Archive of SID

در
پژوهش و سازندگی شماره ۸۲ بهار ۱۳۸۸
پژوهش‌های دامپزشکی

بررسی بیماری یون در دامداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی اصفهان

• **امیر حسین شاهمرادی**
عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان (نویسنده مسئول)
• **نادر مصوری**
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج
• **رضا عارف پژوهی**
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج
• **محمد رضا حیدری**
عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان
• **وحید نعمان**
عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان
• **عبدالرضا نبی نژاد**
عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان
• **کیوان تدین**
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج
• **سیدمحمد حسینی**
کارشناس ارشد اداره کل دامپزشکی استان اصفهان
تاریخ دریافت: مهر ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: تیر ماه ۱۳۸۷
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۳۱۱۷۸۸۵۴۶۰
Email: amirshahmoradi@yahoo.com

چکیده

با توجه به پیشینه وجود بیماری یون (Paratuberculosis) در برخی از دامداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی اصفهان و به منظور بررسی علمی و آزمایشگاهی این بیماری در منطقه مورد نظر، پروژه‌ای طراحی و به مورد اجرا گزارده شد. بر طبق روش توصیه شده مجری طرح، نمونه مدفوع از گاوهای مشکوک به بیماری یون (براساس تشخیص دکتر دامپزشک فارم) اخذ گردید و در ظروف مخصوص بسته بندی قرار داده شد و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل گردید در قسمت تشخیص بخش توبرکولین موسسه رازی حصارک کرج و بر مبنای پروتکل رسمی O.I.E، عملیات جداسازی *Mycobacterium paratuberculusis* (عامل بیماری یون) شامل مراحل : آماده سازی نمونه‌ها، آلودگی زدائی (Decontamination) توسط محلول (Hexadecyl Pridinium Chloride =H.P.C) وتلقیح برروی محیط‌های کشت اختصاصی (Herrold's egg yolk with Mycobactin) و (Herrold's egg yolk without Mycobactin) انجام گردید. محیط‌های کشت تلقیح شده به انکوباتور انتقال داده شد. باکتری *M. paratuberculusis* بسیار کند رشد بوده و سویه گاوی آن در بهترین شرایط نیاز به حداقل ۱۴ هفته انکوباسیون در گرمخانه ۳۷ درجه دارد بنابراین هرنمونه به همین مدت تحت کنترل قرار گرفت. از رسوب مرحله آلودگی زدائی و نیز از پرگنه‌های رشد یافته روی محیط‌های کشت، گسترش میکروسکوپی (Smear) تهیه وسپس به روش ذیل – نلسون رنگ آمیزی و مورد بررسی میکروسکوپی قرار داده شد (۴). در راستای این پژوهش، برروی تعداد۲۲۷ نمونه به آزمایشگاه ارسال شد و در نهایت با کشت ۱۱۹۲ عدد لوله محیط کشت (۹۰۸ لوله کشت اولیه و ۲۸۴ لوله کشت مجدد) و بررسی ۵۱۱ گسترش میکروسکوپی، تعداد ۳۲ نمونه مثبت تشخیص داده شد.

کلمات کلیدی: مایکو باکتین، *Mycobacterium paratuberculosis*، بیماری یون، بیماری کرون، ذیل نیلسون

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches in Pajouhesh & Sazandegi No 82 pp: 13-17

Study of John's disease in industrlal & semi industrial cattle husbandary of Esfahan province

By: A. H. Shahmoradi, Member of Scientific Board of Agricultural and Natural Resources Research Center of Esfahan Province (Corresponding Author Tel: +983117885460). Mosavari. N and Aref Pajouhi R. Members of Scientific Board of Razi Research Insstitute Karaj- Iran. Heidari M.R, Noamaan V and Nabinejad A.R. Members of Scientific Board of Agricultural and Natural Resources Research Center of Esfahan Province. Tadaion K. Member of Scientific Board of Razi Research Institute Karaj Iran. Hosseini S.M. Expert of Veterinary Organization of Esfahan Province

Mycobacterium paratuberclosis is one of the most important of *Micobacterium tuberculosis* Complex family. This pathogen can infect all ruminant animals like cattle , sheep and goat . This research was done with cooperation of Esfahan Agricultral Research Center & Veterinary Organization Isfahan & Karaj Razi Research Institute. The samples put in safe packing and cold position (beside ice). In diagnose section of tuberculin department of Razi Research Institute, According to the (0. I. E) protocol , we work on samples : (Decontamination , culture in special mediums, ,incubation in 37 C for about 14 weeks, and write results). The special mediums in this research include : Herrold's Egg Yolk with Mycobactin & Herrold's Eeg Yolk without Mycobactin Before culture , we took 227 smears (after decontamination stage). During this project we cultured 227x 4 = 908 tubes media (3 tubes of Herrold's egg with Mycobactin and one tube of Herrold's Egg without Mycobactin for every sample). We cultured 1192 media tubes and survey 511 smears during this project We had 71 samples with colonies (acid fast bacillus, then we subcultuered 71 x 4 = 284 on: Herrold's Egg Yolk with mycobactin media. In this stage we found 32 positive & 39 negative samples of 227 total faeces samples.

v

Key words: ziehl neelsen john's disease, *Mycobacterium Paratuberculosis*

مقدمه

درسال ۱۸۹۵ یک محقق آلمانی بنام یون، از گاوهای با علائم (اسهال، کم خونی پیشرونده، لاغری شدید و درنهایت مرگ)، گونه‌ای از مایکوباکتریوم را جدا نمود. بعدها این باکتری را *M. paratuber culosis* و بیماری حاصل را بیماری یون (Johne's Disease) نام نهادند.

در سال ۱۹۳۲ دانشمندی آلمانی بنام کرون و همکارانش بیماری مزمنی را که سبب بروز تب، اسهال، کم خونی پیشرونده و لاغری مفرط می‌شود شناسائی کردند و یکی از عوامل ایجاد بیماری را *M. paratuberculosis* عنوان نمودند این بیماری به همین دلیل بیماری کرون (Crohn's Disease) نام نهاده شد. این دو بیماری دارای نشانی‌های بالینی و پاتولوژیکی مشابهی می‌باشند.

بیماری یون معمولاً به طور مزمن سیر خود را طی می‌نماید. عامل بیماری معمولاً دستگاه گوارش را مورد تهاجم قرار می‌دهد. بعد از ورود باسیل یون به بدن دام و پیدایش عفونت اولیه، حیوان ظاهراً سالم به نظر می‌رسد و ممکن است این حالت سال‌ها ادامه یابد ویا در شرایط خاصی از قبیل حدت باکتری و تعداد آن، تغذیه، بهداشت محیط و یا حالت دفاعی دام، نشانی‌ها و ضایعاتی از بیماری دیده شود. براساس پروتکل (O. I. E) محیط کشت انتخابی جهت *M. paratuberculosis*، Herrold's Eeg Yolk همراه و بدون مایکوباکتین (به ترتیب ۳ و ۱ لوله کشت برای هر نمونه) می‌باشد (۶).

پرگنه‌های اولیه *M. paratuberculosis* ممکن است از ۵ تا ۱۴ هفته پس از کشت ظاهر شوند. بر روی محیط کشت هرولدز اگ مایکوباکتین دار این باکتری بسیار کوچک (به قطر یک میلیمتر)، بدون رنگدانه ، نیم گرد (Hemispherical) سطح باکتری صاف و درخشان می‌باشد. اگر کشت ادامه یابد، به تدریج پرگنه‌ها بزرگتر (۴ تا ۵ میلیمتر) و کدر خواهند شد. شکل کلنی‌ها نیز تغییر یافته واز صاف (Smooth) به خشن (Rough) گرایش پیدا کرده و از فرم Hemispherical به Mammilate تبدیل خواهند شد (۶).

M. paratuberculosis زیر گونه خانواده *M. avium* می‌باشد. این باکتری باسیلی شکل، فاقد دیواره سلولی (دارای اشکال اسفروبلاستیک)، هوازی، اسید فست، کند رشد، دارای شکل کوکوباسیل با ابعاد (۲-۱) × (۰/۵) میکرومتر بوده که دو انتهای آن گرد می‌باشد و علاوه بر دارا بودن خواص عمومی مایکوباکتریوم‌ها، از صفات ویژه ای نیز برخوردار است. دیواره سلولی این باکتری دارای چندین لایه لیپیدی بوده که حدود ۶۰٪ وزن آنرا به خود اختصاص داده است. بدلیل این لایه‌های چربی، دیواره باکتری در برابر عوامل رنگ زدا مثل اسید و الکل مقاوم می‌باشد و اگر چه جزو باکتری‌های گرم مثبت تلقی می‌شود ولی رنگ گرم را به خود نمی‌گیرد. جهت مطالعه پرگنه‌ها، می‌توان آنها را به دو روش ذیل نلسون (بررسی بوسیله میکروسکوپ نوری) و فلوروکرم (بررسی به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنت) رنگ آمیزی نموده ومورد بررسی قرار داد.. این باکتری چون قادر به سنتز مایکوباکتین نمی‌باشد، جهت رشد در محیط کشت، به فاکتور آهن نیاز دارد که با افزودن مایکوباکتین به محیط کشت، امکان رشد آن میسر می‌گردد. محیط‌های اختصاصی تلقیح شده باید حداقل تا ۱۴ هفته در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شوند. به دلیل نیاز شدید به اکسیژن، باکتری در سطح محیط رشد مینماید. اضافه نمودن توئین ۸۰ به محیط کشت سبب جدا شدن باکتری‌ها از یکدیگر شده و از رشد توده ای و غرق شدن در محیط مایع جلوگیری می‌نماید. pH مناسب جهت رشد ۷/۶ – ۶ (متوسط ۷) است، همچنین افزودن CO_2 به محیط کشت رشد باکتری را تسریع

www.SID.ir

Archive of SID

می‌نماید.این باکتری قادر به زندگی در خارج سلول نبوده و به علت دارا بودن دیواره سلولی ویژه، دارای دو فرم Bacillary و Spheroplast بوده که در انسان بیشتر شکل اسفروپلاستیک آن سبب بیماری می‌گردد ولی در دام‌ها هر دو فرم باکتری باعث بروز بیماری می‌گردد. شکل باسیلی باکتری، در محیط‌های اختصاصی راحت تر قابل کشت بوده و بهتر مورد شناسائی قرار می‌گیرد، در حالیکه فرم اسفروپلاسیتک آن به علت متغییربودن شکل و خصوصیات آن، به سختی در محیط کشت رشد می‌نماید. شناسائی فرم اسفروپلاستی باکتری حتی بوسیله تکنیک‌های مدرن مولکولی نیز به راحتی امکان پذیر نیست. این باکتری در موکوس دیواره روده نفوذ می‌نماید، بوسیله ماکروفاژها بلعیده شده، داخل فاگوسیتها تزاید نموده و سبب تورم سلولهای ناحیه و در نهایت متورم شدن عضو می‌گردد. سویه‌های این باکتری که از انسان جدا شده‌اند در برابرحرارت مقاوم‌تر می‌باشند (۶)

گزارش‌های سازمان دامپزشکی کشور و موسسه رازی حاکی از وجود بیماری یون در گاو، گوسفند، بز و شتر در تمام استان‌های کشور می‌باشد. باتوجه به وجود تعداد قابل توجه دامداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی در استان اصفهان و گزارشهای موید بیماری یون در دام‌های این منطقه، اجرای یک طرح تحقیقاتی بر مبنای دستورالعمل‌های استاندارد مد نظر قرار گرفت و خوشبختانه به تصویب رسید و به مرحله اجرا قرارگذاشته شد.

پژوهش‌های مبتنی بر موفقیت در جداسازی و شناسائی *M. paratuberculusis* از گاو در ایران بسیار محدود بوده و اطلاعات کافی در این زمینه در دسترس نمی‌باشد که شاید یکی از دلایل آن محیط‌های کشت بسیار گران و زمان طولانی رشد باسیل یون باشد. این تحقیق کوشیده با اتکاء به روش‌های استاندارد و معتبر جهانی، زمینه را برای جداسازی و شناسائی این باکتری فراهم نموده تا راه جهت مطالعات تکمیلی و مولکولی مهیا گردد.

مواد و روش‌ها

الف - مواد مورد نیاز

۱ -مواد مصرف شدنی (ظروف نمونه گیری – ارلن مایر– پیپت – لام میکروسکوپی– آنس و دستکش)

۲ - لوازم آزمایشگاهی (سانتریفوژ – انکوباتور – اتوکلاو – میکروسکوپ - میکسر)

۳ - نمونه مدفوع دام‌های مشکوک به بیماری یون

۴ - محلول میکروب زدای H.P.C = Hexadecyl Pridinium Chloride

۵ - محیط‌های اختصاصی کشت میکروبی:
(Herrold's Eeg Yolk with Mycobactin)
(Herrold's Eeg Yolk without Mycobactin))

۶ - پودرمحرک رشد مایکوباکتین (Mycobactin)

۷ - محلول رنگ آمیزی ذیل – نلسون (ziehl neelsen)

ب - روش تحقیق

فاز مطالعاتی طرح : جهت انجام این تحقیق در اولین قدم آمار گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی، تعداد دام هریک و نیز سابقه وجود بیماری یون در آنها جمع آوری شد (۲).

فاز اجرائی طرح

نمونه‌های مشکوک به بیماری یون را (براساس تشخیص دامپزشک فارم) را با روشی که مجری طرح جهت نمونه برداری در گاوداری‌ها آموزش داد، اخذ و مشخصات کامل دام، نام دامداری و تاریخ روی آنها ثبت و در ظروف نمونه برداری قرار داده شد و در شرایط سرد به آزمایشگاه ارسال گردید.

مراحل کشت میکروبی نمونه‌ها

۱ - آلودگی زدائی از نمونه‌ها : مقدار یک گرم از مدفوع را درون لوله آزمایشی به حجم ۵۰ میلی لیتر که حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل است می‌ریزیم و۳۰ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه بر روی مخلوط کن برقی قرارمی‌دهیم، سپس ۵ میلی لیتر از قسمت روئی مخلوط را به تیوبی با حجم ۵۰ میلی لیتر که محتوی ۲۰ میلی لیتر محلول آلودگی زدای H.P.C (با رقت ۰/۷۵ درصد) می‌افزائیم. مخلوط جدید را چندین بار وارونه می‌کنیم تا کاملاً مخلوط گردد، و به مدت ۱۸ ساعت بحالت ایستاده و بدون حرکت در درجه حرارت آزمایشگاه قرار می‌دهیم. سپس مایع روئی را تخلیه نموده و از رسوب حاصل جهت کشت میکربی استفاده می‌کنیم. در این مرحله تمام باکتری‌ها بجز مایکوباکتریوم‌ها از بین میروند (۵).

۲ - تلقیح به محیط‌های کشت اختصاصی : برای هر نمونه مقدار ۰/۱ میلی لیتر از رسوب محلول مرحله آلودگی زدائی را به سه لوله محیط جامد شیبدار(Herrold's Eeg Yolk with Mycobactin) و یک لوله محیط جامد شیبدار Herrold's Eeg Yolk without Mycobactin)) تلقیح نمودیم (جمعاً چهار لوله برای هر نمونه) (۶).

۳ - انکوباسیون،کنترل و ثبت داده‌ها : لوله‌های کشت شده به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل و بطور هفتگی کنترل شدند. بر اساس توصیه O.I.E برای ثبت نتیجه نهائی باید حداقل تا ۱۴ هفته به نمونه کشت شده یون (سویه گاوی) مهلت داد، سپس در صورت منفی بودن میتوان آنرا خذف نمود (۶).

۴ - تهیه گسترش میکرسکوپی (اسمیر) : از رسوب محلول مرحله آلودگی زدائی و همچنین از پرگنه‌های رشد یافته روی محیط‌های کشت، گسترش میکروسکوپی تهیه و به روش ذیل – نلسون رنگ آمیزی و مورد بررسی میکروسکوپیک قرار گرفت. در مجموع تعداد ۵۱۱ گسترش (اسمیر) تهیه و مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت (۶).

نتایج

در طول مدت اجرای این تحقیق ۲۲۷ نمونه مشکوک به بیماری پاراتوبرکلوزیس از گاوداری‌های منطقه مورد بررسی دریافت شد. از تعداد ۲۲۷ گسترش پس از مرحله خنثی سازی (قبل از کشت) در ۴۶ نمونه باسیل اسید فست رویت شد (۲۰٪). پس از کشت میکروبی ۲۲۷ نمونه ، برروی لوله‌های کشت ۷۱ نمونه،کلنی‌های مشکوک دارای باسیل‌های اسید فست (۲۷/۳۱٪)ظاهر گردیدکه از این ۷۱ نمونه کشت

www.SID.ir

Archive of SID

مجدد (ساب کالچر) تهیه شد (۲۸۴ = ۴ × ۷۱).

در نهایت از تعداد۷۱ نمونه مشکوک دارای باسیل اسید فست، ۳۲ نمونه مثبت یون تشخیص داده شد (۱۴٪ از کل نمونه‌ها و ۴۵٪ از نمونه‌های مرحله کشت مجدد).

جزئیات آماری نمونه‌ها به قرار زیر است :

تعداد گاوداری‌های صنعتی مورد بررسی: ۱۴

تعدادکل نمونه‌های دریافتی:۲۲۷

تعداد گسترشهای گرفته شده قبل از کشت :۲۲۷

تعداد گسترشهای مثبت قبل از کشت: ۴۶

تعداد گسترشهای منفی قبل از کشت :۹۰۸= ۲۲۷× ۴

تعداد لوله‌های کشت اولیه که در آنها باسیل اسید فست دیده شد: ۷۱

تعداد لوله‌های کشت اولیه که در آنها باسیل اسید فست دیده نشد : ۱۵۶

تعداد لوله‌های کشت مجدد (۴ × ۷۱ = ۲۸۴: (subculture

تعداد گسترش مجدد:۲۸۴

تعدادنمونه‌هائی که در کشت مجدد مثبت شدند:۳۲

تعداد نمونه‌هائی که در کشت مجدد منفی شدند:۳۹

تعدادنمونه‌هائی که در محیط کشت ماکوباکتین دار رشد کردند :۲۵

تعداد نمونه‌هائی که در محیط کشت بدون مایکوباکتین رشد کردند : ۷

تعداد کل لوله‌های محیط کشت شده در طول اجرای طرح :

۹۰۸ + ۲۸۴ = ۱۱۹۲

تعداد کل گسترشهای بررسی شده در طول مدت اجرای طرح:

۲۲۷+۲۸۴ = ۵۱۱

بحث

در ابتدای اجرای طرح، اکثرگاوداری‌های صنعتی بزرگ منطقه به لحاظ اعتبار و مسائل اقتصادی، حاضر به همکاری نبودند. لذا با هماهنگی اداره کل دامپزشکی استان اصفهان و تضمین عدم افشای نام دامداری‌های آلوده، اطمینان آنها جلب و حاضر به همکاری شدند. بنابر توافق به عمل آمده، به‌جای نام گاوداری‌ها از کد استفاده شد.جمعاً ۱۴ گاوداری صنعتی و نیمه صنعتی، جهت انجام این طرح نمونه در اختیار مجری قرار دادند که نام آنها از A تا N کدبندی شد. این نمونه‌ها از نظر جغرافیائی تمام مناطق اصفهان را پوشش می‌دهد، و نتایج به دست آمده مبین این است که بیماری یون در تمام نواحی اصفهان گسترش یافته و متاسفانه با توجه به اینکه برنامه مدونی جهت مبارزه با آن در دست اجرا نمی‌باشد، در آینده بیماری مزمن یون یکی از مشکلات اصلی دامداری‌ها خواهد بود.

شکیبامهر در بین سال‌های ۷۹ – ۱۳۷۸ با استفاده از الایزا و همچنین تهیه گسترش مستقیم، به بررسی بیماری یون در شهرستان ساوجبلاغ پرداخت که پس از بررسی ۲۷۶ نمونه مدفوع و خون، میزان شیوع بیماری را در روش الایزا (۹۱/۲۳) و در بررسی مستقیم گسترشهای میکروسکوپی (۲/۲) تعیین نمود.

شاهرخی در بین سال‌های ۷۸ – ۱۳۷۵ در استان مرکزی از تعداد ۱۰۲ نمونه مدفوع مشکوک به یون کشت داده شده، ۱۶ مورد مثبت جداسازی نمود (۱۵/۶۸٪). وی در کنار کشت میکروبی، آزمون‌های الایزای جذبی و الایزای گاما انترفرون را نیز بکار برد که میزان شیوع در الایزای جذبی (۷۵/۶۸) و در الایزای گاما انترفروت (۷۵/۴۳) را بدست آورد.

Allwood در سال ۲۰۰۲ در دانشگاه سیدنی استرالیا با کشت دو مرحله‌ای نمونه‌های مدفوع، ابتدا نمونه‌ها را روی محیط کشت مایع تجارتی کشت داد و سپس پرکنه‌های مشکوک روی این محیطها را روی محیط کشت جامد هرولدز اگ مایکوباکتین دار کشت نمود که پس از ۴ هفته پرگنه‌ها ظاهر شدند ولی انکوباسیون محیطها تا ۸ هفته ادامه یافت. این محقق همچنین تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع دام دارای علائم بالینی که در تست الایزای جذبی مثبت شده بودند را به محیط کشت هرولد اگ تلقیح نمود و به این نتیجه رسید که کشت دو مرحله‌ای جهت جداسازی از اعتبار بیشتری برخوردار می‌باشد.

با توجه به مطالعات انجام شده در مناطق مختلف دنیا و با عنایت به نتایج آماری این بررسی توصیه می‌شود که:

۱ – با وجود معرفی روش‌های نوین تشخیصی سرمی و مولکولی، کشت میکروبی همچنان از اعتبار بالائی برخوردار می‌باشد بطور یکه هنوز هم OIE این روش را به‌عنوان Gold test تشخیص مایکوباکتریوم‌ها معرفی می‌نماید بویژه جهت انجام آزمونهای ملکولی که نیاز به تولید انبوه باکتری می‌باشد.

۲ – بیماری مزمن پاراتوبرکلوز در اکثر گاوداری‌های ایران منجمله اصفهان وجود دارد که یا شناسائی نمی‌شوند و یا مسئولان دامداری‌های درگیر به علت مسائل اقتصادی و حیثیتی حاضر به افشای آن نیستند.

۳ - با توجه به وجود بیماری کرون (Crohn's Disease) در انسان که نشانی‌های آن بسیار نزدیک با علائم بیماری یون می‌باشد و حتی در برخی از موارد در افراد مبتلا به کرون، *M. paratuber culosis* جدا شده است، احتمال مشترک بودن این بیماری متصور می‌باشد در نتیجه نیاز به یک بررسی همه جانبه در سایر نقاط کشور احساس می‌گردد تا با جمع‌بندی دقیق نتایج، مسئولین اجرائی و متولیان امر بهداشت انسان و دام کشور راهکاری عملی جهت پیشگیری و مبارزه با این بیماری ارائه نمایند.

سپاسگزاری

این بررسی با همکاری بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج و اداره کل دامپزشکی استان اصفهان انجام گرفت.

بنابراین لازم می‌دانیم : از تمامی پرسنل بخش توبرکولین موسسه رازی بدلیل همکاری در مراحل تشخیصی دکتر مرتضی رحمانی رئیس اداره مبارزه با بیماری‌های دام اداره کل دامپزشکی استان اصفهان به خاطر ارتباط دادن مجری تحقیق با دامداری‌ها - دکترمسعود رحمانی دامپزشک بخش خصوصی اصفهان به دلیل کمک در جمع آوری نمونه‌ها و دکتر سعید بکائی استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به خاطر مشاوره آماری تشکر و قدردانی مینمائیم

منابع مورد استاده

www.SID.ir

Archive of SID

۱ - تدین، کیوان. شاهمرادی، امیرحسین. مصوری، نادر. ۱۳۸۲؛ باکتری شناسی سل و اصول طراحی ساختمان و مقررات کار در آزمایشگاه سل، انتشارات نظام دامپزشکی ایران.
۲ -آمار و اطلاعات موجود در سازمان دامپزشکی کشور و معاونت امور دام وزارت جهاد کشاورزی.
3– Collins & Ltne. 1995; Microbiological methods , 7th edition.
4 – Bishop, P J – Neumann, G. 1994; The history of the Ziehl–Nielsen Tubercule 51 , pp; 196 – 206.
5 – Laboratory methods in medical Mycobateriology center for disease control (C D C) U.S.A 1988.
6 - World organisation for animal health (OIE), 23/07/2004,2004-last update, paratuberculosis [Homepage of OIE], [Online]. Available: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00045.htm [09/07/2007].
7 – Veterinery Practice. 1977; PP: 74 – 84.

www.SID.ir