استمارة مستخلصات رسائل واطاريح الماجستير والدكتوراه في جامعة البصرة

الكلية: الطب البيطري
اسم الطالب: كوثر كاظم جبر
القسم: الاحياء المجهرية والطفيليات البيطرية
اسم المشرف : أ. د. فوزية علي عبد الله
أ. م. د. رشا منذر عثمان
التخصص: احياء مجهرية بيطرية
الشهادة: دكتوراه

عنوان الرسالة أو الأطروحة

اكتشاف دور بكتريا نظير السل الطيري ***Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*** في إمراضية المناعة الذاتية في الابقار والانسان

ملخص الرسالة او الاطروحة

الخلاصـــة

مرض جونز او نظير السل هو مرض مزمن تسببه بكتريا نظير السل الطيري يصيب المجترات بشكل واسع مؤديا الى خسائر اقتصادية هائلة في ارجاء مختلفة من العالم. احد اهداف الدراسة هو تحديد او تقدير انتشار المرض في ابقار جنوب العراق سيرولوجيا وجزيئا. أحد الطرق التشخيصية التي استخدمت لتحديد مستوى الاجسام المناعية الخاصة بالبكتريا هواختبار الاليزا غير المباشر حيث استخدم لتشخيص وتقدير انتشار المرض سيرولوجيا في الابقار. 81 (51,9%) من مجموع 156 عينة بلازما ابقار أظهرت نتيجة موجبة ل فحص الاليزا ولم تظهر النتائج ارتباط م بعمر او نوع الابقار(مستوى المعنوية اكبر من0,05) .كأختبار تأكيدي تم اجراء تفاعل البلمرة التسلسلي المعتمد على تحديد القطعة المميزة لبكتريا نظير السل الطيري 900على عينات الحامض النووي المستخلصة من طبقة خلايا الدم البيضاء للأبقار التي أظهرت نتائج اليزا موجبة (عدد81).النتائج الموجبة لتفاعل البلمرة التسلسلي في الابقار ذات النسب المئوية السيرولوجية العالية لاختبار الاليزا (عدد 29 نسبة 35,8 %) .

.بواسطة تقنية PCR-RFLP فحصت اثنين من النيوكليوتيدات متعددة الأشكال (SNPs) للجين SLC11A1 لأجل ايجاد ارتباطها مع القابلية للإصابة بمرض Johne's في الابقار العراقية .اختبرت 50 بقرة ، وبينت النتائج أن في الموقع rs109453173 اثنين من الاشكال المهاجرة كهربائيا هما(electromorph 374) 'CC') و"CG (374، 293 و 81bp) ، كما أظهر الموقع rs109915208 اثنين من الاشكال المهاجرة كهربائيا، (344bp) TT") و CT ("344 و 215 و 129 bp).اختلاف الاشكال المهاجرة كهربائيا بين الابقار الموجبة و السالبة لوجودIS900 كان معنويا (p = 0.0031). لايوجد فرق احصائي معنوي بين هذه الاشكال في الموقع. بين الابقار الموجبة و السالبة لوجودrs109915208 IS900 .من أصل اثنين من SNPs للجين SLC11A1 كان ارتباط rs109453173 معنويا من الناحيه الإحصائية مع القابلية للاصابة بمرض Johne's. اظهر إالشكل الكهربائي المهجرCC الذي تم ملاحظته في موقع rs109453173 وجود ارتباط معنوي مع القابلية للإصابة بمرض Johne's في الأبقار ، وكان مقدار OR (7.875) في الابقار الموجبة IS900 مقابل الابقار 0 السالبةIS900 ، مما يشير إلى أن الأبقار التي لديها electromorph 'CC' لها استعداد للإصابة بمرض Johne's جونز . تم تحوير الكت المستخدم في تشخيص مرض جونز في الابقار لغرض استخدامه لقياس الاجسام المضادة الخاصة ببكتريا نظير السل الطيري في عينات بلازمة مرضى السكر من النوع الاول 10 (11,6%) من مجموع 86 من العينات اظهرت نتيجة موجبه ولم تظهر النتائج الإحصائية فروقات معنويه في تحديد نسبة الاجسام المناعية بين المجاميع اعتماداً على العمر والجنس لمرضى السكر من النوع الاول . اجري الفحص الجزيئي لـ 150 عينة حامض نووي مستخلص من طبقة الخلايا البيضاء لمرضى السكر من النوع الاول و70 عينة لغير المصابين الاصحاء بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي المعتمد على تحديد القطعة المميزة للبكتريا IS900 باستخدام البرايمر الخاص (314 زوج قواعد) . 31 (20,7%) من عينات الحامض النووي المضخمة لمرضى السكر النوع الاول و 26 (37,1%) من عينات الغير مصابين او مجموعة السيطرة اظهرت نتيجة موجبة للقطعة المميزة للبكتريا IS900 . استخدمت تقنية الـ PCR-RFLP لتحديد تعدد الاشكال في موقعين SNB للجين SLCA11 في خمسين عينة حامض نووي مستخلص من طبقة الخلايا البيضاء لـ (25 مريض سكر نوع اول موجب لـ IS900 و25 شخص غير مصاب سيطرة سالب لـ IS900) . في الموقع INT4 تم تحديد اثنين من الاشكال الكهربائية المهاجرة : A (624,310,515 زوج قواعد) وB (624 زوج قواعد) في حالة مرضى السكر بينما في الاشخاص الاصحاء اظهرت النتائج الاشكال الكهربائية : C (624,490,265زوج قواعد) و D (624,500,275 زوج قواعد) في نفس الموقع D543N اظهر ثلاث من الاشكال الكهربائية المهاجرة : E(202,75,151 زوج قواعد) و F (151,75) و G (202) زوج قواعد . النتائج الاحصائية اظهرت ان الشكل الكهربائي A للموقع INT4 له علاقة معنوية لقابلية الاصابة ببكتريا نظير السل الطيري ومرض السكر من النوع الاول (OR : 17,0000 ، CI : 0,902 - 320,382 ، P : 0,0223) بينما الشكل C في نفس الموقع له علاقة معنوية بالمقاومة للاصابة بالبكتريا ومرض السكر . (OR : 0,0484 ، CI : 0,0026 - 0,9010 ، P : 0,0424) لوحظ الانتشار العالي للحامض النووي الخاص ببكتريا نظير السل الطيري في طبقة الخلايا البيضاء لمرضى السكر والاستجابة المناعية لهم لانتجين البكتريا مقارنة بالأشخاص الاصحاء اضافة الى علاقة تواجد الحامض النووي للبكتريا مع الشكل الكهربائي المرحل A للموقع INT4 . كل هذه النتائج تدعم نظرية : ان بكتريا نظير السل الطيري من العوامل البيئية الخطيرة لتطور او ظهور مرض السكر من النوع الاول في الاشخاص الذين يمتلكون استعداد وراثي والذي ربما يشمل طفرة وراثية في جين SLCA11 .

تم تحديد القطعة الخاصة IS900 لبكتريا نظير السل الطيري في عينات الحامض النووي المستخلص من براز الابقار باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي النوعي (التقليدي) والكمي (اللحظي) من مجموع (25 عينة براز) جمعت من حقول متوقعة الاصابة في محافظة البصرة تم تحديد الحامض النووي الخاص بالبكتريا في 6 (24 %) من العينات باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي النوعي (التقليدي) ولكلا الجينين IS900 ، 16srRNA وفي 8 (32 %) من العينات باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي الكمي (اللحظي) للجين IS900 اظهر اختبار x2 نتيجة معنوية لمقارنة تحديد جينات البكتريا IS900 ، 16srRNA باستخدام كل من تفاعل البلمرة التسلسلي النوعي والكمي .

تم فحص 50 عينة حامض نووي مستخلصة من براز الابقار (التي اظهرت علامات سريرية والتي لم تظهر العلامات) بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي وباستخدام البرايمر الخاص للتحري عن تواجد بروتين الصدمة الحراري الخاص ببكتريا نظير السل الطيري . تم تشخيص البروتين في 3 (12%) من عينات الحامض النووي المضخمة لأبقار تظهر الاعراض بينما اظهرت مجموعة السيطرة نتائج سالبة ولم تظهر النتائج الاحصائية فروقات معنوية للمجاميع المفحوصة مقارنة بالمجاميع الموجبة.

خضعت العينات الموجبة لإجراء اختبار تسلسل النيوكليوتيدات وشجرة النشوء حيث استخدمت في الـ BLAST للمقارنة مع GAD65 الخاص بالإنسان. تم التحري عن احتمالية كون بروتين الصدمة الحراري الخاص ببكتريا نظير السل الطيري كمحفز لتحطم خلايا بيتا البنكرياسية الذاتي من خلال تمييز GAD65

الذاتي اظهر تحليل البلاست BLAST بين بروتين الصدمة الحراري الخاص ببكتريا نظير السل الطيري والـ GAD65 الخاص بالإنسان وجود 3 من مناطق الاحماض الامينية المشتركة وبنسبة تشابه 4,5%.

College : Veterinary Medicine **Name of Student: Kawther Kadhim Jebr**
Dep.: Veterinary Microbiology and Parasitology
Name of Supervisors : Prof . Dr. Fawzia A. Abdulla **Assist prof. Dr.Rasha M. Othman**
Certificatte: Ph. D. **Specialization: Veterinary Microbiology**

Tital of Thesis

Exploring The Role of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in The athogenesis of Autoimmunity in Animals and Human

Abstract of Thesis

Summary

John's disease or paratuberculosis is a chronic mycobacterial infection that affects ruminants, adversely, leading to huge economic losses throughout the world. The estimation of sero-prevalence and molecular confirmation of this disease in the cattle population of South-Iraq were from the objectives of this study. One of the diagnostic tools used to detect an antibody in plasma samples was the Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay, indirect-ELISA was used to diagnose and estimate the sero-prevalence of paratuberculosis in cattle. Out of 156 bovine plasma samples, 81 (51.9%) were positive and this MAP-seroprevalence is not significantly connected to age or breed of cows (P>0.05).

In this study, a PCR-based detection of IS900, distinct insertion sequences of MAP from the buffy coat of seropositive cattle (n = 81) were used as a confirmative diagnosis. The positive PCR-based detection of IS900 was observed in animals having high S:P% ELISA values (n=29 :35.8%).

By Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), two single nucleotide polymorphisms (SNPs) of SLC11A1 gene were tested for finding their association with susceptibility to bovine Johens disease in Iraqi cattle. A total of 50 cows were tested, their result revealed that at rs109453173 locus two electromorph 'CC' (374 bp) and 'CG' (374, 293 and 81 bp).The rs109915208 locus also showed two electromorph, 'TT (344bp) and 'CT' (344, 215 and 129 bp) . The differences in the electromorph between IS900 positive and negative cows were found to be statistically significant (p = 0.0031). No significant difference in these electromorph at SNP locus rs109915208 between IS900 positive and negative cows. Out of two SNPs from SLC11A1 gene, rs109453173 had a significant association with the susceptibility to Johne's disease. The CC' electromorph observed at rs109453173 locus showed a significant association with the susceptibility to bovine paratuberculosis in cows. The OR of 'CC' in'IS900 positive versus IS900 negative cattle was7.8750, suggesting that cows having 'CC'were susceptabile to JD compared to CG electromorph.

A commercial kit used for diagnosis of paratuberculosis in cattle was adapted for use on humans to measure anti-MAP IgG in plasma from T1DM patients. The ELISA results revealed that MAP antibodies were detected in 10 out of 86 (11.6%) T1DM samples and there was no significant difference in the detection rate of anti-MAP between the two age groups and sexes of TID patients (P>0.05).

150 T1D subjects and 70 healthy controls were tested for the presence of MAP DNA using IS900- (PCR) by using BA5: BA6 primers. The amplified product IS900 gene sequence (314 bp) were detected in 31 (20.7%) out of 150 T1D patient buffy coat samples and in 26 (37.1%) of 70 healthy controls. The

PCR RFLP was used to detect the polymorphism in two SNPs from SlC11A1 gene in 50 buffy coat samples (25diabetic and25 control), at INT4 locus two electromorph A (624,310and515bp) B (624 bp) in case of diabetic patients while control individuals showed two electromorph,C (624,490and 265bp) and D (624,500 and 275bp). The D543N locus showed three electromorph, E (202,75and151 bp) , F (151 and75bp) and G (202) The Fisher's exact and OD ratio tests revealed that out of two SNPs from SLC11A1 gene, INT4 A electromorph had the significant association with the susceptibility to MAP infection and Type I diabetes disease (OR:17.0000 ; CI : 0. 90 2 to 320.382 ;P:0.0223) while C electro morph at SNP INT4 locus showed significant association with the resistance to MAP infection and Type I diabetes disease (OR: 0.0484 ;CI: 0.0026 to 0.9010;P: 0.0424), Significant association between the presence of MAP DNA and T1D (P = 0.0129). Higher MAP DNA prevalence in leukocyte containing buffy coat layer samples from T1D patients and a positive immune response towards MAP antigen in T1D patient's plasma were observed compared with healthy control subjects. Moreover, an association between MAP DNA presence and SLC11A1 SNP INT4 electromorph A (P=0.0223). These findings taken together support the hypothesis of MAP as an environmental risk factor for the development of T1D in genetically predisposed subjects, probably involving a mechanism of Mutations in this gene lead to malfunction of the phagocytic cell membrane protein and a lack of phagocytosis of the pathogen leading to chronic infection and consequently to autoimmunity. Beside that mutant forms of SLC11A1 alter the processing or presentation of MAP antigens triggering thereby an autoimmune response in T1DM patients.

IS900 region of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) was detected in bovine fecal samples using real-time polymerase chain reaction and conventional PCR, and study the agreement between these tests. A total of 25 bovine fecal samples were collected from herds considered positive for MAP, from Basrah governorates of lraq, MAP DNA was detected in 6 samples (24%) using conventional PCR(for both 16srRNA and IS900) and in 8 samples (32%) using real-time PCR(for IS900). The X^2 test was significant (X^2:0.153 DF:2 P: 0.92635) as result of comparative efficacy of 16S r RNA and IS900 sequence qualitative and quantitative PCR of IS900 gene cow fecal samples.

A total of 50 symptomatic and asymptomatic cows fecal samples were tested by MAPHsp65 PCR, sequencing analysis and phylogenetic tree. The present results revealed that 3(12%) symptomatic cows were positive and all healthy controls were negative with none statistically significant difference (P>0.05) between the two tested groups with respect to PCR positivity. The positive MAPHsp65 gene sequence used in blast analysis in compare to human *GAD65*.

In this study, the possibility of MAP *Hsp65* as a possible trigger for auto-destruction of beta cell through recognition of *GAD65* auto antigen was investigated. BLAST analysis between native MAP *Hsp65* and human *GAD65* revealed the identification of 3 amino acid

regions with 4.5% positive identity.