وضعیت آلودگی شیر گاو به *مایکوباکتریوم اویوم* زیر گونه *پاراتوبرکلوزیس* در گاوداری‌های سنتی منطقه مغان

منصور خاکپور[1*]، مسعود فردین[2]، هیوا احمدی[3]، آیدا نهضتی[4]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، اردبیل، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، دانش‌آموخته دوره دکتری دامپزشکی، تبریز، ایران.
۴- دانشگاه تبریز، دانشکده علوم پزشکی، دانش آموخته پزشکی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: Khakpour@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۰/۴/۱۱ پذیرش نهایی:۹۱/۳/۴)

Archive of SID

چکیده

مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس عامل بیماری یون است که یک بیماری مزمن غیرقابل درمان در تمامی نشخوارکنندگان می‌باشد و از نظر اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش با مراجعه به یازده گاوداری شیری سنتی شیری در منطقه مغان دام‌های موجود به دقت از نظر علائم بیماری یون و تاریخچه مورد بررسی قرار گرفتند و ۸۶ نمونه مدفوعی اخذ گردید. نمونه‌ها ابتدا به روش مشاهده مستقیم میکروسکوپی آزمایش شدند. سپس به صورت تصادفی ۲۰ نمونه از موارد مثبت و ۱۰ نمونه از موارد منفی در آزمایش مستقیم میکروسکوپی انتخاب و بعد از نمونه‌گیری شیر از دام‌های مربوطه، به وسیله آزمایش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایش مشاهده میکروسکوپیکی از مجموع ۸۶ نمونه تعداد ۵۱ (۵۹٪) نمونه مثبت و ۳۵ (۴۱٪) نمونه منفی تشخیص داده شدند. همچنین از ۲۰ نمونه مثبت تعداد ۱۹ (۹۵٪) مورد و از ۱۰ نمونه منفی، ۳ (۳۰٪) مورد در PCR نتیجه مثبت نشان دادند. نتایج حاصله بیانگر ارتباط مستقیم بین آلودگی مدفوع و شیر در دام‌های عفونی است. همچنین با در نظر همبستگی نتایج آزمایش مشاهده میکروسکوپیکی نمونه مدفوع و PCR در نمونه شیر، می‌توان از آزمایش میکروسکوپیکی به عنوان ارزیابی اولیه برای تعیین آلودگی شیر به _مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس_ استفاده نمود. با توجه به نتایج پژوهش حاضر که نشان‌دهنده آلودگی بالای شیر با _مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس_ می‌باشد و با توجه به ارتباط احتمالی این باکتری با بیماری کرون انسان، لزوم توجه بیشتر در این مورد احساس می‌شود

واژه‌های کلیدی: **مغان، بیماری یون، شیر، _مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس_**

www.SID.ir

مقدمه

بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس (Paratuberculosis) یک بیماری مزمن غیرقابل درمان در تمامی نشخوارکنندگان بوده و از نظر اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد. این بیماری انتشار جهانی دارد و شیوع آن در برخی از کشورها در حال افزایش می‌باشد. تاکنون وقوع این بیماری در گاو از استان‌های کشور ما نیز گزارش شده ولی در مورد میزان وقوع و فراوانی این بیماری در گاو، گوسفند و بز در مناطق مختلف کشور آمار دقیقی وجود ندارد (Tabatabayi, 2001). اما با توجه به شواهد موجود، بیماری در بسیاری از نواحی کشور بخصوص در گله‌های عشایری استان فارس رو به افزایش می‌باشد با توجه به علائم بالینی بیماری یون که منجر به کاهش تولید و بهره‌وری در حیوانات پرورشی می‌شود و از طرف دیگر غیرقابل درمان بودن بیماری این امر خسارات جبران ناپذیری را بر سیستم دامپروری کشور وارد می‌نماید (Tabatabayi, 2001). عامل بیماری *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* (*Mycobacterium avium paratuberculosis*) می‌باشد که در شیر، مدفوع، منی، کبد و جنین گاو آلوده موجود باشد. در این میان نقش بالقوه شیر در انتقال عامل بیماری یون از مادران آلوده به گوساله‌ها و همچنین انتقال آن به سایر گاوها در گاوداری‌های سنتی و صنعتی به عنوان یکی از مهمترین عوامل گسترش آلودگی شناخته شده است (Anzabi, Tabatabayi, 2001; 2005). نکته بسیار مهم دیگر نقش باکتری ایجاد کننده بیماری یون در بیماری کرون انسانی (Crohn's disease) می‌باشد. و هر چند که تاکنون علت اساسی برای بیماری کرون بیان نشده ولی تئوری‌های زیادی در خصوص باکتریایی بودن منشاء آن ارائه گردیده که در این رابطه *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* نقش عمده‌ای دارد. چون در بررسی‌های مختلف از افراد مبتلا به کرون جداسازی و شناسایی شده و اکثر آنتی بیوتیک‌هایی که در مورد بیماران کرون مؤثر بوده‌اند همان‌هایی هستند که علیه *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* هم مورد استفاده قرار می‌گیرند (Anadolu, 1999). هدف از انجام پژوهش حاضر اولاً ارزیابی ویژگی‌های تکنیک PCR شیر در شناسایی موارد مثبت یون در مقایسه با روش آزمایش مشاهده مستقیم بوده و در ثانی مشخص کردن میزان آلودگی شیر تولیدی منطقه مغان به این باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش با مراجعه به یازده گاوداری سنتی در منطقه مغان مجموعاً ۸۶ رأس گاو شیری دوشا که دارای علایم بالینی بیماری یون بودند (لاغری مفرط، اسهال مزمن مقاوم به درمان، ...) به عنوان جمعیت مورد مطالعه انتخاب شدند.

در ادامه با تهیه لام میکروسکوپی از مدفوع و تراشه‌های روده و انجام رنگ‌آمیزی ذیل‌نلسون، از طریق باکتریوسکوپی وجود کلامپ‌های باکتریایی در گسترش‌های میکروبی بررسی شد و تعداد موارد مثبت و منفی مشخص گردید. در ادامه کار از نمونه شیرهای اخذ شده از دام‌های مورد نظر تعداد ۲۰ نمونه از موارد مثبت آزمایش مستقیم و ۱۰ نمونه از موارد دارای علایم بالینی ولی منفی از نظر آزمایش مستقیم مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. برای انجام کار ابتدا نمونه‌های شیراخذ شده به صورت استریل به آزمایشگاه انتقال داده

Archive of SID
www.SID.ir

شدند. در آزمایشگاه این نمونه‌ها را سانتریفیوژ کرده و سپس مرحله استخراج DNA از رسوب شیر انجام گرفت. نمونه‌های DNA با برنامه تدوین شده دستگاه ترمال سایکلر بعد از افزودن اجزاء PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه محصول PCR نمونه‌ها در مرحله الکتروفورز وارد تانک الکتروفورز گردید.

مراحل انجام PCR

استخراج DNA: در این مرحله از روش سدیم دو دسیل سولفات (SDS) و پروتئیناز (K) استفاده شد. بدین ترتیب که دولوپ پر از رسوب حاصل از سانتریفوژ نمونه‌های شیر با بافر TE(EDTA,Tris) مخلوط سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی-گراد قرار داده شد تا باکتری‌ها غیرفعال شوند. در ادامه به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵۰ میکرولیتر لیزوزیم مجاور کرده و در نهایت با محلول SDS ۱۰٪ مخلوط کرده و مراحل استخراج DNA بصورت زیر انجام گرفت. ده میکرولیتر از محلول کلریدسدیم ۵ مولار به میکروتیوب‌ها افزوده و در حین همزدن ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/Nacl که قبلاً تا ٦٥ درجه گرم شده اضافه گردید. در این حالت به مدت ۳۰ دقیقه در ٦٥ درجه انکوبه شد.

۷۵ میکرولیتر از محلول chloroform/isoamylalchol به تیوب‌ها اضافه و به مدت هشت دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور سانتریفوژ انجام گرفت.

حدود ٤٠ میکرولیتر ایزوپروپانول به میکروتیوب‌ها اضافه و به آهستگی بهم زده شد. پس از مدتی اسیدهای نوکلئیک در میکروتیوب‌ها ظاهر شدند. در این حالت میکروتیوب‌ها را به فریزر منفی ۲۰ منتقل کرده و حدود سه دقیقه در این دما نگه‌داری شد.

میکروتیوب‌ها در ۱۲۰۰۰ دور به مدت پانزده دقیقه سانتریفوژ و سپس مایع رویی بیرون ریخته شد و حدود ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ سرد شده در فریزر روی رسوب‌ها اضافه و با بهم زدن میکروتیوب‌ها رسوب شستشو داده شد. دوباره در ۱۲۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ کرده، پس از اتمام سانتریفوژ اتانول بیرون ریخته شد و رسوب‌ها در دمای اتاق خشک گردید (Supply, 2001).

انجام PCR: در این پژوهش با استفاده از مقالات موجود (Pillai, 2002; Bhide, 2005) و با مراجعه به بانک ژنی (Gene Bank) و بررسی سکانس IS900 کروموزوم باکتری *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* در نهایت یک جفت پرایمر به شرح زیر از طریق شرکت آلمانی TIB MOLBIOL GmbH (TIB) تهیه و آماده گردید (Anzabi, 2005).

تمامی ۳۰ نمونه DNA استخراج شده بصورت جداگانه در میکروتیوب‌های استریل با اجزای آزمایش PCR مخلوط شدند.

Forward(FP-25)	CCA GGT TCG ACG GGG ATG GC
Reverse(RP-25)	GGT CGG TAC CCT CGG CGT CC

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: اجزای آزمایش PCR و غلظت مورد استفاده برای هر کدام از آنها

اجزای آزمایش	حجم	غلظت نهایی
Sterile, redistilled H2O	14.15 μ l	-
10x PCR buffer	2	Kcl: 50mM, Tris-Cl20 μ M
Mgcl2	0.6	1.5mM
dNTP mix	0.2	100 μ M
Forward primer	0.4	500 n M
Reverse primer	0.4	500 n M
Taqpolymerase enzyme (57 μl)	0.25	1.25 U
Templet DNA	2	100ng
حجم کلی	20 mL	

سپس میکروتیوب‌ها در داخل دستگاه ترمال سایکلر شرکت اپندورف (Ependorf) قرار داده شدند و با انتخاب برنامه زمانی و حرارتی مرتبط به صورت ذیل عمل گردید. مرحله اول، دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه جهت واسرشت DNA، مرحله دوم، دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشت)، دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال)، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه (توسعه) و مرحله نهایی، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه. برنامه فوق به غیر از مرحله اول و مرحله نهایی ۳۵ سیکل تکرار گردید (Anzabi, 2005).

در نهایت محصولات PCR برای مشخص کردن اندازه قطعات، مورد آزمایش ژل الکتروفورز قرار گرفتند در این مرحله با استفاده از آگارز ۱٪ و جریان ۷۰ ولت الکتروفورز انجام گرفت.

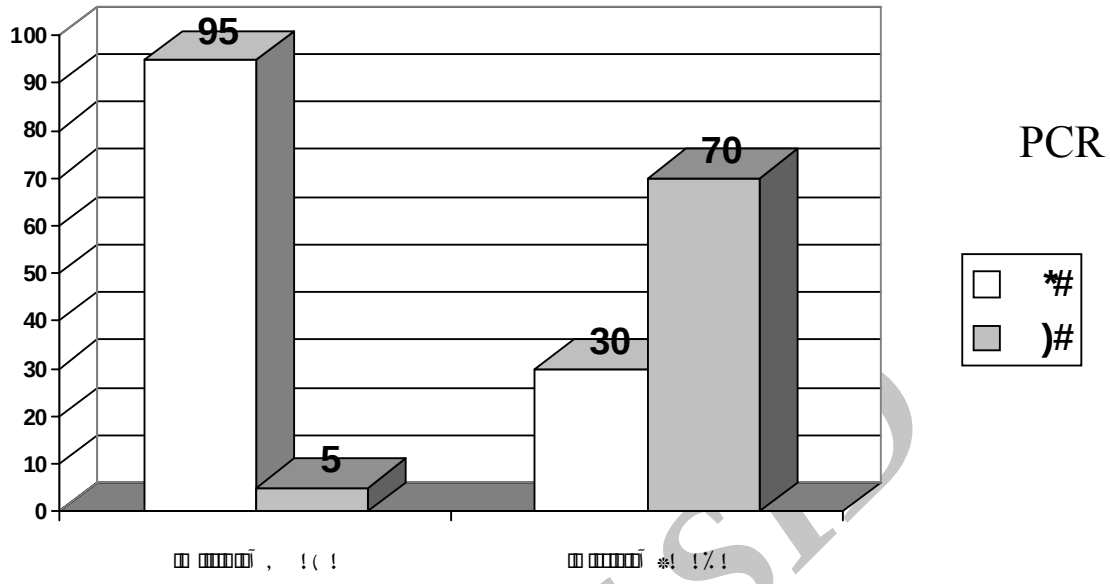
یافته‌ها

در این پژوهش از ۸٦ نمونه مدفوع مورد آزمایش ۵۱ نمونه از کل نمونه‌ها معادل ۵۹ درصد مثبت گزارش شدند و ۳۵ نمونه منفی بودند که حدود ٤۱ درصد کل نمونه‌ها می‌باشد.

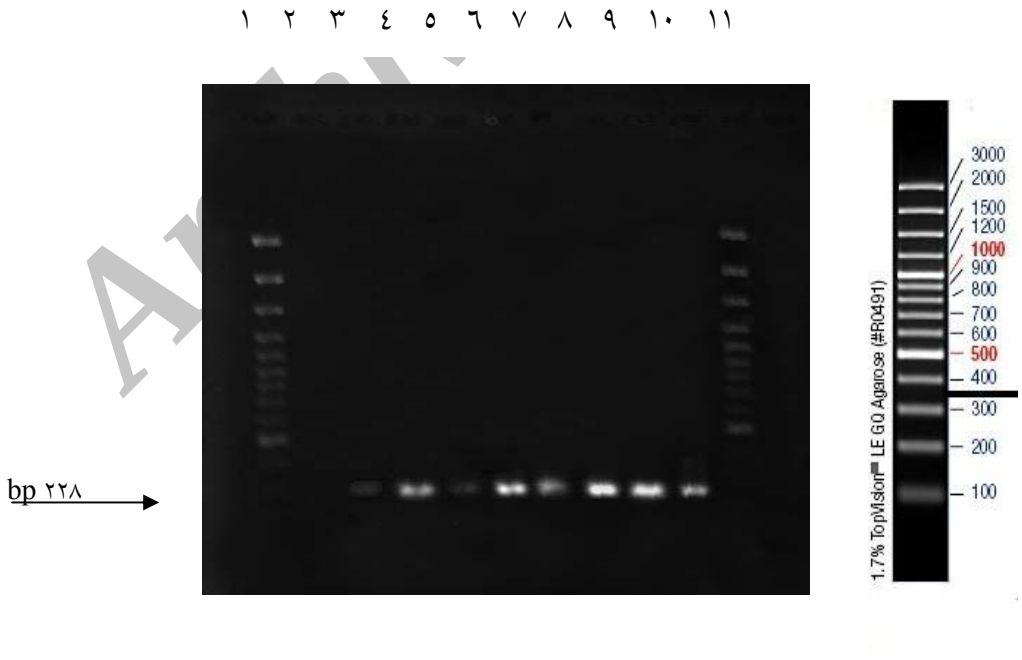
از ۲۰ نمونه انتخاب شده جهت انجام آزمایش PCR که از نظر آزمایش مستقیم میکروسکوپی از مدفوع مثبت بودند. ۱۹ نمونه PCR مثبت بود که شامل حدود ۹۵٪ کل نمونه‌ها می‌گردد و ۱ نمونه PCR منفی بود که شامل حدود ۵٪ نمونه‌ها می‌گردد. همچنین از ۱۰ نمونه شیر انتخاب شده جهت انجام آزمایش PCR که از نظر آزمایش مستقیم میکروسکوپی از مدفوع منفی بودند. ۳ نمونه PCR مثبت بود که شامل حدود ۳۰٪ کل نمونه‌ها می‌گردد و ۷ نمونه PCR منفی بود که شامل حدود ۷۰٪ کل نمونه‌ها می‌گردد.

در مجموع از کل ۳۰ نمونه مورد آزمایش PCR، ۲۲ نمونه مثبت بود که شامل حدود ٦۹٪ کل نمونه‌ها می‌گردد. و ۸ نمونه منفی بود که شامل حدود ۳۱٪ کل نمونه‌ها می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱: درصد هم‌خوانی نتایج PCR نمونه‌های شیر با آزمایش مستقیم (لام) مدفوع در جستجوی *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* در گاوهای دارای علائم بالینی یون



شکل ۱: ردیف ۲ کنترل منفی و ردیف ۱۰ کنترل مثبت و درخانه‌های شماره ۳ ، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، نمونهٔ مثبت که قطعه‌ای به اندازه bp ۲۲۸ ایجاد کرده است ردیف ۱ و ردیف ۱۱ نیز حاوی سایز مارکر ۱۰۰bp DNA ladder plus شرکت Fermentas

Archive of SID
www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این پژوهش مشخص می‌گردد در منطقه مغان درگاوداری‌های سنتی که سابقه درگیری با بیماری یون را داشته‌اند، وجود علایم بالینی به عنوان یک نشانه غربالگری برای تشخیص بیماری یون دارای کاربرد بوده و PCR نمونه‌های شیر این دام‌ها به عنوان یک تست تأییدی هم‌خوانی بالایی را دارد.

از طرف دیگر وجود موارد مثبت آزمایش PCR در بین نمونه‌هایی که از نظر آزمایش مستقیم میکروسکوپی منفی بودند نشان دهنده این است که تست مستقیم میکروسکوپی نمی‌تواند به عنوان یک تست تشخیصی منفرد سطح اطمینان بالایی را از نظر اپیدمیولوژیک ایجاد کند بطوریکه موارد منفی این تست در پژوهش، دارای نمونه‌های مثبت PCR بودند (۳۰٪ موارد) با توجه به ماهیت درون سلولی عامل بیماری یون و ایجاد فرم مزمن و حتی عدم وجود علائم واضح در برخی از موارد بیماری، این نتایج در مورد سایر روش‌های تشخیصی نیز قابل پیش‌بینی می‌باشد (نمودار ۱).

در یک پژوهش که در ایتالیا صورت گرفته است، در مرحله اول گوسفندها از نظر سرولوژیک مورد بررسی قرار گرفته و در ادامه نمونه‌های مثبت و منفی از نظر سرولوژیک از طریق PCR شیر آزمایش شده‌اند که تعداد ۹ نمونه از ۱۵ دام سرم مثبت و تعداد ٤ نمونه از ١٤ دام سرم منفی از نظر آزمایش PCR شیر مثبت گزارش شده‌اند (Nebbia, 2003).

پژوهش دیگری که در هند بر روی گاومیش آبی صورت گرفته است نشان می‌دهد که از ۲۰ مورد دارای علایم بالینی ١٤ نمونه از نظر آزمایش PCR و تنها ٦ نمونه از نظر کشت مثبت گزارش شده‌اند (Sivakumar, 2004).

در پژوهش دیگر که در هند انجام گرفته است بصورت مقایسه‌ای حساسیت روش‌های مختلف تشخیص بیماری یون مورد بررسی قرار گرفته که از بین روش‌های تست یونین، کشت بافت، کشت مدفوع، PCR بافتی و الایزا، روش PCR بافتی بعد کشت بافتی مناسب‌ترین حساسیت را داشته است (Tripathi, 2005).

در پژوهش دیگر که در سال ۲۰۰۷ در هند انجام گرفته بطور مقایسه‌ای سه روش الایزای شیر، کشت شیر و PCR شیر بر روی گاوهای بومی صورت گرفته است که در این بین PCR شیر بهترین نتایج را بدنبال داشته است. در این پژوهش هم از رسوب و هم از خامه شیر به عنوان منبع باکتری برای استخراج DNA استفاده شده که بصورت مقایسه‌ای استفاده از رسوب با ٦٢٪ مثبت نسبت به خامه ارجح‌تر گزارش شده (خامه ۵۰٪ مثبت) (Sharma, 2007) در پژوهش حاضر نیز از رسوب شیر استفاده شده است.

علاوه بر شیر از نمونه‌های بافتی و حتی سلول‌های خون نیز برای PCR استفاده می‌کنند. بطوریکه در یک پژوهش که در اسلواکی صورت گرفته است از بافی کوت به عنوان نمونه PCR استفاده شده است (Bhide, 2005).

در پژوهش دیگری که در منطقه تبریز توسط انزابی و همکاران صورت گرفته است با انجام آزمایش PCR بر روی شیر ۸۰ رأس گاو مشکوک به ابتلا به بیماری یون تعداد ۲۵ نمونه مثبت گزارش شده است. (۳۲٪) همچنین موارد متعدد مثبت در بین گاوهای بظاهر سالم

Archive of SID
www.SID.ir

و شیر پاستوریزه نیز گزارش شده است (Anzabi, 2005) که نشان دهنده آلودگی نسبتاً بالای منطقه می‌باشد. میزان آلودگی در مناطق مختلف ایران و سایر کشورهای جهان متفاوت است بطوریکه مطالعات سالهای اخیر نشان می‌دهد در گله‌های گاو شیرده در امریکا قریب به ٤٠٪ گاوها آلوده به عامل یون می‌باشند (Pillai, 2002).

مطالعات دیگر در انگلستان در دهه نود میزان آلودگی شیرهای پاستوریزه که توسط آزمایش PCR مثبت شده‌اند را ۳۰٪ گزارش نموده‌اند (Millar, 1996).

با پیشرفت روش‌های تشخیص مولکولی از جمله تکنیک PCR اهمیت و ارزش استفاده از آن در تشخیص بیماری‌ها روز به روز بیشتر می‌شود. این امر در ارتباط با تشخیص بیماری یون نیز به اثبات رسیده است.

بطوریکه در مطالعات متعدد استفاده از آزمایش PCR در مقایسه با سایر روش‌ها تعداد نمونه‌های مثبت بیشتر را به همراه داشته و حساسیت بالا و ویژگی مناسب این تکنیک را در تشخیص بیماری یون نشان می‌دهد.

بعنوان نمونه در یک مطالعه در سال ۱۹۹۷ از ۷۲ رأس گاو شیری ٦٠٪ نمونه‌های شیر از نظر PCR مثبت بوده‌اند در حالیکه همین نمونه‌ها از طریق کشت باکتریایی تنها ۳۰٪ مثبت گزارش شده‌اند (Stevenson, 1997) گزارش‌های متعدد با نتایج بررسی‌های ما از این نظر هم‌خوانی دارد.

در پژوهش حاضر از توالی‌های IS900 در ژنوم *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* برای تشخیص مولکولی این باکتری استفاده شده است که در پژوهش-های متعدد بعنوان یک روش کارآمد از این توالی برای طراحی پرایمر استفاده شده است. همچنین در برخی مطالعات بصورت مقایسه‌ای از دیگر سکانس‌های موجود در ژنوم این باکتری از جمله IS901 و توالی-های MIRU استفاده شده است که همچنان توالی IS900 به عنوان روش استاندارد مطرح می‌باشد (Sharma, Sivakumar, 2004 Tripathi, 2005; Bhide, 2005 ; Nebbia, 2003; 2007;).

در نهایت با توجه به نتایج پژوهش حاضر که نشان-دهنده آلودگی بالای شیر تولیدی منطقه می‌باشد و توجه به ارتباط احتمالی این باکتری با بیماری کرون انسان[1]، لزوم توجه بیشتر در این مورد احساس می‌شود (Anadolu, 1999). از سوی دیگر مقاومت نسبتاً بالای این باکتری به تیمارهای حرارتی وویژگی درون سلولی بودن آن که همگی منجر به بقای بیشتر این باکتری بویژه در جریان پاستوریزه کردن شیر می‌گردد، بایستی مورد توجه بیشتر محققین به خصوص در زمینه بهداشت عمومی قرار گیرد (Tabatabayi, 2001 ; Anzabi, 2005).

منابع

- Anzabi, Y., Tabatabayi, A.H. and Asgharzadeh, M. (2005). A survey on the infection status of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in dairy cattle using PCR of Tabriz. Journal of Iran veterinary science, 4: 125-131[In Farsi].

Archive of SID
www.SID.ir

- Anadolu, R., Calikoghn, E., Karayalcin, S. and Gurgey, E. (1999). Cutaneous Crohn's disease: metastatic Crohn's is a misnomer'. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 13 (1): 61-8.
- Bhide, M., Chakurkar, E., Tkacikova, L., Barbuddhe, S., Novak, M. and Mikula, I. (2005). IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* sub Sp. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. Veterinary Microbiology, 112 (1)**:** 33-41.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T. and Herman-Taylor, J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows milk in England and Wales. Journal of Applied and Enviromental Microbiology, 17: 3446-52.
- Nebbia, P., Robino, P., Robino, P., Zoppi, S. and De Meneghi, D. (2003). Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* sub sp *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested- PCR. Small ruminant research, 66: 1-3.
- Pillai, S.R. and Jayarao, B.M. (2002). Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* sub sp. *paratuberculosis* directly from raw milk. Journal of Dairy Science, 85: 1052-1057.
- Sharma, G., Singh, S.V., Sevilla, I., Singh, A.V., Whittington, R.J., Just, R.A., Kumar, S., Gupta, V.K., Singh, P.K., Sohal, J.S. and Vihan, V.S. (2007). Evaluation of indigenous milk ELISA with m-culture and m-PCR for the diagnosis of Bovine Johne's (BJD) in lactating Indian dairy cattle. Research Veterinary Science, 84 (1): 30-37.
- Sivakumar, P., Tripathi, B.N. and Nem, singh. (2004). Detecion of *Mycobacterium avium* sub sp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (Bubalus bubalis) by PCR and bacterial culture. Veterinary Microbiology. 108 (3-4): 263-270.
- Stevenson, K. and Sharp, JM. (1997). The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* sub sp. *paratuberculosis* research. Veterinary Journal, 153: 269-286.
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., Van Soolingen, D. and Locht, D. (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. Journal of Clinical Microbiology, 39: 3563-3571.
- Tabatabayi, A.H. and Firouzi, R. (2001). Diseases of animals due to Bacteria, Tehran University Press, pp. 414 [In Farsi].
- Tripathi, B.N., Periasamy, S., Paliwal, O.P. and Singh, N. (2005). Comparison of IS900 tisuue PCR, bacterial culture, johnin and serological test for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. Veterinary Micribiology, 116: 129-137.

Archive of SID

www.SID.ir