

Original Article

PCR detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by the F57, IS1311, HspX, MAP02, ISMav2 and Locus 255 markers, a supplement to the conventional IS900 element

Reza Najafpour¹, Mohammad Reza Zolfaghari^{1*}, Nader Mosavari², Razieh Nazari¹,
Keyvan Tadayon^{2*}

1. Department of Microbiology, Qo.C., 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: 2024.09.29

Accepted: 2024.12.22

Revised: 2024.12.13

Published: 2025.10.01

* Email: mo.zolfaghari123@iau.ac.ir, mmb093@gmail.com

Abstract

Introduction: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) causes Johne's disease (paratuberculosis) in ruminants. MAP exhibits the slowest growth rate among cultivable mycobacteria, as cultures of MAP-suspected specimens may require 16 weeks or more before visible colonies appear. Currently, IS900 is the most frequently used genetic marker in PCR-based diagnostic protocols of MAP. However, its specificity has been questioned, as IS900-like elements have been reported in the genomes of other mycobacteria. **Objective:** Here, we describe the application of IS900 along with six additional genetic loci specific to MAP, including F57, IS1311, HspX, MAP02, ISMAV2, and Locus 255. **Methods:** PCRs, conducted in singleplex format were of conventional type. Optimization measures on thermal and MgCl₂-concentration were employed in a way that a single optimized thermal protocol was applicable for all the markers. This strategy was applied to 30 Iranian MAP isolates from bovine (N=24), caprine (N=2), and ovine (N=4) samples collected in Alborz, Fars, Isfahan, Zanjan, Qazvin, and Tehran provinces. **Results:** Amplification in all PCR reactions across the 30 isolates, as well as the MAP laboratory strain 316f, was successful, producing the expected PCR products of 560, 704, 608, 211, 278, 507, and 404 bp corresponding to IS900, F57, IS1311, HspX, MAP02, ISMAV2, and Locus 255, respectively. **Conclusion:** In the Iranian context, where the IS900 element remains the cornerstone of molecular diagnosis for MAP, combining it with any of the six additional markers described in this study, along with the IS900 element, can considerably improve the accuracy and reliability of laboratory detection of MAP.

Key words: MAP, PCR, amplification, MAP02, ISMAV2, Locus 255, F57, IS1311, HspX



Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by Razi Vaccine & Serum Research Institute This article is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

مقاله کامل

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

شناسایی *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP)

با استفاده از مارکرهای ژنتیکی F57, IS1311, HspX, MAP02,

IS900, Locus 255, ISMav2، مکملی بر مارکر شناخته شده

رضا نجف پور^۱، محمدرضا ذوالفقاری^{۱*}، نادر مصوری^۲، راضیه نظری^۱، کیوان تدین^{۲*}

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

۲. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بخش تحقیق و تولید تویرکولین و مالتین، کرج، ایران.



تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۷/۰۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۲۳

* Email: mo.zolfaghari123@iau.ac.ir, mmb093@gmail.com

چکیده

مقدمه: مایکوباکتریوم ایویوم زیرگونه پاراتوبرکولوزیس (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) ایجاد بیماری یون (پاراتوبرکولوزیس) در نشخوارکنندگان است. این باکتری دارای کندترین سرعت رشد در میان مایکوباکتریوم های قابل رشد است و کشت نمونه های مشکوک به آن ۱۲ هفته یا حتی بیشتر پیش از آنکه پرگنه مشهودی ایجاد کند، به طول می انجامد. در حال حاضر IS900 شناخته شده ترین مارکر ژنتیکی در پروتکل های تشخیصی MAP با پایه PCR است. با این حال به واسطه شناسایی عناصر ژنتیکی شبیه IS900 در ژنوم مایکوباکتریوم های دیگر، اختصاصیت این مارکر زیر سؤال قرار گرفته است. **هدف:** در مطالعه حاضر کاربرد این مارکر همراه با شش مارکر اختصاصی دیگر شامل F57, IS1311, HspX, MAP 02, ISMav2, Locus 255 شرح داده شده است. **روش کار:** واکنش های PCR به صورت انفرادی و به روش متعارف اجرا شدند. تمهیدات لازم برای بهینه سازی شرایط دما و اجزای واکنش به نحوی انجام پذیرفت که واکنش های همه مارکرها از طریق یک پروتکل قابل اجرا باشند. این رویه بر روی ۳۰ جدایه بومی MAP جمع آوری شده از گاو (۲۴ مورد)، بز (۲ مورد) و گوسفند (۴ مورد) در استان های اصفهان، البرز، تهران، زنجان، فارس و قزوین اجرا شد. **یافته ها:** اجرای این روش در تمام واکنش های PCR بر روی همه جدایه ها و همچنین سوپه آزمایشگاهی MAP 316f با موفقیت همراه بود و محصولات مورد انتظار در تکتیر به طول ۵۶۰، ۷۰۴، ۶۰۸، ۲۱۱، ۲۷۸، ۵۰۷ و ۴۰۴ زوج باز به ترتیب در مورد مارکرهای IS900, F57, IS1311, HspX, MAP02, ISMav2 و Locus 255 تولید شدند. **نتیجه گیری:** در شرایط ایران که مارکر ژنتیکی IS900 همچنان به مثابه ستون فقرات در روش های مولکولی تشخیص MAP به کار گرفته می شود، استفاده هم زمان آن با هریک از شش مارکر ژنتیکی شرح داده شده در این مطالعه به توانایی آزمایشگاه در تشخیص صحیح MAP خواهد افزود.

کلمات کلیدی: MAP, PCR, amplification, MAP02, ISMav2, Locus 255

مقدمه

پاراتوبریکولوزیس بیماری مزمن درمان‌ناپذیری در میان نشخوارکنندگان اهلی و وحشی است که توسط *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) گاو اسهال مزمن شاخص اساسی بیماری در کنار دیگر نشانه‌های معمول یک بیماری عفونی عمومی است. در مراحل پیشرفته و پایانی بیماری لاغری شدید، کاهش میزان تولید شیر، ادم، کم‌خونی، ناباروری و در نهایت مرگ از نشانه‌های شناخته‌شده بیماری هستند. بیماری تقریباً از همه جهان گزارش شده یا می‌شود. در نتیجه ناکارآمدی راهکارهای متعارف موجود در تشخیص پاراتوبریکولوزیس، در حال حاضر ریشه‌کنی و کنترل این بیماری به‌سادگی امکان‌پذیر نیست (۱). دوره کمون طولانی و حضور موارد تحت بالینی بیماری سبب می‌شود که حیوانات آلوده پیش از شناسایی برای مدت طولانی قادر به پخش تعداد زیاد باکتری (5×10^{12} باکتری در هر روز) از طریق مدفوع خود باشند (۲). کشت نمونه مشکوک به حضور باکتری روی محیط‌های اختصاصی روش استاندارد و مقبول بین‌المللی در شناسایی عامل بیماری است. یک چالش مهم در این روش این است که چندین هفته زمان برای دستیابی به نتیجه قابل اعتماد لازم خواهد بود (۳) علاوه بر این، استفاده از روش‌های آلودگی‌زدایی مرسوم در جریان کشت آزمایشگاهی نمونه‌های مشکوک به وجود این باکتری می‌تواند خود سبب نابودی و غیرفعال شدن باکتری شوند. همچنین گرمخانه‌گذاری طولانی به‌خصوص در مورد نمونه‌های گوسفندی، می‌تواند موجب خشک شدن محیط کشت و نابودی باکتری و در نتیجه پاسخ منفی کاذب شود. در کنار این چالش‌ها، زمان نمونه‌برداری از دام متناسب با پیشرفت بیماری و میزان دفع باکتری از بدن دام نیز در میزان موفقیت آزمایش کشت باکتری تأثیرگذار است. وجود بیش از ۹۷٪ شباهت ژنتیکی میان *M. avium* subsp. *paratuberculosis* و *M. avium* subsp. *avium* (MAA) (۱) معرفی مارکرهای ژنتیکی یا آنتی‌ژنتیکی اختصاصی *M. avium* subsp. *paratuberculosis* را با مشکل مواجه می‌کند. در سال‌های اخیر و هم‌زمان با انتشار اطلاعات مربوط به ژنوم کامل جدایه‌های MAP در بانک‌های اطلاعات ژنتیکی مطالعات گسترده‌ای انجام و بدین ترتیب مارکرهای ژنتیکی اختصاصی جدیدی معرفی شده که امکان شناسایی MAP را تسهیل کرده‌اند. در سال

۲۰۰۲ وجود ۲۷ لوکوس ژنتیکی اختصاصی MAP گزارش شد که در MAA و دیگر گونه‌های مایکوباکتریایی نزدیک به آن‌ها وجود نداشتند (۱).

در میان مارکرهای ژنتیکی معرفی‌شده در مورد MAP، *IS900* به‌عنوان شناخته‌شده‌ترین شاخص بین‌المللی این باکتری بیشترین کاربرد را در آزمایش‌های تشخیصی با پایه PCR داشته است. این مارکر نخستین بار در ۱۹۸۹ گزارش شد. این لوکوس ژنتیکی به طول 1451 bp به تعداد ۱۶ تا ۲۲ تکرار در ژنوم MAP گزارش می‌شود (۵). با این حال شناسایی توالی‌های شبیه به این مارکر (۶). در ژنوم دیگر مایکوباکتریوم‌ها و نتایج مثبت کاذب در مورد دیگر اعضای کمپلکس، دقت و درستی این مارکر در آزمایش‌های تشخیصی وابسته به PCR مورد تردید قرار گرفته است، به‌طوری که به‌تازگی پرایمرهای معرفی‌شده پیشین و استفاده از این مارکر در مقیاس بین‌المللی مورد مناقشه بوده (۷) و بر استفاده از یک مارکر دوم برای تأیید نتیجه مثبت یک *PCR-IS900* تأکید شده است (۶). مارکر ژنتیکی *ISMav2* در سال ۲۰۰۱ در آلمان معرفی شد (۸-۱۱). این مارکر شباهتی به هیچ‌یک از IS elements شناخته‌شده در ژنوم مایکوباکتریوم‌ها ندارد. در ژنوم MAP حداقل سه نسخه از این لوکوس مشاهده می‌شود (۲). گزارشی از وجود این مارکر ژنتیکی در ژنوم دیگر مایکوباکتریوم‌ها در اختیار نیست. *F57* این مارکر ژنتیکی به طول 620 bp و با میزان G + C content برابر با 58.9% در سال ۱۹۹۳ معرفی شد (۱۲-۱۴). این مارکر در ژنوم سایر مایکوباکتریوم‌ها گزارش نشده است. *Locus 255* این مارکر ژنتیکی در سال ۲۰۰۲ به‌عنوان مارکر اختصاصی شناسایی و معرفی شد. سودمند بودن این مارکر در سال ۲۰۰۸ به‌صورت کاربردی در شناسایی نشان داده شد (۱۵، ۱۶). *Locus MAP02* این لوکوس را در سال ۲۰۰۴ Paustian (۱۷) شناسایی و به‌عنوان یک مارکر اختصاصی معرفی کرد. استفاده کاربردی در پروتکل PCR از این لوکوس ژنتیکی که ۶ رونوشت از آن در ژنوم MAP دیده می‌شود توسط Stable نشان داده شده است (۱۸). *Locus IS1311* این مارکر ژنتیکی را در سال ۱۹۹۴ Guerrero شناسایی کرد (۱۹). این لوکوس به طول 1317 bp یک insertion sequence شناخته‌شده در ژنوم MAP است. وجود آن در ژنوم برخی دیگر از اعضای کمپلکس MAA گزارش شده است. پنج مورد موتاسیون نقطه‌ای با ماندگاری زیاد (Highly conserved SNPs) در

باکتری یا اطمینان از عدم رشد آن ادامه یافت. ماده ژنتیکی با روش ساده جوشانیدن استخراج شد (۲۸).

آزمایش‌های ژنومی

هفت آزمایش مستقل از یکدیگر همگی براساس PCR انجام پذیرفت. این آزمایش‌ها PCR-IS900، PCR-F57، PCR-IS1311، PCR-HspX، PCR-MAP02، PCR-Mav2 و PCR-Locus 255 را شامل شد. توالی پرایمرهای استفاده‌شده براساس اطلاعات منتشرشده در مطالعات پیشین، به‌جز مواردی که بنا به دلایل تکنیکی بازطراحی شدند، گزینش و توسط شرکت TAG Copenhagen (Denmark) ساخته شدند (جدول ۱).

برای طراحی پرایمر از نرم‌افزار (۳۱) Primer 3 استفاده شد. سوپیه معیار برای طراحی پرایمر، سوپیه MAP K10 (Accession: SAMN00017104) انتخاب و ژنوم آن از درگاه https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000007865.1/ استخراج شد. در هر مورد یک قطعه از این ژنوم به طول حدود ۲ kb با مرکزیت منطقه میان دو پرایمر پیشنهادی از دو پهلوی آن به‌صورتی انتخاب شد که منطقه مورد نظر به‌صورت تقریبی در وسط قرار گرفته باشد. برای بهینه‌سازی فرایند تکثیر از روش چهار پروتکل موازی استفاده شد، به‌طوری که برای هر مارکر ژنتیکی آزمایش‌های PCR به شکلی تنظیم شد که در مجموع ۲۴ واکنش مستقل PCR در قالب چهار گروه شش‌عددی تعریف شد. در هر پروتکل ۶ واکنش با ۶ دمای مختلف annealing (شامل دماهای ۵۵، ۵۷، ۵۹، ۶۱، ۶۴ و ۶۶ درجه سانتی‌گراد) اجرا شد. در دو گروه از چهار گروه میزان غلظت پرایمر استفاده‌شده ۱ و در دو گروه دیگر ۵ پیکومول و درعین‌حال در دو گروه میزان نهایی غلظت کلرید منیزیم یک میلی‌مولار و در دو گروه دیگر دو و نیم میلی‌مولار تنظیم شد. در همه واکنش‌ها ۰/۶ میکرولیتر از ترکیب DMSO نیز اضافه شد. اجرای واکنش‌های PCR به روش single-plex و حجم اجزا در همه پروتکل‌ها به شکلی تنظیم یافت که هر واکنش در نهایت برابر با پانزده میکرولیتر باشد. از کیت تجاری آمپلیکون (Denmark, ®Ampliquor) به‌عنوان master mix استفاده شد. به‌عنوان کنترل منفی از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد. ژل‌های الکتروفورز (۱/۵% آگاروز) Invitrogen USA به‌صورت

طول این لوکوس شناسایی شده است که با استفاده از آن‌ها می‌توان میان سویه‌های MAP و MAA و همچنین میان سویه‌های تیپ گاوی و گوسفندی MAP تشخیص افتراقی داد (۲۰). Ellingson (۲۱-۲۳) در سال ۱۹۹۸ لوکوس ژنتیکی Locus HspX را معرفی کرده و نشان داده است که به‌رغم وجود تنها یک رونوشت از این ژن در ژنوم MAP می‌توان از آن در تشخیص افتراقی MAP از دیگر گونه‌های مایکوباکتریایی استفاده کرد (۴۲، ۵۲).

مطالعات انجام‌پذیرفته در ایران پیشینه شناسایی پاراتوبرکولوزیس را در دهه‌های ۱۹۵۰ (گاوی) و ۱۹۶۰ (گوسفند و بز) نشان می‌دهند و این در حالی است که اسناد و گزارش‌های باقی‌مانده از کارپانتیه و دلپی از نخستین دامپزشکان اروپایی در استخدام دولت ایران در حدود یکصد سال پیش از این، اشاره‌ای به وجود پاراتوبرکولوزیس در ایران نکرده‌اند. افزایش گزارش‌های وقوع بیماری در گله‌های نشخوارکنندگان (۲۶) و همچنین حیات وحش از مناطق جغرافیایی مختلف ایران (۲۷)، و نیز گرانی قیمت گوشت و فرآورده‌های لبنی ناشی از افزایش هزینه‌های تولید متأثر از تحریم‌های بین‌المللی، بر اهمیت بهبود مدیریت پاراتوبرکولوزیس و از جمله شناسایی سریع و دقیق بیماری می‌افزاید. بیشتر مطالعات صورت‌گرفته در جست‌وجو و شناسایی در ایران متکی بر آزمایش‌های PCR-IS900 هستند، ازاین‌رو، هدف از اجرای مطالعه حاضر، معرفی پروتکل‌های ساده تشخیصی وابسته به PCR متعارف در مورد MAP با استفاده از مارکرهای جدیدتر است.

مواد و روش‌ها

جدایه/ سوپیه MAP مورد آزمایش: در این مطالعه ۳۰ جدایه بومی MAP مشتمل بر ۴ جدایه گوسفندی، ۲ جدایه بزی و ۲۴ جدایه گاوی جمع‌آوری‌شده از استان‌های اصفهان، البرز، تهران، زنجان، فارس و قزوین همراه با یک سوپیه غیربومی آزمایشگاهی آزمایش شدند.

کشت باکتری در محیط اختصاصی و استخراج ژنوم: کشت باکتری در لوله‌های فالكون ۵۰ میلی‌لیتری محتوی محیط‌های کشت زرده تخم مرغ هرولدز غنی‌شده با مایکوباکتین (mycobactin supplemented Herrold's Egg-Yolk) انجام پذیرفت. گرمخانه‌گذاری برای ۸ تا ۱۲ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تا هنگام مشاهده توده رشد

جدول ۱- فهرست و جزئیات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Locus/primer	Nucleotide sequence (5'→ 3')	Start	Stop	PCR Product size (bp)	Reference (s)
IS 900- F	TTCTTGAAGGGTGTTCGGGGGCC	39815	40374	560	(11)
IS 900- R	GCGATGATCGCAGCGTCTTTGG				
F57- F	ACCGAATGTTGTTGTCACCG	886774	887477	704	This study
F57- R	GGACACCGAAGCACACTCTC				
IS1311-F	GCGTGAGKCTCTGTGGTGAA	33323	33930	608	(29)
IS1311-R	ATGACGACCGCTTGGGAG				
HspX-F	GACCGGCTATCTGTGGAAC	2424510	2424720	211	(30)
HspX-R	CTCGTCGGCTTGCACCTG				
MAV2-F	CGGTCGAGGTGCTCTTTGAT	274549	275055	507	This study
MAV2-R	GTTTGTTTCGTACCTCGCCG				
ISMAP02-F	GCACGGTTTTTCGGATAACGAG	362574	362809	278	This study
ISMAP02-R	TCAACTGCGTCACGGTGTCTTG				
255-F	CAGTCACCCCGCGGCCGGTA	3093134	3093537	404	(16)
255-R	TCTACTGACCCGCAGATCGAA				

به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و به دنبال آن ۳۵ نوبت از یک چرخه سه مرحله ای مشتمل بر گرمایش در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گرمایش در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک مرحله گرمایش ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، اجرا شد.

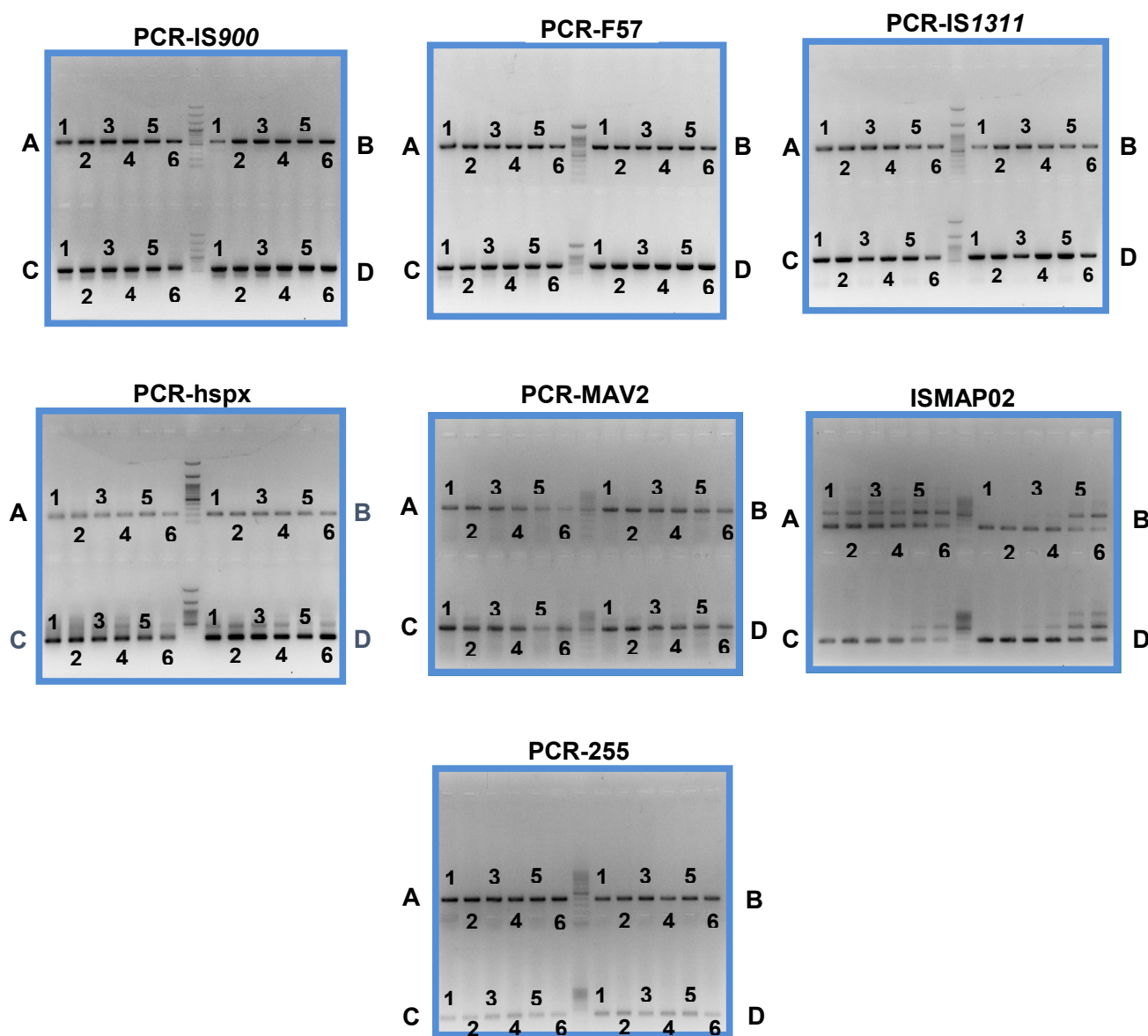
در نتیجه اجرای آزمایش های PCR-IS900، PCR-F57، PCR-Locus، PCR-Mav2، PCR-MAP02، PCR-HspX، IS1311 255 بر روی جدایه های بومی و سویه آزمایشگاهی همه آنها قطعات ژنتیکی مورد انتظار به طول ۵۶۰، ۷۰۴، ۶۰۸، ۲۱۱، ۲۷۸، ۵۰۷ و ۴۰۴ زوج باز را به ترتیب تولید و بدین ترتیب هویت شناخته شده آنها به عنوان MAP تأیید شد.

بحث و نتیجه گیری

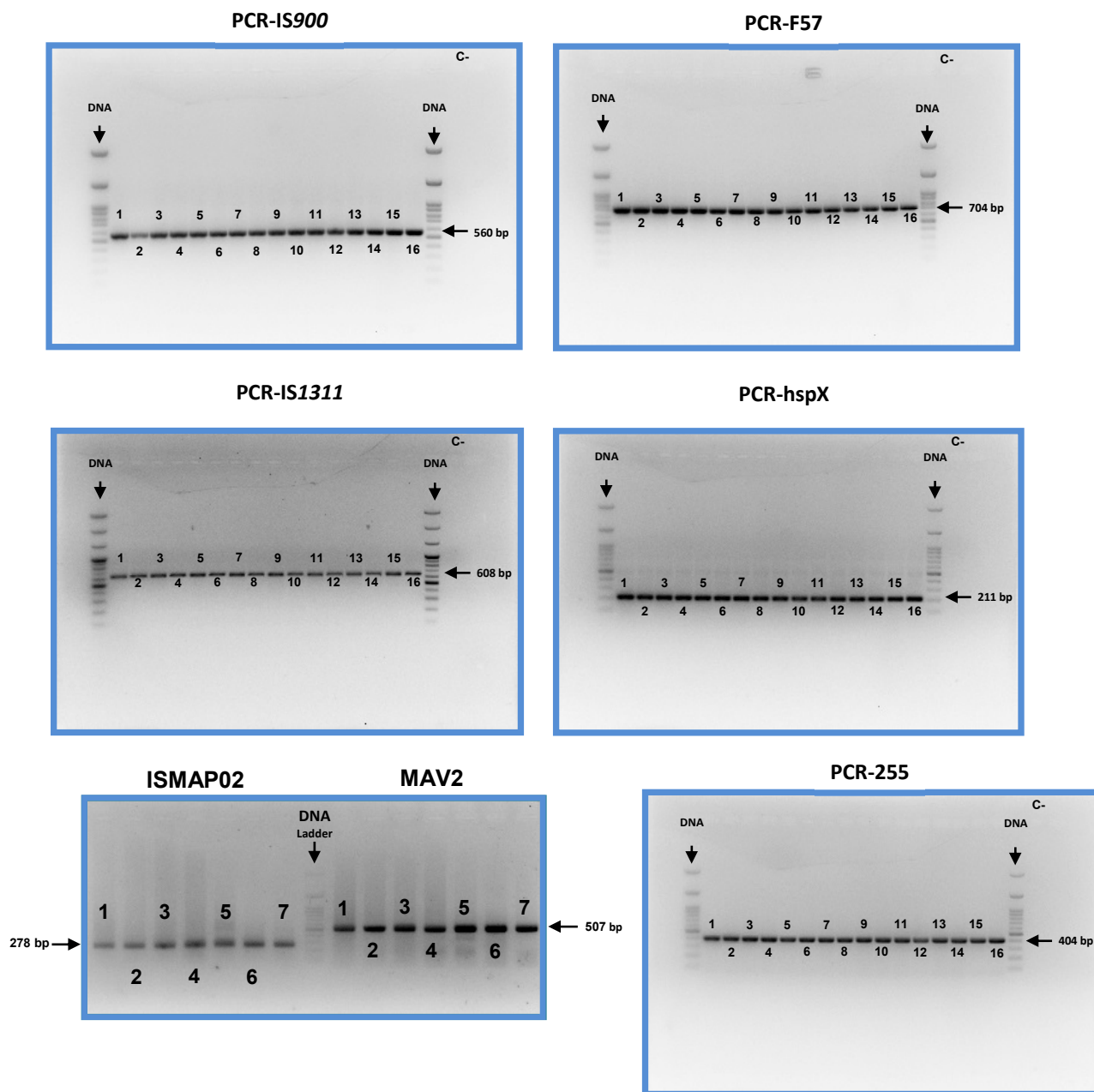
پیش رنگ شده با R Safe Red، برای ۲ ساعت در میدان الکتریکی (2 V/cm) الکتروفورز بارگذاری و با کمک دستگاه ژل داک (USA, ®BioRad) عکسبرداری شد.

نتایج

پس از ارزیابی مشاهدات مرحله بهینه سازی و امکان سنجی اجرای همه آزمایش ها با استفاده از یک پروتکل جامع قابل اجرا از نظر دما و غلظت اجزا (منیزیم کلراید و پرایمرها)، نشان داده شد که چنین امکانی وجود دارد (شکل ۱). بدین ترتیب برای همه مارکرها از ۷/۵ میکرولیتر از PCR master mix، ۱ میکرولیتر از هر کدام از دو پرایمر، ۲ میکرولیتر از نمونه DNA و ۰/۶ میکرولیتر از ترکیب DMSO همراه با ۲/۹ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد. پروتکل دمایی مشتمل بر یک مرحله اولیه گرمایش



تصویر ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصولات مرحله بهینه سازی پروتکل های PCR-IS900، PCR-F57، PCR-IS1311، PCR-HspX، PCR-255، PCR-Locus 255، PCR-Mav2، MAP02. به عنوان کنترل مثبت از ژنوم سویه آزمایشگاهی MAP 316f استفاده شده است. اندازه مارکر استفاده شده Sinaclone Ladder 100 bp Plus (SL7041) است.



تصویر ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصولات تکثیرشده در نتیجه اجرای پروتکل های PCR-IS900، PCR-F57، PCR-IS1311، PCR-hspX، PCR-Locus 255، PCR-Mav2، PCR-MAP02، HspX. اندازه مارکر استفاده شده Sinaclone (SL7041) Ladder 100 bp Plus است.

محیط کشت در طول دوره انکوباسیون اتکا بر این روش را جز در آزمایشگاه های مرجع موجه نشان نمی دهد. ضمن آنکه با توجه به حجم زیاد باکتری های قابل دفع روزانه در حیوانات بیمار، شناسایی سریع بیماری و تعیین سرنوشت دام بیمار در سریع ترین زمان ممکن

با وجود محدود بودن میزان موفقیت، کشت نمونه کلینیکی در محیط اختصاصی و جداسازی باکتری همچنان روش استاندارد طلایی در مطالعات اپیدمیولوژی پاراتوبرکولوزیس شناخته می شود (۷). زمان زیاد لازم برای دوره انکوباسیون و احتمال بالای آلودگی

که شناسایی و کار با آن‌ها در سیستم ژل الکتروفورز معمولی به‌سادگی انجام‌شدنی است (جدول ۱). یکی دیگر از ویژگی‌های درخور توجه مطالعه حاضر موفقیت در تنظیم پروتکل‌های PCR است، به‌گونه‌ای که امکان اجرای همه آن‌ها با یک پروتکل دما و اجزای یکسان فراهم شده است. این ویژگی هزینه‌های اجرا را کاهش و سرعت انجام آزمایش‌ها را افزایش می‌دهد، ضمن اینکه با توجه به تفاوت اندازه قطعات مورد انتظار در تکثیر امکان اجرای همه پروتکل‌ها به‌صورت Multiplex را نیز فراهم می‌سازد.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از مارکرهای اختصاصی ژنتیکی MAP در کنار مارکر شناخته‌شده IS900، سبب اطمینان از درستی یافته‌های مقدماتی در جریان انجام آزمایش‌های وابسته به PCR می‌شود. امکان استفاده هم‌زمان از چند مارکر ژنتیکی اختصاصی MAP در آزمایشگاه‌های مجهز به ماشین ترموسایکلر Real-time به‌صورت واکنش‌های Multiplex و همچنین به‌صورت singleplex در آزمایشگاه‌های مجهز به ماشین ترموسایکلر متعارف وجود دارد.

تشکر و قدردانی

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره 2-18-18-94154 پرداخت همه هزینه‌ها و پشتیبانی مورد نیاز برای انجام این مطالعه را تعهد و تأمین کرده است.

تعارض منافع

نویسندگان تأیید می‌کنند که در خصوص این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

منابع

1. Bannantine JP, Baechler E, Zhang Q, Li L, Kapur V. Genome Scale Comparison of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with Mycobacterium avium subsp. avium Reveals Potential Diagnostic Sequences. J Clin Microbiol. 2002;40(4):1303-10.
2. Stratmann J, Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF. Development of a Peptide-Mediated Capture PCR for Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Milk. J Clin Microbiol. 2002;40(11):4244-50.

برای جلوگیری از انتشار بیشتر بیماری دارای اهمیت است (۷). از آنجاکه رونوشت‌های IS900 به تعداد قابل توجهی (۲۲-۱۶) در ژنوم دیده می‌شوند (۵) و این مارکر ژنتیکی به‌صورت اختصاصی فقط در ژنوم MAP مشاهده می‌شود، لذا به‌عنوان یکی از بهترین مارکرهای در دسترس با حساسیت زیاد معرفی شده است، به‌طوری که در آزمایش PCR می‌تواند مقادیر در حد 1 fg (purified genomic DNA) را نیز شناسایی کند (۳۲). سازمان بهداشت جهانی حیوانات (OIE/WOAH) آزمایش PCR-IS900 را به رسمیت شناخته (۷) و در مقایسه با هیستوپاتولوژی و رنگ‌آمیزی اسید فست یا حتی کشت باکتریایی نیز حساس‌تر اعلام شده است (۷). باوجوداین، نخستین پرایمرهای طراحی و پیشنهادشده برای شناسایی این مارکر و از جمله IS900/150 & IS900/921 معرفی‌شده توسط Vary (۳۳) و سپس Cousins (۳۴) و همچنین p90/p91 معرفی‌شده توسط Millar (۳۵)، به‌دلیل طراحی در زمان پیش از دسترسی به ژنوم کامل باکتری دچار نقص در طراحی (primer design errors) هستند. در سال‌های اخیر با رفع این نقیصه ویژگی مورد مناقشه و همچنین حساسیت این آزمایش بهبود یافته است (۷).

استفاده هم‌زمان دو مارکر ژنتیکی اختصاصی MAP با هدف افزایش وبژگی پروتکل جست‌وجوی باکتری توصیه شده است (۳۶). با توجه به معروفیت جهانی مارکر IS900 در مطالعات مربوط به شناسایی MAP و استفاده فراگیر از آن در میان پژوهشگران ایرانی، استفاده از مارکرها و پروتکل پیشنهادی مطالعه حاضر می‌تواند بر دقت و صحت تشخیص بیماری در گله‌های نشخوارکنندگان بیفزاید. استفاده از پروتکل‌های Nested PCR به‌رغم مزیت افزایش حساسیت به‌دلیل بالا بردن احتمال آلودگی و خطا در آزمایش توصیه نمی‌شود (۳۶).

بسیاری از پروتکل‌های PCR-IS900 تعریف‌شده موجود سازگار با ماشین‌های Real-time PCR طراحی شده‌اند که با توجه به بهای قابل توجه این تجهیزات و همچنین هزینه جاری کار با آن‌ها، استفاده روزمره در آزمایشگاه‌های دامپزشکی را با چالش مواجه می‌کند. بر همین اساس همه پروتکل‌های PCR در مطالعه حاضر به‌نحوی تنظیم شده که اولاً سازگار با ماشین‌های متعارف هستند و علاوه‌براین اندازه محصولات تکثیرشده مورد انتظار به‌گونه‌ای است

3. Correa Valencia NM, Hernández-Agudelo JM, Fernández-Silva JA. Decontamination protocols for bovine fecal and environmental samples for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth on solid media: a systematic review and a suggested step-by-step decontamination protocol. *Austral journal of veterinary sciences*. 2024;56(1):1-13.
4. Green E, Tizard M, Moss M, Thompson J, Winterbourne D, McFadden J, Hermon-Taylor J. Sequence and characteristics of IS 900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic acids research*. 1989;17(22):9063-73.
5. Conde C, Price-Carter M, Cochard T, Branger M, Stevenson K, Whittington R, et al. Whole-Genome Analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IS 900 Insertions Reveals Strain Type-Specific Modalities. *Frontiers in microbiology*. 2021;12:660002.
6. Englund S, Bölske G, Johansson K-E. An IS 900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS microbiology letters*. 2002;209(2):267-71.
7. 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.
8. Sung JS, Chang Y-F, Huang C, Zhu J, Huang L, Han SY, et al. Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 2004;16(2):116-20.
9. Strommenger B, Stevenson K, Gerlach G-F. Isolation and diagnostic potential of IS Mav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*. 2001;196(1):31-7.
10. Lakshmi B, Mukherjee F, Surendra K, Bahekar V, Prasad A, Rana S, et al. Optimization and validation of a diagnostic real-time PCR for specific detection of *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis*. *Adv Anim Vet Sci*. 2016;4(1):12-24.
11. Dohmann K, Strommenger B, Stevenson K, De Juan L, Stratmann J, Kapur V, et al. Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(11):5215-23.
12. Rasper-Hössinger M, Biggel M, Stephan R, Seehusen F, Scherrer S. Strain diversity in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-positive bovine fecal samples collected in Switzerland. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023;10:1154516.
13. Poupart P, Coene M, Van Heuverswyn H, Cocito C. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31(6):1601-5.
14. Hernandez Reyes AL. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a captive wood bison herd: diagnostics and disease dynamics overtime. 2024.
15. Karthikeyan A, Gunaseelan L, Porteen K, Masilamoni BS. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercial milk and milk products of Tamil Nadu. 2020.
16. Bannantine JP, Baechler E, Zhang Q, Li L, Kapur V. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(4):1303-10.
17. Paustian ML, Amonsin A, Kapur V, Bannantine JP. Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's Disease. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(6):2675-81.
18. Stabel J, Bannantine J. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMAP 02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(9):4744-50.
19. Roiz M, Palenque E, Guerrero C, Garcia M. Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(5):1389-91.
20. Mizzi R, Plain KM, Timms VJ, Marsh I, Whittington RJ. Characterisation of IS 1311 in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genomes: Typing, continental clustering, microbial evolution and host adaptation. *Plos one*. 2024;19(2):e0294570.
21. Ellingson JL, Bolin CA, Stabel JR. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of *paratuberculosis*. *Molecular and cellular probes*. 1998;12(3):133-42.
22. Byrne AS. Identification and diversity of mixed strain infections of *mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle from Canadian herds: Memorial University of Newfoundland; 2023.
23. Bannantine JP, Stabel JR. HspX is present within *Mycobacterium paratuberculosis*-infected macrophages and is recognized by sera from some infected cattle. *Veterinary microbiology*. 2000;76(4):343-58.
24. Thirumalapura NR, Fera W, Hue E, Zellers C, Tewari

- D. Evaluation of a high-throughput nucleic acid extraction method for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples by PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2021;33(2):375-8.
25. Martins L. Detection of Johne's Disease on dairy farms using different qPCR target genes for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in young stock. 2023.
26. Gholamhosseini Moghaddam T, Haghkhah M, Moham-madi GR. Investigating the Prevalence of *Mycobacterium avium* Subspecies Paratuberculosis (MAP) in Industrial Dairy herds using Ziehl-Neelsen Staining, Culture, and PCR in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*. 2023;15(2):11-8.
27. Ghorani M, Eslami F, Soleimani S, Razi H, Khakpour F. The report of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in a wild goat (*Capra aegagrus*) in Iran. *Journal of Zoonotic Diseases*. 2024;8(2):509-14.
28. 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.
29. Okuni JB, Dovas CI, Loukopoulos P, Bouzalas IG, Ka-teete DP, Joloba ML, Ojok L. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from Ugandan cattle and strain differentiation using optimised DNA typing techniques. *BMC Veterinary Research*. 2012;8:99.
30. Ellingson J, Stabel J, Bishai W, Frothingham R, Miller J. Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Molecular and cellular probes*. 2000;14(3):153-61.
31. Yang L, Ding F, Lin Q, Xie J, Fan W, Dai F, et al. A tool to automatically design multiplex PCR primer pairs for specific targets using diverse templates. *Scientific Reports*. 2023;13(1):16451.
32. Kawaji S, Taylor DL, Mori Y, Whittington RJ. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Veterinary microbiology*. 2007;125(1-2):36-48.
33. Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Dorian T, Hermon-Taylor J. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(9):3446-52.
34. Cousins D, Whittington R, Marsh I, Masters A, Evans R, Kluver P. *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from the faeces of ruminants possess IS 900-like sequences detectable by IS 900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular and cellular probes*. 1999;13(6):431-42.
35. Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Dorian T, Hermon-Taylor J. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Applied and environmental microbiology*. 1996;62(9):3446-52.
36. Möbius P, Hotzel H, Raßbach A, Köhler H. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Veterinary microbiology*. 2008;126(4):324-33.