بررسی وضعیت آلودگی شیر گاو به باکتری *Mycobacterium avium paratuberculosis* با روش کشت و PCR در منطقه تبریز

دکتر یونس انزابی[۱]* ، دکتر عبدالمحمد حسنی طباطبایی[۲]، دکتر محمد اصغرزاده[۳]

چکیده

نقش بالقوه شیر در انتقال آلودگی بیماری یون به گوساله‌ها از مادران آلوده از یک طرف و از طرف دیگر نقش دام هایی که باکتری عامل این بیماری یعنی مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس را در شیر خود دفع می‌کنندبه عنوان عوامل مهم گسترش آلودگی به بیماری یون در گله‌های گوشتی و شیری بسیار مهم می‌باشد. همچنین بدلیل ارتباط احتمالی که بین عامل بیماری یون و بیماری کرون در انسان مطرح می‌باشد لذا شیر به عنوان یکی از منابع مهم تغذیه‌ای می‌تواند در انتقال عفونت نقش داشته باشد.

بدین منظور بررسی حضور مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس در شیر مصرفی برای تغذیه انسان و دام می‌تواند شاخص بسیار مهمی در تعیین میزان گسترش این عفونت در جوامع دامی و احیاناً انسانی باشد. لذا در این تحقیق وضعیت آلودگی شیرهای تولیدی در گاوداریهای منطقه تبریز و نیز شیرهای مورد مصرف در بازار تبریز از نظر آلودگی به عامل بیماری یون مورد بررسی قرار گرفت.

جهت انجام این تحقیق، شیر ۸۰ راس گاو به ظاهر سالم و نیز شیر ۸۰ راس گاو مشکوک به ابتلا به بیماری یون و نیز ۲۰ نمونه شیر پاستوریزه تجاری عرضه شده به بازار مصرف تبریز و نیز ۲۰ نمونه از شیرهای آزمایش شده مربوط به گاوهای به ظاهر سالم و مشکوک به ابتلا به بیماری یون که مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس از آنها جدا شده بود(بعد از پاستوریزاسیون آزمایشگاهی) به روش کشت میکروبی و PCR مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج حاصله به این شرح ثبت شد: شیر گاوهای مشکوک به بیماری یون در ۱۷مورد (شامل ۲۱/۲۵٪ موارد) به کشت میکروبی و در ۲۵مورد (شامل ۳۱/۲۵٪ موارد) به PCR جواب مثبت دادند. همچنین شیر گاوهای سالم در ٦مورد (شامل۷/۵٪ موارد) به کشت میکروبی و در ١٤مورد (شامل ۱۷/۵٪ موارد) به PCR جواب مثبت دادند از طرف دیگر شیرهای پاستوریزه کارخانه‌ای در ۳ مورد (شامل ۱۵٪ موارد) به کشت میکروبی و در ۷مورد (شامل ۳۵٪ موارد) به آزمایش PCR جواب مثبت دادند. از طرف دیگر شیرهای پاستوریزه آزمایشگاهی در ۲مورد (شامل۱۰٪ موارد) به کشت میکروبی و در ۳مورد (شامل ۱۵٪ موارد) به آزمایش PCR جواب مثبت دادند.

واژه‌های کلیدی : *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس، شیرگاو، بیماری یون، تبریز*

A Survey on The Infection Status of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in Dairy Cattles Using PCR & Culture of Tabriz Region

Anzabi.Y[1*], Tabatabayi. A.H[2], Asgharzade. M[3]

1-Postgraduated of veterinary microbiology, faculty of specialised veterinary sciences, Islamic azad university, Science & Research Campus, Tehran, Iran.
2-Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, Tehran university, Tehran Iran.
3-Department of biochemistry, Faculty of medicine, Tabriz medicine scinces, Tabriz, Iran.

Transmission of *Mycobacterium avium paratuberculosis* through milk is amoung major ways of its distribution in further is dairy and beef herds. Because of the probable relation of ageils of John's disease's and human Crohn's disease, milk can important plars an role in transmission of to human. The role, detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in milk could be an important index in determination of its distribution in both animal and human populations. In this study the milks of some dairy farms around Tabriz city and also whole milks in the markets, were evaluated.

80 milk samples from apparently healthy cows 80 samples from cows suspected to infection with *Mycobacterium avium paratuberculosis*, 20 samples of commercial pasteurized milk and 20 samples of appearantly helthy cows which *Mycobacterium avium paratuberculosis* had been isolated from their milk (after pasteurization in laboratory) by means of microbial and PCR evaluation, were collected. Among the samples of suspected cows, 17 cases(21.25%) in culture and 25 cases(31.25%) in PCR were positive. Also in samples of apparently healthy cows, 6 cases (7.5%) by microbial culture and 14 cases(17.5%) in PCR were positive in addition, of mony the milk samples which obtained from commercial pasteurized milk, 3 cases (15%) by microbial culture, 7 cases (35%) of PCR were found positive. Amoung the milk samples which had been pasteurized at laboratory, 2 cases(10%) by microbial culture and 3 cases(15%) by PCR were positive.

Key words : *Mycobacterium avium paratuberculosis, Cow milk, John's disease, Tabriz*

۱- دانش آموخته دکتری تخصصی میکروبیولوژی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، تهران، ایران.
۲- گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳- گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز _ ایران.

مقدمه

نقش بالقوه شیر در انتقال آلودگی بیماری یون به گوساله‌ها از مادران آلوده از یک طرف (چه آنهایی که علائم بیماری را نشان می‌دهند و چه آنهایی که فاقد نشانه هستند)و از طرف دیگر نقش دام‌هایی که باکتری عامل این بیماری یعنی مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس (*Mycobacterium avium paratuberculosis* =*M.a.p*) را در شیر خود دفع می‌کنند به عنوان عوامل مهم گسترش آلودگی درداخل گله مخصوصاً زمانی که در گاوداریها از شیر گاوهای آلوده برای تغذیه تعداد زیادی از گوساله‌ها (چه شیری و چه گوشتی) استفاده می‌شود بسیار مهم می‌باشد(٤). همچنین بدلیل ارتباطی که بین باکتری ایجاد کننده بیماری یون درایجاد بیماری کرون در انسان مطرح است لذا شیر به عنوان یکی از منابع مهم تغذیه‌ای انسان می‌تواند در انتقال میکروارگانیسم از دام‌های آلوده به انسان نقش مهمی ایفا کند(٢). اما جداسازی باکتری مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس از شیر بروش کشت میکروبی به عنوان یک روش استاندارد ولی دشوار و بسیار کند(بطوریکه گاهی تا ١٢هفته یا بیشتر به طول می‌انجامد)(٤)، در بسیاری از موارد سرعت مورد نیاز در شناسایی دام‌های آلوده به منظور پیشگیری از گسترش عفونت در گله‌های گاو و نیز انتقال آلودگی به جوامع انسانی را نخواهد داشت لذا عملاً کنترل و پیشگیری عفونت دچار مشکلات اساسی خواهد بود.

بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از یک روش سریع و در عین حال دقیق و با حساسیت بالا مثل واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(PCR= *Polymerase chain reaction*) (٣) در شناسایی حضور و دفع باکتری عامل بیماری یون از شیر گاوهای آلوده (چه با علائم و چه بدون علائم بالینی) در شرایطی که گسترش عفونت می‌تواند خسارات جبران ناپذیری به صنعت گاوداری و نیز بهداشت جامعه انسانی وارد کند ضروری است(١). سوابق کارهای تحقیقی انجام شده در نقاط مختلف دنیا نشان می‌دهد که توانسته‌اند به کرّات عامل بیماری یون را از شیر گاوهای با علائم بالینی جدا نمایند. همچنین جداسازی میکروب مذکور از مدفوع دام‌های آلوده و نیز از نمونه‌های برداشته شده از عقده‌های لنفاوی دستگاه گوارش و نواحی ایلئوسکال هم انجام گرفته است(٣٢). علاوه براین روش PCR توانایی شناسایی باکتری عامل بیماری یون را در نمونه های مدفوع و بافت‌های آلوده مثل روده، ناحیه دریچه‌های ایلئوسکال و نیز عقده‌های لنفاوی مربوطه را داشته است.این تحقیقات نقش مهم دفع باکتری مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزین از شیر و اهمیت آن در اپیدمیولوژی و گسترش عفونت مروبطه را در گاوداریها را، علی‌الخصوص پس از اجرای روشهای مدیریت بهداشتی زمانی بهتر نشان داده است که توانسته‌اند با پرهیز از مصرف شیر گاوهای آلوده توسط گوساله‌ها به میزان خیلی بیشتری از میزان ابتلاء به بیماری یون بکاهند(٢). از طرف دیگر توانسته‌اند مقاومت باکتری مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس را در مقابل عمل پاستوریزاسیون نشان دهند که این کار نقش بالقوه شیر پاستوریزه مصرفی جوامع انسانی را در انتقال این باکتری از دام به انسان با اهمیت کرده است(٦).

مواد و روش کار

در این تحقیق کشت میکروبی و نیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) بر روی نمونه‌های شیر ٨٠ رأس گاو به ظاهرسالم و نیز ٨٠ رأس گاو مشکوک به ابتلا به بیماری یون که از تعدادی از گاوداریهای صنعتی منطقه تبریز که سابقه بیماری یون در پرونده بهداشتی آن گاوداریها ثبت شده بود انجام گردید. همچنین ٢٠ نمونه از شیرهای آزمایش شده که باکتری مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس از آنها جدا شده بود پس از پاستوریزاسیون آنها و نیز ٢٠ نمونه شیر پاستوریزه کارخانه‌ای عرضه شده به

بازار مصرف تبریز انتخاب و آزمایشات فوق بر روی آنها هم انجام گردید. ضمناً نمام کارهای آزمایشگاهی هم روی خامه شیر و هم روی رسوب شیر انجام گرفت و این باعث شد که در واقع تعداد کل نمونه‌ها از ۲۰۰ نمونه به ٤۰۰ نمونه برسد.

روش کشت میکروبی نمونه‌های شیر:

نمونه‌های شیرکه در ظروف ۵۰ میلی‌لیتری استریل اخذ شده بود، در دور حدود ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس خامه به مقدار حدوداً ۵ml برداشت شده و در لوله آزمایش استریل دیگری ریخته شده و پس از خالی کردن مایع روئی رسوب، عمل آلوده‌زدایی هم بر روی رسوب و هم بر روی خامه با استفاده از محلول ۰/۷۵ ٪ HPC (*Hexadecyl pyridnium choloride*) به این شکل انجام می‌گرفت که حدود ۲۰ml از این ماده (تقریباً ٤ برابر رسوب یا خامه) را به لوله حاوی رسوب و نیز خامه اضافه کرده و لوله‌ها چندین بار تکان داده می‌شد تا خوب مخلوط شوند و سپس هر کدام به مدت ۵ ساعت در دمای اتاق قرار می‌گرفتند. بعد از این مدت محتویات لوله‌ها بار دیگر در دور حدود ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب پس از کنترل pH ودر صورت نیاز رساندن آن به pH = ۷/۲ – ۷/٤ با استفاده از سود نرمال به ٤ محیط کشت هرولد حاوی زرده تخم‌مرغ (*Herrold 's egg yolk medium*)که به صورت شیب‌دار تهیه شده بود انتقال داده می‌شد (۳ تا از محیط‌های مذکور حاوی حداقل ۲mg/۱۰۰۰ml مایکوباکتین و یا چندین برابر عصاره مایکوباکتریوم فلئی *(Mycobacterium phlei)* ، یک محیط هم بدون مایکوباکتین بود). با توجه به دیر رشد بودن (*Mycobacterium avium paratuberculosis* M.a.p)قسمت عمقی محیط شیب‌دار نسبتاً ضخیم تهیه می‌شد تا محیط در زمان انکوباسیون طولانی مدت خشک نشود و از آلوده شدن فضای انکوباسیون توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها هم تا حد امکان ممانعت بعمل می‌آمد. پس از کشت، محیطها به صورت افقی در انکوباتور ۳۷°c قرار داده می‌شد تا اینکه سطح تماس نمونه با سطح محیط در حداکثر خود باشد و شانس جداسازی افزایش پیدا کند(١٤).

تذکر۱ : بسیار مهم است که pH محیط‌های بالا در حالتی که می‌خواهد جامد شود در حد ۷/٤–۷/۲ تنظیم گردد.

تذکر۲ : توصیه می‌شود بعد از عمل آلوده‌زدایی از رسوبی که به منظور کشت استفاده می‌شود یک گسترش مناسب میکروبی تهیه و به روش ذیل نیلسن رنگ‌آمیزی و اندازه، مورفولوژی و آرایش باکتری‌های موجود احتمالی بررسی شود(١٤).

استخراج DNA از مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس :

در بررسی مولکولی ژنوم باکتری، اولین مرحله، استخراج DNA از ژنوم باکتری می‌باشد. باکتری عامل یون دارای یک دیواره غنی از چربی، پلی‌ساکارید و پروتئین می‌باشد.

دراستخراج DNA از باکتری توسط روش SDS (*Sodium dodecyle sulfat*) و پروتئیناز K، DNA خالص و یکدست بدست نمی‌آید. در این تحقیق برای بدست آوردن DNA خالص علاوه بر استفاده از SDS و پروتئیناز K، از ماده CTAB (*N- cetyl- N,N,N- trimethyl ammonium bromide*) استفاده شد. CTAB یک دترجنت کاتیونیک می‌باشد که در شرایط یونی مختلف اعمال گوناگونی انجام می دهد. CTAB در شرایط *low ionic strength* باعث رسوب اسیدهای نوکلئیک می‌شود و پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها در محلول باقی می‌مانند و برعکس در شرایط *high ionic strength*، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها کمپلکس تشکیل می‌دهند و اسیدهای نوکلئیک در محیط باقی می‌مانند(۳۳).

در این تحقیق برای استخراج DNA مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس ازCTAB، در شرایط یونی بالا(۰/۵M <

Nacl) استفاده شد. با بکار بردن CTAB در این شرایط، کمپلکس CTAB با پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها تشکیل شد و در نهایت این کمپلکس با اثر دادن ایزوآمیل الکل کلروفرم جدا شد و اسیدهای نوکلئیک با افزودن ایزوپروپانول روی مایع رویی بدست آمد. DNA بدست آمده توسط این روش خالص و یکدست می‌باشد(۱۵).

پرایمر مورد استفاده :

با استفاده از مقالات موجود و با مراجعه به بانک ژنی و بررسی سکانس IS900 کروموزوم باکتری مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس در نهایت یک جفت پرایمر به شرح زیر از طریق شرکت طوبی نگین تهیه و آماده گردید:

GGT TCG ACG GGG FP-25: CCA GC ATG
CGG TAC CCT CGG RP-26: GGT CC CGT

که محصول پرایمرهای بالا قطعه‌ای به اندازه۲۲۸bp می‌باشد.

برنامهٔ استفاده شده در ترمال سایکلر:

برنامه مورد استفاده با پرایمرهای FP-25و RP-26 در جدول۱ آمده است.

جدول ۱: برنامه مورد استفاده با پرایمرهای FP-25و RP-26

توسعه	اتصال	دناتوراسیون	
-----	-----	٤ دقیقه در ^{oc}۹٤	سیکل اول
٤٠ ثانیه در ^{oc}۷۲	۳۰ثانیه در ^{oc}۷۰	۳۰ثانیه در ^{oc}۹٤	سیکلهای اصلی*
۷ دقیقه در ^{oc} ۷۲	-----	-----	سیکل آخر

سیکلهای اصلی ۳۵ بار تکرار می‌گردد.

در این برنامه و در طی روند PCR قطعه‌ای به اندازه ۲۲۸bp تکثیر داده می‌شود که درعمل الکتروفورز با مقدار ۷/۵ µl ازمحصول PCR و در آگاروز ۱/۲٪ باند آن مشخص می‌گردد.

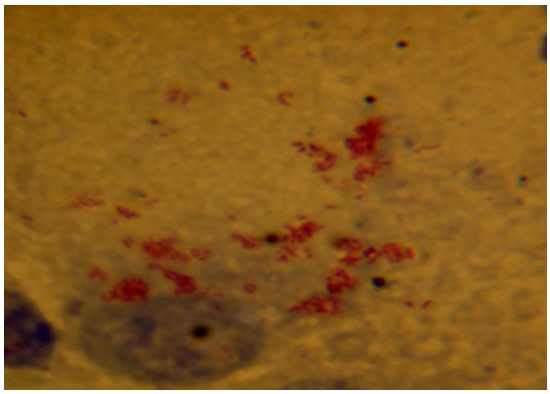
الکتروفورز DNA در ژل آگاروز:

پس از الکتروفورز ابتدا ژلها در تانکی حاوی اتیدیوم بروماید (10mg/ml) قرار داده شده و پس از حدود ۱۵دقیقه از این

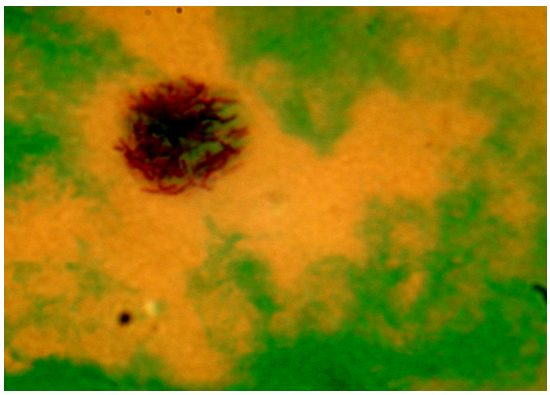
رنگ خارج و با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور بررسی گردیدند (۱۵و۱۸).

نتایج

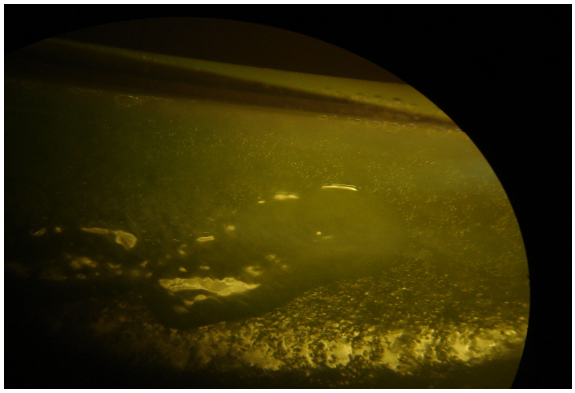
اشکال تهیه شده از نتایج آزمایشات مستقیم، کشت میکروبی اختصاصی باسیل یون و همچنین نتایج PCR نمونه‌های شیر در نگاره های ۱ تا ٤ آمده است.



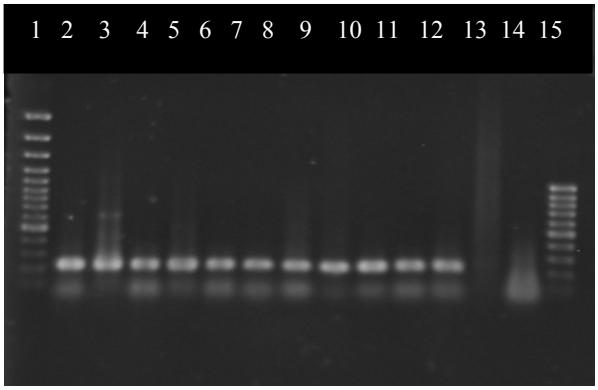
نگارهٔ ۱: باسیلهای اسیدفست عامل بیماری یون در آزمایش مستقیم نمو نه شیر آلوده زدایی شده (رنگ آمیزی اختصاصی ذیل نیلسن)



نگارهٔ ۲: کلامپ باسیلهای اسیدفست عامل بیماری یون در آزمایش مستقیم انجام شده در مورد کشت مثبت نمونه‌های شیر(رنگ آمیزی اختصاصی ذیل نیلسن)



نگارۀ۳: پرگنه تشکیل شده از باکتریهای عامل بیماری یون درسطح محیط کشت جامد هرولد حاوی زردۀ تخم مرغ و مایکوباکتین



نگارۀ ٤: دراین شکل در ردیف ۲ کنترل مثبت و در ردیفهای ۳ تا ۱۲ محصولPCR ۲۲۸bp و در ردیفهای ۱۳ و ١٤ نمونه منفی دیده می‌شود. همچنین ردیف اول سایز مارکر DNA ladder plus۱۰۰bp شرکت Fermentas به ترتیب حاوی باندهائی به اندازهbp ۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰ ، ۱۲۰۰، ۱۰۳۱، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ٦۰۰، ۵۰۰، ٤۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ردیف ۱۵ سایزمارکر ۱۰۰bp شرکت Fermentas به ترتیب حاوی باندهایی به اندازه ۱۰۳۱bp، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۵۰۰، ٤۰۰، ۳۰۰ ،۲۰۰، ۱۰۰، ۸۰ می‌باشد.

جدول۲ نشان دهنده نتایج آزمایش های انجام شده در این تحقیق می‌باشد.

جدول ۲:نتایج آزمایشهای انجام شده در این تحق

نوع نمونه	تعداد	تعداد موارد مثبت کشت در محیط جامد هر ولد حاوی زردۀ تخم مرغ و مایکو باکتین	تعداد موارد مثبت PCR
شیر گاوهای مشکوک به ابتلا به بیماری یون	۸۰	۱۷	۲۵
شیر گاوهای به ظاهرسالم	۸۰	٦	١٤
شیرپاستوریزه کارخانه‌ای	۲۰	۳	۷
شیرپاستوریزه آزمایشگاهی	۲۰	۲	۳
جمع	۲۰۰	۲۸	٤۹

با توجه به نتایج حاصله که در جدول۲ ثبت شده است مشخص گردید که آلودگی شیر گاوهای مشکوک به بیماری یون به باکتری M.a.p توسط آزمایش مستقیم در ۱۲ مورد مثبت دیده شده است که این شامل ۱۵٪ موارد می‌شود در حالیکه وقتی همین نمونه ها از طریق کشت در محیط هرولد حاوی زرده تخم‌مرغ دارای مایکوباکتین بررسی شدند ۱۷ مورد مثبت شد که این تعداد شامل ۲۱/۲۵٪ موارد بود. اما وقتی نمونه‌های مذکور توسط PCR با محصول ۲۲۸bp بررسی گردید نتیجه ۲۵ مورد مثبت بود که شامل ۳۱/۲۵٪ موارد می‌باشد. همچنین در مورد شیر گاوهای به

ظاهر سالم فقط در ۷ نمونه آزمایش مستقیم برای مشاهده M.a.p مثبت بود که شامل ۸/۷۵٪ موارد بود ولی نتایج حاصله از کشت میکروبی همین نمونه‌ها نشان داد که ٦ نمونه شیر مثبت است که شامل ۷/۵٪ موارد می‌باشد اما وقتی همین نمونه‌های شیر با روش PCR بررسی شد نتایج مثبت حاصله از PCR قطعه ۲۲۸ در ١٤ نمونه (شامل ۱۷/۵٪ موارد) ثبت گردید.

در همین تحقیق بررسی همزمان شیرهای پاستوریزه کارخانه‌ایی عرضه شده به بازار مصرف تبریز در هیچ موردی به آزمایش مستقیم جواب مثبت ندادند در حالیکه ۳ نمونه از این شیرها به کشت میکروبی جواب مثبت دادندکه با توجه به تعداد ۲۰ نمونه شیر پاستوریزه آزمایش شده تعداد موارد مثبت حاصله از کشت میکروبی این شیرها ۱۵٪ مشخص گردید و این در حالیست که همین شیرها به آزمایش PCR نتایج متفاوتی دادند بطوریکه نتایج مثبت حاصله از PCR قطعه ۲۲۸bp در ۷ نمونه که شامل ۳۵٪ موارد می باشد مشخص گردید.

همچنین بدنبال مشخص شدن نتایج حاصله از کشت نمونه‌های شیر گاوهای به ظاهر سالم و مشکوک به ابتلا به بیماری یون تعداد ۲۰ نمونه از آنها که باکتری M.a.p از آنها جدا شده بود جهت مشخص نمودن کارائی پاستوریزاسیون در ازبین بردن و یا غیر فعال سازی باکتری مذکور در آزمایشگاه میکروب‌شناسی تحت تاثیر پاستوریزاسیون کند (دمای ٦٥^{oc} و مدت ۳۰ دقیقه) قرار گرفته و سپس تمام آزمایشات اعمال شده در مورد نمونه‌های قبلی اینجا هم انجام گردید که نتایج حاصله بدین شکل بود که فقط در یک نمونه آزمایش مستقیم مثبت شد که شامل ۵٪ موارد بود در حالیکه در دو نمونه کشت میکروبی مثبت بود که شامل ۱۰٪ موارد بود ولی نتایج مثبت حاصله از PCR قطعه ۲۲۸bp در سه نمونه که شامل ۱۵٪ موارد بود بدست آمد.

بحث

در مطالعه‌ای که بر روی شیر ۲۱۱رأس گاو مربوط به گله‌هائی که در آنها سابقه‌ی بیماری یون وجود داشت انجام گردید مشخص شد که فقط ۹ نمونه از آنها (٤٪ موارد) به کشت شیر جواب مثبت دادند در حالیکه وقتی همین نمونه‌ها از طریق PCR و با استفاده از بررسی عنصر IS900 ژنوم باکتری عامل یون آزمایش گردید در نمونه‌های مربوط به ٦۹ رأس (۳۳٪ موارد) وجود عامل بیماری یون در شیر نشان داده شد. همچنین وقتی همین آزمایشها بر روی ۲۰ نمونه از شیرهای مربوط به تانک شیر گاوداریهای مذکور انجام گرفت ۱۰ نمونه (۵۰٪ موارد) با روش PCR جواب مثبت نشان داد در حالیکه جواب کشت میکروبی فقط در مورد یک نمونه(۵٪ موارد) توانست مثبت باشد. لذا این تحقیق توانایی بالای روش PCR را برای آشکارسازی آلودگی شیر کارتیه‌های گاوها و نیز شیر مربوط به تانک شیر گاوداریها به عامل بیماری یون را به خوبی نشان داد(٢٤). نتایج حاصله از تحقیق حاضر هم در قسمت آزمایش PCR که در آن در ۳۱/۲۵٪ موارد عامل بیماری یون در شیر گاوهای مشکوک به ابتلا به بیماری یون نشان داده شد تقریباً یکسان می‌باشد. در حالیکه نتایج کشت شیر خیلی متفاوت می‌باشد(۹).

در مطالعات سالهای اخیر در مورد گله‌های گاوهای شیرده آمریکایی نشان داده است که قریب به ٤۰٪ گاوهای این گله‌ها به عامل بیماری یون آلوده شده‌اند که این امر در آمریکا باعث صدمات اقتصادی فراوان به صنعت شیر ولبنیات می‌شود(٢٤). که نتایج حاصله از این تحقیق نیز تقریباً همین امر را در مورد آلودگی شیرخام گاوها مشخص نموده است(۳۱/۲۵٪ در مورد شیر گاوهای مشکوک به ابتلا به بیماری یون و ۱۷/۵٪ در مورد شیر گاوهای به ظاهرسالم گاوداریهایی شیری)(٢٤).Greet Brratin در مطالعه‌ای که در سال۱۹۹۹ بر روی شیرهای پاستوریزه شده گله‌های با

سابقه بیماری یون انجام داده است توانسته با استفاده از PCR مربوط به عنصر IS900 وجود باکتری عامل بیماری یون را در ۷٪ نمونه‌ها آشکار کند همچنین در مطالعه مشابهی که در سال۲۰۰۲ توسط Giese و Ahrens انجام گرفت این باکتری در ۸٪ شیرهای پاستوریزه مشخص گردید(۲٤).

آزمایشات متعدد در خصوص احتمال بقاء باکتری M.a.p در شیر پاستوریزه تجاری در بریتانیا به عنوان بخشی از بررسی‌های بسیار گسترده درخصوص کیفیت میکروبیولوژیک شیر پاستوریزه و شیر خام گاوها در این کشور نشان داد که حداقل ۱/۸٪ از نمونه‌های شیر پاستوریزه آزمایش شده از نظر کشت باکتری مذکور مثبت بودند. البته همین تحقیقات یک استثنای مهم را هم در این خصوص مشخص کردند که آن هم مربوط به زمانی بود که شیر آلوده به M.a.p از گاوهای مختلف یک گله مبتلا به عفونت پاراتوبرکلوزیس جمع‌آوری می‌شود که در این صورت به هنگام جمع‌آوری در تانکرهای حمل شیر به کارخانه و نیز جمع‌آوری آنها به همراه شیرهای گله‌های دیگر در تانکرهای اصلی کارخانه‌های شیر پاستوریزه باعث می‌شود که تعداد باکتری مذکور درشیر به سطح خیلی پایینی کاهش یابد ولذا پاستوریزاسیون معمولی و متداول کارخانه‌ای به طور موثر در مورد باکتریهای فوق الذکر اعمال می‌شود. یافته اخیر مشخص نمود که آلودگی شیرهای پاستوریزه بسته به میزان آلودگی اولیه در نمونه‌های جمع‌آوری شده در تانکرهای شیر می‌تواند از میزان ۱/۸٪ مشخص شده در این تحقیق متفاوت باشد(۱٦). اما در تحقیق حاضر کشت میکروبی شیرهای پاستوریزه تجاری در ۱۵٪ موارد مثبت بود در حالیکه جواب آزمایش PCR آنها حدود ۳۰٪ مشخص گردیده است که وجود همین اختلاف در یک تحقیق که در سالهای ۲۰۰۰-۱۹۹۹ در بریتانیا انجام گرفته است نیز دیده می‌شود(۱۸).بطوریکه تحقیقی که در سالهای ۲۰۰۰-۱۹۹۹ میلادی در بریتانیا در مورد آلودگی شیر گاو به باکتری M.a.p انجام گرفت نشان داد که موارد مثبت با آزمایش PCR در ۱۱/٦٪ نمونه‌ها وجود داشت در حالیکه نتایج حاصل از کشت میکروبی همین نمونه‌ها فقط در ۱/۸٪ از موارد مثبت بود که این اختلاف می‌تواند بیانگر غیر فعال بودن این باکتری در اثر عمل پاستوریزاسیون متداول کارخانه‌ای باشد، درحالی که DNA باکتریهای کشته هنوز وجود دارد. از طرف دیگر نتایج همین تحقیق نشـان داد که نمونه‌های شیرخام گاوها در ۷/٦٪ موارد به آزمایش PCR جواب مثبت و در ۱/٦٪ موارد هم به کشت میکروبی جواب مثبت دادند. عقیده براینست که این نتیجه نمی‌تواند توجیه کننده اثر بخشی قابل توجه پاستوریزاسیون بر بقاء باکتری M.a.p در شیر باشد. لذا به نظر می رسد که مقدار زیادی از اختلاف بین نتایج PCR و کشت میکروبی مربوط به حساس‌تر بودن روش PCR باشد، بایستی توجه کرد که حداقل حد ردیابی روش کشت بعد از ضدعفونی با محلول ۰/۷۵٪ HPC به مدت حدود ۵ ساعت تقریباً 10 CFU/50ml نمونه شیر می‌باشد. در حالیکه حداقل حد ردیابی PCR در این شرایط بسیار پایین‌تر از این مقدار است. به طوریکه حدوداً 1CFU/50ml نمونه شیر تخمین زده شده است(۱٦). البته به نظر می‌رسد تعداد موارد متفاوت مربوط به تعداد نمونه‌های آزمایش شده باشد و موضوع مهم، مساله اختلاف درکارائی دو روش کشت و PCR می‌باشدکه تحقیق حاضر هم همان را اثبات کرده است.

مطالعات اخیر در ناحیه Wisconsin آمریکا نشان داد که حدود ۳٤٪ ازگاوهای شیری با مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس آلوده‌اند. همچنین گزارش اخیر سیستم دیده‌بان سلامت ملی حیوانات(NAHMS) برآوردی حدود ۲۲٪ آلودگی در گاوهای شیری ایالات متحده آمریکا را نشان می دهد. ضمن اینکه میزان شیوع بیماری یون را نیز حدود ۱۰٪ و یا حتی مقداری هم بیشتر محاسبه کرده است(۱۰). نتایج این مطالعات هم با نتایج تحقیق حاضر

مخصوصاً با نتایج آزمایشات PCR که آلودگی به عامل یون را در شیر گاوهای مشکوک به ابتلا به بیماری یون ۳۱/۲۵٪ و درشیرگاوهای به ظاهر سالم ۱۷/۵٪ برآورده کرده است همخوانی دارد البته اختلاف‌های ملاحظه شده بیشتر مربوط به میزان کمتر دفع باکتری از شیر در قیاس با مدفوع می‌باشد بطوریکه نتایج بررسی‌های مختلف بر روی کشت شیر در مقایسه با کشت مدفوع جهت جداسازی عامل بیماری یون مشخص کرده است که سرعت بسیار پائین رشد و نیز میزان به مراتب کم‌تر این باکتری درشیر در مقایسه با مدفوع احتمالاً توجیه کنندهٔ مسائل زیر می‌باشد :

دستورالعمل جداسازی M.a.p از شیر که توسط محققان استفاده می‌شود بایستی از آنچه که در مورد نمونه‌های مدفوع استفاده می‌شود متفاوت باشد.

۲- M.a.p چون یک باکتری سخت‌گیر است و به نیازهای رشد خود وابستگی شدید دارد لذا پایداری آن در شیر به مراتب کمتر از مدفوع خواهد بود(۱۷).

۳- به همان دلایل گفته شده بنظر می‌رسد که غالباً تعداد باکتریهای عامل بیماری یون در شیر گاو آلوده درمقایسه با مدفوع به مراتب کمتر باشد(۱۷و۲٤).

تحقیقات وسیعی که در مورد آلودگی شیرگاو (پاستوریزه و خام) در بریتانیا انجام گرفته اثبات کرده است که تعداد پرگنه‌های حاصله از کشت شیر در موارد مثبت نشان داده است که سطوح پایین M.a.p یعنی ۲۰-٤CFU/50ml در هر دو نوع نمونه شیر وجود دارد که این سطح آلودگی گزارش شده همانند سطح آلودگی گزارش شده در مورد شیر گاوهای مبتلا ولی بدون علائم یون یعنی حدود ۸-۲ CFU/50ml در نمونه شیر می‌باشد(۱٦). از طرف دیگر تحقیقات بعدی نشان داده است که مدفوع گاوها در بیماری یون امکان دارد که حاوی حدود 10^8CFU از باکتری M.a.p در هر گرم مدفوع باشد بنابراین سطح واقعی عفونت با باکتری مذکور در شیر خام حیوان مبتلا به عفونت یونی بسته به تدابیر بهداشتی مورد استفاده در اتاق شیر دوشی امکان دارد که بسیار بالاتر از ۸-۲CFU/50ml در نمونه شیر باشد(۱٦).

نتایج تحقیق حاضر از چند جنبه مشکلات مربوط به شناسایی عامل بیماری یون را از طریق کشت میکروبی نشان داد که مهمترین آنها عبارت بودند از اینکه اولاً تعداد موارد شناسایی شده توسط این روش غالباً کمتر از موارد شناسایی شده توسط آزمایش PCR می‌باشد و لذا به نظر می‌رسد که کشت میکروبی نمی‌تواند آلودگی واقعی شیر را به M.a.p مشخص نماید. از طرف دیگر طولانی‌شدن مدت انکوباسیون برای مشاهده پرگنه این باکتری، غالباً باعث افزایش احتمال آلودگی ثانویه آزمایشگاهی و نیز حتی خشک شدن و ناکارآمد شدن محیط کشت قبل از حصول نتیجه لازم می‌شد که احتمالاً در ثبت نتایج واقعی تاثیر گذاشته است و این در حالی بود که رشد باکتری در محیط مایع هرولد حاوی زرده تخم‌مرغ و مایکوباکتین بسیار سریع‌تر و مناسب‌تر اتفاق می‌افتاد. تعدادی از مطالعات هم که در زمینه مسائل مربوط به کشت M.a.p انجام گرفته غالباً مؤید یافته‌های این تحقیق می‌باشد همچنین در تحقیقی گزارش کرده‌اند که از تعداد ۵۰ رأس گوسفند آلوده به بیماری یون در استرالیا فقط در مورد ٤ رأس (۸٪ موارد) توانسته‌اند که باکتری عامل یون را در آزمایشگاه و در محیط کشت جدا کنند. مشابه همین مسئله در خصوص مشکلات رشد میکروارگانیسم عامل بیماری یون در گوسفندان آلمان، نیوزلند، اسکاتلند، کانادا، آمریکا، اسپانیا و ایسلند نیز آزمایش و تجربه شده است(۷).

از طرف دیگر در مطالعات مختلف مشخص شده است که تفاوت در کشت آزمایشگاهی سویه‌های مختلف عامل بیماری یون ممکن است باعث بوجود آمدن حالات مختلف شود که احتمالاً مربوط به عوامل رشد متفاوت هر کدام از آنها می‌باشد که به امر جداسازی میکروبی آنها با یک روش واحد خدشه ایجاد می‌کند (۷). همچنین اعلام شده است که مشکل جداسازی باکتری عامل یون در گوسفندان مشابه

حالتی است که برای مایکوباکتریوم عامل جذام انسان وجود دارد. بطوریکه این باکتری یعنی مایکوباکتریوم لپرا(Mycobacterium lepra)مایل به رشد در محیط مایع دارد در حالیکه جداسازی آندر محیط جامد بسیار دشوار انجام می‌گیرد (۷). بایستی ذکر گردد که با توجه به نتایج حاصله از تحقیق حاضر و مقایسه آن با تحقیقات مختلف انجام شده در این زمینه به جرأت می‌توان گفت که آزمایش PCR جهت شناسایی عفونت پاراتوبرکلوزیس کارآئی بسیار بالائی را در مقایسه با دیگر روش‌های متداول داراست که جهت مشخص کردن میزان تطابق آزمایش های مورد استفاده در این تحقیق مبادرت به انجام تست Kappa شد که نتایج حاصله به این صورت است که توافق کشت با PCR اساسی می‌باشد(K=۰/٦٧). لذا باتوجه به مطالب بالا بایستی در استفاده از آزمایش PCR از پرایمرهایی استفاده کرد که مشابه پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق محصول حاصله از آنها حاوی ۲۲۸bp باشد.

در یک مطالعه تجربی درمورد کشت شیر برای جداسازی M.a.p در روی محیط هرولد حاوی مایکوباکتین وزرده‌ی تخم‌مرغ مشخص شده است که جواب مثبت زمانی آشکار می شود که 100 CFU/50ml ازاین باکتری در نمونه موجود باشد در حالیکه برای ایجاد جواب مثبت از همین نمونه‌ی شیر از طریق PCR وجود حدود ۱۰ CFU/50ml از باکتری در نمونه غالباً کافی به نظر می‌رسد(۲٤). در تشخیص موارد کلینیکی بیماری یون گاو آزمایش الایزا و کشت مدفوع حساسیتی حدود ۸۵٪ را دارا هستند. در حالیکه این حساسیت در اولین دوره شیردهی حیوان در مورد هر دو آزمایش کاهش می‌یابد به طوریکه این کاهش برای الایزا حدود ۲۵٪ و برای کشت مدفوع حدود ۳۵٪ می‌باشد(۱۰).

در تحقیقی که بر روی شیر ۲٦ رأس گاو در استرالیا انجام گرفت از نمونه مربوط به ۹ رأس از آنها یعنی ۳۵٪ موارد مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس جدا گردید. همچنین در گاوهای مذکور بیماری یون ازطریق مطالعات هیستوپاتولوژیکی و آزمونهای بالینی نیز تائید شد. از طرف دیگر مشخص شد هر چند که در این مطالعه نمونه‌های آزمایش شده مربوط به شیر گاوهای با علائم بالینی واضح بیماری یون بود ولی می‌توان چنین تصور کرد که گاوهای با علائم تحت بالینی نیز M.a.p را از شیر خود دفع می‌نمایند. لازم به ذکر است که مطالعات نشان می‌دهد که درگله‌هائیکه بیماری یون در آنها از طرق مختلف (مثل بالینی، هیستوپاتولوژی و کشت) محرز شده است تعداد موارد تحت بالینی این بیماری به مراتب بیشتر از میزان شیوع بیماری به صورت بالینی است. که چنین دامهایی عامل مهمی در گسترش آلودگی در داخل گله نیز خواهد بود. این مشکل زمانی پیچیده‌تر خواهد شد که در یک گاوداری از این شیرهای به ظاهر سالم ولی آلوده برای سایر گوساله‌ها نیز استفاده شود(۳۰).

همچنین یک بررسی در مورد عفونت‌های مایکوباکتریوم در آهوهای وحشی اسکاتلند نشان داده است که PCR بطور موثری حساس‌تر از کشت جهت تعیین مایکوباکتریوم‌ها در غدد لنفی است. همچنین این آزمایش بطور مناسبی در تشخیص وجود M.a.p در خون گاوهای آلوده کاربرد دارد در حالیکه جداسازی آن از راههای متداول دیگر بسیار سخت است(۲۷).

در مطالعه‌ای هم که در یک گله شیری ۷۲ رأسی برای تشخیص M.a.p انجام شده حدد ٦۰٪ نمونه‌های شیر با آزمایش PCR مثبت شدند در حالیکه همین نمونه‌ها به کشت باکتری فقط در ۳۰٪ موارد جواب مثبت داده‌اند(۲۷).

از طرف دیگر مطالعات بعدی نیز نشان داده است که در عفونت‌های تحت بالینی بیماری یون باکتری M.a.p در مونوسیت‌های خونی وماکروفاژهای بافتی حاضر هستند وبعدها ممکن است از آنها بیرون بریزند که در این موارد مخصوصاً آزمایش PCR با کارائی بالایی حضور M.a.p را بسیار بهتر در مقایسه با کشت می‌تواند شناسایی کند چرا

که در بیشتر چنین مواردی میکروارگانیسم داخل سلولی مذکور به تعداد کافی در درسترس نیست تا توسط کشت متداول باکتریائی جداسازی شود در حالیکه برای PCR چنین مشکلی نداریم(۲۷).

اما در تحقیق حاضر علی‌رغم اینکه کارائی بالای PCR نسبت به کشت میکروبی جهت شناسایی M.a.p در شیر مشخص شد منتها در PCR هم مشکلاتی وجود دارد که در تحقیقات انجام شده هم غالباً به این مسائل به نوع دیگر اشاره شده است: در مطالعه‌ای نشان داده شده است که توانایی شناسایی عامل بیماری یون با آزمایش PCR زمانیکه از پرایمرهایی استفاده شود که محصول PCR در آن قطعه‌ای شامل ۲۲۹bp باشد بسیار بالاتر است(۲٤). در تحقیقی نشان داده شده است که زمانیکه میزان عامل یون در نمونه شیر کمتر از ۱۰CFU/ml باشد اثبات حضور آن توسط PCR می‌تواند بسیار متفاوت باشد که این مسئله غالباً به از دست رفتن بسیاری از این ارگانیسم‌ها در قسمت خامه شیر در هنگام سانتریفوژ نمونه مربوط می‌شود.(۲٤) لذا برای بررسی جامع و کامل نمونه‌های شیر حتماً بایستی خامه شیر نیز در آزمایش‌ها شرکت داده شوند(۲٤) این مسئله مهم در تحقیق حاضر هم مشخص شد چراکه همانطور که اشاره شد تعداد زیادی از جواب‌های مثبت آزمایشPCR مربوط به خامه شیرها بود. از طرف دیگر بایستی به این نکته توجه داشت که از نظر تئوری PCR توانایی تشخیص حتی یک ژنوم انفرادی را نیز در یک نمونه داراست لذا حساسیت بالائی برای PCR در مقایسه با دیگر روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی قائل هستند. مخصوصاً استفاده از این روش در جائیکه برای انجام روش‌های روتین میکروبشناسی محدودیت‌های جدی وجود دارد (مثل تشخیص باکتریولوژیک بیماری یون) برای بهبود تشخیص و شناسایی عامل بیماری کاربرد مهمی دارد(۱۷). ولی با این وجود برای انجام آزمایش PCR هم محدودیت‌هایی مطرح است که عمدتاً مربوط به موارد زیر است:

۱- DNA فراوان بدست آمده از میزبان یا میکروارگانیسم‌های دیگر غیر از میکروارگانیسم مورد نظر.

۲- وجود مواد ممانعت کننده از گسترش PCR که غالباً در نمونه‌های بالینی وجود دارد.

۳- میزان آمادگی متفاوت DNA ژنوم هر میکروارگانیسم جهت انجام PCR موفق بر روی آن(۱۷).

اما نکته مهم دیگری که در این تحقیق مشخص شد که هم از نظر بهداشت دام و نیز ازنقطه نظر بهداشت تغذیه انسان بسیار حائز اهمیت است مشخص شدن آلودگی شیرهای پاستوریزه تجاری و حتی پاستوریزه شده آزمایشگاهی به عامل بیماری یون است البته اختلاف مشخصی بین نتایج PCR این نمونه‌ها و کشت میکروبی آنها ملاحضه شد که دلایل مشخص زیر برای توجیه آن مطرح است که نشان می‌دهد چرا در برخی موارد با اینکه آزمایش PCR یک نمونه شیر پاستوریزه مثبت است ولی کشت آن منفی می شود بدین جهت تعداد موارد مثبت کشت میکروبی به مراتب کمتر از موارد مثبت PCR می‌گردد. تحقیقات انجام شده دردانشگاههای ایرلند و بریتانیا در مورد حساسیت مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس به گرما نشان داده است که تحت شرایط آزمایشگاهی پاستوریزاسیون، این باکتری می‌تواند در دمای ۷۲°c به مدت ۱۵ثانیه زنده بماند، همچنین مشخص شده که بقاء این باکتری زمانی محرز است که باکتری مذکور در شیر خام به تعداد بیش از ۱۰۰CFU/ml وجود داشته باشد (۱٦).

برخی از پژوهشگران از احتمال بهبودی و ترمیم متعاقب آسیب ناشی از گرمای نیمه کشنده (نظیر روش پاستوریزاسیون ۱۵ثانیه‌ای در دمای۷۲°c) توسط M.a.p خبر داده‌اند. هر چند که هنوز مدارک محکم علمی برای اثبات این ادعا بدست نیامده است واثبات قطعی این امر مستلزم بررسی‌های بیشتری در آینده می‌باشد (۱٦).

نتایج نهایی حاصله از بررسی چند ساله اخیر محققین بریتانیایی در مورد آلودگی شیرهای خام و پاستوریزه تجاری

ارائه شده به بازار مصرف این مطلب را روشن کرده است که شیرهای پاستوریزه خرده فروشی که به صورت تجاری به بازار عرضه می‌شوند گاهگاهی می‌توانند حاوی سطوح پایینی از M.a.p قابل زیست باشند. البته برخورد و رویارویی بالقوه بهداشت عمومی با این وضعیت به درستی قطعی و روشن نیست و معلوم نشده است که شیوع بیماری کرون در انسان‌ها آیا ثابت باقی مانده است یا خیر؟ لذا با توجه اهمیت بهداشتی حضور M.a.p در شیرهای پاستوریزه بازاری که احتمال پتانسیل بیماریزا در انسان مخصوصاً در ارتباط با اتیولوژی بیماری کرون را داراست این مسئله یعنی حضور باکتری M.a.p حتی در شیرهای پاستوریزه تجاری می‌تواند امری ناخواسته و ناخوشایند تلقی گردد(۱۶). در نهایت هم بایستی به این نکته اساسی توجه کرد که یکی از مهمترین مشکلاتی که در بهبود تشخیص عفونت ناشی از مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس درگله دام‌ها وجود دارد اینست که واقعاً یک آزمایش کامل و یا اصطلاحاً استاندارد طلایی واقعی برای این مسئله وجود ندارد که بتوان ارزش واقعی آزمایش های جدید ابداع شده نظیر انواع روش‌های PCR را با آن مقایسه کرد. هر چند که اجباراً بایستی کشت میکروبی را ولو بطور ناکامل بدین منظور پذیرفت چراکه این روش قدیمی ولی نسبتاً با ارزش متاسفانه نمی‌تواند تمام حیوانات عفونی را در یک جمعیت مشخص کند و فقط زمانی ارزش مقایسه‌ای می‌تواند داشته باشد که هدف مشخص کردن دام‌هایی است که این باکتری را دفع می کنند(۳) البته هدف تحقیق حاضر هم همین مسئله بود لذا بطور نسبی می‌شود مقایسه‌ای بین کارائی PCR و روش کشت را انجام داد.

اما در مورد اینکه دفع M.a.p چه اهمیت‌های بهداشتی برای دام و انسان دارد مطالب زیادی مطرح است بطوریکه مطالعات متعدد در ایالات متحده امریکا در خصوص بیماری یون نشان داده است گاوهائیکه دارای عفونت مزمن بوده و به کشت مدفوع جواب مثبت داده‌اند در مقایسه با گله‌هائیکه جواب منفی می دهند حدود۱۵٪ شیر کمتری تولید می‌کنند. همچنین یافته‌های مشابهی به وسیله آزمایش الایزا در گاوها گزارش شده که نتایج حاصله اثرات زیان‌آوری را بر روی افزایش تولید شیر نشان می‌دهد(۱۰). و همچنین در خصوص اهمیت و میزان ماندگاری M.a.p در داخل شیرخام و پاستوریزه که هم از بعد بهداشت و تغذیه دام‌ها مخصوصاً گوساله‌های نوزاد و هم از بعد بهداشت عمومی انسان مخصوصاً استفاده از شیر و مواد لبنی حائز اهمیت است بررسی‌های متعددی انجام گرفته است ولی نتایج یکی از آنها شاید بسیار جالبتر و مهمتر باشد بطوریکه در تحقیقی تجربی در بریتانیا اثبات شد که باکتریهای M.a.p موجود در شیر خام گاوهای مبتلا به عفونت یون بیشتر از سویه‌های کشت شده همین باکتری در آزمایشگاه که به داخل لوله‌های آزمایش حاوی شیر اضافه شده بود در برابر گرما مقاوم بوده است(۱۶). که این قضیه می‌تواند توجیه‌گر تفاوت در آزمایش بر روی شیرهای آلوده خام و نیز شیرهایی باشد که بطور تجربی به باکتری M.a.p آلوده می‌شوند بطوریکه گاهی نتایج حاصله از بررسی آنها همخوائی‌های لازم و مورد انتظار را ندارد.

البته بر همین اساس هم انتقادهای عمومی بر علیه یافته‌های آزمایشگاهی در خصوص مدت زمان تحمل دمای پاستوریزاسیون توسط عامل بیماری یون وجود دارد چراکه به نحوه شبیه سازی شرایط آزمایشگاهی و طبیعی ایرادهایی وارد شده است. ولی در هر حال مطالعات اخیر نشان داده است که نتایج معتبر درباره مقاومت گرمائی M.a.p فقط با استفاده از بررسی شیرهای پاستوریزه شده با مقیاس صنعتی روش مداوم (HTST) ونیز با آزمایش شیرهای عفونی با آلودگی طبیعی بدست می‌آید(۱۶).

تشکر وسپاسگزاری

بدینوسیله از کارشناسان مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات مخصوصاً آقای مهندس رضا

عصاره و کارشناس بخش میکروبشناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز آقای ابراهیم شرقی تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

۱. طباطبائی.ع.ح و فیروزی. ر.(۱۳۸۰)بیماریهای باکتریائی دام. انتشارات دانشگاه تهران- صفحات : ٤٢٣- ٤١٤ .

2.Barrington GM, Gay. JM, Eriks. IS, Carrigon. M. (2003). Temporal patterns of diagnostic results in serial samples from cattle with advanced para tuberculosis infections. J.Vet. Diagnos.(15). PP: 195-200.

3.Billman- Jacobe. H, Carrigon. M, Cockram. F, Chiodini. R.J, (1992). A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of John's disease in cattle. Australian Vet. J.(69). PP: 25-28.

4.Chiodini. R.J. (1990). Characterization of Mycobacterium paratuberculosis and organisms of the Mycobacterium avium complex by restriction polymorphism of the rRNA gene region . J . Clin . Mic.(28). PP: 489-494.

5.Chiodini. R.J, Hermon- Taylor. J. (1994). Prevalence of Mycobacterium paratuberculosis in retail dairy products. Nat. Res. Ini, Coo. Gra. Pro.(NRICGP).(3). PP: 1-19.

6.Chiodini.R.J, Hermom- Tylor.J. (1993). The termal resistance of Mycobacterium paratuberculosis in raw milk under condition simulating pasteurization. J. Vet. Diagn. (5). PP: 629.

7.Choy. E, Whittington. R.J, Marsh. I,(1998). A method for purification and characterization of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from the intestinal mucosa of sheep with John's disease. Vet. Microbiol. (64). PP: 51-60.

8.Collins. D.M, Gabric. D.M, Lisle. G.W. (1990). Identification of two groups of Mycobacterium paratuberculosis strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J.Clin. Mic.(28). PP: 1591-1596.

9.Corti. S, Stephan. R.(2002). Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis specific IS900 insertion sequences in bulk- tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. BMC. Mic.(2:15). PP: 1-14.

10.Donald C. Sookett.(1999). John's disease diagnosis and control. John's disease on U.S dairy operations. PP: 1-52.

11.Doyle. M.E.(1998).Mycobacterium paratuberculosis – Another emerging pathogen of the human gastrointestinal tract? FRI. Bri.(10). PP: 1-5.

12.Dwiredi. A, choubey. B, Sarin.B,. (2000). A new rapid method for the isolation of mycobacterial DNA. Indian J. Vet. Path. (24). PP: 87-90.

13.England.S, (2003). IS900/ERIC- PCR as a tool to distinguish Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from closely related mycobacteria. Vet.Microbiology (96). PP: 277-287.

14.Gilmour. N. GL,Wood. G.W. (1996). Paratuberculosis (John's disease). OIE manual. chapter 3.1.6.pp: 218-226.

15. Green. E.P, Tizard. M.L.V, Moss. M.T, . (1989). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of Mycobacterium paratuberculosis. Nucleic acids research. (17). pp: 9063-9073.

16.Irene.R.G, Hywel.J.B, Michael.T.R. (2002). Incidence of Mycobacterium paratuberculosis in bulk raw andcommercially pasteurized cows milk from approved dairy processing Establishments

in the United kingdom.Applied and enviromental microbiology. (68).PP: 2428-2435.
17.Khare.S, Ficht.T.A, Santos.R.L, . (2004). Rapid and sensitive detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine milk and faeces by a combination of immunomagnetic bead separation – conventional PCR and real time PCR. Journal of Cli. Mic.(42).PP: 1075-1081.
18.Millar.D, Ford.Jon, Sanderson.J,.(1996). IS900 PCR to detect Mycobacterium paratuberculosis in retail supplies of whole pasteurized cows milk in England and Wales.J.App. Env. Mic. (17). pp: 3446-52.
19.Millar. D, Simon.J.W, Tizard.M.L.V,.(1995). Solid – Phase hybridization capture of low abundance target DNA sequences: Application to the polymerase chain reaction detection of Mycobacterium paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp. silvaticum. J. Ana. Bio .(226). pp: 325-330.
20.Milner.A.R, Mack.W.N, Coates. K.J,.(1990). the sensitivity and specifity of modified ELISA for the diagnosis of John's disease from a field trial in cattle.Vet. Mic.(25).pp: 193-198.
21.Nielsen.S.S, Thamsborg.S.M, Houe. H, . (2000). Bulk tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. Preventive Veterinary Medicine.(44).pp:1-7.
22.Nordlund. K.V,Goodger. W.J, Pelletier.J,. (1996) Associations between sub clinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. J.Ame.Vet.Med. Ass (11). pp: 1872-1876.
23.Pavlik. I, Horvathova.A, Dvorska. L,. (1999). Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. J. Mic. Meth. (38). pp: 155-167.
24.Pillai.S.R, Jayarao. B. M.(2002). Application of IS900 PCR for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis directly from raw milk. J. Dairy Sci. (85). pp: 1052-1057.
25.Quinn. P.J, Carter. M.E, Markey. B, .(1994). Clinical Veterinary Microbiology. Wolf Publishing. pp: 167-169.
26.Quinn.P. J, Markey. B.K, Carter. M.E, .(2002) Veterinary Microbiology and Microbial disease. Blackwell publishing. pp: 97-105.
27.Stevenson. K, Sharp. J.M.(1997). The contribution of molecular biology to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis research. The Vet. J. (153). pp: 269-286.
28.Streeter, R.N, Hoffsis, G.F, Bech-Neilson. S,.(1995). Isolation of Mycobacterium parauberculosis from clostrum and milk of sub clinically infected cows. Ame.J. Vet. Res(50). pp:58.
29.Sweeney. R.W, Whitlick. R.H, Hamir. A.N,. (1992).Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the milk and supramammary lymphnodes of infected asymptomatic cows. J.clin. Mic. (30). pp: 166-171.
30.Taylor. T.K, Wilks. C.R, McQueen. D.S.(1991). Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the milk of a cow with John's disease.Vet. Record . (109). pp: 532-533.
31.Whipple. D, Kapke. P, Vary.C. (1990). Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from Mycobacterium paratuberculosis. J. clin. Mic. (28). pp: 2561-2564.
32.Whittington. R.J, Hope. A.F, Marshall. D.J,. (2000). Molecular epidemiology of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. J.Cli. Mic. (38). pp: 3240-3248.

33.Wren. B, Dorrell. N.(2002). Functional Microbial Genomics. Volume 33 Academic Press. pp: 3-49