DOI: http://dx.doi.org/10.22034/vj.2017.109226

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.109226

تعیین ویژگی‌های ژنتیکی سویه‌های *مایکوباکتریوم ایویوم* زیر گونه *پاراتوبرکولوزیس* III & V و 316F با استفاده از یک راهبرد چندگانه

• **مریم مهره کش حقیقت**
بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دامپزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **امیرحسین شاهمرادی**
بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **کیوان تدین**
بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دامپزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **روح اله کشاورز**
بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **رایناک قادری**
بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دامپزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **محمد سخاوتی**
بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دامپزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **نادر مصوری (نویسنده مسئول)**
بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت: بهمن ۹۴ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۵

Email: n.mosavari@rvsri.ac.ir

چکیده

دو سویه غیر بومی *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP 316F) و MAP III & V به مدت نیم قرن در موسسه رازی نگهداری و از آن‌ها برای تهیه پاراتوبرکولین استفاده شده است. به منظور شناسایی خصوصیات ژنتیکی این دو سویه یک استراتژی سه محور تعیین هویت (PCR-IS۹۰۰، PCR-F۵۷)، تعیین تیپ (PCR-Collins, PCR-gyrA, PCR-gyrB) و تعیین ژنوتیپ (MLVA-Thibault, SSR-Amonsin) به کار گرفته شد. در نتیجه اجرای این استراتژی هویت هر دو سویه به عنوان MAP تایید گردید و تیپ آنها از نوع گاوی شناخته شد. در ژنوتایپینگ تیپ MLVA آن‌ها INMV2 نشان داده شد که با نمونه فرانسوی (Merial) سویه MAP 316F همخوانی دارد. در تفسیر این یافته ها می‌توان گفت شباهت تیپ ژنتیکی دو سویه در SSR-Amonsin و MLVA-Thibault ممکن است اتفاقی باشد و یا نشانگر تعلق آنها به یک کلون اجدادی واحد باشد. علاوه بر این چون مؤسسه اتلیک ترکیه تامین کننده سویه MAP ۳۱۶F مورد بررسی در این تحقیق می باشد، بنابراین احتمالا یک منبع فرانسوی تامین کننده این سویه برای مؤسسه اتلیک ترکیه بوده است. انتظار می رود اجرای این استراتژی بر روی جدایه‌های بومی ایران دانش مولکولار اپیدمیولوژی موجود را در رابطه با پاراتوبرکولوزیس در ایران افزایش دهد.

کلمات کلیدی: gyrB، gyrA، SSR typing، MLVA، F57، IS900

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 89-100

Molecular identification of ***Mycobacterium avium*** subspecies paratuberculosis 316F and III & V strains by a multi-approach strategy

By: Mohrekesh Haghighat, M., Tuberculin & Mallein Research and Production Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Shahmoradi, A.H., Veterinary Research Department, Isfahan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Tadayon, K., Aerobic Bacteria Veterinary Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Keshavarz, R., Tuberculin & Mallein Research and Production Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Ghaderi, R. Aerobic Bacteria Veterinary Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Sekhavati M., Aerobic Bacteria Veterinary Vaccines Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mosavari, N., (Corresponding Author) Tuberculin & Mallein Research and Production Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2016-02-14 Accepted: 2016-06-08

Email: n.mosavari@rvsri.ac.ir

For almost half a century *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) 316F and MAP III & V strains have been used in preparation of paratuberculin at Razi institute. In order to characterize their genomic properties, a multi-approach strategy was employed to authenticate their identity (PCR-IS900 or PCR-F57), their type (PCR-Collins, PCR-gyrA or PCR-gyrB) and their genotype (MLVA-Thibault or SSR-Amonsin). Consequently, both strains proved to be MAP and from a cattle type. In MLVA the genotype was found to be INMV2, a type identical to that of the French MAP 316F Merial sub-strain. In explanation of these observations, the identical patterns of both studies strains in MLVA as well as SSR typing might be a case of coincidence or a an indication of a mutual ancestral clone. Besides, the fact that the supplier of MAP 316F strain studied here is the Turkish Etlik institute, it is likely that the original source for this strain is French. Application of the strategy developed in this study on indigenous MAP isolates will improve the current molecular epidemiology understanding of paratuberculosis in Iran.

Key words: IS900, F57, MLVA, SSR typing, gyrA, gyrB

مقدمه

بیماری پاراتوبرکولوزیس در سال‌های نخستین قرن نوزدهم میلادی شناسایی گردید (۱). باکتری *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) عامل ایجاد این بیماری در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی می‌باشد (۲). علیرغم پیشرفت کند و بدون نشانه‌های کلینیکی پاراتوبرکولوزیس در بدن میزبان (۳)، این بیماری باعث بروز خسارت‌های اقتصادی گسترده از طریق کاهش میزان بهره‌وری اقتصادی ناشی از لاغری و کشتار زودهنگام، کاهش تولید شیر و گوشت، تلفات مستقیم دام‌های آلوده و همچنین اعمال محدودیت‌های اجباری در تجارت دام زنده می‌گردد. پاراتوبرکولوزیس تقریبا در میان نشخوارکنندگان از تمام جهان گزارش گردیده است (۴, ۵).

ضررهای اقتصادی پاراتوبرکولوزیس در دامپزشکی به مراتب بیشتر از اهمیت احتمالی زئونوتیک آن مورد توجه قرار گرفته است (۶,۷). شواهد به‌دست آمده از پاتولوژی، میکروبیولوژی و بیولوژی مولکولی پاراتوبرکولوزیس در طول یک قرن گذشته توانایی MAP را در آلودگی انسان در تمام سنین نشان داده‌اند (۸). علاوه بر این نقش این پاتوژن در ایجاد بیماری‌های Crohn disease, type-1 diabetes, sarcoidosis, multiple sclerosis and Hashimoto's thyroiditis و Blau syndrome در انسان مورد بررسی قرار گرفته است (۲, ۹). تظاهرات پاتولوژیک و بالینی پاراتوبرکولوزیس در دام‌ها با کرون در انسان شباهت بسیار زیادی دارد اما در شرایطی که MAP در میزبان های اصلی آن به سادگی قابل ردیابی است، جداسازی آن در انسان بسیار مشکل می‌باشد (۱۰). علیرغم تمام این یافته‌ها پذیرش پاراتوبرکوبوزیس به عنوان یک بیماری مشترک، همچنان محل مناقشه علمی می‌باشد (۱۱).

در جغرافیای ایران پاراتوبرکولوزیس برای نخستین بار در سال‌های ۱۹۶۲ تا ۱۹۶۵ در گاوداری شرکت نفت آبادان و در بین گاوهای اصیل Syndhie و Jersaise این دامداری که از انگلستان وارد شده بودند، توسط خلیلی در مؤسسه رازی اهواز شناسایی و گزارش گردید (۱۲). در سال ۱۹۶۲ طلاچیان موفق به جداسازی باکتری عامل بیماری گردید (۱۳). در سال ۱۹۷۲ نیز بهارصفت پاراتوبرکولوزیس را در گله بز (نژاد نجدی) و گوسفند (نژاد آواسی) موسسه دامپروری حیدرآباد کرج که از اسرائیل وارد شده بودند، گزارش و عامل بیماری را جداسازی نمود (۱۲). برخی از پژوهشگران ایرانی معتقدند بر خلاف سل گاوی که وجود آن در میان گاوهای بومی ایران حتی پیش از آغاز واردات دام‌های اصیل اروپایی مورد

توجه قرار گرفته اســت، منشاء وجود و انتشــار پاراتوبرکولوزیس در میان گله‌های گاو، گوسفند و بز ایران واردات دام‌های آلوده و انتقال عامل بیماری توسط آنان می‌باشد (۱۲). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که در حال حاضر این بیماری بــا درجات مختلفی از نظر فراوانــی تقریبا در تمام قطب‌های پرورش نشــخوارکنندگان و مناطق دامپروری کشــور و از جمله آذربایجان شــرقی (۱۴)، خراســان رضوی (۱۵)، فارس (۱۶)، اصفهان (۱۷). مرکزی (۱۸)، مازندران (۱۹) و خوزســتان (۲۰) وجود دارد. محدودیت‌های مالی و کمبود نیروی انســانی و تمرکز بر روی کنترل بیماری‌های مهم‌تر مشترک میان انســان و دام نظیر سل گاوی و بروســلوز باعث گردیده است علیرغم خســارت‌های مالی قابل توجه، پاراتوبرکولوزیس در فهرســت بیماری‌های اولویت‌دار در برنامه کاری نهادهای دامپزشکی دولتی قرار نداشته باشد.

دوره انکوباسیون MAP بسیار طولانی است و رشد آزمایشگاهی باکتری در جداسازی اولیه وابســته به وجود مکمل آهن (mycobactin j) می‌باشد و به ویژه در مورد جدایه‌های انســانی و گوسفندی می‌تواند بیش از یکسال به‌طول انجامد (۲۱ , ۲۲). در ســال ۲۰۰۵ ژنوم کامل ســویه MAP K10 شناسایی و اطلاعات آن منتشــر گردید. این سویه در دهه ۷۰ میلادی در آمریکا از یک گله گاو شــیری جداســازی گردیده بود. در ژنوم این ســویه ۴,۸۲۹,۷۸۱ زوج باز شناسایی گردید (۲۳).

در ســال‌های اخیر به منظور فراهم نمودن امکان تشــخیص MAP با اســتفاده از روش‌های بیولوژی مولکولی، تعــدادی پروتکل PCR بر مبنای مارکرهــای ژنتیکی اختصاصی MAP معرفی شــده‌اند کــه از میان آن‌ها می‌تــوان بــه IS900 (۲۴)، ISMav2 (۲۵)، f۵۷ (۲۴)، locus ۲۵۵ (۲۶)و HspX (۲۷) اشاره نمود.

وجود ســویه هــای مختلف در جمعیت MAP بر اســاس مشــاهده ویژگی‌هــای متفاوت فنوتیپی از دهه ۱۹۳۰ میلادی مورد توجه قرار گرفته است. بر اســاس خصوصیات فنوتیپی، ژنوتیپی و همچنین میزبان، تاکنون سه تیپ MAP مورد شناسایی قرار گرفته است که شامل Type I (Sheep/S type) و Type II (Cattle/C type) وType III (Intermediate) می‌باشــد (۲۸, ۲۹). تشــخیص افتراقی میان این سویه‌ها توســط سه روش IS۹۰۰-PFGE ، RFLP و PCR-REA *IS 1311* مقدور گردیده است (۳۰) همچنین در ســال ۲۰۰۲ امکان تمایز میان سویه‌های تیپ ۱ و تیپ ۲ با استفاده از یک PCR تک مرحله‌ای امکان‌پذیر گردید (۳۱).

در سال ۲۰۰۴ آمونسین ۱۱ لوکوس SSR را در ژنوم سویه MAP **K**۱۰ شناسایی نمود که از نظر تعداد کپی واحدهای تکرار شونده یک (نظیر G)، دو (مانند GC) و سه (مانند GGT) نوکلئوتیدی در میان جدایه‌های MAP دارای تنوع بودند (۳۲). با اســتفاده از این ویژگی آمونسین روشی را ابداع نمود (SSR typing) که متکی بر PCR بود و امکان بررســی تنوع ژنتیکی و اپیدمیولــوژی جدایه‌های MAP از نقاط مختلف جهان فراهم می‌نمود. بر اســاس اطلاعات موجود نشان داده شده است که فقط جدایه‌های خاصی از MAP که دارای تیپ‌های SSR مشــخصی می‌باشند، قادر به آلوده نمودن میزبان‌های مختلف و از جمله انسان می‌باشند (۳۰).

در ســال ۲۰۰۷ تیبالــت روش Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) را با اســتفاده از ۸ لوکوس در مورد ژنوتایپینگ MAP معرفی نمود که به تدریج با کســب مقبولیت جهانی به روش اســتاندارد در تایپینگ مولکولی MAP تبدیل گردید (۱۱, ۳۰, ۳۳-۳۵) تاکنون ۱۳۹ تیــپ ژنتیکی در دیتابانک اروپایــی *Mycobacterium avium* complex ثبــت و از طریــق درگاه mac-inmv.tours.inra.fr/ قابل مشــاهده اســت (۳۶). از نظر تکنیکی مبانی این روش بدون پیچیدگی و انجام آن نیازمند دسترسی به مقادیر اندکی از ژنوم باکتری می‌باشد و نتایج بدست آمده ساده و در عین حال دارای قابلیت پردازش دیجیتال و سازگار با روش‌های پردازش الکترونیکی و ذخیره در بانک‌های اطلاعاتی می‌باشند. این ویژگی‌ها روش MLVA را نسبت به روش‌های قدیمی‌تر PFGE و RFLP ارجح نموده‌اند (۲۸). در ســال ۲۰۰۷ با بررسی مقایسه‌ای ژنوم سویه‌های MAP در منطقه ژنتیکی لوکوس‌های gyrA و gyrB و Costellanous، وجود پلی‌مرفیســم در نوکلئوتیدهای واقع در موقعیت‌های ۸۶۸، ۱۶۵۳، ۱۸۲۲ و ۱۹۸۶ در ژن gyrA و ۲۶۴، ۱۰۸، ۱۶۲۶، ۱۳۵۳ و ۴۹۴ در ژن gyrB را متناســب با تیپ‌های گاوی، گوسفندی و حد واسط باکتری نشان داد و الگوریتمی را تعریف نمود که امکان تشــخیص افتراقی میان این سویه‌ها را فراهم می‌نمود (۳۷).

در سال ۱۹۵۷ در جریان بازدید فتح اله انتصار از مؤسسه Weybridge انگلستان سویه‌های آزمایشگاهیMAP ۳۱۶F و MAP III & V از این مرکز به مؤسســه رازی کرج انتقال داده شــد و از آن‌هــا در تولید پاراتوبرکولین استفاده گردید. در سال‌های اخیر این سویه‌ها مجددا از مؤسسه Etlik آنکارا در ترکیه دریافت و به مؤسسه رازی انتقال داده شدند.

در مطالعه حاضر با هدف شناسایی ویژگی‌های ژنتیکی دو سویه MAP ۳۱۶F و MAP III & V، از یــک الگوریتــم تلفیقی مشــتمل بر دو مارکر ژنتیکــی *IS۹۰۰* و F۵۷ به عنوان مارکرهای تعیین هویت و روش Collins و همچنیــن SNP typing ژن‌هــای gyrA و gyrB بــه منظور تعیین تیپ و روش‌های MLVA (هشــت لوکــوس) و همچنیــنSSR typing (چهار لوکوس) به منظور تعیین تیپ ژنتیکی این سویه‌ها استفاده شد.

مواد و روش‌ها

سویه های باکتری و استخراج کروموزوم باکتری

ســویه‌های MAP III & V و MAP 316F از آرشــیو میکروبی بخش تحقیــق و تولیــد توبرکولین و مالئین مؤسســه رازی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. هریک از این سویه‌ها بر روی دو لوله کشت یونیورسال حاوی محیط کشــت Herold's egg-yolk medium به همراه مایکوباکتین J (۲۶) تجدید کشــت شدند و ۱۲-۸ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تا زمان مشــاهده پرگنه‌ها، باقی ماندند. اطمینان از رشد مایکوباکتریایی از طریق تهیه لام میکروسکوپی از لوله‌های کشت و مشاهده باکتری‌های اسید فســت انجام پذیرفت. برای استخراج ژنوم باکتری از روش ساده جوشانیدن اســتفاده شــد و ماده ژنتیکی به‌دست آمده به‌صورت مســتقیم برای تمام آزمایش‌های ژنومی استفاده گردید (۳۸).

آزمایش‌های ژنومی

در مجموع شــش آزمایش مستقل در سه مرحله تعیین هویت، تعیین تیپ و ژنوتایپینگ ســویه‌ها انجام گردید که همه آن‌ها بر اســاس سیستم PCR اجرا گردیدند. در مرحله نخســت بــه منظور تعیین هویت، دو مارکر ژنتیکــی هــم ارز IS900 و F57 که در بین اعضای جنــس مایکوباکتریوم تنها در ژنوم باکتری‌های MAP یافت می‌شــوند، مورد استفاده قرار گرفتند.

پروتکل پیشنهادی داهمن در مورد PCR-IS900 با تغییرات اندک (۳۹) و در مورد PCR-F57 از روش شانبروکر (۴۰) همراه با اصلاحات کلی و از جمله یک زوج پرایمر جدید استفاده گردید. در مرحله دوم به منظور تعیین تیپ ژنتیکی باکتری‌ها (تیپ گوسفندی و یا گاوی) از دو استراتژی استفاده شد. این استراتژی‌ها شامل پروتکل کالینز و پروتکل پیشنهادی کاستلانوس بودکه همراه با اصلاحات اجرا شدند. در مورد پروتکل کاستلانوس در مورد هر یک از دو ژن gyrA و gyrB، چهار زوج پرایمر جدید طراحی شد تا امکان تکثیر کامل طول هر ژن همراه با بخشی از قسمت‌های جانبی در دو سمت آن فراهم گردد. در مرحله سوم برای تعیین ژنوتیپ سویه‌ها از دو روش تیپالت‌MLVA- (۲۱) و آمونسین‌SSR- (۳۲) استفاده شد. در روش MLVA از پروتکل پیشنهادی تیپالت استفاده شد. در ارتباط با لوکوس‌های ۲۹۲، X3، ۲۵، ۳۷، ۳ و ۷ از پرایمرهای معرفی شده تیپالت و در مورد دو لوکوس ۱۰ و ۳۲ به جهت ملاحظات تکنیکی از دو زوج پرایمر جدید استفاده شد. در روش SSR typing بر مبنای پروتکل پیشنهادی آمونسین چهار لوکوس SSR8، SSR2، SSR1 و SSR9 با استناد بر بالاتر بودن قدرت تفریق ژنتیکی آن‌ها در گزارشات منتشر شده پیشین مورد استفاده قرار گرفتند و برای هرکدام از آن‌ها یک زوج پرایمر جدید طراحی گردید.

طراحی پرایمرهای جدید با استفاده از برنامه Primer ۳ (۴۱, ۴۲) صورت پذیرفت (جدول ۱). برای این منظور حدود دو کیلو باز از ژنوم MAP K10 در حریم هریک از لوکوس‌های مورد نظر در هر دو پهلوی آن به شکلی انتخاب گردید که لوکوس مورد نظر از نظر موقعیت تقریبا در میانه قرار گرفته باشد.

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 ۱۲ میکرولیتر و متشکل از شش میکرولیتر PCR master mix، یک میکرولیتر از هر پرایمر ۰/۴۸، میکرولیتر DMSO، سه میکرولیتر از ماده ژنتیکی و ۰/۵۲ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر بود. به عنوان کنترل منفی از آب دوبار تقطیر استفاده شد. از ژل ۱/۲ درصد آگاروز (Invitrogen®, USA) پیش رنگ شده با Red Safe® برای آشکارسازی محصولات واکنش استفاده شد. ژل‌ها در میدان الکتریکی به قدرت دو ولت بر سانتیمتر به مدت دو ساعت ران شده و در دستگاه ژل داک (BioRad®,USA) عکس‌برداری شدند. تعیین اندازه تقریبی محصولات تکثیر به کمک مارکر استاندارد DNA ساخت مؤسسه رازی (۴۳) صورت پذیرفت.

برای انجام واکنش‌های PCR تا حد امکان از پروتکل‌های مشترک و در مجموع از چهار پروتکل استفاده گردید به گونه‌ای که برای آزمایش‌های IS۹۰۰، F۵۷ و Collins از یک پروتکل، برای آزمایشات gyrA و gyrB از یک پروتکل و همچنین در مورد MLVA typing و SSR typing هریک از یک پروتکل استفاده شد (جدول ۱). بر حسب مورد و ضرورت تکنیکی، پرایمرهای جدید در مورد همه و یا تعدادی از لوکوس‌های ژنتیکی هدف در هر آزمایش طراحی و مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین توالی نوکلئوتیدها و اندازه محصولات PCR

به منظور تکمیل یافته‌های ژل الکتروفورز و تعیین دقیق اندازه محصولات تکثیر، محصولات PCR در مورد آزمایش‌های MLVA (هشت لوکوس) و SSR (چهار لوکوس)، gyrA (چهار لوکوس)، gyrB (چهار لوکوس) هر دو سویه تعیین توالی گردیدند. 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 K10 و MAP4 و همچنین سویه *Mycobacterium avium* subspecies *avium* ۱۰۴ مقایسه شدند. از نرم افزار Tandem Repeats Finder Version ۴,۰۷b به منظور تعیین دقیق ساختمان و تعداد واحدهای تکرار شونده در هر لوکوس استفاده شد.

نتایج

آزمایش‌های PCR-IS۹۰۰ و PCR-F۵۷

هر دو سویه تحت بررسی در آزمایش‌های PCR-IS۹۰۰ و PCR-F۵۷ محصولاتی به ترتیب به اندازه‌ی ۵۶۰ جفت باز و ۷۰۴ جفت باز تولید نمودند و بدین ترتیب هویت آن‌ها به عنوان MAP تائید شد.

آزمایش Collins

در آزمایش PCR-Collins هر دو سویه قطعه‌ای به طول ۳۱۰ جفت باز مشاهده و شناسایی گردید و بدین ترتیب تیپ هر دو سویه تحت آزمون به عنوان type ۲ (گاوی) مورد تائید قرار گرفت.

آزمایش SNP-gyrA & SNP-gyrB

با انجام موفقیت آمیز چهار واکنش PCR در مورد هر ژن جمعا هشت محصول PCR در مورد هر سویه بدست آمد و توالی نوکلئوتیدی آن‌ها تعیین گردید. در نتیجه چیدمان توالی‌های بدست آمده توالی کامل هر ژن در هر سویه مشخص شد. بدین ترتیب نوکلئوتیدهای ۸۶۸، ۱۶۵۳، ۱۸۲۲ و ۱۹۸۶ در ژن gyrA و ۲۶۴، ۱۰۸، ۱۶۲۶، ۱۳۵۳ و ۴۹۴ در ژن gyrB متناسب با نقاط هم ارز در ژنوم سویه MAP **K10** تعیین گردیدند (جدول ۳). با توجه به همخوانی میان این نوکلوتیدها در هر دو سویه تحت بررسی و سویه گاوی MAP K10 تیپ هر دو سویه نیز گاوی تعیین گردید (جدول ۳).

مشاهدات آزمایش

MLVA typing

اندازه قطعات مربوط به لوکوس های هشت گانه VNTR292 (300 bp), X3 (۲۹۸ bp)، MIRU-VNTR ۲۵ (۳۵۰ bp)، MIRU-VNTR ۴۷ (۲۱۶ bp)، MIRU-VNTR ۳ (۲۰۸ bp)، MIRU-VNTR ۷ (۲۰۳ bp)، MIRU-VNTR ۱۰ (۸۰۳ bp) and MIRU-VNTR ۳۲ (۶۴۹ bp) بر اساس یافته‌های ژل الکتروفورز و همچنین تعین توالی شناسایی و مشخص گردید. استفاده از نرم افزار Tandem Repeats Finder در جستجو به دنبال واحدهای تکراری در هر لوکوس نشان داد که در لوکوس‌های VNTR۲۹۲ ،X۳ ،MIRU-VNTR۴۷ ،۲۵ ،MIRU-VNTR ۳ ،MIRU-VNTR ۷ ،MIRU-VNTR ۱۰ و MIRU-VNTR ۳۲ به ترتیب تعداد سه، دو، سه، سه، دو، دو، دو و هشت کپی از واحدهای تکرار شونده در ژنوم هر دو سویه وجود دارد. جستجو در درگاه بین‌المللی ژنوتایپینگ MLVA مربوط به MAP مستقر در فرانسه هویت این تیپ ژنتیکی را INMV۲ تعیین نمود.

مشاهدات آزمایش SSR typing

نتایج حاصل از بررسی رشته‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده در جریان تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Finder Tandem Repeats نشان داد که در ژنوم سویه MAP III & V و MAP 31F اندازه قطعات تکثیر شده مرتبط با لوکوس SSR8 ، SSR1،SSR2 و SSR9 به ترتیب برابر ۷۷۰، ۸۰۰، ۷۸۱ و ۵۸۱ زوج باز می‌باشد. با در نظر گرفتن اینکه واحد تکرار شونده در هر دو لوکوس SSR1 و SSR2، یک نوکلئوتید انفرادی G ، در لوکوس SSR8 سه نوکلئوتید TGG و در لوکوس SSR9 سه نوکلئوتید GCA می‌باشد، تعداد کپی‌های واحد تکرارشونده در لوکوس SSR1 برابر با ۱۹، در لوکوس SSR2 برابر با ۱۰، در لوکوس SSR8 برابر پنج و در لوکوس SSR9 برابر با پنج عدد در ژنوم این سویه‌ها مشخص گردید.

بحث

نگهداری طولانی مدت دو سویه MAP 316F و MAP III & V در کنار سویه D4 *Mycobacterium avium* subspecies *avium* در آرشیو میکروبی مؤسسه رازی که نخستین بار در دهه سی شمسی از موسسه Weybridge به ایران انتقال داده شدند، نگرانی‌هایی را در زمینه احتمال آلودگی اتفاقی تقاطعی (cross-contamination) آن‌ها بوجود آورده بود. با اجرای دو آزمایش PCR-IS900 و PCR-F57 که به‌عنوان دو مارکر ژنتیکی اختصاصی هم ارز اما مستقل MAP را هدف قرار می‌دهند، خلوص سویه‌های مورد بررسی تایید گردید.

اجرای استراتژی دوگانه PCR-Collins و SNP-gyrA & SNP-gyrB در این پروژه به درستی تیپ گاوی هر دو سویه MAP 316F و MAP III & V را نشان داد که با آنچه از پیشینه این دو سویه منتشر شده بود، در سازگاری می‌باشد. نویسندگان معتقدند تعیین تیپ پاتوژن در مطالعات اپیدمیولوژی پاراتوبرکولوزیس در ایران باید مورد توجه محققین قرار گیرد.

مناقشه پایدار بر سر اهمیت MAP به عنوان یک پاتوژن قادر به ایجاد بیماری در انسان سبب گردیده است که در صنایع و واحدهای فرآوری لبنی وجود این باکتری به عنوان یک مؤلفه تهدیدکننده سلامتی مصرف‌کنندگان در نظر گرفته نشود. این در حالی است که وجود این باکتری در انواع محصولات لبنی پاستوریزه اعم از شیر و فرآورده‌های آن نظیر پنیر و پودر شیر خشک (۴۴-۴۶) در نقاط مختلف جهان گزارش شده و دست‌کم در مصرف‌کنندگان دچار مشکلات سیستم ایمنی می‌تواند یک تهدید برای سلامتی محسوب گردد (۴۷, ۴۸). بدین ترتیب با در نظر گرفتن فقدان منابع کافی مالی برای اجرای برنامه‌های تست و کشتار، واکسیناسیون می‌تواند به عنوان یک راهکار اقتصادی در کنترل گسترش بیماری در گله‌های نشخوارکنندگان کوچک ایران مورد توجه قرار گیرد (۴۹). هر دو سویه MAP 316F و MAP III & V، بصورت گسترده در انگلستان به عنوان سویه‌های واکسینال در آزمایشات کلینیکی مورد استفاده قرار گرفته اند و سویه MAP 316F در حال حاضر معروف‌ترین سویه شناخته شده بین‌المللی در تهیه واکسن تجارتی پاراتوبرکولوزیس (®Gudair®, Silirum®, Neoparasec) شناخته می‌شود. انتظار می‌رود اجرای احتمالی برنامه واکسیناسیون علیه پاراتوبرکولوزیس در ایران پس از اجرای مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی بر روی جدایه‌های پاتوژن در ایران و همچنین مقایسه آن‌ها با سویه یا سویه‌های مورد استفاده در واکسن انتخابی صورت پذیرد (۵۰, ۵۱). در حال حاضر حداقل دو تحت سویه (sub-strain/daughter strain) از سویه معروف MAP 316F شناخته شده است که شامل نمونه موجود در مؤسسه Weybridge انگلستان و نمونه موجود در مؤسسه Merial فرانسه می باشد. اجرای پروتکل MIRU-VNTR تیپ ژنتیکی نمونه انگلیسی را INMV۱۷ (۳۱۳۳۲۲۲۸) و تیپ نمونه فرانسوی را INMV۲ (۳۲۳۳۲۲۲۸) تعیین نموده است. این دو سویه در تعداد واحدهای تکرار شونده ژنوم خود در لوکوس X۳ اختلاف دارند به طوریکه در این لوکوس در تحت سویه انگلیسی فقط یک کپی و در تحت سویه فرانسوی دو کپی از واحد تکرار شونده مشاهده می‌شود. تحت سویه مورد بررسی در این تحقیق که در سال‌های اخیر از مؤسسه اتلیک ترکیه تهیه شده و به مؤسسه رازی انتقال یافته است مشابه با نمونه فرانسوی دارای تیپ ژنتیکی INMV2 می باشد. توضیح این مشابهت می‌تواند تصور وجود یک تامین‌کننده فرانسوی برای تحت سویه موجود در مؤسسه اتلیک و یا وجود یک سویه اجدادی مشترک بین تحت سویه فرانسوی و ترک باشد. از آنجایی که اطلاعی از ویژگی‌های ژنتیکی تحت سویه ترک منتشر نگردیده است، نمی توان این درستی این فرضیات را بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

تامین مالی و لجستیکی این تحقیق بطور کامل توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و از طریق یک فقره پروژه تحقیقاتی به شماره ۲-۱۸-۹۴۱۰۶ تامین گردیده است. مریم مهره کش حقیقت دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته باکتری شناسی پزشکی مؤسسه رازی است و بخشی از مطالب منتشر شده در این مقاله ناظر بر یافته‌های تحقیقاتی پایان نامه مشارالیه می باشد. نادر مصوری راهنمایی پروژه کارشناسی ارشد مریم حقیقت را به عهده داشته است. کیوان تدین ایده تحقیق و استراتژی عملیات آزمایشگاهی مورد استفاده در این مطالعه را برنامه‌ریزی نموده، تحلیل و پردازش نتایج و همچنین نگارش متن مقاله را انجام داده است. روح اله کشاورز عملیات آزمایشگاهی کار بر روی باکتری زنده، بازیافت سویه های واکسینال، تجدید کشت و استخراج ماده ژنتیکی مورد نیاز تحقیق را مدیریت و اجرا نموده است.

میزان مسئولیت و مشارکت نادر مصوری و کیوان تدین در تهیه و تدوین این مقاله یکسان و برابر می‌باشد.

نویسندگان مایلند یاد و خاطره دکتر فتح اله انتصار و دکتر سید هادی هدایتی و نیز دکتر سید مرتضی صدری اساتید پیشکسوت بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین مؤسسه رازی را گرامی دارند.

منابع مورد استفاده

1. Chiodini RJ, Chamberlin WM, and Pfaller S, What is *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis? Appl Environ Microbiol 2011; 77: 1923-1924; author reply 1923-1924.

2. Galiero A, Fratini F, Mataragka A, Turchi B, Nuvoloni R, Ikonomopoulos J, and Cerri D, Detection of *mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in cheeses from small ruminants in tuscany. *Int J Food Microbiol* 2016; 217: 195-199.

3. Windsor PA, Paratuberculosis in sheep and goats. Vet Microbiol

2015; 181: 161-169.
4. Momotani E, Romona NM, Yoshihara K, Momotani Y, Hori M, Ozaki H, Eda S, and Ikegami M, Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 148: 55-68.
5. Wolf R, Barkema HW, De Buck J, and Orsel K, Sampling location, herd size, and season influence *mycobacterium avium* ssp. Paratuberculosis environmental culture results. *J Dairy Sci* 2015; 98: 275-287.
6. Wolf R, Barkema HW, De Buck J, Slomp M, Flaig J, Haupstein D, Pickel C, and Orsel K, High herd-level prevalence of *mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in western canadian dairy farms, based on environmental sampling. *J Dairy Sci* 2014; 97: 6250-6259.
7. Nagel-Alne GE, Asheim LJ, Hardaker JB, Solverod L, Lindheim D, and Valle PS, The norwegian healthier goats programme--a financial cost-benefit analysis. *Prev Vet Med* 2014; 114: 96-105.
8. Wynne JW, Beller C, Boyd V, Francis B, Gwozdz J, Carajias M, Heine HG, Wagner J, Kirkwood CD, and Michalski WP, Snp genotyping of animal and human derived isolates of *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. *Vet Microbiol* 2014; 172: 479-485.
9. Waddell LA, Rajic A, Stark KD, and Mc ES, The zoonotic potential of *mycobacterium avium* ssp. Paratuberculosis: A systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol Infect* 2015; 143: 3135-3157.
10. Sechi LA and Dow CT, *Mycobacterium avium* ss. Paratuberculosis zoonosis - the hundred year war - beyond crohn's disease. Front Immunol 2015; 6: 96.
11. Ronai Z, Csivincsik A, Gyuranecz M, Kreizinger Z, Dan A, and Janosi S, Molecular analysis and miru-vntr typing of *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis strains from various sources. *J Appl Microbiol* 2015; 118: 275-283.
12. Baharsefat M, Amjadi A, Ahourai P, Yamini B, Entessar F, and Hedayati H, Paratuberculosis in goats and sheep in iran. Epidemiological, clinical, pathological features and laboratory diagnosis. *Archive of Razi Institute* 1972; 24: 49-61.
13. Talatchian M, First report of johne's disease in iran. Bulletin-Office international des epizooties 1965; 64: 779.
14. Fathi R, Sarkarati F, Eslami M, Rezavand B, and Nourizadeh A, Detection of *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in cow milk using culture and pcr methods. *Archives of Razi* Institute 2011; 66: 95-100.
15. Seyyedin M, Tadjbakhsh H, and Salehi T, Identification of *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in fecal samples of holstein-friesian cattle using molecular and cultivation methods. *Journal of Veterinary Research* 2010; 65: 135-140, 171.
16. Ansari-Lari M, Haghkhah M, Bahramy A, and Novin Baheran AM, Risk factors for *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in fars province (southern iran) dairy herds. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41: 553-557.
17. Shahmoradi AH, Arefpajohi R, Tadayon K, and Mosavari N, Paratuberculosis in holstein-friesian cattle farms in central iran. *Trop Anim Health Pro*d 2008; 40: 169-173.
18. Ghaem Maghami S, Khosravi M, Ahmadi M, Denikoo A, Haghdin M, and Koochakzadeh A, Study of the prevalence rate of john's disease in markazi province and evaluation of absorbed elisa for adoption as a diagnostic method. *Scientific-Research Iranian Veterinary Journal* 2012; 8: 54-59.
19. Sadati R, Jafarpour M, Mirinargesi M, Nazemi A, and Barghi A, Prevalence of *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in dairy cattle bred in northern iran by nested-pcr. 2012;
20. Haji KMR, Ghorbanpour M, and Soleymani M, The prevalence *mycobacterium paratuberculosis* infection in ileocecal valve of cattle slaughtered in ahvaz abattoir, southern. *Iranian Journal of Veterinary Research* (IJVR) 2006;
21. Thibault VC, Grayon M, Boschiroli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, Gutierrez MC, Supply P, and Biet F, New variable-number tandem-repeat markers for typing *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis and m. Avium strains: Comparison with is900 and is1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2404-2410.
22. Dimareli-Malli Z, Mazaraki K, Stevenson K, Tsakos P, Zdragas A, Giantzi V, Petridou E, Heron I, and Vafeas G, Culture phenotypes and molecular characterization of *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis isolates from small ruminants. *Res Vet Sci* 2013; 95: 49-53.
23. Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, and Kapur V, The complete genome sequence of *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 12344-12349.
24. Wolf R, Orsel K, De Buck J, and Barkema HW, Calves shedding *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis are common on infected dairy farms. *Vet Res* 2015; 46: 71.
25. Sting R, Hrubenja M, Mandl J, Seemann G, Salditt A, and Waibel S, Detection of *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in faeces using different procedures of pre-treatment for real-time pcr in comparison to culture. *Vet J* 2014; 199: 138-142.
26. Mobius P, Hotzel H, Rassbach A, and Kohler H, Comparison of 13 single-round and nested pcr assays targeting is900, ismav2, f57 and locus 255 for detection of *mycobacterium avium* subsp.

Paratuberculosis. *Vet Microbiol* 2008; 126: 324-333.
27. Singh AV, Chauhan DS, Singh A, Singh PK, Sohal JS, and Singh SV, Application of is1311 locus 2 pcr-rea assay for the specific detection of 'bison type' *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates of indian origin. *Indian J Med* Res 2015; 141: 55-61.
28. Castellanos E, Romero B, Rodriguez S, De Juan L, Bezos J, Mateos A, Dominguez L, and Aranaz A, Molecular characterization of *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis types ii and iii isolates by a combination of miru-vntr loci. *Vet Microbiol* 2010; 144: 118-126.
29. Collins DM, Gabric DM, and De Lisle GW, Identification of two groups of *mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1591-1596.
30. Sohal JS, Singh SV, Singh AV, and Singh PK, Strain diversity within *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis--a review. *Indian J Exp Biol* 2010; 48: 7-16.
31. Collins DM, De Zoete M, and Cavaignac SM, *mycobacterium avium*subsp. Paratuberculosis strains from cattle and sheep can be distinguished by a pcr test based on a novel DNA sequence difference. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4760-4762.
32. Amonsin A, Li LL, Zhang Q, Bannantine JP, Motiwala AS, Sreevatsan S, and Kapur V, Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among*mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis strains. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1694-1702.
33. Verdugo C, Pleydell E, Price-Carter M, Prattley D, Collins D, De Lisle G, Vogue H, Wilson P, and Heuer C, Molecular epidemiology of *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis isolated from sheep, cattle and deer on new zealand pastoral farms. *Prev Vet Med* 2014; 117: 436-446.
34. Oakey J, Gavey L, Singh SV, Platell J, and Waltisbuhl D, Variable-number tandem repeats genotyping used to aid and inform management strategies for a bovine johne's disease incursion in tropical and subtropical australia. *J Vet Diagn Invest* 2014; 26: 651-657.
35. Fernandez-Silva JA, Abdulmawjood A, Akineden O, and Bulte M, Genotypes of *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis from south american countries determined by two methods based on genomic repetitive sequences. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44: 1123-1126.
36. Stevenson K, Alvarez J, Bakker D, Biet F, De Juan L, Denham S, Dimareli Z, Dohmann K, Gerlach GF, Heron I, Kopecna M, May L, Pavlik I, Sharp JM, Thibault VC, Willemsen P, Zadoks RN, and Greig A, Occurrence of *mycobacterium avium*subspecies paratuberculosis across host species and european countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. BMC Microbiol 2009; 9: 212.
37. Castellanos E, Aranaz A, Romero B, De Juan L, Alvarez J, Bezos J, Rodriguez S, Stevenson K, Mateos A, and Dominguez L, Polymorphisms in gyra and gyrb genes among mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis type i, ii, and iii isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3439-3442.
38. Karimnasab N, Tadayon K, Khaki P, Moradi Bidhendi S, Ghaderi R, Sekhavati M, and Asadi F, An optimized affordable DNA-extraction method from salmonella enterica enteritidis for pcr experiments. *Archives of Razi* 2013; 68: 105-109.
39. Dohmann K, Strommenger B, Stevenson K, De Juan L, Stratmann J, Kapur V, Bull TJ, and Gerlach GF, Characterization of genetic differences between *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis type i and type ii isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5215-5223.
40. Schonenbrucher H, Abdulmawjood A, Failing K, and Bulte M, New triplex real-time pcr assay for detection of*mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 2751-2758.
41. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, and Madden TL, Primer-blast: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC bioinformatics 2012; 13: 1.
42. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, and Leunissen JA, Primer3plus, an enhanced web interface to primer3. Nucleic Acids Res 2007; 35: W71-W74.
43. Sekhavati M, Tadayon K, Ghaderi R, Banihashemi R, Jabbari AR, Shokri G, and Karimnasab N, "In-house" production of DNA size marker from a vaccinal bacillus anthracis strain. *Iranian journal of microbiology* 2015; 7: 45.
44. Shin MK, Shin SW, Jung M, Park H, Park HE, and Yoo HS, Host gene expression for *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis infection in human thp-1 macrophages. *Pathog Dis* 2015; 73:
45. Paolicchi F, Cirone K, Morsella C, and Gioffre A, First isolation of *mycobacterium avium*subsp paratuberculosis from commercial pasteurized milk in argentina. *Braz J Microbiol* 2012; 43: 1034-1037.
46. Eltholth MM, Marsh VR, Van Winden S, and Guitian FJ, Contamination of food products with*mycobacterium avium* paratuberculosis: A systematic review. *J Appl Microbiol* 2009; 107: 1061-1071.
47. Monif GR, The hruska postulate of crohn's disease. Med Hypotheses 2015; 85: 878-881.

48. Mameli G, Madeddu G, Cossu D, Galleri G, Manetti R, Babudieri S, Mura MS, and Sechi LA, Immune response induced by epstein-barr virus and *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis peptides in current and past infectious mononucleosis: A risk for multiple sclerosis? *Eur J Neurol* 2015;

49. Groenendaal H, Zagmutt FJ, Patton EA, and Wells SJ, Cost-benefit analysis of vaccination against *mycobacterium avium* ssp. Paratuberculosis in dairy cattle, given its cross-reactivity with tuberculosis tests. *J Dairy Sci* 2015; 98: 6070-6084.

50. Singh SV, Singh PK, Kumar N, Gupta S, Chaubey KK, Singh B, Srivastav A, Yadav S, and Dhama K, Evaluation of goat based 'indigenous vaccine' against bovine johne's disease in endemically infected native cattle herds. *Indian J Exp Biol* 2015; 53: 16-24.

51. Singh SV, Singh PK, Singh AV, Sohal JS, Kumar N, Chaubey KK, Gupta S, Rawat KD, Kumar A, Bhatia AK, Srivastav AK, and Dhama K, 'Bio-load' and bio-type profiles of *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in the domestic livestock population endemic for johne's disease: A survey of 28 years (1985-2013) in india. Transbound Emerg Dis 2014; 61 Suppl 1: 43-55.

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

Locus/primer (alias)	Nucleotide sequence (۳ →'۵')	Reference (s)
IS۹۰۰f	TTC TTG AAG CGT GTT CGG GGC C	(۳۹)
IS۹۰۰r	GCG ATG ATC GCA GCG TCT TTG G	
F۵۷f	ACC GAA TGT TGT TGT CAC CG	This study
F۵۷r	GGA CAC CGA AGC ACA CTC TC	
DMC۵۲۹-	TTG ACA ACG TCA TTG AGA ATC C	(۳۱)
DMC۵۳۱-	TCT TAT CGG ACT TCT TCT GGC	
DMC۵۳۳-	CGG ATT GAC CTG CGT TTC AC	
GYRB-۱f	CGC GGT TAG CTG GGT AGA AA	Tadayon K, unpublished data
GYRB-۱r	TCA GGC CCT TGT TGA GGA AC	
GYRB-۲f	GGC TAC GAG TGG TCG CAG TA	
GYRB-۲r	CTC ACC TTG ACC GAG ATC ACC	
GYRB-۳f	GTT CGC CAA CAC CAT CAA CA	
GYRB-۳r	GTG ATG ATC GCC TGC ACT TC	
GYRB-۴f	CGC GCA AGT CGG AAT TGT AT	
GYRB-۴r	CAT TGC GGG TGA TGA AGC TG	
GYRA-۱f	CGA TGA GCG TAA TCG TCG GC	Tadayon K, Unpublished data
GYRA-۱r	CCT CTT CCA CCT CAA CGA CTC	
GYRA-۲f	ATC GCC GAC GCC TAC AAG	
GYRA-۲r	CGA TGT CGA CGG TTT CCG A	
GYRA-۳f	ACG AGG TCA TCG CCC TGA T	
GYRA-۳r	CTG GGT GGT GAA GAA CAG GA	
GYRA-۴f	ATC CTG TTC TTC ACC ACC CAG	
GYRA-۴r	TCG CCC TCA CCC AGA TTC AT	
MAP۲۹۲-f (MIRU۲۳ / MIRU۲)	CTT GAG CAG CTC GTA AAG CGT	(۲۱)
MAP۲۹۲-r	GCT GTA TGA GGA AGT CTA TTC ATG G	
MAP-X۳ (VNTR۱۶۵۸ / MIRU۳)	AAC GAG AGG AAG AAC TAA GCC G	
MAP-X۳	TTA CGG AGC AGG AAG GCC AGC GGG	
MAP-MIRU۲۵f	GTC AAG GGA TCG GCG AGG	

ادامه جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

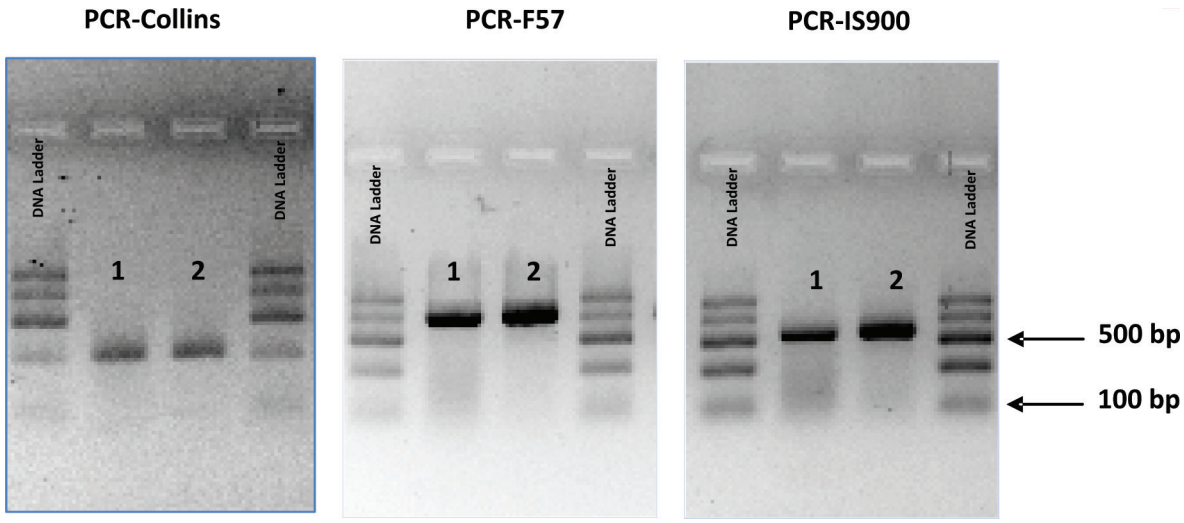
Locus/primer (alias)	Nucleotide sequence (۵'→۳')	Reference (s)
MAP-MIRU۲۵r	TGG ACT TGA GCA CGG TCA T	(۲۱)
MAP-MIRU۴۷f	CGT TGC GAT TTC TGC GTA GC	
MAP-MIRU۴۷r	GGT GAT GGT CGT GGT CAT CC	
MAP-VNTR۳f	CAT ATC TGG CAT GGC TCC AG	
MAP-VNTR۳r	ATC GTG TTG ACC CCA AAG AAA T	
MAP-VNTR۷f	GAC AAC GAA ACC TAC CTC GTC	
MAP-VNTR۷r	GTG AGC TGG CGG CCT AAC	
MAP-VNTR۱۰f	CTC AAA GTC AGT GTG CCC GA	
MAP-VNTR۱۰r	TCC TCT ACG CGG TCA TCT AC	
MAP-VNTR۳۲f	GGA ACA CCA TGC CGA AGT TG	
MAP-VNTR۳۲r	GCT AAG TTC CGG TTT GCC GA	
SSR۱f	ACC TTC ACC CCG AGT ACA AC	This study
SSR۱r	CGG CCT CAT AAC CGT TGC T	
SSR۲f	CCT CCA GCC CGG AAT CGT C	
SSR۲r	CTG TTC GCC GCC CAG C	
SSR۸f	CTG GAA GGA CCT GGG CCT	
SSR۸r	CCG CAC ATA CAA GAA GC	
SSR۹f	CCG AGT TCC TCG ACC CAG T	
SSR۹r	GAT GGC GCC GAA CAC GAT T	

جدول۲- جزئیات اجزاء واکنش ها و چرخه های حرارتی پروتکل های PCR مورد استفاده در این تحقیق.

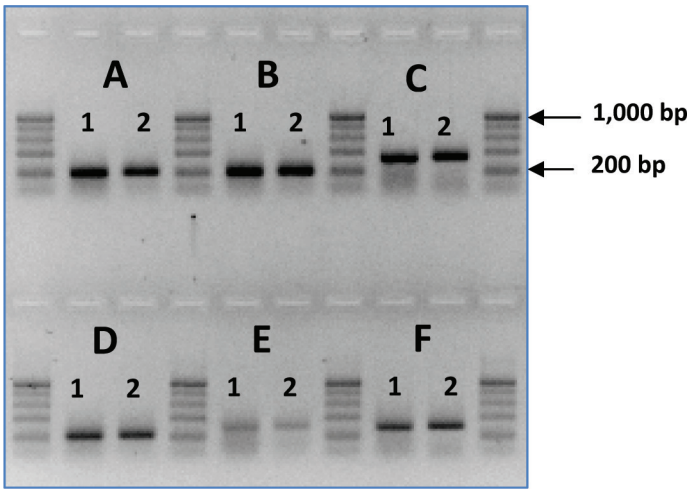
PCR protocol	PCR master mix (µl)	Primer forward (pmol/µl ۵)	Primer reverse (pmol/µl ۵)	DNA template (µl)	DMSO (µl)	PCR water (µl)	Total volume (µl)
Collins ,F۵۷ ,IS۹۰۰	۷،۵	۰،۵	۰،۵	۴	۰،۶	۱،۹	۱۵
۳۲ ,۱۰ ,۷ ,۳ ,۴۷ ,۲۵ ,X۳ ,۲۹۲	۷،۵	۱	۱	۴	۰،۶	۰،۹	۱۵
(gyr (A,B	۷،۵	۰،۲۵	۰،۲۵	۴	۰،۶	۲،۴	۱۵
SSR۹ ,SSR۸ ,SSR۲ ,SSR۱	۷،۵	۰،۲۵	۰،۲۵	۵	۰،۶	۱،۴	۱۵

جدول۳- ساختار نوکلئوتیدهای پلی مرفیک (SNP) دو ژن gyrA و gyrB در ژنوم تیپ های یک (گوسفندی)، دو (گاوی) وسه (حد واسط) PAM. نوکلئوتیهای هم ارز در ژنوم سویه MAP K10 به عنوان شاخص مشخص گردیده است.

Gene	Base position	MAP K۱۰	MAP III & V, MAP ۳۱۶F	Type I	Type I I	Type III
gyrA	۸۶۸	G	G	A	G	G
	۱۶۵۳	C	C	A	A	A
	۱۸۲۲	C	C	A	C	A
	۱۹۸۶	C	C	C	C	T
gyrB	۱۰۸	T	T	C	T	C
	۲۶۴	G	G	T	G	T
	۴۹۴	C	C	T	C	T
	۱۳۵۳	T	T	C	T	C
	۱۶۲۶	C	C	C	C	T



شکل ۱- PCR آمپلی فیکاسیون لوکوس‌های F57 و IS900 و Colins در مورد سویه MAP III&V (ستون شماره ۱) و MAP 316F (ستون شماره ۲). ژل الکتروفورز مورد استفاده از نمونه (Invitrogen® Multi-purpose Agarose) و غلظت آن معادل ۲,۱ درصد می باشد. DNA size marker بکار رفته دارای ۵ باند الکتروفورز در محدوده ۱۰۰ الی ۹۰۰ pb می باشد.



شکل ۲- PCR آمپلی فیکاسیون لوکوس‌های VNTR3 (A), VNTR7 (B), MIRU-VNTR25 (C), MIRU-VNTR47 (D), MIRU292 (E) and X3 (F) در مورد سویه MAP III&V (ستون شماره ۱) و MAP 316F (ستون شماره ۲). ژل الکتروفورز مورد استفاده از نمونه (Invitrogen® Multi-purpose Agarose) و غلظت آن معادل ۲,۱ درصد می باشد. DNA size marker بکار رفته دارای ۵ باند الکتروفورز در محدوده ۲۰۰ الی ۱۰۰۰ pb می باشد.