دانشگاه فردوسی مشهد
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

تعیین کمیت باکتری مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در مدفوع گاوهای هلشتاین با استفاده از روش *Real-time PCR*

مهدی خیرآبادی

خرداد ۱۳۹۰

دانشگاه فردوسی مشهد
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

تعیین کمیت باکتری مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در مدفوع گاوهای هلشتاین با استفاده از روش *Real-time PCR*

مهدی خیرآبادی

استادان راهنما

دکتر مجتبی طهمورث پور

دکتر محمدرضا نصیری

استاد مشاور

دکتر عباسعلی ناصریان

خرداد ۱۳۹۰

تعهد نامه

عنوان پایان نامه:

تعیین کمیت باکتری مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس در مدفوع گاوهای هلشتاین با استفاده از روش *Real-time PCR*

اینجانب مهدی خیرآبادی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح دام دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی جناب آقایان دکتر مجتبی طهمورث پور و دکتر محمدرضا نصیری متعهد می‌شوم:

- **نتایج ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می‌گیرم.**
- **در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.**
- **مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.**
- **کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان‌نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (*Ferdowsi University of Mashhad*) به چاپ خواهد رسید.**
- **حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تاثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.**
- **در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان‌نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.**

تاریخ

نام و امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده

باکتری مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس به عنوان عامل بیماری یون شناخته می‌شود و همچنین ممکن است در شیوع بیماری کرون در انسان نقش داشته باشد. خسارات اقتصادی سنگین حاصل از این بیماری، موجب پیشرفت سنجش‌های سریع، حساس و خاصی برای شناسایی حیوانات آلوده گردیده است، که برای طرح‌ریزی راهبردهای منطقی در کنترل گسترش پاراتوبرکلوزیس ضروری می‌باشد. ژنوم این باکتری از حدود ۵ میلیون جفت باز در یک کروموزوم حلقوی با بیش از ٤٥٠٠ ژن تشکیل شده است و طول متوسط هر ژن در آن ۱۰۱۵ جفت باز می-باشد. ژن‌های بیماریزای مرتبط با این باکتری شامل *hspX*، *F57* و *IS900* هستند که ما در این تحقیق از توالی درون جایگیر *IS900* برای شناسایی پاراتوبرکلوزیس استفاده کردیم. هدف از این مطالعه، توسعه‌ی تکنیک *Real-time PCR* برای تعیین کمیت باکتری پاراتوبرکلوزیس در نمونه‌های مدفوع گاوی بود. نمونه‌های مدفوع از ٤٠ گاو موجود در ۲ گله‌ی گاوهای شیری تجاری و در موقعیت‌های متفاوت ایران جمع‌آوری شدند. قطعه‌ی ٤٠٠ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای *P90* و *P91* مخصوص جایگاه ژنی *IS900* از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور تشخیص پاراتوبرکلوزیس در نمونه‌های مدفوع تکثیر شد. ۱۰ نمونه مدفوع توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مثبت نشان داده شد. قطعه‌ی ٤٠٠ جفت بازی تکثیر شده از جایگاه ژنی *IS900* در داخل ناقل *pTZ57R/T* همسان سازی شد. پلاسمید نوترکیب، استخراج شد و به عنوان *DNA* استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. نتایج با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از پلاسمید حاوی *IS900* (۹۸ *%* $= R^2$) تعیین کمیت شدند. توانایی کمی سازی در این آزمایش در دامنه‌ی گسترده‌ی خطی (۵۰ تا ۵×$۱۰^۵$ کپی) برای ارزیابی تعداد کپی‌های قطعه‌ی هدف از پاراتوبرکلوزیس در نمونه‌های مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که روش *Real-time PCR* می‌تواند به عنوان روش جایگزین برای تشخیص سریع‌تر پاراتوبرکلوزیس معرفی شود. کاربرد سودمند این سنجش، توانایی کمیت‌سنجی دقیق و سریع تعداد سلول‌های پاراتوبرکلوزیس در نمونه‌های ناشناخته می‌باشد.

کلید واژه‌ها: *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس*، بیماری یون، کمی‌سازی، *IS900*، *Real-time PCR*.

فهرست منابع

فصل اول

۱- مقدمه ۱
۱-۱- اهمیت موضوع ۱
۱-۲- اهداف تحقیق ۲

فصل دوم

۲- بررسی منابع ۵
۲-۱- جمعیت میکروبی مایکوباکتریوم آویوم ۵
۲-۱-۱- طبقه‌بندی ۷
۲-۲- باکتری مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس ۷
۲-۲-۱- ویژگی‌های ژنوتیپی *MAP* ۹
۲-۲-۲- بیماریزایی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس ۱۰
۲-۲-۳- تشخیص آلودگی با مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس ۱۲
۲-۳- بیماری یون ۱٤
۲-۳-۱- آزمون‌های تشخیصی مورد استفاده برای شناسایی بیماری یون ۱۵
۲-۳-۲- روش‌های ملکولی برای شناسایی بیماری ۱۷
۲-٤- کاربرد مهندسی ژنتیک در *QRT-PCR* ۲۱
۲-٤-۱- روش *T/A Cloning* ۲۲
۲-۵- روش‌های کمی‌سازی اسیدهای نوکلئیک ۲۳
۲-۵-۱- مشکلات آنالیزهای کمی در واکنش *PCR* معمولی ۲٤
۲-۵-۲- اساس روش *PCR* رقابتی ۲٦
۲-۵-۳- روش *Real-time PCR* ۲٦
۲-۵-۳-۱- مقایسه *Real-time PCR* و *PCR* معمولی ۲۸
۲-۵-۳-۲- مقایسه *Real-time PCR* و *RT-PCR* به شیوه معمولی ۲۹
۲-۵-۳-۳- رنگ‌های گزارشگر ۳۰

۲-۵-۳-٤- ماده آزمایشی در آزمایشات *Real-time PCR* ۳۲
۲-۵-۳-۵- قطعه هدف ۳۳
۲-۵-۳-٦- طراحی آغازگرهای اختصاصی *Real-time PCR* ۳۳
۲-۵-۳-۷- کنترل‌های واکنش ۳٤
۲-۵-۳-۸- رنگ مرجع خنثی استفاده شده در دستگاه *ABI* ۷۳۰۰ ..... ۳۵
۲-۵-۳-۹- اثر پرایمر دایمر بر *PCR* کمی ۳٦
۲-۵-۳-۱۰- روش‌های مختلف تعیین کمیت بوسیله *Real-time PCR* ۳۷
۲-۵-۳-۱۱- منحنی استاندارد ۳۹
۲-۵-۳-۱۲- موارد استفاده از تکنیک *Real-time PCR* ٤۱

فصل سوم

۳- مواد و روش‌ها ٤۳
۳-۱- نمونه‌گیری از مدفوع گاوهای هلشتاین ٤۳
۳-۲- روش استخراج *DNA* از مدفوع با استفاده از کیت *Bioneer* ٤٤
۳-۳- تعیین کیفیت و کمیت *DNA* استخراج شده ٤۵
۳-٤- طراحی آغازگرها ٤۵
۳-۵- انجام *PCR* برای ردیابی باکتری در مدفوع ٤٦
۳-۵-۱- برنامه حرارتی مورد استفاده جهت تکثیر قطعه ٤۰۰ جفت بازی از باکتری ٤٦
۳-۵-۲- مواد و مقادیر لازم برای انجام *PCR* برای یک واکنش ٤٦
۳-٦- همسانه‌سازی قطعه الگو در باکتری *DH5α* ٤۷
۳-٦-۱- تهیه محیط کشت باکتری ٤۷
۳-٦-۲- کشت خطی و کشت مایع باکتری *DH5α* ٤۸
۳-٦-۳- تهیه سلول‌های مستعد ٤۸
۳-٦-٤- واکنش لیگاسیون ٤۹
۳-٦-۵- انتقال پلاسمیدها به باکتری ۵۰
۳-٦-٦- غربالگری پرگنه‌ها ۵۱
۳-٦-۷- استخراج پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت *Roche* ۵۱

۳-٦-۸- تعیین کیفیت و کمیت پلاسمید نوترکیب استخراج شده ۵۲
۳-٦-۹- روش استفاده شده جهت تأیید صحت پلاسمید نوترکیب ۵۲
۳-٦-۹-۱- هضم دوآنزیمی پلاسمید ۵۲
۳-۷- *Real-time PCR* ٥٤
۳-۷-۱- ساخت استاندارد با استفاده از *DNA* پلاسمید ۵۵
۳-۷-۲- مراحل ساخت رقت های ساخته شده ٥٦
۳-۷-۳- مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در *Real-time PCR* ۵۹
۳-۷-٤- کنترل منفی ٦۰

فصل چهارم

٤- نتایج و بحث ٦۱
٤-۱- تعیین کمیت و کیفیت *DNA* ٦۱
٤-۲- برسی محصولات *PCR* ٦۲
٤-۳- همسانه‌سازی قطعه *IS900* ٦٥
٤-۳-۱- تأیید صحت توالی همسانه‌شده ٦٦
٤-۳-۱-۱- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت پلاسمید نوترکیب ٦٦
٤-۳-۱-۲- نتایج هضم دوآنزیمی ٦۷
٤-٤- نتایج حاصل از *Real-time PCR* ٦۸
٤-٤-۱- نتایج منحنی‌های تکثیر استانداردها ٦۸
٤-٤- ۲- نتایج منحنی ذوب حاصل از نمونه ها ۷۰
٤-٤-۳- نتایج منحنی‌های سایبرگرین و راکس ۷۱
٤-٤- ٤- رسم منحنی استاندارد ۷۲
٤-٤- ٥- محاسبه تعداد نسخه‌های نمونه‌های مجهول با استفاده از معادله منحنی استاندارد ۷٦
٤-٤- ٦- محاسبه بازدهی تکثیر در *Real-time PCR* ۷۸

فصل پنجم

۵- نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۸۱

فصل ششم

٦- منابع ۸۳

فهرست اشکال

شکل ۲-۱: عکس میکروسکوپی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس. ۷
شکل ۲-۲: نمایی از ژنوم *MAP*. ۹
شکل۲-۳: بافت روده ای بیماری یون دامی و کرون انسانی. ۱۲
شکل۲-٤: ارتباط *MAP* با بیماریهای یون دامی و کرون انسانی. ۱۵
شکل ۲-۵: شمای کلی انجام همسانه‌سازی. ۲۲
شکل ۲-٦: فاز ثابت در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. ۲۵
شکل۲-۷: مقایسه مراحل RT-PCR معمولی و Real Time RT-PCR برای تعیین کمیت. ۳۰
شکل۲-۸: سازوکار رنگ سایبرگرین. ۳۲
شکل۲-۹: منحنی ذوب یک واکنش نامطلوب PCR، که در آن پرایمرها بر یکدیگر اثری متقابل داشته اند. ۳٦
شکل۲-۱۰: نمایی از روش تعیین کمیت مطلق. ۳۸
شکل۲-۱۱: منحنی استاندارد ایجاد شده (لگاریتم (رقت) / Ct) با استفاده از یک سریال رقتی ۱۰ برابر. ٤۰
شکل ۳-۱: نقشه پلاسمید pTZ57R/T و مکان‌های برشی آن. ٤۹
شکل۳-۲: شمای کلی یک پروسه Real-time PCR. ۵٤
شکل۳-۳: دستگاه (ABI (Applied Biosystems 7300 مورد استفاده در این تحقیق. ۵۵
شکل٤-۱: DNA از نمونههای مورد مطالعه بر روی ژل آگارز ۱٪. ٦۱
شکل٤-۲: خروجی نانودراپ اسپکتروفتو متری. ٦۲
شکل٤-۳: تکثیر قطعه ٤۰۰ جفت بازی از توالی IS900 در نمونه های مورد مطالعه. ٦۳
شکل٤-٤: پرگنه‌های آبی رنگ تولید شده از باکتری‌های حاوی پلاسمید (کنترل منفی). ٦۵
شکل٤-۵: پرگنه‌های سفیدرنگ تولید شده از باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب. ٦۵
شکل٤-٦: خروجی نانودراپ اسپکتروفتو متری. ٦۷
شکل٤-۷: تأیید صحت توالی قطعه همسانه‌شده توسط هضم دوآنزیمی ٦۸
شکل٤-۸: منحنی واکنش تکثیری استاندارد ها. ٦۹
شکل٤-۹: منحنی ذوب. ۷۰
شکل٤-۱۰: Component plot ۷۱
شکل٤-۱۱: منحنی استاندارد رسم شده توسط نرم افزار ABI. ۷٤

فهرست جداول

جدول ۲-۱: مقایسه مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس با دیگر گونه های مایکوباکتریوم از لحاظ ژنوتیپی. ۱۰
جدول ۲-۲: ساختار انتهایی ′۳ محصولات تولیده بوسیله ***Taq*** پلیمراز ۲۳
جدول ۲-۳: مزایا و معایب RT-PCR در مقابل cPCR. ۲۸
جدول ۳-۱: وزن های محاسبه شده پلاسمید مورد نیاز برای تعداد نسخه های متفاوت. ۵۷
جدول ۳-۲: محاسبه غلظت نهایی از هر رقت استفاده شده. ۵۷
جدول ۳-۳: ساخت رقت های مربوط به استانداردها ۵۸
جدول۳-٤: مواد و مقادیر لازم برای انجام واکنش Real-time PCR ۵۹
جدول۳-۵: جدول برنامه حرارتی استفاده شده توسط دستگاه ABI ٦۰
جدول٤-۱: مختصات و ویژگی های منحنی استاندارد در آزمایش. ۷٤
جدول٤-۲: گزارش نتایج استانداردها. ۷۵
جدول٤-۳: جدول گزارش نتایج نمونه های مجهول با استفاده از منحنی استاندارد ۷۸

فهرست علائم و اختصارات

علائم	لاتین	فارسی
µg	*Microgram*	میکروگرم
µl	*Microlitre*	میکرولیتر
bp	*Base pair*	جفت باز
cPCR	*Competitive PCR*	واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رقابتی
Ct	*Cycle Treshold*	سیکل آستانه
ddW	*Double Distilled Water*	آب دوبار تقطیر
DNA	*Deoxyribonocleic Acid*	اسید دزوکسی ریبو نوکلئیک
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*	الایزا
FISH	*Fluoreseent in situ hybridization*	هیبریدیزاسیون درجا فلوئورسنت
IS	*Insertion Sequence*	توالی درون جایگیر
KG	*Kilogram*	کیلوگرم
LB	*Lauria – Bertani*	لوریا- برتانی
MAP	*Mycobacterium avium paratuberculosis*	مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس
MCS	*Multiple Cloning Site*	جایگاه چندگانه همسانه سازی
NCBI	*National center of biotechnology information*	مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی
NG	*Nanogram*	نانوگرم
NTC	*Non Template Control*	کنترل منفی
OD	*Optic Density*	چگالی نوری
PCR	*Polymerase Chain Reaction*	واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
qPCR	*Quantitative PCR*	واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی
qRT-PCR	*Quantitative Real-time PCR*	واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی در زمان واقعی
rpm	*round per minute*	دور در دقیقه
RT-PCR	*Real-time PCR*	واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

فصل اول

۱- مقدمه

۱-۱- اهمیت موضوع

یون[1] بیماری باکتریایی است که باعث اختلالات جذبی در نشخوارکنندگان می‌گردد. عامل این بیماری باکتری مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس (که از این پس به اختصار *MAP* نامیده می شود) می باشد. یکی از مشکلات اصلی کار با این ارگانیسم، ماهیت رشد آهسته آن است و از خصوصیات غیرمعمول *MAP* این است که تمایل زیادی به خوشه‌دار شدن دارد که سبب شمارش نادرست آن می گردد. به دلیل ماهیت رشد آهسته، تحمل گرمایی، گرایش به خوشه ای شدن، حضور آن در شیر پاستوریزه و ارتباطش با بیماری مزمن روده‌ای، به عنوان یک پاتوژن مهم در مطالعات شناخته شده است.

امکان انتقال باکتری از حیوان به انسان از طریق شیر اثبات شده است. به همین دلیل نگرانی‌های جامعه در مورد این بیماری به سبب فرضیه هایی در مورد دخیل بودن عامل مولد این بیماری در یک بیماری انسانی به نام کرون[2] رو به افزایش است. با توجه به سخت بودن جداسازی عامل فرضی بیماری کرون از بافتهای انسانی و عدم وجود مدل های حیوانی مناسب، جای تعجب نیست که هنوز عامل اصلی بیماری کرون شناسایی نشده است.

---

[1] - *John's disease*
[2] - *Crohn disease*

بیماری یون در بین حیوانات اهلی در سطح جهان شایع است و اثر قابل ملاحظه‌ای بر اقتصاد جهانی دارد. خسارات این بیماری به تنهایی در آمریکا سالانه بالغ بر ۱.۵ میلیارد دلار برآورد شده است. بیماری در چند دهه اخیر خسارتهای شدیدی را در ارتباط با کاهش تولید شیر، کاهش وزن، ناباروری، حذف زود هنگام دام از گله، اشاعه آلودگی، کاهش راندمان غذایی، هزینه های کنترل و پیشگیری، افزایش هزینه درمان و مرگ و میر وارد آورده است. دامهای مبتلا منابع بالقوه گسترش بیماری می باشند زیرا مقادیر زیادی باکتری مولد را از طریق مدفوع در محیط پخش می کنند. از آنجا که باکتری دردام‌های مبتلا به داخل شیر ترشح می شود، شناسایی دام های آلوده به منظور ریشه کنی وکنترل کامل بیماری یون امری بسیار ضروری است.

توسعه و بهینه‌سازی روش‌های تشخیصی خاص، حساس و سریع برای تشخیص مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس در کنترل بیماری یون امری ضروری است که به لحاظ اقتصادی در مزارع حیوانات مهم می باشد. با توجه به خسارات حاصل از این بیماری و نیز چند مرحله‌ای بودن آن، روشی برای تشخیص این بیماری مناسب است که آن را در مراحل اولیه شناسایی کند. لذا اهمیت تکنیک‌های تشخیصی سریع و دقیق در تشخیص به موقع بیماری مزمن فوق از مدفوع گاوهای آلوده(چه با علائم و چه بدون علائم بالینی) که دارای دوره کمون حتی تا ۲ سال هم می‌تواند باشد، از واگیری و انتقال آن به سایر دام ها می‌تواند جلوگیری کند. همچنین مطرح شدن بیماری کرون در انسان که سلامت جامعه انسانی را تهدید می کند و ارتباط تنگاتنگ آن با بیماری یون نیز اهمیت استفاده عملی ازاین تکنیک‌ها را در این مورد صد چندان می کند.

۱-۲- اهداف تحقیق

با توجه به عدم وجود آزمون تشخیصی سریع و قابل کاربرد در سطح کشور و نیز میزان شیوعی که این بیماری در سطح گله‌های گاو شیری دارد، نیاز فراوانی به کاربرد روش‌های جدید جهت شناسایی این

بیماری احساس می‌شود. به همین جهت در این مطالعه سعی می‌شود روش نوین ملکولی *quantitative Real-time PCR* جهت بررسی تغییرات جمعیت باکتری مایکو باکتریوم پاراتوبرکلوزیس توسعه یابد، تا یک روش کمی‌سازی سریع و قابل اطمینان جهت بررسی سطح آلودگی در گله‌های کشور معرفی گردد.

در حال حاضر تنها روش کمی که در زمینه تشخیص‌های ملکولی میکروارگانیسم ها مورد استفاده واقع می شود، روش*Real-time PCR* می‌باشد. البته این روش نیز مانند سایر روش‌ها مشکلات و مسائل خاص خود را دارد که بایستی به آن توجه داشت تا نتایج کمی به دست آمده از آن قابل اعتماد باشد.

انجام این آزمایش می‌تواند منجر به شناسایی زودتر محصولات آلوده گردد و اقدامات کنترل کردن این آلودگی‌ها سریعتر انجام گردد تا از اشاعه آن به کل محصولات جلوگیری گردد. همچنین به سبب اهمیت روزافزون امنیت غذایی ونیز نقش احتمالی این باکتری در ایجاد بیماری کرون در انسان از طریق لبنیات مصرفی به نظر می‌رسد که انجام این مطالعه ضروری است. در نهایت این تحقیق مقدمه‌ای برای مطالعات آینده خواهد شد تا میزان حساسیت دام‌ها نسبت به تعداد باکتری موجود در مدفوع یا شیر سنجیده شود تا بتوان تصمیم‌گیری دقیق‌تری در این موضوع اتخاذ نمود.

فصل دوم

۲- بررسی منابع

۲-۱- جمعیت میکروبی مایکوباکتریوم آویوم

از نظرطبقه‌بندی مایکوباکتریها متعلق به جنس مایکوباکتریوم[1]درخانواده مایکوباکتریاسه[2]و طبقه اکتینو میستال‌ها[3] می‌باشند، که گروهی از مهمترین پاتوژن‌های انسانی و حیوانی را شامل می‌شوند. از دیگر اعضا این خانواده به طور مثال می‌توان به مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اشاره کرد. طبقه اکتینومیستال‌ها شامل گروه بزرگ و متعددی از میکروارگانیسم‌ها می باشد اما مایکوباکتریها به آسانی با توجه به توان آنها در سنتز اسید میکولیک که در دیواره سلولی آنها یافت می شود، قابل تمایز می باشند. مایکوباکتریها **از نظر** باکتریایی موجوداتی هوازی، میله ای شکل و داخل سلولی اختیاری و فاقد حرکت می باشند (راستوجی و همکاران، ۲۰۰۱).

مایکوباکتریوم‌ها را نمی‌توان در گروه باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی قرارداد. در واقع روش رنگ‌آمیزی گرم در طبقه‌بندی آنها باارزش نیست، چون استفاده ازرنگ‌های قلیایی حتی بدون ید موجب تثبیت رنگ در باکتری می‌گردد ورنگ ایجاد شده توسط الکل یا اسید از بین نمی‌رود و به همین دلیل آنها را

---

[1] - *Mycobacterium*
[2] - *Mycobacteriaceae*
[3] - *Actinomycetales*

اسید-فاست(مقاوم در برابر اسید) می‌نامند و این خاصیت به علت وجود موم در ساختمان باکتری است. رنگ آمیزی اختصاصی مایکوباکتریوم‌ها ذیل-نلسون نام دارد. مایکوباکتریوم از نظر و یژگی‌های آنتی ژنیک، بیوشیمیائی ومورفولوژیک، شبیه سایر مایکوباکتریاسه‌ها می‌باشد. همچنین این ارگانیسم، رشد بسیار کندی نیز دارد (سلطانی، ١٣٨٦).

بسیاری از گونه های مایکوباکتری، مانند مایکوباکتریوم آویوم، هم در جمعیت های انسانی و هم در جمعیت های حیوانی بیماری‌زا هستند. می توان گونه مایکوباکتریوم آویوم را براساس آنالیزهای بیوشیمیایی و نیز *DNA*، متناظر با بیماری‌زایی و گستره میزبان‌ها به سه زیر گونه تقسیم کرد:

مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم *(Mycobacterium avium subspecies avium)*، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیکوم *(Mycobacterium avium subspecies silvaticum)* و مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*).

مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس در نشخوارکنندگان موجب عفونت روده که معمولاً با نام بیماری یون شناخته می‌شود، می‌گردد. به سبب نفوذناپذیری زیاد دیواره سلولی مایکوباکتریوم‌ها، آنها تا حد زیادی در مقابل صدمات فیزیکی و شیمیایی مقاوم می‌باشند (روسل، ١٩٩٦). این امر به *MAP* اجازه می-دهد تا در محیط برای مدت‌های طولانی زنده بماند که عاملی مهم در شیوع بیماری یون می‌باشد.

تحلیل ژن‌های *rRNA (rDNA)* در مایکوباکتریوم‌ها موجب تفکیک این جنس به دو دسته مجزا شده است. این دسته بندی منطبق بر دسته بندی سنتی به دو گروه تندرشد (غیر بیماریزا) و کندرشد (بیماریزا) می باشد. مایکوباکتریوم‌های تند رشد دارای دو نسخه از ژن‌های *rRNA* می‌باشند در حالی که مایکوباکتریوم‌های

کند رشد مثل مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم و مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس فقط یک نسخه از این ژن‌ها را دارا می‌باشند (چیودینی، ۱۹۹۰).

۲-۱-۱- طبقه‌بندی

سلسله *(Kingdom)* : باکتری *(Bacteria)*

شاخه *(Phylum)* : اکتینوباکتریا *(Actinobacteria)*

رده *(Class)* : اکتینوباکتریدا *(Actinobacteridae)*

راسته *(Order)* : اکتینومیستاله *(Actinomycetales)*

زیرراسته *(Suborder)* : کورینه باکترینا (*Corynebacterineae*)

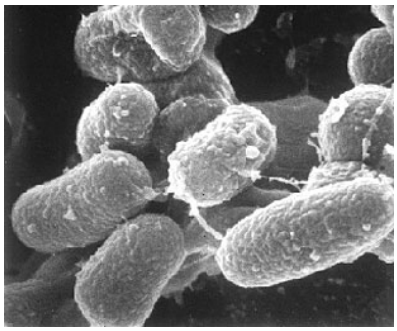
تیره *(Family)* : مایکوباکتریاسه *(Mycobacteriaceae)*

جنس *(Genus)* : مایکوباکتریوم *(Mycobacterium)*

گونه *(Species)* : مایکوباکتریوم آویوم *(Mycobacterium avium)*

زیر گونه *(Subspecies)* : مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس *(M. avium paratuberculosis)*

۲-۲- باکتری مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس



شکل ۲-۱: عکس میکروسکوپی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس.

Map باسیلی هوازی اجباری، گرم مثبت، مقاوم در برابر اسید و پاتوژن داخل سلولی اختیاری است. این باکتری مانند دیگر مایکوباکتری‌های بیماری‌زا نیازمند یک منبع آلی آهن می‌باشد. باکتری فاقد هاگ و کپسول می‌باشد و به خشکی و همچنین ترکیبات اسیدی و برخی عوامل ضدعفونی کننده مقاوم است و می تواند برای ماه‌ها در آب و خاک زنده بماند (معیر و نقیشه، ۱۳۸۳).

در سطح زیر گونه‌ای می توان از نظر فنوتیپی مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس را به لحاظ وابستگی آن به مایکوباکتین از مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم و مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیکوم تشخیص داد. *Map* می تواند بیش از یک سال در مدفوع و خاک و بسته به دما و *PH* بین ۹ تا ۱۷ ماه در آب زنده بماند. مقاومت دمایی باکتری یکی دیگر از عوامل حیات آن است که احتمالاً در انتقال بیماری به انسان اهمیت دارد. تیمار دمایی ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تمامی جدایه‌های مایکوباکتریوم بوویس را از بین می‌برد. در چنین شرایطی، ۵ تا ۹ درصد از جدایه‌های *Map* زنده خواهد ماند و در نتیجه احتمالاً نسبت به پاستوریزاسیون صنعتی مقاوم هستند (چیودینی و هرمون تایلور، ۱۹۹۳).

مایکوباکتریوم آویوم پاراتوبرکلوزیس نسبت به دیگر پاتوژن‌های موجود در شیر مانند گونه‌های لیستریامونوسیتوژن[1] و کوکسیلا[2] از مقاومت دمایی بالاتری برخوردار است (سونگ و کولینز، ۱۹۹۸). اخیراً تحقیقات در مورد بقای *Map* در فراورده‌های لبنی افزایش یافته است. باکتری *Map* را می توان از شیر خام گاوهایی که به صورت بالینی و تحت بالینی به یون مبتلا هستند جدا کرد (استریتر و همکاران، ۱۹۹۵). همچنین می‌توان *DNA* مربوط به *Map* را در شیرهای پاستوریزه یافت (میلار و همکاران، ۱۹۹۶)

[1] - *Listeria monocytogen*
[2]- *Coxiella*