



Original Article

Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using PCR-REA strategy in Iran

Faraj Tabrizi, E¹, Zolfaghari, MR^{1*}, Mosavari, N², Nazari, R¹, Tadayon, K^{2*}

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

2- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bovine Tuberculosis Laboratory, Tuberculin and Mallein Research & Production Department, Karaj, Iran.

Received: 2024-04-25

Accepted: 2024-07-09

Revised: 2024-07-09

Published: 2025-03-21

*Email: Mreza.zolfaghary@gmail.com, mmb093@gmail.com

Abstract

The economically-challenging paratuberculosis caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map), is a contagious chronic disease that essentially affects ruminants. It bears characteristic clinical symptoms including incurable diarrhea, mesenteric lymphadenitis, proliferative enteropathy and progressive emaciation. Considering the evolutionary important variability of Map genome, characterization of its strains is pivotal in diagnosis and epidemiological investigation, and therefore establishing prevention and disease control strategies. The present work was therefore designed to extend our currently limited knowledge on population structure of Map in Iran. A total of 30 recently-archived Map isolates obtained from bovine, ovine and caprine hosts representing a diverse geographical origin were revived and sub-cultured to obtain the required genomic material. They were subsequently analyzed for the presence of IS900, the Map specific sequence, as well as IS1311 using PCR protocols. They were further typed using IS900 and IS1311 polymerase chain reaction-restriction endonuclease analysis (PCR-REA) using Alw I and Hinf I enzymes. All the DNA samples were found positive for the two genetic markers of IS900 and IS1311. On top of this both IS900 and IS1311 PCR-REA analyses jointly demonstrated that showed that all Map strains under examination belonged to the cattle type. Taking into account the diverse geography of ruminant exporting countries to Iran plus lacking reports of paratuberculosis in the indigenous ruminant breeds, the presence and circulation of the "cattle type" Map strains in the today's Iran looks odd and deserves more investigation as this can have important epidemiological implications in regard with the paratuberculosis control and prevention in Iran.

Keywords: Paratuberculosis, John's disease, cattle type, IS900, IS1311, PCR-REA, Iran



تایپینگ مولکولی جدایه‌های مایکوباکتریوم ایویوم زیر گونه پاراتوبرکلوزیس به روش PCR-REA در ایران

الیکا فرج تبریزی^۱، محمدرضا ذوالفقاری^{۱*}، نادر مصوری^۲، راضیه نظری^۱، کیوان تدین^{۲*}

۱- دپارتمان میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

۲- موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بخش تحقیق و تولید توبرکلوزیس و مالئین، کرج، ایران



تاریخ دریافت: ۱۴۰۳-۰۲-۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳-۰۴-۱۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳-۰۴-۱۹ تاریخ انتشار: ۱۴۰۴-۰۱-۰۱

*Email: Mreza.zolfaghary@gmail.com, mmb093@gmail.com

چکیده

پاراتوبرکلوزیس توسط *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* بیشتر در نشخوارکنندگان ایجاد می‌گردد. این بیماری با اسهال درمان‌ناپذیر و لاغری مفرط پیش‌رونده همراه می‌باشد. تغییرپذیری ژنوم این باکتری سبب می‌شود که شناسایی سویه‌های آن در زمینه تشخیص، اپیدمیولوژی و سازماندهی سیاست‌های پیشگیری و کنترل بیماری، نقش راهبردی داشته باشد. به منظور بهبود دانش موجود از ساختار جمعیت بومی این باکتری و در جستجوی جدایه‌های گوسفندی آن، در مجموع ۳۰ جدایه از آرشیو باکتری‌های مؤسسه رازی از میزبان‌های گاو، گوسفند و بز مناطق مختلف ایران، تجدیدکشت شدند تا ماده ژنتیکی مورد نیاز برای اجرای تحقیق فراهم گردد. وجود مارکرهای ژنتیکی *IS1311* و *IS900* با استفاده از پروتکل‌های وابسته به PCR بررسی و پس از آن با استفاده از آنزیم‌های اندونوکلاز *Hinf I* و *Alw I* و اعمال پروتکل PCR-REA *IS900 & IS1311* تیپ جدایه‌های مورد بررسی تعیین گردید. ژنوم همه جدایه‌های تحت آزمایش واجد مارکرهای *IS1311* و *IS900* بودند ضمن آنکه هر دو پروتکل بکار رفته PCR-REA *IS900 & IS1311* بصورت همخوان هویت همه ۳۰ جدایه تحت آزمون را تیپ گاوی این باکتری (cattle type) نشان دادند. با در نظر گرفتن تنوع جغرافیایی صادرکنندگان دام به ایران و فقدان گزارشات وجود بیماری در نژادهای بومی، فعالیت انحصاری سویه‌های تیپ گاوی در ایران امروز، عجیب بنظر می‌رسد و تحقیقات بیشتری را می‌طلبد زیرا یافته‌های این تحقیقات می‌تواند پیامدهای مهم اپیدمیولوژیک در ارتباط با پیشگیری و کنترل بیماری در ایران بدنبال داشته باشد.

کلمات کلیدی: پاراتوبرکلوزیس، بیماری یون، تیپ گاوی، PCR-REA، *IS1311*، *IS900*، ایران

اصیل خارجی (نژاد Sindhi و Jersey) را در نواحی جنوبی ایران (گاوداری شرکت نفت آبادان) گزارش نمود که در بولتن سازمان بهداشت جهان دام انعکاس داده شدند (۱۴). این گاوها پیشتر از انگلستان وارد شده بودند. طلاچیان در سال ۱۹۶۲ با کشت نمونه‌های آسیب‌شناسی یک رأس ماده گاو Jersey تلف شده از پاراتوبرکلوزیس متعلق به شرکت مذکور بر روی محیط‌های کشت Smith و Dubos و محیط‌های جامد غنی‌شده با عصاره الکی *Mycobacterium phlei* موفق به جداسازی *Map* گردید که هویت آن در مرکز آزمایشگاه مرکزی دامپزشکی ویبریچ انگلستان نیز به تأیید رسید. طلاچیان بر عدم مشاهده شخصی کشتارگاهی یا آزمایشگاهی بیماری و یا دریافت گزارشات وجود آن در هیچیک از گاوان نژادهای بومی ایران تا زمان تهیه گزارش خود تأکید می‌نماید (۱۴). در سال ۱۹۶۵ دوباره پاراتوبرکلوزیس در یک گاوداری نگهدارنده گاوان اصیل وارداتی در مجاورت تهران مشاهده گردید (۱۴). از طرف دیگر بهارصفت در سال ۱۹۷۲ وجود پاراتوبرکلوزیس را در گله بز نژاد نجدی و گوسفند نژاد آواسی موسسه دامپروری حیدرآباد کرج که از اسرائیل وارد شده بودند، گزارش و موفق به جداسازی عامل بیماری گردید (۱۵). واردات دام‌های آلوده بخصوص از انگلستان و اسرائیل مهم‌ترین فرضیه حال حاضر در زمینه پیشینه جمعیت *Map* در ایران در نظر گرفته شده است و تنها مطالعات تکمیلی آتی خواهند توانست خلاف آن را ثابت نمایند. بدون در نظر گرفتن اینکه در واقعیت جمعیت *Map* در ایران بومی و یا غیربومی می‌باشد مطالعه حاضر با تمرکز بر روش REA به منظور شناخت بهتر تیپ ژنتیکی تعدادی از جدایه‌های آرشیو شده اخیر *Map* در کشور از منظر تیپ ژنتیکی آنها به مورد اجرا گذاشته شده است.

روش کار

جدایه‌های باکتری و استخراج ماده ژنتیکی

تعداد ۳۰ جدایه از آرشیو *Map* موجود در موسسه رازی انتخاب گردیدند. این جدایه‌ها در سال‌های گذشته از گله‌های گاو، گوسفند و بز در استان‌های البرز، اصفهان، تهران، زنجان، فارس و قزوین جداسازی و با روش‌های متعارف ژنتیکی و از جمله *IS900*-RFLP analysis (۱۶) و MLVA analysis (۱۷) مورد بررسی قرار گرفته بودند (جدول ۱). علاوه بر جدایه‌های مذکور یک سویه آزمایشگاهی *Map* بنام RVSRII نیز انتخاب و هر کدام از آنها بر روی دو لوله کشت یونیورسال حاوی محیط کشت هرولدز با پایه زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با مایکوباکتین جی Herrold's egg yolk medium (HEYM) Mycobactin-j-supplemented تجدید کشت شدند. استخراج ماده ژنتیکی به روش جوشانیدن انجام گردید (۱۷).

آزمایش‌های *PCR-IS900* و *PCR-IS1311*

توالی پرایمرهای مورد استفاده بر اساس توصیه Marsh و Whittington (۱۲، ۱۸) در مورد *IS900* با انجام اصلاحات محدود که ضرورت آن اخیراً مورد توجه بیشتر قرار گرفته است (۱۹) و Shin در مورد *IS1311* (۲۰) با اعمال تغییرات اندک صورت پذیرفت بطوریکه از پرایمرهای: P90: ۵'-GTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-۳' و P91: ۵'-GAGGTCGATCGCCACGTGA-۳' در مورد *IS900* و همچنین

مقدمه

پاراتوبرکلوزیس توسط *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* ایجاد می‌گردد که می‌تواند پروتکل‌های متداول پاستوریزاسیون تجاری شیر و لبنیات را تحمل نماید (۱). این بیماری به صورت مشخص روده نشخوارکنندگان را درگیر و یک بیماری عفونی مزمن مسری غیر قابل درمان را ایجاد می‌نماید که از تمام جهان گزارش می‌گردد (۲). تاکنون در جمعیت جهانی *Map* دو گروه بزرگ ژنتیکی (lineage) در میان سویه‌های آن مورد شناسایی قرار گرفته‌اند: سویه‌های گاوی (Cattle strains) یا Type II و سویه‌های گوسفندی (Sheep strains). سویه‌های Type II خود در دو زیر گروه سویه‌های گاوی (Cattle strains or Type II) و سویه‌های گاومیش (Bison strains or B strains) تقسیم‌بندی می‌گردند با این توضیح که زیر گروه سویه‌های گاومیش به دو دسته کوچکتر سویه‌های گاومیش تیپ آمریکایی (USA Bison type) و سویه‌های گاومیش تیپ هندی (Indian Bison type) تفکیک می‌گردند. از طرف دیگر سویه‌های گوسفندی به دو زیر گروه Type I و Type II "Intermediate or III" دسته‌بندی شده‌اند (۳). تمایز میان این گروه‌های ژنتیکی با استفاده از راهکارهایی نظیر analysis (۴) و variable number tandem repeat analysis (۵) امکان‌پذیر گردیده است. بر اساس مطالعات تکاملی انجام پذیرفته *M. avium subsp. hominissuis (Mah)* به عنوان جد *Map* تعریف شده است (۶) و سویه‌های گوسفندی از نظر تکاملی در وضعیت حد واسط سویه‌های *Mah* و سویه‌های Type C قرار دارند (۳). عناصر متحرک ژنتیکی و از جمله آنها *IS900* نقش مهمی در ایجاد تغییر در کروموزوم و سازگاری باکتری با میزبان خود دارند. لوکوس *IS900* به صورت انحصاری فقط در ژنوم *Map* مشاهده می‌شود و در ژنوم دیگر اعضای *Mycobacterium avium complex* مشتمل بر *M. avium*، *M. mageritense*، *M. silvaticum* (subsp. *Mas*) و *M. goodii* دیده نمی‌شود. این لوکوس ژنتیکی یک Insertion Sequence به طول ۱۴۵۱ زوج باز (۷) و عضو خانواده *IS110* شناخته شده است که یک *transposase* به نام *p43* را کد می‌نماید (۸). از آنجایی که تعداد ۱۶ تا ۲۲ رونوشت از این عنصر ژنتیکی در هر ژنوم *Map* گزارش شده است لذا این لوکوس به عنوان یکی از بهترین نشانگرهای تشخیصی *Map* شناخته می‌شود. توالی ژنتیکی این لوکوس در ژنوم سویه‌های متعلق به گروه‌های گاوی و گوسفندی بسیار پایدار است (۹) و بدین ترتیب استفاده از *IS900*-RFLP امکان تفکیک میان این دو گروه از سویه‌ها را فراهم می‌نماید (۱۰). *IS1311* یک لوکوس ژنتیکی دیگر می‌باشد که در سویه‌های *Map* و *Maa* دیده می‌شود. این Insertion Sequence به طول ۱۳۱۷ زوج باز یک *transposase* مربوط به خانواده *IS256* را کد می‌نماید (۳). پنج نوکلئوتید در پنج موقعیت از طول *IS1311* شناخته شده‌اند که ترکیب آنها می‌تواند میان سویه‌های گوسفندی و گاوی *Map* تفکیک نماید (۱۱). در سال ۱۹۹۹ Marsh یک پروتکل بر اساس تکنیک Restriction Enzyme Analysis (REA) با تمرکز بر *IS1311* و استفاده از آنزیم *Hinf I* به منظور تفکیک میان سویه‌های گاوی و گوسفندی پیشنهاد نمود (۱۲) که هنوز هم به عنوان یک روش ساده و معتبر به کار گرفته می‌شود (۱۳). در ایران از سال ۱۹۵۷ به بعد شعبه اهواز مؤسسه رازی مواردی از وجود پاراتوبرکلوزیس در میان گاوان

(۲۹:۱) از آکریل‌آمید و بیس‌آکریل‌آمید استفاده گردید. برای بارگذاری ژل، ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR هضم شده به چاهک اختصاص یافته در ژل مغروق در تانک الکتروفورز، تخلیه گردید. جهت تعیین اندازه محصولات PCR هضم شده از سایز مارکر تجارتي ۵۰ bp plus، محصول شرکت سینا کلون، استفاده گردید. منبع تغذیه جهت اعمال یک میدان الکتریکی به قدرت ۲ v/cm به مدت ۵ ساعت بر روی ژل تنظیم گردید. ظاهرسازی محصولات هضمی بر روی ژل به کمک رنگ‌آمیزی نیترات نقره مقدور گردید و تصویر بدست آمده با استفاده از دوربین عکاسی دیجیتال ذخیره گردید. تعیین اندازه قطعات هضمی با استفاده از بندهای تفکیک شده در سایز مارکز تجارتي صورت پذیرفت.

نتایج

یافته‌های هر دو سیستم بکار رفته در این مطالعه در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. تجدید کشت، استخراج ماده ژنتیکی مناسب و تکثیر در مورد هر ۳۰ جدایه و سویه آزمایشگاهی همانطور که انتظار می‌رفت موفق بود. در *IS900*-PCR تولید یک قطعه به طول ۴۰۲ جفت باز و در *IS1311* تولید یک قطعه به طول ۶۰۸ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱). در هضم آنزیمی با آنزیم *Alw I* مورد استفاده در *IS900*-PCR-REA analysis همه جدایه‌ها و سویه آزمایشگاهی تحت آزمون، دو باند مورد انتظار واضح و غیر قابل اشتباه ۱۴۷ و ۲۶۶ جفت باز را تولید و بدین ترتیب هویت آن‌ها به عنوان *Map* تایید گردید. در *IS1311*-PCR-REA analysis نیز به همین ترتیب همه جدایه‌ها و سویه آزمایشگاهی تحت آزمون باندهای به طول ۶۰۸ جفت باز را تولید نمودند. الگوی به‌دست آمده پس از هضم با آنزیم *Hinf I* در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه یکسان و مشتمل بر چهار باند به طول‌های ۶۷، ۲۱۸، ۲۸۵ و ۳۲۳ جفت باز بود که نشان‌دهنده تعلق همه باکتری‌های تحت آزمایش به تیپ گاوی بود (شکل ۲).

بحث

شش دهه پس از انتشار نخستین موارد وقوع پاراتوبرکلوزیس در ایران، تعداد موارد وقوع بیماری در گله‌های گاو، گوسفند و بز بصورت فزاینده گزارش می‌گردد بطوریکه در حال حاضر این بیماری تقریباً در همه مناطق جغرافیایی ایران که نشخوارکنندگان اهلی پرورش داده می‌شوند، مشاهده می‌گردد (۲۲). پاراتوبرکلوزیس مشمول برنامه‌های کشوری کنترل و ریشه‌کنی بیماری‌های دامی نمی‌گردد و بدین ترتیب هزینه‌های کنترل بیماری و از جمله اجرای تشخیص زود هنگام و حذف دام آلوده، دامداران را از اعمال این روش‌ها باز می‌دارد. در جریان مطالعه حاضر بدون در نظر گرفتن نوع دام میزبان، همه ۳۰ جدایه مورد آزمایش توسط هر دو استراتژی مورد استفاده در سازگاری با الگوهای پیشتر شناخته شده ویژه سویه‌های تیپ گاوی منطبق نشان داده شدند. حضور و فعالیت انحصاری جدایه‌های *Map* در ذیل جمعیت سویه‌های گاوی این باکتری در ایران، پیش از این نیز مورد توجه قرار گرفته و گزارش گردیده است (۱۶، ۲۳-۲۵). بر خلاف *Mycobacterium bovis* عامل سل گاوی، تاکنون نشانه‌های از وجود و فعالیت *Map* در گله‌های نشخوارکنندگان بومی ایران پیش از هنگام ورود دام‌های نژاد اروپایی گزارش نگردیده

پرایمرهای M۵۶: ۵'-GCGTGAGKCTCTGTGGTGAA-۳' و M۱۱۹: ۵'-ATGACGACCGCTTGGGAG-۳' در مورد لوکوس *IS1311* استفاده شد. ساخت پرایمرها توسط شرکت TAG Copenhagen دانمارک انجام پذیرفت. حجم نهائی هر واکنش PCR برابر با ۱۲ میکرولیتر تنظیم گردید. در هر واکنش منفرد PCR، ۶ میکرولیتر مخلوط تجاری آماده مصرف Ampliqon® (دو برابر غلظت)، ۱ میکرولیتر از محلول کاری هریک از پرایمرها (با غلظت ۵ پیکومول در میکرولیتر)، ۰٫۶ میکرولیتر DMSO، ۲ میکرولیتر از ژنوم استخراج شده باکتری و ۱٫۴ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر اضافه گردید. ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf™) Mastercycler™ برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت. دو پروتکل مشابه برای اجرای PCR به کار گرفته شدند که هر دو شامل یک دور مقدماتی گرمایش (Initial denaturation) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه تکراری از Denaturation در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing در ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (*IS900*-PCR) یا ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (*IS1311*) و Extension در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه بودند. فرآیند با انجام یک مرحله Final extension در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰۰ ثانیه خاتمه یافت. از ژنوم سویه RVSRI1 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. جهت اطمینان از موفقیت PCR در تکثیر قطعات ژنتیکی مورد نظر ۵ میکرولیتر از هر محصول PCR بروش الکتروفورز با استفاده از ژل یک درصد آگاروز پیش رنگ شده با Red Safe در میدان الکتریکی به قدرت ۷ cm به مدت ۲ ساعت رانده و سپس عکس‌برداری شدند.

آزمایش هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم‌های محدودکننده

از آنزیم‌های تولیدی Thermo Scientific استفاده گردید. انجام PCR-*IS900*-REA analysis با استفاده از روش مرسوم اجرا گردید. بطور خلاصه مقادیر در مورد هر جدایه مشتمل بر ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR (با میزان کمی حدود ۲ میکروگرم محصول)، ۱ میکرولیتر از بافر مخصوص (۱۰ برابر غلظت) همراه آنزیم *Alw I*، ۲ میکرولیتر از آنزیم *Alw I* و ۱۸ میکرولیتر آب مقطر بدون نوکلئاز به یک میکروتیوب منتقل گردید و پس از مخلوط شدن به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا فرآیند هضم آنزیم تکمیل گردد. جهت خاتمه فرآیند، میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. در مورد *IS1311*-REA analysis PCR از پروتکل پیشنهادی Sevilla استفاده شد (۲۱). اندک تفاوت‌های محدود با روش فوق شامل استفاده جایگزین از آنزیم *Hinf I*، ۱۷ میکرولیتر آب مقطر بدون نوکلئاز و اجرای فرآیند هضم در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه ادامه یافت و عملیات هضم از طریق گرمادهی در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه خاتمه یافت.

تفکیک و تصویربرداری از محصولات هضم آنزیمی

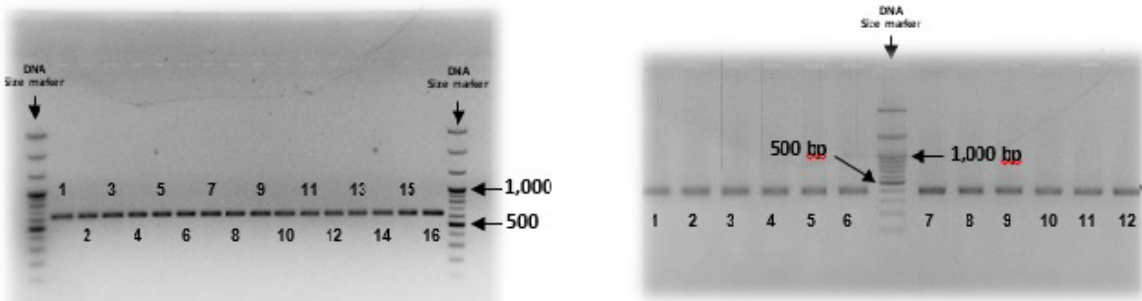
برای تفکیک و تصویربرداری قطعات حاصل از اعمال فرآیند هضم آنزیمی بر روی محصولات PCR، از ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰٪ بر پایه بافر TBE استفاده شد. برای تهیه آکریل‌آمید ۳۰٪ حجمی/وزنی به نسبت

جدول ۱- جدایه های ایرانی مورد استفاده در این مطالعه و تعداد و اندازه باندهای مورد انتظار مشاهده شده در آزمایشات آنالیز IS900-REA با استفاده از آنزیم Alw I و IS1311-REA با استفاده از آنزیم Hinfl. تیپ ژنتیکی IS900-RFLP Type از مطالعه عبدالمحمدی و همکاران استخراج شده است [۱۷].

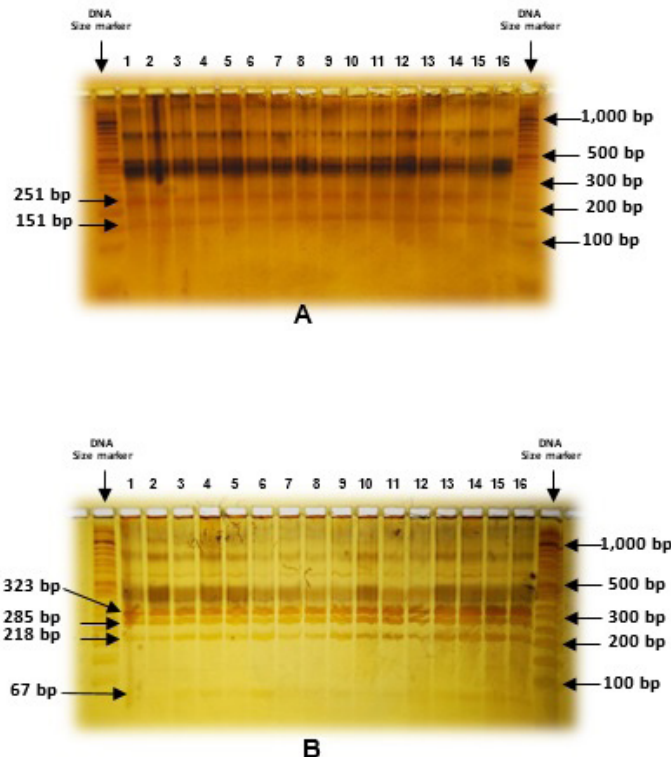
Isolate/strain ID	Province	City	Host	IS900-RFLP Type	Electrophoretic bands	
					detected in IS900-REA	detected in IS1311-REA
K-10	ND	ND	Bovine(Reference strain)	-	147 & 266	67.218.285.323
1131	Alborz	Karaj	Bovine	B	147 & 266	67.218.285.323
1231	Isfahan	Semirum	Ovine	B	147 & 266	67.218.285.323
1452	Zanjan	Zanjan	Bovine	B	147 & 266	67.218.285.323
1453	Zanjan	Zanjan	Bovine	B	147 & 266	67.218.285.323
1911	Isfahan	Isfahan	Caprine	B	147 & 266	67.218.285.323
27004	Qazvin	Qazvin	Bovine	B	147 & 266	67.218.285.323
31214	Fars	Kherameh	Ovine	B	147 & 266	67.218.285.323
6	Alborz	Karaj	Bovine	B	147 & 266	67.218.285.323
8152	Tehran	Islamshahr	Bovine	B	147 & 266	67.218.285.323
1310	Qazvin	Qazvin	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
167	Alborz	Karaj	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
26883	Alborz	Kordan	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
27209	Alborz	Karaj	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
27697	Qazvin	Qazvin	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
27951	Qazvin	Abyek	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
28109	Qazvin	Qazvin	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
2970	Qazvin	Qazvin	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
433134	Fars	Kherameh	Caprine	G	147 & 266	67.218.285.323
87893	Isfahan	Isfahan	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
88012	Qazvin	Qazvin	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
88024	Isfahan	Isfahan	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
9002 A	Isfahan	Isfahan	Bovine	G	147 & 266	67.218.285.323
RVSRI 1	ND	ND	(Laboratory strain)	New1	147 & 266	67.218.285.323
26766	Zanajin	Abhar	Bovine	New2	147 & 266	67.218.285.323
31216	Fars	Kherameh	Ovine	New2	147 & 266	67.218.285.323
1239	Isfahan	Semirum	Ovine	New3	147 & 266	67.218.285.323
19 B	Alborz	Karaj	Bovine	New3	147 & 266	67.218.285.323
27278	Alborz	Soheilieh	Bovine	New3	147 & 266	67.218.285.323
16	Alborz	Karaj	Bovine	New4	147 & 266	67.218.285.323
8071	Tehran	Islamshahr	Bovine	New4	147 & 266	67.218.285.323
28046	Qazvin	Abyek	Bovine	New4	147 & 266	67.218.285.323

تنوع ژنتیکی قابل توجه و تعدد سویه‌های گزارش شده در جمعیت به نسبت جدایه‌های محدود مطالعه شده در جمعیت این باکتری در ایران (۱۶، ۱۷)، می‌تواند گویای دوره زمانی طولانی‌تر فعالیت در جغرافیای ایران نسبت به آنچه که اکنون می‌پنداریم و یا تعدد کلون‌های اجدادی باکتری در کشور و یا استقلال کانون‌های فعال باکتری از نظر تکاملی باشد. نویسندگان معتقدند انجام آزمایشات تکمیلی و از جمله تعیین توالی کامل ژنومی جدایه‌های بومی ایران و مقایسه آنها با سویه‌ها و جدایه‌های دیگر مناطق جهان می‌تواند به یافتن پاسخ این پرسش‌ها کمک نماید.

است. در کتاب دلپی "بررسی ناخوشی‌های ساری دام در ایران" که در سال ۱۳۱۷ انتشار یافته است، اشاره‌ای به مشاهده کشتارگاهی یا بالینی پاراتوبرکلوزیس در میان نشخوارکنندگان ایران دیده نمی‌شود (۲۶). با فرض اینکه واردات بز و گوسفند خارجی در دهه پنجاه و شصت میلادی مسیر معرفی پاراتوبرکلوزیس به ایران را شرح می‌دهد (۱۵) و در نظر گرفتن وجود سویه‌های تیپ گوسفندی در هر دو کشور انگلستان و اسرائیل (۲۷) به عنوان مبداء دام‌های وارداتی مذکور، فقدان این گروه از سویه‌ها در ایران خارج از انتظار بنظر می‌رسد. از طرف دیگر سطح



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصولات (A) IS900-PCR و (B) IS1311-PCR جدایه‌های Map. ستون‌های ۱ الی ۱۱ (A) و ۱ الی ۱۵ (B) جدایه‌های ایرانی و ستون‌های ۱۲ (A) و ۱۶ (B) سویه Map laboratory strain RVSRI1 را تشکیل می‌دهند.



شکل ۲- آنالیز IS900-REA (با استفاده از آنزیم Alu I (A) و IS1311-REA (با استفاده از آنزیم Hinfl (B) بر روی جدایه‌های Map. ستون‌های ۱ الی ۱۵ (A) and B) جدایه‌های ایرانی و ستون‌های ۱۶ (A and B) سویه Map laboratory strain RVSRI1 را تشکیل می‌دهند.

differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiology*. 2012;12:1-12.

11. Whittington R, Marsh I, Choy E, Cousins D. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Molecular and cellular probes*. 1998;12(6):349-58.

12. Marsh I, Whittington R, Cousins D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Molecular and cellular probes*. 1999;13(2):115-26.

13. Lingayat SS, Shafi TA, Naikwade BS, Sakhare MP, Siddiqui MF, Suryawanshi PR, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in different captive wild animals. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2023;12(1):229-33.

14. Talatchian M. First report of Johne's disease in Iran. *Archives of Razi Institute*. 1966;18(1):53-6.

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

16. Abdolmohamadi L, Haghkhan M, Mosavari N, Tadayon K. Genotype profiling of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from feces and milk of Iranian bovine, ovine and caprine hosts, are the sheep (S) type strains mysteriously overlooked in Iran. *Iranian Veterinary Journal*. 2021;16(4):47-54.

17. Najafpour R, Zolfaghari MR, Mosavari N, Nazari R, Tadayon K. More insights about genomic population structure of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) from multiple hosts in west and central provinces of Iran using a boosted genotyping approach. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2023;100:101912.

18. Whittington R, Donat K, Weber MF, Kelton D, Nielsen SS, Eisenberg S, et al. Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Veterinary Research*. 2019;15.

19. Bannantine JP, Stabel JR, Bayles DO, Biet F. Improved DNA Amplification of the Hallmark IS 900 Element in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a Reexamination Based on Whole-Genome Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2023;89(2):e01682-22.

20. Shin SJ, Lee BS, Koh WJ, Manning EJB, Anklam K, Sreavatsan S, et al. Efficient Differentiation of *Mycobacterium avium* Complex Species and Subspecies by Use of Five-Target Multi-

نتیجه‌گیری کلی

فقدان سویه‌های پاراتوبرکلوزیس غیر از تیپ گاوی در ایران، با توجه به مشاهده و گزارش بیماری در گوسفند و بز، عجیب و غیرمنتظره است. برای ارزیابی دقیق این پدیده ژنوتایپینگ جدایه‌های بیشتری از جمعیت این باکتری در ایران مورد نیاز می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌نمایند که در این پژوهش هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مورد استفاده

- Gill C, Saucier L, Meadus W. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. *Journal of Food Protection*. 2011;74(3):480-99.
- O'Brien R, Mackintosh C, Griffin F. Paratuberculosis in deer, camelids and other ruminants. *Paratuberculosis: organism, disease, control*: CABI Wallingford UK; 2020. p. 188-99.
- Mizzi R, Plain KM, Timms VJ, Marsh I, Whittington RJ. Characterisation of IS1311 in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* genomes: Typing, continental clustering, microbial evolution and host adaptation. *Plos one*. 2024;19(2):e0294570.
- Stromerova NH, Faldyna M. *Mycobacterium avium* complex infection in pigs: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;57:62-8.
- Gomez-Buendia A, Alvarez J, Bezos J, Mourelo J, Amado J, Saez JL, et al. Non-tuberculous mycobacteria: occurrence in skin test cattle reactors from official tuberculosis-free herds. *Frontiers in Veterinary Science*. 2024;11:1361788.
- Whittington RJ, Hope AF, Marshall DJ, Taragel CA, Marsh I. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IS900 Restriction Fragment Length Polymorphism and IS1311 Polymorphism Analyses of Isolates from Animals and a Human in Australia. *J Clin Microbiol*. 2000;38(9):3240-8.
- Conde C, Price-Carter M, Cochard T, Branger M, Stevenson K, Whittington R, et al. Whole-Genome Analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IS900 Insertions Reveals Strain Type-Specific Modalities. *Front Microbiol*. 2021;12.
- Tizard ML, Moss MT, Sanderson JD, Austen BM, Hermon-Taylor J. p43, the protein product of the atypical insertion sequence IS900, is expressed in *Mycobacterium paratuberculosis*. *Microbiology*. 1992;138(8):1729-36.
- Semret M, Turenne CY, Behr MA. Insertion Sequence IS900 Revisited. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):1081-3.
- Biet F, Sevilla IA, Cochard T, Lefrançois LH, Garrido JM, Heron I, et al. Inter-and intra-subtype genotypic differences that

plex PCR. J Clin Microbiol. 2010;48(11):4057-62.

21. Garrido JM, Vazquez P, Molina E, Plazaola JM, Sevilla IA, Geijo MV, et al. Paratuberculosis Vaccination Causes Only Limited Cross-Reactivity in the Skin Test for Diagnosis of Bovine Tuberculosis. PLoS One. 2013;8(11).

22. Abdolmohammadi Khiav L, Khangahi Abyaneh H, Fallah Mehrabadi MH, Mosavari N, Tadayon K. Meta-analysis of Johne's disease in Iranian animals' population (1999-2020). Archives of Razi Institute. 2024;79(1):173-84.

23. Nassiri M, Soltani M, Mahdavi M, Doosti M. Identification and strain determination of *M. paratuberculosis* (MAP) by PCR and REA methods based on IS900 and IS1311 insertion segments. ABJ 2012; 4 (1):83-96.

24. Soltani M, Nassiry MR, Shahroudi F, Sadeghi B. PCR-restric-

tion endonuclease analysis for strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* based on polymorphisms in IS1311. Middle East Journal of Scientific Research. 2010;5(4):311-5.

25. Tadayon K, Mosavari N, Keshavarz R, Shahmoradi A, Ghaderi R, Sekhavati M, Haghighat M. Paratuberculosis in ruminants, a molecular search for traces of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* type I and type II in Iran. Veterinary Research & Biological Products. 2016;29(1):89-95.

26. Delpy JPL. A Study on the Contagious Diseases of Farm Animals in Iran: Razi Vaccine & Serum Research Institute; 1939.

27. Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. Molecular Characterization of Pigmented and Nonpigmented Isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002;40(5):1798-804.

