مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی،دوره یازدهم، شماره یک، بهار و تابستان هزار و سیصدو نودونه

مقاله پژوهشی

شناخت تنوع ژنتیکی جمعیت *مایکوباکتریوم ایویوم* زیر گونه *پاراتوبرکلوزیس* ایران به روش RFLP-IS*900*

لیدا عبدالمحمدی خیاو[1]، مسعود حق خواه[2]، کیوان تدین[1] و نادر مصوری[1]

۱- *آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم های بیماریزای دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات و ترویج کشاورزی (تات)*

۲- *دپارتمان پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز*

دریافت مقاله: ۴ مرداد ۱۳۹۹؛ پذیرش نهایی: ۲۰ شهریور ۱۳۹۹

چکیده:

بیماری یون که عامل آن *مایکوباکتریوم ایویوم* زیر گونه *پاراتوبرکلوزیس* است یکی از مهمترین بیماری های التهاب روده ای همراه با اسهال مزمن پیشرونده در نشخوارکنندگان محسوب می گردد. اپیدمیولوژی این بیماری و سویه های عامل بوجود آورنده این بیماری در ایران بخوبی شناسایی نگردیده است. برای شناسایی تعداد سویه های در گردش، و پراکنش جغرافیایی آنها و متعاقب آن کنترل و ریشه کنی بیماری نیاز به انجام تحقیقات مولکولار اپیدمیولوژی است لذا هدف از انجام این تحقیق تهیه الگوی ژنومی به روش RFLP-IS900 می باشد.

در این تحقیق از ۱۴۲ نمونه مشکوک، ۴۷ جدایه مورد تائید قرار گرفت و ۳۶ جدایه دارای DNA مناسب برای RFLP بود که در ژنوتایپینگ RFLP-IS*900* با استفاده از آنزیم BstEII ۹ تیپ مشخص شد که در این میان دو تیپ انفرادی (Orphan) و ۷ تیپ مشترک (Clustered) بود. بیشترین تیپ مشترک در (۲۰ جدایه) تیپ C1 مشاهده گردید که ۳ مورد مشترک در یک فارم استان قزوین و ۳ مورد مشترک دیگر در سه فارم متفاوت در همان استان بود. هیچ کدام از جدایه های ایرانی الگویی شبیه سویه های واکسینال نداشتند ولی دو سویه واکسینال III&V و 316F دارای الگوی ژنتیکی یکسان بودند.

مقدمه:

یون یا پاراتوبرکلوزیس یکی از مهمترین بیماری های التهاب روده ای همراه با اسهال مزمن پیشرونده در نشخوارکنندگان است که صنعت دامپروری را مورد خطر جدی قرار می دهد و با کاهش تولید مثل دام، لاغری مفرط و مرگ همراه است. این بیماری در گاوهای شیری خسارت قابل توجهی را با کاهش تولید شیر، افزایش نازایی و مرگ گاو ایجاد می نماید و باعث خسارات اقتصادی سنگین به صنعت دامپروری می گردد(۱).

عامل ایجاد کننده این بیماری باکتری *مایکوباکتریوم ایویوم* زیر گونه *پاراتوبرکلوزیس* است که احتمال نقش آن در ایجاد سندرم کرون و بیماری های دیابت تیپ ۱ مالتیپل اسکلروزیس، سارکوئیدوز و تیروئید هاشیموتو نیز مطرح گردیده است (۲۱). شیوع این بیماری در نواحی مختلف دنیا متفاوت می باشد.

در ایران وضعیت شیوع و اپیدمیولوژی این بیماری بخوبی شناخته نشده است. از این نظر که برای کنترل بیماری، شناسایی شیوع و تعداد سویه های در گردش و پراکنش جغرافیایی بیماری و سویه های عامل ایجاد کننده آن نیاز به انجام تحقیقات مولکولار اپیدمیولوژی است و یکی از معتبرترین روش های مولکولار اپیدمیولوژی و ردیابی عفونت که برای کنترل عفونت و ریشه کنی بیماری در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می گیرد تکنیک انگشت نگاری DNA با استفاده از روش استاندارد RFLP مایکوباکتریوم ها می باشد لذا هدف از این مطالعه بررسی تعداد سویه های در گردش و تنوع ژنتیکی *مایکوباکتریوم ایویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* (ژنوتایپینگ) به روش RFLP-IS*900* می باشد.

مواد و روش کار :

نمونه های مدفوع ارسالی از سراسر کشور به همراه نمونه های جمع آوری شده از موارد مشکوک به یون گزارش شده به این مرکز پس از آلودگی زدایی با محلول هگزا دسیل پیرینیدیوم کلراید (HPC) ۰/۷۵٪ ، در محیط هرولداگ مایکوباکتین دار و بدون مایکوباکتین کشت داده شد. همچنین از دو سویه واکسینال III&V و 316F به عنوان کنترل مثبت در تمام مراحل استفاده گردید. پس از رشد باکتری DNA ژنومی استخراج و تمام جدایه ها با 16s rRNA- PCR و IS*900*-PCR تائید گردیدند. DNA با کیفیت و

کمیت مناسب جهت انجام RFLP مورد استفاده قرار گرفت وآنالیز تصاویر بر اساس تعداد و اندازه باندها انجام گرفت (۱۵).

نتایج کشت

در این مطالعه از ۱۴۲ نمونه مشکوک، ۴۷ مورد کشت مثبت مجزا گردید که با PCR مورد تائید قرار گرفتند. از تمام موارد کشت مثبت ۳۶ جدایه دارای DNA مناسب برای RFLP انتخاب گردید. همچنین ۱۱ جدایه آرشیو آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم های بیماریزای دام موسسه رازی و ۲ سویه واکسینال III&V و 316F نیز مورد آنالیز با RFLP قرار گرفتند.

نتایج RFLP

در ژنوتایپینگ RFLP-IS*900* با استفاده از آنزیم BstEII از مجموع ۴۷ جدایه و دو سویه واکسینال ۹ تیپ مشخص شد که در این میان دو تیپ انفرادی (Orphan) و ۷ تیپ مشترک (Clustered) شناسایی گردید. بیشترین تیپ مشترک در (۲۰ جدایه) تیپ C1 مشاهده گردید که ۳ مورد مشترک در یک فارم استان قزوین و ۳ مورد مشترک دیگر در سه فارم متفاوت در همان استان مشاهده گردید. هیچ کدام از جدایه های ایرانی الگویی شبیه سویه های واکسینال نداشتند ولی دو سویه واکسینال III&V و 316F دارای الگوی ژنتیکی یکسان بودند.

بحث

بیماری یون سال هاست که در ایران وجود دارد و به صنعت دامپروری خسارات سنگینی را وارد کرده است (۱۹). با این حال متاسفانه تحقیقات پراکنده ای در زمینه شیوع آن وجود دارد. برای کنترل و مبارزه با شیوع این بیماری یکی از ابزارهای قدرتمند انگشت نگاری DNA یا RFLP می باشد. لذا در این بررسی از تکنیک RFLP برای بررسی ژنوتایپینگ استفاده شد.

در این مطالعه هیچ کدام از جدایه های ایرانی الگویی شبیه سویه های واکسینال نداشتند ولی دو سویه واکسینال III&V و 316F دارای الگوی ژنتیکی یکسان بودند که با نتایج MLVA و SSR سویه های واکسینال در ایران مطابقت داشت. یکسان بودن سویه های III&V و 316F ممکن است اتفاقی باشد و یا نشان دهنده یک کلون اجدادی واحد باشد که البته برای تائید نیاز به انجام تحقیقات تکمیلی می باشد (۸).

بیشترین تیپ مشترک در ایران تیپ C1 بود که از دامداری های پنجاستان ایزوله گردید.از بین ۲۰ سویه C1 ،۳ مورد مشترک در یک فارم استان قزوین و ۳ مورد مشترک دیگر در سه فارم متفاوت در همان استان مشاهده گردید که احتمالا بدلیل ارتباط جابجایی دام تجارت و مدیریت دامداری است.

نکته مهم دیگر این است که در این بررسی هرگز سویه S مشاهده نشد و حتی گوسفندان با سویه گاوی آلوده شدند. در بررسی مهره کش حقیقت در ایران بر روی سویه های غیر بومی به روش PCR-Collins نیز مشخص شد که سویه گاوی هر دو مورد را شامل شد که مانند بررسیSingh می باشد(۳۴). در بررسی Singh در هند نیز هیچکدام از جدایه های گوسفند و بز با سویه S آلوده نشدند بلکه مانند بیشتر موارد جدا شده از گاو از تیپ گاومیش کوهان دار بودند. در این راستا یافته های Cousins و Whittington(۲۵) بر خلاف نتایج ما می باشد. در این مناطق (استرالیا) صنعت گوسفند داری از رونق خاصی با مدیریت ویژه ای برخوردار است که متفاوت با ژنوتایپینگ این باکتری در ایران می باشد.

در این بررسی نتایج RFLP مطابق اروپا و آمریکا می باشد که می توان مطرح نمود شاید منشاء ورود عامل بیماری یون از گاوهای وارداتی از اروپا بویژه انگلستان باشد. همانطور که گزارشات نشان داد برای اولین بار در ایران در سال ۱۹۶۲ میلادی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس توسط دکتر طلا چیان (عضو هیئت علمی موسسه رازی) و دکتر خلیلی (رئیس سرم سازی اهواز) از مدفوع گاوهای نژادهای Sindhie و Jersaise (گاوهای وارداتی از کشور انگلستان به مزرعه شرکت نفت آبادان) جدا گردید (بهارصفت و همکاران، ۱۹۷۲) (۷).

اگرچه RFLP روش استاندارد و تکرار پذیر و مستقل از تکنیک های دیگر است اما وقت گیر بوده و نیازمند DNA با کیفیت بالا و انجام تکنیک های پیشرفته است و هر آزمایشگاهی قادر به انجام نمی باشند. چنین تکنیکی در تلفیق با سایر تکنیک های تایپینگ دیگر مانند PFGE ، MIRU و MPIL یا سایر روش هایی که می توانند ایندکس تمایز را افزایش دهند، در مطالعات

مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی،دوره یازدهم، شماره یک، بهار و تابستان هزار و سیصدو نودونه

اپیدمیولوژی مولکولی استفاده نمود و از نتایج آن در مطالعات فیلوژنتیکی بهره برد (۴۰). لذا باید در آینده تحقیقات بیشتری در تلفیق RFLP با تکنیک های مختلف صورت گیرد تا اپیدمیولوژی پاراتوبرکلوزیس در قسمت های مختلف ایران به دقت مشخص گردد.

1- Li L. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA; 2005. 102(35) : 12344-9.

2- 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.

3- Van Sollingen D, Hass P, Keremer K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. National institute of Public Health and Environment Bilthoven, The Netherlands. November 2002. 1-45.

4- Pavlic I, Horvathova A, Dvorska L, Bartl Jiri, , Svastova P, Maine R, Rychlik I. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Journal of Microbiological Methods. 1999;38: 155-167.

5- 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.

۶- مهره کش حقیقت م. شاهمرادی ا ح . تدین ک. کشاورز ر. قادری ر. سخاوتی م. مصوری ن. ۶- ۶- تعیین ویژگی‌های ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم ایویوم زیر گونه پاراتوبرکولوزیس III & V و F۳۱۶ با استفاده از یک راهبرد چندگانه. تابستان ۱۳۹۶. (۲)۳۰. ۱۰۰-۸۹.

7- Singh SV, Sohal JS, Singh PK, Singh AV. Genotype profiles of Mycobacterium avium subspecies Paratuberculosis isolates recovered from animals, commercial milk and human beings in North India. Int J Infect Dis. Sep 2009;13(5).

8- Cousins DV, Williams SN, Hope A, Eamens GJ. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS*900* RFLP. Aust Vet J. Mar 2000;78(3): 184-90.

9- 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: 49-61.

10- Thibault VC, Grayon M, Boschiroli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, Gutierrez MC, Supply P, Biet F. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS*900* RFLP and IS*1245* Restriction fragment length polymorphism typing. J Clin Microbiol. Aug 2007;45(8):2404–2410.