردند استفاده می‌شود. از گروه اول می‌توان به PFGE و RFLP-IS۹۰۰ و از گروه دوم به Variable number Tandem Repeat (VNTR) typing و Short Sequence Repeat (SSR) typing اشاره نمود. در سال ۲۰۰۴ در ژنوم سویه MAP K۱۰ ۱۱ لوکوس SSR شناسایی گردید که که از نظر تعداد کپی واحدهای تکرار شونده ۱ (نظیر G)، ۲ (مانند GC) و ۳ (مانندGGT) نوکلئوتیدی در میان جدایه‌های MAP دارای تنوع بودند (۷). با ابداع روش آمونسن (SSR typing) امکان بررسی تنوع ژنتیکی و اپیدمیولوژی جدایه‌های MAP از نقاط مختلف جهان فراهم گردید. استفاده از این تکنیک نشان داده است که میزبان‌های این باکتری و از جمله انسان فقط توسط جدایه‌های MAP دارای تیپ‌های خاص SSR آلوده می‌شوند (۸).

تنوع ژنتیکی سویه‌های واکسینال III & V و جدایه‌های حاد MAP موجود در آرشیو میکروبی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی حصارک در مناطق ژنتیکی SSR۱ و SSR۲ پیش از این بررسی و انتشار یافته است. در مطالعه حاضر یافته‌های حاصل از اعمال این روش با استفاده از دو لوکس دیگر SSR۸ و SSR۹ روش تایپینگ SSR analysis مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

روش مطالعه

جدایه‌های باکتری و استخراج کروموزوم باکتری

جدایه‌های MAP گاوی Razi 01450 از ابهر زنجان، بزی Razi 01911 و گوسفندی Razi 01231 از اصفهان همراه با سویه واکسینال III & V در این مطالعه وارد گردیدند. سه جدایه باکتری در طول سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ از عقده‌های لنفاوی لاشه دام‌های مبتلا جداسازی و پس از ژنوتایپینگ به روش VNTR analysis(۲۹) به عنوان نمونه‌های شاخص از تیپ‌های INMV5 (جدایه گاو)، INMV39 (جدایه بز) و همچنین INMV2 (جدایه گوسفند) همراه با و سویه Map (III & V) انتخاب و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

هریک از چهار باکتری بر روی دو لوله کشت یونیورسال حاوی محیط کشت Herold's egg-yolk medium به همراه مایکوباکتین J (۲۶) تجدید کشت شدند و ۸-۱۲ هفته در دمای ۳۷ °C تا زمان مشاهده پرگنه‌ها باقی ماندند. استخراج کروموزوم باکتری به روش جوشانیدن صورت پذیرفت (۹).

آزمایش‌های ژنومی: برای اطمینان از هویت باکتری‌ها آزمایش‌های PCR-F۵۷ (با استفاده از زوج پرایمرهای۳' TTC TTG AAG CGT GTT و۳' GCG ATG ATC GCA GCG TCT TTG ۵' CGG GGC C F۵۷f ۵' G F۵۷r) و PCR-IS۹۰۰ (با استفاده از پرایمرهای ۳' ACC GAA TGT GGA CAC CGA AGC ACA CTC ۳' و ۵' TGTTGT CAC CG INSf ۵' TC INSr) بصورت موازی اجرا گردیدند (۱۰). در مورد ژنوتایپینگ SSR به روش پیشنهادی Amonsin اجرا گردید (۷). دو لوکوس SSR۸ و SSR۹ (با توجه به بالاتر بودن میزان تنوع ژنتیکی آن‌ها در گزارشات پیشین (۱۱) مورد استفاده قرار گرفتند. بدلیل مواجهه با اشکال در آملیفیکاسیون در جریان استفاده از پرایمرهای پیشنهادی Amonsin ، پرایمرهای جدید برای لوکوس SSR۸ (۳' SSR۸f ۵' CTG GAA GGA CCT CGG CCT G و۳' SSR۸r ۵' CCG CAC ATA CAA GTC GAA GC) و لوکوس SSR۹ (۳' SSR۹f ۵' CCG AGT TCC TCG ACC CAG T و ۵' GAT GGC GCC ۳' SSR۹r ۵' GAA CAC GAT T) طراحی و مورد استفاده قرار گرفت. از نرم افزار Primer ۴,۰,۰ Version۳ برای طراحی پرایمر استفاده گردید (۱۲, ۱۳).

آزمایش PCR: ساخت پرایمرها توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen®, Korea) صورت پذیرفت. برای آماده‌سازی همه واکنش‌ها از PCR master mix (شرکت آمپلیکون دانمارک) استفاده شد. حجم نهایی هر واکنش برابر با ۱۲µL و متشکل از ۶ میکرولیتر PCR master mix ، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر ۰/۴۸، میکرولیتر DMSO، ۳ میکرولیتر از ماده ژنتیکی و ۰/۵۲ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر بود. به عنوان کنترل منفی از Double Distilled PCR water استفاده شد. از ژل ۱,۲، آگاروز (Invitrogen® , USA) پیش رنگ شده با Red Safe® آشکارسازی محصولات PCR با استفاده صورت گرفت. ژل‌ها در میدان الکتریکی به قدرت ۲ V/cm به مدت ۲ ساعت رانده و در دستگاه ژل داک (BioRad®, USA) عکسبرداری شدند. تعیین اندازه تقریبی محصولات آمپلیفیکاسیون به کمک DNA size marker استاندارد ساخت مؤسسه رازی (۹) صورت پذیرفت.

برای انجام واکنش‌های PCR از دو پروتکل استفاده شد. پروتکل نخست که از آن برای آزمایش‌های IS۹۰۰ و F۵۷ استفاده شد شامل یک مرحله اولیه گرمایش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C و به دنبال آن ۴۰ نوبت از یک چرخه سه مرحله‌ای شامل گرمایش در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، گرمایش در دمای ۶۱°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در آخر یک مرحله حرارتی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. در پروتکل دوم که در مورد SSR typing بکار گرفته شد، مرحله اولیه گرمایش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C و بدنبال آن ۳۵ نوبت از یک چرخه سه مرحله‌ای مشتمل بر ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، گرمایش در دمای ۶۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک مرحله گرمایش ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه، به کار گرفته شد.

تعیین توالی نوکلئوتیدها و اندازه محصولات: PCR به منظور تکمیل یافته‌های ژل الکتروفورز تعیین دقیق اندازه محصولات آمپلیفیکاسیون، محصولات PCR هر ۲ لوکوس SSR در تمام چهار باکتری تعیین گردید. از نرم افزارهای Clustal W۲ و Chromas lite Version ۲,۱,۱ برای قرائت و پردازش کروماتوگرام‌ها و مقایسه آن‌ها با مناطق هم ارز از ژنوم MAP K۱۰ و MAP۴ و همچنین سویه *Mycobacterium avium subspecies avium* ۱۰۴ مقایسه شدند. از نرم افزار bTandem Repeat ۴,۰۷ Finder Version به منظور تعیین دقیق ساختمان و تعداد واحدهای تکرار شونده در هر لوکوس استفاده شد.

نتایج

هر چهار باکتری تحت بررسی در آزمایش‌های PCR-IS۹۰۰ و PCR-F۵۷ محصولاتی به ترتیب به اندازه ۵۶۰ bp و ۷۰۴ bp تولید نمودند و بدین ترتیب هویت همه آن‌ها به عنوان MAP تائید شد.

نتایج حاصل از بررسی رشته‌های نوکلئوتیدی بدست آمده در جریان تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Finder Tandem Repeat نشان داد که در لوکوس SSR۸ در ژنوم سویه MAP III & V و سویه MAP K10 همراه با جدایه Razi 1450 طول محصول PCR برابر با ۷۸۱ bp و ۵ کپی از واحد تکرار شونده TGG وجود دارد، همین قطعه در جدایه Razi 1911 دارای طول ۷۷۸ bp و واجد ۴ کپی از واحد تکرار شونده TGG می‌باشد. در مقایسه در ژنوم سویه MAP ۴ که تنها سویه جدا شده از انسان می‌باشد که ژنوم کامل آن اخیرا تعیین توالی شده است، تعداد ۴ کپی از این واحد تکرارشونده وجود دارد (شکل ۲). علاوه بر این تعداد ۳ کپی نیز از این واحد تکرارشونده در ژنوم MAA 104 وجود دارد (شکل ۲). در عین حال در ژنوم MAA 104 تعداد ۷ SNPs در موقعیت‌های ۴۳، ۱۱۸، ۱۲۷ و ۱۶۹ ، ۴۶۹، ۶۰۷ و ۷۰۹ در مقایسه با سویه MAP K۱۰ شناسایی گردید.

در لوکوس SSR۹ در ژنوم سویه MAP III & V، سویه MAP K۱۰ همراه با جدایه Razi 1450 و جدایه Razi 1231 طول محصول PCR برابر با ۵۸۱ bp و ۵ کپی از واحد تکرار شونده GCA وجود دارد، در مقایسه در ژنوم سویه MAP ۴ تعداد ۳ کپی از این واحد تکرار شونده دیده می شود (شکل ۲). همین قطعه در جدایه Razi 1911 دارای طول ۵۷۸ bp و واجد ۴ کپی از واحد تکرار شونده می‌باشد که مشابه سویه MAA 104 می‌باشد (شکل۲). علاوه بر این در موقعیت نوکلئوتید ۴۵۹ این قطعه در جدایه Razi 01231 همراه با سویه MAP III & V جایگزینی A با G مشاهده می‌شود ضمن آنکه در همین لوکوس در ژنوم MAA 104 تعداد ۴ SNPs در موقعیت‌های ۲۷۶، ۲۹۶، ۴۲۹ و ۵۰۲ در مقایسه با سویه MAP K۱۰

شناسایی گردید (شکل ۲).

بحث

مطالعات انجام گرفته بر روی م. پاراتوبرکولوزیس با استفاده از SSR genotyping نشان داده‌اند که بین تیپ‌های SSR باکتری از یکسو و میزبان و حدت آن و همچنین شدت بیماری از سوی دیگر ارتباط معنی‌داری وجود دارد بطوریکه فقط تیپ‌های ژنتیکی خاصی از این باکتری قادر به آلوده نمودن میزبان‌های انسانی گزارش شده اند (۱۴). بنظر می‌رسد در شرایطی که باکتری‌های دارای SSR type های خاص نوع تحت بالینی پاراتوبرکولوزیس را ایجاد می‌نمایند برخی دیگر اسباب ایجاد فرم‌های پیشرونده و حاد بیماری در میزبان می‌شوند (۱۵, ۱۶).

اجرای SSR genotyping بر روی جدایه‌های MAP جمع‌آوری شده از گاو در اوگاندا نشان داده است که لوکوس SSR۸ می‌تواند از جمله پلی مرف‌ترین لوکوس‌های از این نوع در میان جدایه‌های MAP باشد (۱۱). در حال حاضر در شرایط ایران با توجه به نبود مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی پاراتوبرکولوزیس بر مبنای SSR genotyping راجع به اهمیت این یافته نمی‌توان اظهارنظر جامع نمود. اما بنظر می‌رسد مشاهده دو آلل برای هریک از دو لوکوس SSR۸ و SSR۹ در میان سه جدایه گاوی، گوسفندی و بزی ایران نشان دهنده سطح قابل توجه پلی مرفیسم در این دو لوکوس باشد. ترکیب ۵ کپی از واحد تکراری (TGG) در لوکوس SSR۸ و CAG در لوکوس SSR۹ بصورت مشترک در هر دو جدایه گوسفندی Razi 1231 و گاوی Razi 1450 زنجان دیده می‌شود در حالی‌که جدایه بزی Razi۱۹۱۱ اصفهان در هریک از این دولوکوس دارای ۴ تکرار می‌باشد بدین ترتیب ضمن آنکه بصورت مشخص وجود دستکم ۲ سویه ژنتیکی MAP در میان گله‌های دام تحت بررسی در این تحقیق جالب توجه می‌باشد، احتمال وجود سویه یا سویه‌های دیگر در فضای جغرافیایی ایران قابل تصور می‌باشد. علاوه بر این نظر به اینکه در مطالعه حاضر یک سویه واحد MAP با SSR genotype واحد هم از گاو (Razi 01450) و هم از گوسفند (Razi 01231) مبتلا به پاراتوبرکولوزیس جدا شده است احتمال داده می‌شود که تنوع میزبانی سویه‌های MAP در ایران در مقیاس بزرگتر وجود داشته باشد.

تیپ ژنتیکی SSR type سویه غیر ایرانی MAP III & V در مؤسسه رازی از آن برای تولید پاراتوبرکولین و همچنین واکسن پاراتوبرکولوزیس استفاده می‌شود همراه با سویه MAP K۱۰ که ژنوم آن بطور کامل تعیین توالی شده است(۱۲) در مطالعه حاضر مشابه با دو جدایه ایرانی Razi 01450 و Razi 01231 شناسایی گردید (جدول). با توجه به فاصله زیاد جغرافیایی و عدم ارتباط تایید شده اپیدمیولوژیک میان جدایه‌های ایرانی و سویه‌های خارجی مورد اشاره به نظر می‌رسد این تیپ خاص SSR از MAP از فراوانی گسترده‌تر نسبت به تیپ‌های دیگر ژنتیکی برخوردار باشد. موضوع فروانی بیشتر برخی از کلون‌های خاص MAP پیش از این مورد توجه قرار گرفته است (۲۵)، (۱۸).

نویسندگان معتقدند با انجام تحقیقات تکمیلی و با استفاده از لوکوس‌های بیشتر سیستم SSR genotyping و همچنین بکار گرفتن جدایه‌های دیگر ایرانی می‌توان بصورت دقیق‌تر راجع به فیلوژنی جمعیت MAP در ایران اظهار نظر نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقایان دکتر کیوان تدین و دکتر نادر مصوری و نیز کارشناسان بخش‌های هوازی و توبرکولین موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بخاطر همکاری در مراحل کشت و تامین مواد ژنتیکی این مطالعه تشکر می نمایند. هزینه اجرای این تحقیق بصورت کامل توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و از طریق پروژه تحقیقاتی به شماره ثبت ۹۴۱۰۶-۱۸-۱۸-۲ تامین و پرداخت گردیده است. مطالب منتشر شده در این مقاله ناظر بر یافته‌های بخشی از پروژه پایان‌نامه تحصیلی کارشناسی ارشد زهرا زمانی دانش‌آموخته دانشگاه آزاد اسلامی (واحد علوم و تحقیقات رشت) می‌باشد. نویسندگان فرارسیدن شانزدهم دی ماه ۱۳۹۴ مصادف با نودمین سالگرد تاسیس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی را به همکاران و هموطنان شادباش می‌گویند.

منابع مورد استفاده

1. Talatchian, M., First report of Johne's disease in Iran. Bull Off Int Epizoot, 1965. 64: p. 779-82.

2. Baharsefat, M., et al., Paratuberculosis in goats and sheep in Iran, Epidemiological, clinical, pathological features and laboratory diagnosis. Archive of Razi Institute, 1972. 24: p. 49-61.

3. Shahmoradi, A.H., et al., Paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle farms in Central Iran. Trop Anim Health Prod, 2008. 40(3): p. 169-73.

4. Sadati, R., et al., Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle bred in northern Iran by nested PCR. Global Vet, 2012. 8(3): p. 259-263.

5. Castellanos, E., et al., Discovery of stable and variable differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III genomes by pan-genome microarray analysis. Appl Environ Microbiol, 2009. 75(3): p. 676-86.

6. Collins, D.M., D.M. Gabric, and G.W. de Lisle, Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J Clin Microbiol, 1990. 28(7): p. 1591-6.

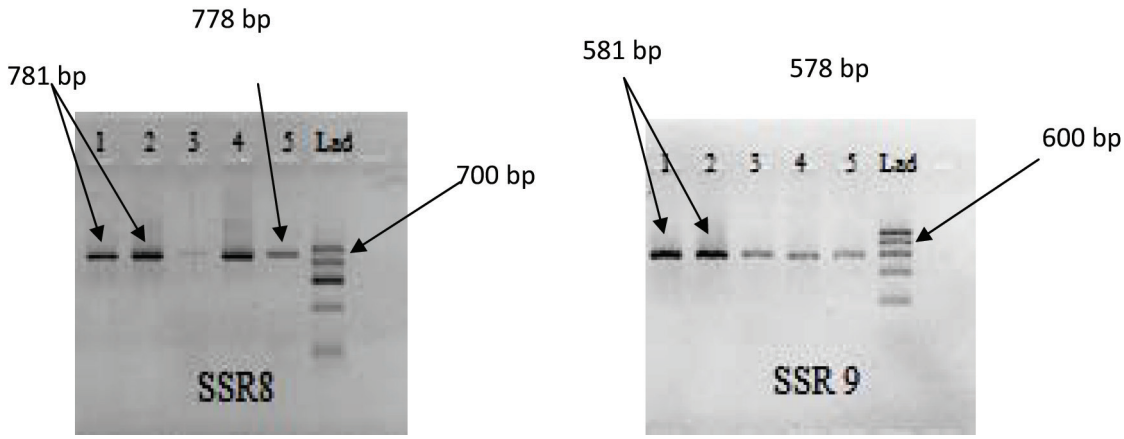
7. Amonsin, A., et al., Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains. J Clin Microbiol, 2004. 42(4): p. 1694-702.

8. Sohal, J.S., et al., Strain diversity within *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-a review. Indian J Exp Biol, 2010. 48(1): p. 7-16.

9. Sekhavati, M., et al., "In-house" production of DNA size marker from a vaccinal *Bacillus anthracis* strain. Iranian Journal of Microbiology, 2015. 7(1): p. 45-49.

10. Ebrahim, Z., K. Tadayon, and N. Mosavari, Genomic Characterization of the Vaccinal Strain of *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* (MAP) 316F by MIRU-VNTR. mljgoums,

2015. 9(3): p. 10-18.
11. Okuni, J.B., et al., Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from Ugandan cattle and strain differentiation using optimised DNA typing techniques. BMC Vet Res, 2012. 8: p. 99.
12. Untergasser, A., et al., Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res, 2012. 40(15): p. e115.
13. Ye, J., et al., Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, 2012. 13: p. 134.
14. Ghadiali, A.H., et al., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. J Clin Microbiol, 2004. 42(11): p. 5345-8.
15. Motiwala, A.S., et al., Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. J Clin Microbiol, 2004. 42(4): p. 1703-12.
16. Motiwala, A.S., et al., Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. J Clin Microbiol, 2003. 41(5): p. 2015-26.



تصویر ۱) الکتروفورز محصولات PCR مربوط به لوکوس های SSR8 و SSR9 بر روی ژل آگاروز ۲،۱. ستون شماره 1 Razi 01911، ستون شماره 2Razi 01450 ، ستون شماره ۳ Razi 01231 مربوط به جدایه های ایرانی و ستون شماره ۴ معرف سویه V و III PAM می باشند. DNA size marker بکار رفته دارای ۵ باند الکتروفورز به فواصل 200 bp در محدوده 100 الی 900 (SSR8 bp) یا 200 الی 1000 (SSR9) می‌باشد.

```
MAPRAZIIII&V-SSR8 GGTGGTGGTGGTGGTGGCGCA
MAP4SSR8          GGTGGTGGTGGTGG---CGCA
MAP01911-SSR8     GGTGGTGGTGGTGG---CGCA
MAPRAZI01450-SSR8 GGTGGTGGTGGTGGTGGCGCA
MAPK10-SSR8       GGTGGTGGTGGTGGTGGCGCA
MAA108SSR8        GGTGGTGGTGGCG------CA
                  ...360.......370.....
```

A

```
MAPRAZI01231-SSR9 AGCAGCAGCAGCACGT
MAPRAZIIII&V-SSR9 AGCAGCAGCAGCACGT
MAPRAZI01450-SSR9 AGCAGCAGCAGCACGT
MAPK10-SSR9       AGCAGCAGCAGCACGT
MAPRAZI01911-SSR9 AGCAGCAGCA---CGT
MAP4SSR9          AGCAGCA------CGT
MAA104SSR9        AACAGCAGCA---CGT
                  ...300.......310
```

B

تصویر ۲- چیدمان مقابسه ای و توالی نوکلئوتیدها با استفاده از نرم افزار Clustal 2.0.12 Multiple Sequence Alignment در لوکوس های A (SSR8) و B (SSR9) در میان ۳ جدایه ایرانی و سویه MAP III & V. قطعه هم ارز از سویه MAP K10 و MAP 4 به منظور کمک به مقایسه اضافه شده است.