Archive of SID

شناسایی مولکولی *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* در گاوهای شیری شهرستان تنکابن (شمال ایران)

راضیه ساداتی*[۱]، مصطفی جعفرپور[۲]، علی ناظمی[۳]، امین برقی[۴]

۱*- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، باشگاه پژوهشگران جوان، تنکابن، ایران، صندوق پستی: ۴۶۸۱۷

۲و۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه بیولوژی، تنکابن، ایران، صندوق پستی: ۴۶۸۱۷

۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، باشگاه پژوهشگران جوان، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

razisadati@yahoo.com

چکیده

مطالعه حاضر اولین تلاشی است که در جهت شناسایی گاوهای آلوده به *Mycobacterium paratuberculosis* به روش تست یونین و PCR در شهرستان تنکابن انجام می‌گیرد. Paratuberculosis عفونت مزمن روده ای در نشخوارکنندگان می‌باشد و عامل بیماری، به طرق مختلفی از دام آلوده به محیط انتشار پیدا می‌کند. شیر یکی از منابع مهم برای حضور باکتری و به عنوان عاملی برای گسترش آلودگی می‌باشد. همچنین به دلیل ارتباط احتمالی که بین عامل بیماری یون و بیماری کرون در انسان مطرح است، بررسی حضور باکتری در شیر، می‌تواند شاخص مهمی در تعیین میزان گسترش این عفونت در جوامع دامی و احیاناً انسانی باشد. در این مطالعه ابتدا ۹۰ رأس گاو شیری توسط تست یونین مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج تست به صورت ۳ مورد مثبت، ۲۳ مورد مشکوک و ۶۲ مورد منفی به دست آمد. سپس نمونه‌ها به روش nested PCR بررسی شده و از دو جفت پرایمر اختصاصی برای تکثیر قطعه ی bp ۱۹۴ موردنظر استفاده شد. طبق نتایج بدست آمده شیوع آلودگی در ۳ منطقه مورد نظر متفاوت بوده و رنجی بین ۴/۲ تا ۷/۷٪ را نشان داد. همچنین مشخص شد تست یونین قابلیت شناسایی دام‌های بیمار را از بین موارد مشکوک ندارد در نتیجه، استفاده از تکنیک PCR جهت شناسایی دقیق دام‌های بیمار امری ضروری به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: ایران، تنکابن، گاوهای شیری، *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* .

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری یون (Johne´s Disease)، نوعی آنتریت عفونی و مزمن در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی می‌باشد که توسط *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) ایجاد می‌گردد. این بیماری، مهلک و مسری بوده به طوری‌که آن را تورم روده مزمن میکروبی نیز می‌نامند. بیماری به تدریج سبب تخریب بافت روده دام‌های آلوده شده که با علائم لاغری مفرط، اسهال شدید و دائمی، کاهش شیر و نازائی در گاو مشخص می‌شود و سرانجام مرگ دام‌های آلوده را درپی دارد. همچنین این بیماری خسارت‌های بیشماری به صنعت و اقتصاد کشورها وارد می‌نماید. جایگاه ایجاد عفونت در روده و گره‌های لنفاوی است ولی این باکتری داخل سلولی، توسط ماکروفاژها به قسمت‌های دیگر بدن نیز انتقال پیدا می‌کند. انتشار *M.paratuberculosis* به محیط از طریق مدفوع، شیر، آغوز و منی صورت گرفته و در موارد شدید، از طریق شیر دفع می‌گردد (۱و۷). بنابراین شیر یکی از منابع مهم برای حضور باکتری می‌باشد. همچنین به دلیل ارتباطی که بین عامل بیماری یون و بیماری کرون در انسان مطرح است، توجه به بهداشت صنعت شیر ضروریست. کرون عفونت مزمن گرانولومایی روده در انسان است و دارای اتیولوژی پیچیده‌ای می‌باشد. با شناسایی *M. paratuberculosis* در روده برخی افراد که هیچگونه سابقه بیماری التهاب روده‌ای نداشتند مشخص شده که این باسیل اسید فست از طریق مصرف مواد غذایی از جمله شیر وارد بدن افراد مبتلا شده است، این مسئله نقش بالقوه شیر و فرآورده‌های مصرفی آن را در انتقال باکتری از دام به انسان بیان می‌کند (۱۹). بر طبق تحقیقات صورت گرفته در گاوهایی که در مرحله بالینی بیماری قرار دارند، تعداد سلول‌های *M. paratuberculosis* منتشر شده در شیر کمتر از ۱۰۰ CFU/ml بوده و در گاوهای آلوده بدون علائم کلینیکی ۲ تا ۸ CFU/ml می‌باشد. بنابراین یکی از مشکلات اساسی، شناسایی دام‌های آلوده فاقد علائم کلینیکی می‌باشد، زیرا این دام‌ها با توجه به طولانی بودن دورهٔ کمون بیماری که عموماً ۲ تا ۱۰ سال طول می‌کشد، از ناقلین اصلی بیماری یون محسوب می‌شوند (۸و۱۲). در نتیجه به دلیل خسارات جبران ناپذیری که بیماری یون به صنعت گاوداری و نیز بهداشت جامعه انسانی وارد می‌کند، استفاده از تست‌های دقیق و کارآمد برای شناسایی بیماری ضروری به نظر می‌رسد. کشت میکروبی یکی از روش‌های رایج ولی دشوار و بسیار کند بوده و به دلیل نیازهای پیچیدهٔ غذایی باکتری و مدت زمان انکوباسیون طولانی برای رشد *M. paratuberculosis* (شیر ۱۸ تا ۵۲ هفته و مدفوع ۱۲ هفته)، ممکن است تا ۶ ماه به طول انجامد. در ایران تست غربالگری برای شناسایی عفونت پاراتوبرکلوزیس وجود ندارد و استراتژی سازمان دامپزشکی کشور بر مبنای شناسایی و حذف دام‌های آلوده به بیماری‌هایی از جمله تب مالت و سل گاوی طراحی شده است. در نتیجه در این مطالعه از تست توبرکولین مقایسه‌ای به عنوان تست غربالگر اولیه برای شناسایی گاوهای آلوده به پاراتوبرکلوزیس استفاده گردید. با توجه به اینکه این تست در گزارش موارد مشکوک از حساسیت و ویژگی کافی جهت شناسایی دام‌های آلوده برخوردار نیست، بهره‌گیری از یک متد سریع، دقیق و با حساسیت بالا مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ضروری به نظر می‌رسد (۴و۱۵).

www.SID.ir

Archive of SID

هدف از این مطالعه بررسی شیوع عفونت پاراتوبرکلوزیس در گاوهای شیری مناطق مختلفی از شهرستان تنکابن به روش IS900 nested-PCR و همچنین مقایسه نتایج بدست آمده از این روش با تست جلدی Johnin بود.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۰ گله شیری از ۳ منطقه مختلف شهرستان تنکابن (تنکابن، سلیمان آباد، نشتارود) انتخاب گردید که تاکنون آلودگی گاوهای شیری به عفونت پاراتوبرکلوزیس در این منطقه بررسی نشده بود. در این مطالعه از تست توبرکولین مقایسه‌ای به عنوان تست پایه استفاده شد. به این صورت که، پس از تزریق دو نوع توبرکولین مرغی یا Johnin (حاوی عصارهٔ *M. paratuberculosis*) و پستانداری (حاوی عصارهٔ M.bovis) به گاوها و قرائت تست پس از ۴۸ ساعت، گاوهایی که دارای افزایش ضخامت محل تزریق نسبت به توبرکولین پستانداری بودند، برای مرحله نمونه‌گیری انتخاب شدند.

نمونه‌گیری از شیر ۹۰ گاو در طی ۴ ماه (خرداد تا شهریور ۸۸) به عمل آمده، سپس نمونه‌ها با آزمایش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه‌گیری از گاوهای شیری به صورت دستی و با رعایت نکات بهداشتی صورت گرفت. ابتدا برای جلوگیری از آلودگی، نوک پستان با الکل ۷۰٪ شستشو داده شد. نمونه شیر (۳۰-۲۰ ml) در لوله‌های سانتریفوژ ۵۰ ml استریل جمع‌آوری شده و توسط محفظه یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. لوله‌ها در ۴۰۰۰ rpm برای ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و رسوب باقی مانده با phosphate buffered saline (PBS ,pH 7.3) شستشو داده شد.

استخراج DNA *M. paratuberculosis* از نمونه‌های شیر توصیف شده توسط Corti و Stephan (۵) با اعمال تغییرات جزئی انجام گرفت. پس از vortex سوسپانسیون، ۳۰۰ µl از آن به لوله‌های ۱/۵ اپندورف انتقال یافته و نمونه‌ها برای ۲۰ دقیقه در dry plate ۹۵°C قرار گرفتند. پس از اضافه کردن ۲۰ µl پروتئیناز K (۱ mg/ml)، نمونه‌ها vortex شده و برای ۲۰ دقیقه در dry plate ۶۵°C و ۹۵°C قرار داده شدند. به هر نمونه ۲۰۰µl mycobacterial lysis buffer (0.1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA) اضافه کرده و پس از قرار گرفتن در dry plate ۶۵°C، ۴۰۰µl فنل به لوله‌ها اضافه شد و پس از سانتریفوژ لایه‌ی آبی به لوله جدید انتقال یافت. مشابه همین مرحله با phenol/ choloroform/ isoamylalcohol (25:24:1) انجام شده و به لایه‌ی آبی نهایی ۸۰۰ µl اتانول ۹۶٪ اضافه شد. بعد از میکس کامل، رسوب DNA در ۲۰°C- برای ۳۰ دقیقه قرار داده شد و پس از سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰ rpm، رسوب با اتانول ۷۰٪ خنک شستشو داده شده و بعد از خشک شدن، در ۱۰ µl آب استریل حل گردید.

در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، پروتوکل IS900 nested PCR توصیف شده توسط Stabel (۱۶) با اعمال تغییرات جزئی استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر گردیده است. مقدار (۳ میکرولیتر) از DNA خالص شده به عنوان الگو برای IS900 nested PCR استفاده شد. ترکیب واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR شامل (۱۰ pmol) از

www.SID.ir

Archive of SID

هر کدام از پرایمرها، ($MgCl_2$ ۱ mM)، (۲۰۰ µM) dNTPs، (۲/۵ U) Smar Taq polymerase و بافر (۵۰ mM KCl، ۵۰ mM Tris-HCl) بود. برنامه PCR با ۳ دقیقه دمای اولیه واسرشته شدن ۹۵°C و ۳۵ چرخه، هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه دمای واسرشته شدن C °۹۴، ۳۰ ثانیه دمای چسبیدن ۶۲°C و ۴۵ ثانیه دمای تکثیر ۷۲°C و سپس ۷ دقیقه دمای تکثیر نهایی ۷۲°C، انجام شد.

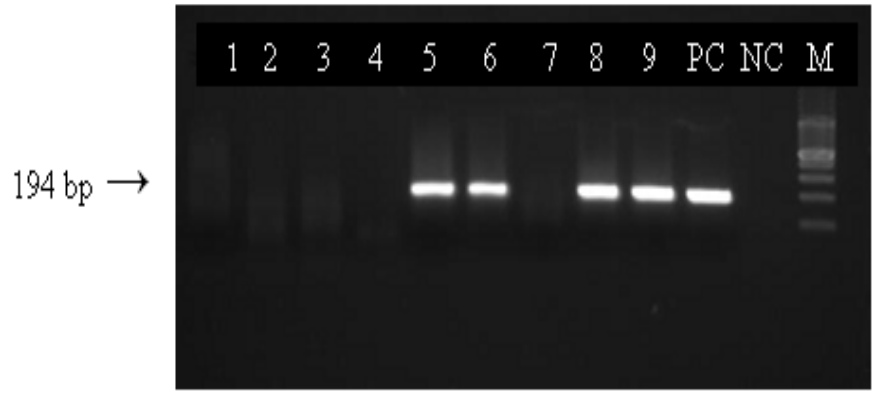
جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در IS900 nested PCR

Target gene	Type	Sequence 5′→3′	Length of product (bp)
Single PCR	Forward	GTTCGGGGCCGTCGCTTAGG	400
	Reverse	GAGGTCGATCGCCCACGTGA	
Nested PCR	Forward	GCTTAGGCTTCGAATTGCC	194
	Reverse	CTCCGTAACCGTCATTGTCC	

مقدار (۵ میکرولیتر) از محصول PCR به عنوان DNA ی الگو با ترکیبات ذکر شده قبلی، برای nested PCR مورد استفاده قرار گرفت. برنامه PCR با ۲ دقیقه دمای اولیه واسرشته شدن ۹۴°C و ۲۵ چرخه، هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در ۵۸°C، ۴۰ ثانیه در ۷۲°C و سپس ۷ دقیقه دمای تکثیر نهایی ۷۲°C انجام گرفت. محصول nested PCR با الکتروفورز روی ژل ۲/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

محصول PCR تکثیر شده توسط پرایمرهای اختصاصی *M. paratuberculosis*، با آنالیز ژل الکتروفورز تک باند ۱۹۴ bp را برای نمونه‌های مثبت شیر نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱: ردیف‌های ۵، ۶، ۸، ۹ محصول PCR نمونه‌های مثبت شیر با طول ۱۹۴ bp و ردیف‌های ۱-۴ و ۷ نمونه‌های منفی شیر
PC: کنترل مثبت NC: کنترل منفی M: شناساگر مولکولی (۱۰۰ bp)

www.SID.ir

Archive of SID

از ۹۰ رأس گاو مورد مطالعه در ۳ منطقه مختلف شهرستان تنکابن، نتایج تست یونین به صورت ۳ مورد مثبت، ۲۳ مورد مشکوک و ۶۲ مورد منفی به دست آمد.

پس از انجام IS900 nested-PCR بر روی نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده، ۵ نمونه از ۹۰ نمونه شیر مثبت شد که طبق نتایج مندرج در جدول ۲ شیوع آلودگی در این مناطق متفاوت می‌باشد و رنجی بین ۴/۲ تا ۷/۷٪ را نشان داد. همچنین مشخص شد که موارد مثبت تست توبرکولین دارای نمونه شیر با PCR مثبت و از موارد مشکوک، ۲ نمونه دارای PCR مثبت هستند. بنابراین به جرأت می‌توان گفت که تست توبرکولین در موارد مثبت و با وجود علائم بالینی در دام‌ها، از حساسیت کافی برخوردار می‌باشد، ولی در موارد مشکوک، بنابر اهمیت این بیماری برای شناسایی دقیق دام‌های آلوده و حذف آن‌ها از گله‌های سالم، نمی‌توان تنها به این تست اکتفا کرده و در کنار آن انجام PCR الزامیست. مقایسه نتایج تست یونین و nested-PCR در گاوهای شیری مطالعه شده در جدول ۳ آمده است.

جدول ۲: شیوع فراوانی پاراتوبرکلوزیس در گاوهای شیری ۳ منطقه مختلف شهرستان تنکابن

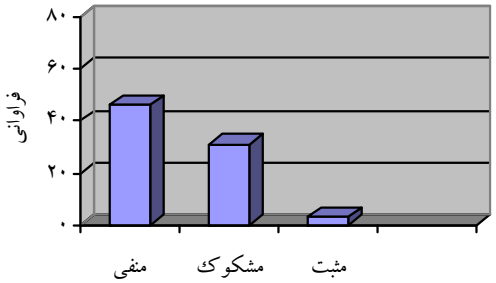
نسخه PCR	مثبت		منفی	
فراوانی / منطقه	تعداد	شیوع در گله	تعداد	شیوع در گله
تنکابن	۲	٪۴/۲	۴۵	٪۹۵/۷
سلیمان آباد	۲	٪۶/۶	۲۸	٪۹۳/۳
نشتارود	۱	٪۷/۷	۱۲	٪۹۲/۳

جدول ۳: مقایسه نتایج PCR و تست یونین

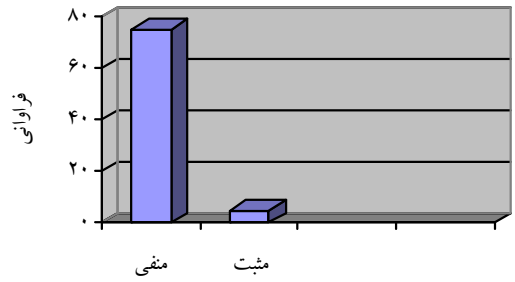
نوع تست	یونین گاوهای شیری			
تست یونین / PCR	مثبت	مشکوک	منفی	کل
مثبت	۳(٪۱۰۰)	۲(٪۸)	۰	۵
منفی	۰	۲۳(٪۹۲)	۶۲(٪۱۰۰)	۸۵
کل	۳	۲۵	۶۲	۹۰

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۱: فراوانی نسبی پاراتوبرکلوزیس بر حسب تست یونین



نمودار۲: فراوانی نسبی پاراتوبرکلوزیس بر حسب PCR

بحث

با توجه به زیان‌هایی که بیماری یون به صنایع دامی و بهداشت جوامع انسانی وارد می‌سازد، توجه به جایگاه آن و تلاش برای ریشه کن کردن بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. دفع *M. paratuberculosis* از طریق شیر و مدفوع از تمام گاوهای مبتلا (با علائم و تعدادی بدون علائم بالینی) صورت می‌گیرد که باعث آلودگی بستر، علوفه، آب آشامیدنی و در نهایت انتشار آلودگی به تمام گله می‌شود (۱۲و۱۸). شیوع بیماری یون در اثر صدور گاوهای نژاد خالص و اصیل آلوده، در بسیاری از کشورهای دنیا گسترش یافته است، به طوری‌که تحقیقات در ناحیه Wisconsin آمریکا نشان داده که حدود ۳۴٪ از گاوهای شیری این منطقه آلوده به عفونت پاراتوبرکلوزیس هستند (۶و۱۰).

اهمیت تشخیص بیماری به این نکته مهم باز می‌گردد که، بسیاری از گاوهای مبتلا، علائم و نشانی‌های بالینی بارزی از خود نشان نداده و تنها دچار ضعف و لاغری می‌باشند. در عین حال دام‌هایی نیز یافت می‌شوند که در ظاهر لاغر و نحیف بوده و حتی در کالبدگشایی ضخامت و چین خوردگی روده را نشان می‌دهند اما مبتلا به یون نمی‌باشند. بدین لحاظ اکتفا به علائم بالینی دام به تنهایی قابل اعتماد نبوده چنانچه نتایج این مطالعه در مورد گاوهای بررسی شده با تست یونین نیز این نکته را تأیید می‌کند زیرا که این تست قابلیت شناسایی دام‌های بیمار را از بین موارد مشکوک ندارد. در این روش با لمس کردن محل تزریق یونین پس از ۴۸ ساعت، گاوها به سه گروه منفی، مشکوک و مثبت تفکیک می‌گردند. تست زمانی منفی تلقی می‌شود که اختلاف ضخامت محل تزریق نسبت به توبرکولین پستانداری کمتر از ۲ میلی‌متر بوده و علائم بالینی مثل ادم، نکروز و حتی درد در محل مشاهده نگردد. زمانی که افزایش ضخامت پوست در حد ۴-۲ میلی‌متر باشد، تست مشکوک و هرگاه بیش از ۴ میلی‌متر باشد، حتی اگر علائم بالینی رویت نگردد جواب تست مثبت اعلام می‌شود.

البته تست یونین به دلیل ایجاد واکنش‌های مثبت و منفی کاذب به طور کامل قابل اطمینان نبوده و موارد تحت بالینی دارای حداقل حساسیت جلدی می‌باشند. در نتیجه در ایران استفاده از روش‌های مولکولی به عنوان تست تکمیلی کمک زیادی به سلامت گله‌های شیری و در نهایت بهداشت جامعه انسانی می‌نماید.

کشت و مشاهده باسیل‌های اسید فست در گسترش مدفوع، از روش‌های متداول و استاندارد برای شناسایی *M. paratuberculosis* می‌باشد، ولی به دلیل کند رشد بودن و نیازهای پیچیدهٔ غذایی باکتری، این آزمایش ممکن است تا چندین ماه به طول انجامد

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین این روش قابلیت شناسایی ۵۰٪ از گاوهای آلوده را دارد (۱۵و۱۷).

برای شناسایی *M. paratuberculosis* توسط PCR متداولترین تارگت IS900 می‌باشد (۷، ۸ و۱۰). برای این منظور مطالعات متعددی با استفاده از PCR برای شناسایی این باکتری در تانک‌های شیر صورت گرفته است از جمله مطالعهٔ Grant و همکارانش (۹)، بر روی ۲۲۴ نمونه از تانک شیر که توانستند شیوع عفونت را در United Kingdom ۷/۸٪ گزارش کنند. همچنین در مطالعهٔ مشابهی توسط Corti و Stephan (۵)،که در مناطق مختلفی از Switzerland انجام شد، ۲۷۳ (۱۹/۷٪) نمونه از مجموع ۱۳۸۴ نمونهٔ شیر دارای PCR مثبت بودند.

در ایران با وجود انجام مطالعات متعدد و پراکنده، آمار دقیقی از شیوع بیماری یون در دست نمی‌باشد. از جمله تحقیق صورت گرفته توسط Haghkhah و همکاران (۱۰) بر روی ۱۱۰ رأس گاو شیری که شیوع آلودگی را در منطقه شیراز ۲۳٪ اعلام کردند.

در گله‌هایی که بیماری در آن‌ها از طرق مختلف (بالینی، هیستوپاتولوژی و کشت) محرز شده است، تعداد موارد تحت بالینی به مراتب بیشتر از میزان شیوع بیماری به صورت بالینی است. این مسئله با توجه به نتایج تحقیق حاضر نیز به اثبات رسید چرا که از ۲۳ نمونه مشکوک شیر که فاقد علائم بالینی مشخصی بودند، ۲ نمونه دارای PCR مثبت شد که چنین دام‌هایی از عوامل مهم گسترش آلودگی در گله می‌باشند.

از آنجا که بیماری یون علاوه بر مشکلات بهداشتی، خسارت‌های اقتصادی زیادی نیز از جمله کاهش تولید شیر و گوشت، کاهش باروری، کشتار و تلفات، حذف بالغین و تولد گوساله‌های نارس را موجب می‌گردد، با این حال تست روتین و دقیقی برای شناسایی بیماری در ایران وجود ندارد. امید است در آینده با استفاده از روش‌های نوین مولکولی و انجام مطالعات گسترده بتوانیم در راستای شناسایی دقیق و ریشه کن کردن بیماری قدم برداریم.

www.SID.ir

سپاسگزاری

با تشکر از فرهاد موسی خانی (دپارتمان بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی کرج، ایران)، برای در اختیار گذاشتن *M. paratuberculosis* DNA به عنوان کنترل مثبت PCR و سازمان دامپزشکی شهرستان تنکابن که همکاری قابل توجهی در این پژوهش داشتند.

منابع

1. Anzaby, Y.; Tabatabayi, A.H. and Asgharzade, M., 2006. A survey of the infection status of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* dairy cattle using PCR and culture of Tabriz vegion Iran. Journal Veternary Science, 2, 397-310.
2. Bannantine, P.; Rosu, V.; Zanetti, S.; Rocca, S.; Ahmed, N. and Sechi, A., 2008. Antigenic profiles of recombinant proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in sheep with Johne´s disease. Veternary Immunology and Immunopathology, 122, 116- 125.
3. Buergelt, C.D. and Williams, J.E., 2004. Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. Journal Veternary, 82, 497-503.
4. Crossley, B.M.; Zagmutt-Vergara, F.J.; Fyock, T.I. and Whitlock, R.H., 2005. Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* by dairy cows. Veternary Microbiology, 107, 257-263.

Archive of SID

5. Corti, S. and Stephan, R., 2002. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland.BMC Microbiology, 2-15.
6. Fouad, A.K.; Osato, S. and Zaatari, E., 2001. Etiology of Crohn´s disease the role of Mycobacterium paratuberculosis. Molecular Medicine, 247-251.
7. Gao, A.; Odumeru, J.; Raymond, M. and Mutharia, L., and 2005. Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from bulk tank milk. Canadian Journal of Veternary Research, 69, 81-87.
8. Giese, S.B. and Ahrens, P., 2000. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. Veternary Microbiology, 77, 291-297.
9. Grant, I.R.; Ball, H.J. and Rowe, M.T., 2002. Incidence of *Mycobacterium Paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cow´s milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. Veternary Microbiology, 68, 2428-2435.
10. Haghkhah, M.; Ansari-Lari, M.; Novin-Baheran, A.M. and Bahramy, A., 2008. Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* by bulk tank milk PCR in Fars province (Southern Iran) dairy herds. Preventive Veternary Medicine, 86, 8-13.
11. Herthnek, D.; Saxmose, S.; Lindberg, A. and Bolske, G., 2008. A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in milk. Journal of Microbiological Methods, 75, 335-340.
12. Leroy, B.; Viart, S.; Trinchero, N.; Roupie, V.; Govaerts, M.; Letesson, J.J.; Huygen K. and Wattiez, R., 2008. Use of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* specific coding sequences for serodiagnosis of bovine Paratuberculosis. Veternary Microbiology, 4208-4214.
13. Singh, S.V.; Sohal, J.S.; Singh, P.K. and Singh, A.V., 2009. Genotype profiles of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* isolates recovered from animals, commercial milk, and human beings in North India. International Journal of Infectious Diseases, 775-781.
14. Slana, I.; Kralik, P.; Kralova, A. and Pavlik, I., 2008. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitve real time quantitative PCR and culture examination. International Journal of Food Microbiology, 128, 250-257.
15. Shama, G.; Singh, S.V.; Sevilla, I.; Singh, A.V.; Whittington, R.J.; Juste, R.A. and Kumar, S., 2008. Evaluation of indigenous milk ELISA with m-culture and m-PCR for the diagnosis of Bovine Johne´disease (BJD) in lactating Indian dairy cattle. Research in Veternary Science, 84, 30-37.
16. Stabel, J.R.; Wells, S.J. and Wagners, B.A., 2002. Relationships Between Fecal Culture, ELISA, and Bulk Tank Milk Test Results for Johne´s Disease in US Dairy Herds. Journal Dairy Science, 85, 525-531.
17. Whitlock, R.H.; Wells, S.J.; Sweeney, R.W. and Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne´s disease): sensitivity and specificity of each method.Veternary Microbiology, 77, 387-398.
18. Sweeney, R.W.; Whitlock, R.H. and Rosenberger, A.E., 1992. *Mycobacterium Paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. Journal Clinical Microbiology, 30, 166-171.
19. Uzoigwe, J.C.; Khaitsa, M.I. and Gibbs, P.S., 2007. Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosi* as a cause of Crohn´s disease. Epidemiology and Infection, 135, 1057-1068.

www.SID.ir