

“Research article”

DOI: 10.30495/JFH.2021.1942137.1328

## Identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in raw and pasteurized milk samples using culture, IS900 PCR and IS900 nested PCR methods

Soltani, M.

Department of Animal Science, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

Corresponding author: m.soltani@areeo.ac.ir

(Received: 2021/10/7 Accepted: 2021/12/01)

### Abstract

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*MAP*), the causative agent of Johne’s disease, is a very slow-growing bacterium that imposes heavy costs on livestock-related industries. Due to the similar clinical and pathological symptoms in Johne’s and Crohn’s diseases, *MAP* is likely to play a role in the development and progression of Crohn’s disease. Hence, the possibility of transferring *MAP* through milk has created many concerns. To investigate the status of *MAP* contamination in raw and pasteurized milk samples in Kerman province, three diagnostic methods, including culture, IS900 PCR, and IS900 nested PCR was used. The results showed that the level of contamination with *MAP* in raw milk was relatively high in the studied herds. Based on culture, PCR, and nested PCR assays, 4.38%, 9.16%, and 13.55% were found positive, respectively. In pasteurized milk samples, 1.12%, 3.93%, and 6.18% were found positive for *MAP* by culture, PCR, and nested PCR, respectively. Comparing the methods used in this study demonstrated the best capability of nested PCR to detect *MAP* contamination. High levels of *MAP* contamination in raw milk on the one hand and relatively high resistance to thermal treatments, along with its intracellular characteristics, cause more survival of this bacterium, especially in the milk pasteurization process. Therefore, food hygiene researchers should pay more attention to the public health hazard caused by this bacterium.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** *Mycobacterium paratuberculosis*, Identification, Contamination, Milk, Pasteurization

DOI: 10.30495/JFH.2021.1942137.1328

«مقاله پژوهشی»

## شناسایی مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه‌های شیر خام و پاستوریزه با استفاده از روش‌های کشت، IS900 PCR و IS900 nested PCR

مهدی سلطانی

بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

\*نویسنده مسئول مکاتبات: m.soltani@areeo.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۷/۱۵ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۹/۱۰)

### چکیده

مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: MAP*) یک باکتری بسیار کند رشد است که به‌عنوان عامل بیماری یون، هزینه‌های سنگینی را به صنایع مرتبط با دامداری تحمیل می‌کند. با توجه به علائم بالینی و آسیب‌شناسی مشابه در بیماری‌های یون و کرون، احتمال می‌رود MAP در بروز و پیشرفت کرون نقش داشته باشد. از این‌رو امکان انتقال MAP از طریق شیر موجب ایجاد نگرانی‌های زیادی شده است. برای بررسی وضعیت آلودگی به MAP در نمونه‌های شیر خام و پاستوریزه در استان کرمان از سه روش تشخیص شامل کشت، IS900 PCR و IS900 nested PCR استفاده شد. نتایج نشان داد آلودگی به MAP در شیر خام تولیدی در گله‌های مورد مطالعه نسبتاً زیاد بود؛ به‌نحوی که میزان موارد مثبت در روش کشت، PCR و nested PCR به‌ترتیب ۴/۳۸، ۹/۱۶ و ۱۳/۵۵ درصد برآورد شد. میزان آلودگی در نمونه‌های شیر پاستوریزه نیز در روش کشت، PCR و nested PCR به‌ترتیب ۱/۱۲، ۳/۹۳ و ۶/۱۸ درصد به‌دست آمد. مقایسه روش‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر توانایی بیشتر nested PCR را برای تشخیص آلودگی MAP نشان داد. بالا بودن سطح آلودگی در شیر خام از یک‌سو و مقاومت نسبتاً بالای این باکتری به تیمارهای حرارتی از سوی دیگر در کنار ویژگی درون‌سلولی بودن آن، موجب بقای بیشتر این باکتری به‌ویژه در جریان پاستوریزه کردن شیر می‌گردد. لذا ضروری است محققین بهداشت مواد غذایی نسبت به آلودگی شیر به این باکتری توجه بیشتری داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس، تشخیص، آلودگی، شیر، پاستوریزاسیون.

## مقدمه

بیماری یون در اثر آلودگی به مایکوباکتریوم آوریوم *Mycobacterium avium* (subspecies *paratuberculosis*: MAP) که یک باکتری بسیار کند رشد است به وجود می‌آید. این باکتری به دلیل مقاومت دیواره سلولی در شرایط سخت برای مدت طولانی زنده می‌ماند و در برابر کلرزی و پاستوریزاسیون پایدار است. حیوانات آلوده به پاراتوبرکلوزیس از روزهای اول شروع به انتشار MAP در مدفوع و در مراحل بعدی در شیر می‌کنند. بیماری یون از نظر اقتصادی از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت دام‌پروری محسوب می‌شود؛ به نحوی که خسارت سالانه ناشی از آن در یک مزرعه با ۲۰۰ رأس گاو تقریباً چند هزار یورو تخمین زده شده است (Taghipour, 2007; Bazargani et al., 2007). با توجه به مسیرهای انتقال MAP از طریق شیر خام و پاستوریزه، آغوز، بزاق، مدفوع-دهانی، داخل رحمی، گوشت و محیط (Grant et al., 2002a)، احتمال بسیار قوی آن در توسعه یا پیشرفت بیماری کرون مطرح شده است.

موفقیت در کنترل یک بیماری به شناسایی زود هنگام و اختصاصی عامل آن وابسته است، اما تشخیص زود هنگام MAP به دلیل نیاز به محیط خاص برای کشت، زمان طولانی نهفتگی، انتشار مکرر و پنهان باکتری، نشانه‌های بالینی مبهم در مراحل اولیه و نوسان در پاسخ‌های ایمنی میزبان با چالش همراه است. تشخیص بیماری یون بستگی با جداسازی MAP زنده (کشت)، پیگیری پیامدها بر سیستم ایمنی میزبان (ELISA) یا تکثیر ژنوم (PCR) ممکن است. وجود

برخی موانع مانند سرعت رشد بسیار کند، مسائل مربوط به آلودگی و هزینه‌های زیاد در روش کشت MAP منجر به توسعه روش‌های جایگزین برای شناسایی شده است (Garg et al., 2015). روش ELISA با محدودیت‌هایی مانند حساسیت و ویژگی کم به دلیل واکنش متقابل با مایکوباکتریوم‌های محیطی مواجه است (Piras et al., 2015). تکثیر اسیدهای نوکلئیک توسط بسیاری از محققان برای به دست آوردن مزایایی مانند حساسیت، ویژگی و سرعت بالا برای تشخیص MAP استفاده شده است (Garg et al., 2015).

ژن Insertion Sequence 900 (IS900) که در ۱۴ تا ۲۰ نسخه در ژنوم MAP حضور دارد، هدفی مناسب و بسیار حساس برای تشخیص MAP است (Hanifian et al., 2013). با این حال، با شناسایی برخی عناصر شبیه IS900 در سایر مایکوباکتریوم‌ها، منحصر به فرد بودن IS900 برای MAP مورد تردید قرار گرفت و برای غلبه بر این محدودیت، استفاده از روش restriction endonuclease analysis (REA) در کنار PCR روی جایگاه IS900 (PCR-REA) برای کسب حساسیت و ویژگی بالا برای تشخیص MAP پیشنهاد شد (Cousins et al., 1999).

با توجه به وجود MAP در شیر گاوهای مبتلا به یون (بالینی و تحت بالینی)، آلودگی به این باکتری در شیر خام و پاستوریزه در ایران نیز گزارش شده است (Anzabi and Hanifian, 2012; Anzabi, 2014). به سبب مقاومت دمایی MAP، احتمالاً تعداد زیادی از باکتری‌های موجود در شیر پس از پاستوریزاسیون زنده می‌مانند. تحقیقات انجام شده در مورد حساسیت

نمونه‌ها برچسب‌گذاری شده و روی یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان منتقل شدند. همچنین، با هدف بررسی وضعیت آلودگی در نمونه‌های شیر پاستوریزه، ۱۷۸ نمونه شیر پاستوریزه (با ۱/۵ درصد چربی) به‌طور تصادفی از محصولات چهار شرکت تولیدی جمع‌آوری شد و در شرایط استاندارد به آزمایشگاه منتقل شدند.

#### - استخراج DNA

برای استخراج DNA از کیت تجاری Diatom DNA prep 100 (Galart-Diagnosticum, Russia) با برخی تغییرات در دستورالعمل سازنده استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۴۰ میلی‌لیتر شیر در شتاب ۴۰۰۰ g به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و استخراج DNA از مخلوط لایه‌های رسوب و خامه شیر انجام شد (Anzabi, 2014). پس از دو بار شستشو با Phosphate buffered saline (PBS) (pH = ۷/۲)، ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (lysis reagent: LR) حاوی گوانیدین تیوسیانات و ۵۰ میکرولیتر پروتئیناز K (Thermo Fisher Scientific, USA) به لوله‌ها اضافه شد و به‌آرامی مخلوط گردید تا محتوای لوله همگن شود و سپس در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه گرمخانه گذاری شدند. لوله‌ها تکان داده شدند و سپس ۳۰ میکرولیتر سوسپانسیون جاذب حاوی دانه‌های سیلیس (NucleoS) اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق چرخانده شد. پس از سانتریفیوژ در شتاب ۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ ثانیه، مایع رویی دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر LR به پلت اضافه شد و تکان داده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی (saline buffer: SB)

حرارتی این باکتری در شیر مشخص کرده است که اگر تعداد باکتری در شیر خام بیش از ۱۰۰ CFU/ml باشد، حتی با قرار گرفتن در معرض حرارت ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ ثانیه عامل بیماری فعال باقی می‌ماند، بنابراین احتمالاً افزایش زمان گرمادهی به ۲۵ ثانیه برای غیرفعال کردن این باکتری اثر بیشتری دارد (Patel and Shah, 2011).

با توجه به بالا بودن شیوع MAP در گاوهای شیری در استان کرمان (Soltani, 2018)، این مطالعه به‌منظور بررسی وضعیت آلودگی به MAP در نمونه‌های شیر خام و پاستوریزه مصرفی و مقایسه سه روش تشخیص مختلف شامل کشت، IS900 PCR و IS900 nested PCR برای تشخیص باکتری در این نمونه‌ها انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### - نمونه‌گیری و آماده‌سازی نمونه‌ها

در مدت هشت ماه (آبان ۱۳۹۵ تا خرداد ۱۳۹۶) تعداد ۲۵۱ نمونه شیر کارتیبه به‌صورت تصادفی از حیوانات به‌ظاهر سالم از شش گله با سابقه درگیری با بیماری یون در اطراف شهر کرمان جمع‌آوری شد. جهت تهیه نمونه شیر ابتدا کارتیبه‌ها با آب تمیز گرم شسته شد و با استفاده از حوله کاغذی یک‌بارمصرف خشک شد. شیر ابتدایی هر کارتیبه جهت جلوگیری از آلودگی احتمالی دور ریخته شد. سپس کارتیبه‌ها با غوطه‌ورسازی در محلول ضدعفونی‌کننده سپتی‌گارد-PPA (به‌بان شیمی، ایران) ضدعفونی شدند و پس از دو دقیقه با استفاده از حوله کاغذی یک‌بارمصرف خشک شدند. سپس از هر کارتیبه به میزان مساوی (۱۵ میلی‌لیتر) داخل قوطی‌های استریل شده دوشیده شد.

(Biometra, Germany) شامل ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس (واسرشت ابتدایی)، ۴۰ چرخه (شامل ۹۴ درجه سلسیوس ۴۰ ثانیه (واسرشت)، ۶۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه (اتصال آغازگرها) و ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه (توسعه) و ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس (توسعه نهایی) بود. برای دقیق‌تر نمودن مسیر بررسی از نمونه‌های کنترل مثبت (حاوی DNA خالص MAP تهیه‌شده از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) و منفی (حاوی آب مقطر) در واکنش PCR استفاده شد. محصولات PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شدند و در صورت تکثیر باند ۴۱۳ جفت بازی، نمونه مثبت در نظر گرفته شد. برای جلوگیری از نتایج مثبت کاذب، از روش REA استفاده شد (Cousins et al., 1999). به‌طور خلاصه، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR مثبت، ۱۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۲ میکرولیتر بافر Tango و ۲ واحد از آنزیم *AhaI* (Thermo Fisher Scientific, USA) به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و محصولات هضم برای تفکیک بهتر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند و مشاهده قطعات ۲۵۸ و ۱۵۵ جفت بازی، به‌عنوان MAP تلقی شد.

#### - نحوه انجام IS900 nested PCR

روش IS900 nested PCR با استفاده از محصولات واکنش IS900 PCR به‌عنوان الگو انجام شد (Corti and Stephan, 2002). برنامه حرارتی شامل ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس (واسرشت ابتدایی)، ۴۰ چرخه

اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید. پس از سانتریفیوژ در شتاب ۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ ثانیه، مایع رویی برداشته شد و ۵۰۰ میکرولیتر محلول SB اضافه و تکان داده شد. لوله‌ها در شتاب ۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ ثانیه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی برداشته و در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد تا زمانی که پلت به‌طور کامل خشک شود. مقدار ۷۵ میکرولیتر محلول شستشو (ExtraGen E) از قبل گرم شده به لوله اضافه شد، تکان داده شد و در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس لوله‌ها تکان داده شد و در شتاب ۱۰۰۰۰ g به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید و DNA خالص به‌دست آمده برای استفاده در مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس ذخیره شد.

کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و به کمک سیستم مستندسازی ژل UVIDoc (Uvitec, UK) و طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه Thermo Fisher Scientific, ) NanoDrop ND1000 (USA) مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### - نحوه انجام IS900 PCR

آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول (۱) نشان داده شده است. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو، بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۲۰۰ پیکامول از هر آغازگر و ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز انجام شد. برنامه حرارتی مورد استفاده دستگاه ترمال سایکلر

با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شدند و در صورت تکثیر باند ۲۹۸ جفت بازی، نمونه مثبت در نظر گرفته شد.

شامل ۹۴ درجه سلسیوس ۴۰ ثانیه (واسرشت)، ۵۸ درجه سلسیوس ۱ دقیقه (اتصال آغازگرها) و ۷۲ درجه سلسیوس ۳ دقیقه (توسعه) و ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس (توسعه نهایی) بود. محصولات nested PCR

جدول (۱) - توالی آغازگرهای استفاده شده در تحقیق حاضر

منبع	طول محصول (جفت باز)	توالی	نام آغازگر	
Millar et al. (1996)	۴۱۳	5'-GAAGGGTGTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3'	P90	IS900
		5'-GGCGTTGAGTTCGATCGCCACGTGAC-3'	P91	
Corti and Stephan (2002)	۲۹۸	5'-ATGTGGTTGCTGTGTTGGATGG-3'	AV1	IS900 (nested)
		5'-CCGCCGAATCAACTCCAG-3'	AV2	

انجام واکنش IS90 PCR، برای انجام واکنش هضم آنزیمی، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR مثبت، ۱۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۲ میکرولیتر بافر Tango و ۲ واحد از آنزیم *AlwI* (Thermo Fisher Scientific, USA) به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و محصولات هضم با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شدند. مشاهده قطعات ۲۵۸ و ۱۵۵ جفت بازی، به عنوان *MAP* تلقی شد.

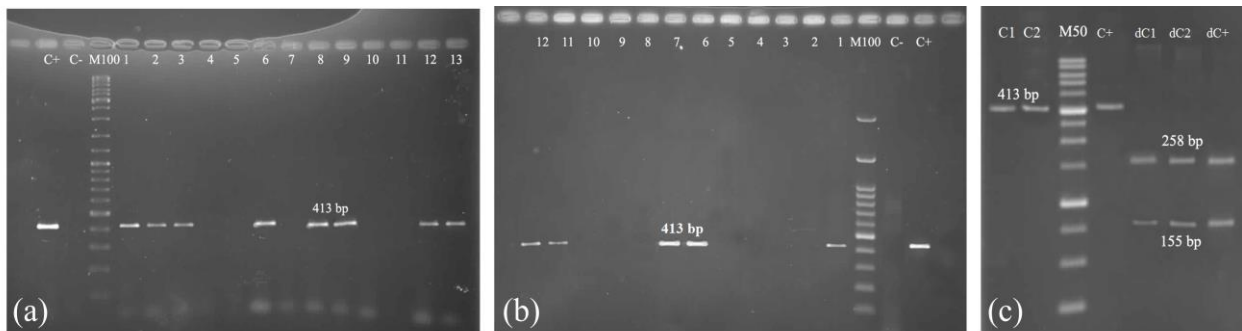
#### یافته‌ها

استخراج DNA از نمونه‌ها با کیفیت مناسبی انجام گرفت و حاصل آن انجام موفق واکنش‌های PCR و nested PCR بود (شکل‌های ۱ و ۲). ظاهر شدن پرگنه‌های *MAP* در محیط کشت ۳ تا ۴ ماه طول کشید و هویت پرگنه‌ها پس از استخراج DNA، با استفاده از روش IS900 PCR-REA با آنزیم *AlwI* به عنوان *MAP* تأیید شد (شکل ۱). هیچ‌یک از جدایه‌های *MAP* روی محیط کشت فاقد مکمل مایکوباکتین J رشد نکردند.

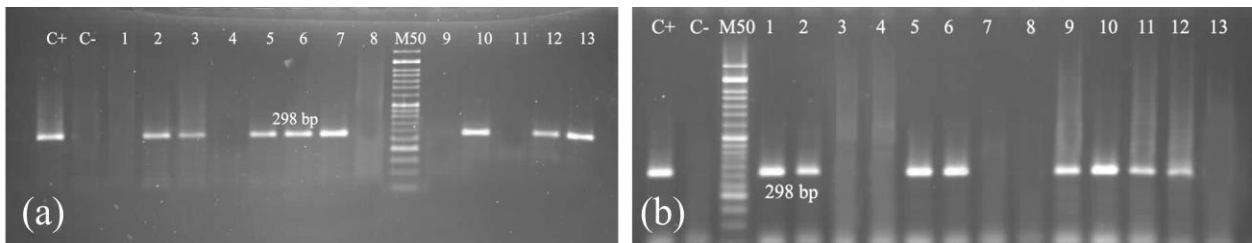
- آماده‌سازی، آلودگی‌زدایی و کشت نمونه‌های شیر  
کشت باکتری روی نمونه‌هایی که با nested PCR مثبت تشخیص داده شده بودند انجام گرفت (Anzabi, 2014). به‌طور خلاصه، ۳۰ میلی‌لیتر شیر به مدت ۳۰ دقیقه در شتاب ۲۴۰۰ g سانتریفیوژ شد و پس از حذف لایه مایع میانی، خامه شیر و پلت در ۵۰ میلی‌لیتر هگزادسیل پیریدینیوم کلراید (HPC) ۰/۷۵ درصد (Merck, Germany) مخلوط شد. پس از ۵ ساعت ثابت ماندن، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و مجدداً در ۱ میلی‌لیتر PBS معلق شد و به عنوان مایه تلقیح استفاده گردید. به ازای هر نمونه، ۳۰۰ میکرولیتر از مایه تلقیح روی یک لوله حاوی محیط Herrold's egg yolk medium (HEYM) به تنهایی و دو لوله حاوی محیط HEYM همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر مایکوباکتین J کشت داده شدند. نمونه‌های برای ۴ ماه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند و هر دو هفته مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت، برای تأیید پرگنه‌های ایجاد شده به عنوان *MAP*، از روش IS900 PCR-REA استفاده شد. به‌طور خلاصه، پس از استخراج DNA از پرگنه‌های مربوطه و

آلودگی در ۲ نمونه (۱/۱۲ درصد) با کشت تشخیص داده شد اما نتایج IS900 nested PCR حاکی از آلودگی ۱۱ نمونه (۶/۱۸ درصد) به *MAP* بود. نتایج نشان داد آلودگی در ۲۱۷ نمونه شیر خام (۸۶/۴۵ درصد) و ۱۶۷ نمونه شیر پاستوریزه (۹۳/۸۲ درصد) قابل ردیابی نبود.

بر اساس نتایج به دست آمده (جدول ۲)، آلودگی در ۴/۳۸ درصد از نمونه‌های شیر خام (۱۱ نمونه) با استفاده از کشت قابل ردیابی بود در حالی که در ۱۱ نمونه دیگر تنها با استفاده از روش IS900 nested PCR تشخیص آلودگی ممکن شد. در شیر پاستوریزه نیز



شکل (۱) - (a) نتیجه IS900 PCR روی نمونه‌های شیر خام (M100: نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی، C+: کنترل مثبت، C-: کنترل منفی) (b) نتیجه IS900 PCR روی نمونه‌های شیر پاستوریزه (M100: نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی، C+: کنترل مثبت، C-: کنترل منفی) (c) تأیید نتایج مثبت کشت با روش‌های IS900 PCR-REA و IS900 PCR: C2 و C1: نمونه‌های مثبت کشت، M50: نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی، C+: کنترل مثبت، dC1 و dC2: فرآورده هضم نمونه‌های مثبت کشت، dC+: فرآورده هضم کنترل مثبت)



شکل (۲) - (a) نتیجه IS900 nested PCR روی نمونه‌های شیر خام (M50: نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی، C+: کنترل مثبت، C-: کنترل منفی) (b) نتیجه IS900 nested PCR روی نمونه‌های شیر پاستوریزه (M50: نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی، C+: کنترل مثبت، C-: کنترل منفی)

جدول (۲) - نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بر اساس روش تشخیص

IS900 nested PCR	IS900 PCR	کشت	تعداد (درصد)	
-	-	+	(۰/۰)	شیر خام
-	+	+	(۰/۰)	
+	-	+	(۰/۰)	
+	+	+	(۴/۳۸) ۱۱	
-	+	-	(۰/۰)	
+	+	-	(۴/۷۸) ۱۲	
+	-	-	(۴/۳۸) ۱۱	
-	-	-	(۸۶/۴۵) ۲۱۷	
-	-	+	(۰/۰)	شیر پاستوریزه
-	+	+	(۰/۰)	
+	-	+	(۰/۰)	
+	+	+	(۱/۱۲) ۲	
-	+	-	(۰/۰)	
+	+	-	(۲/۸۱) ۵	
+	-	-	(۲/۲۵) ۴	
-	-	-	(۹۳/۸۲) ۱۶۷	

جدول (۳) - نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بر اساس منبع نمونه

IS900 nested PCR	IS900 PCR	کشت	تعداد نمونه	محل نمونه گیری	نوع نمونه
تعداد مثبت (درصد)	تعداد مثبت (درصد)	تعداد مثبت (درصد)			
(۱۲/۵) ۵	(۱۰) ۴	(۵) ۲	۴۰	گله ۱	شیر خام
(۷/۳۲) ۳	(۴/۸۸) ۲	(۰) ۰	۴۱	گله ۲	
(۱۱/۹) ۵	(۷/۱۴) ۳	(۲/۳۸) ۱	۴۲	گله ۳	
(۱۳/۹۵) ۶	(۹/۳) ۴	(۶/۹۸) ۳	۴۳	گله ۴	
(۲۲/۲۲) ۱۰	(۱۵/۵۶) ۷	(۸/۸۹) ۴	۴۵	گله ۵	
(۱۲/۵) ۵	(۷/۵) ۳	(۲/۵) ۱	۴۰	گله ۶	
(۱۳/۵۵) ۳۴	(۹/۱۶) ۲۳	(۴/۳۸) ۱۱	۲۵۱	کل	
(۲/۲۲) ۱	(۲/۲۲) ۱	(۰) ۰	۴۵	شرکت ۱	شیر پاستوریزه
(۶/۸۲) ۳	(۴/۵۵) ۲	(۲/۲۷) ۱	۴۴	شرکت ۲	
(۴/۵۵) ۲	(۲/۲۷) ۱	(۰) ۰	۴۴	شرکت ۳	
(۱۱/۱۱) ۵	(۶/۶۷) ۳	(۲/۲۲) ۱	۴۵	شرکت ۴	
(۶/۱۸) ۱۱	(۳/۹۳) ۷	(۱/۱۲) ۲	۱۷۸	کل	

به نحوی که در نمونه‌های حاصل از گله ۲ کمترین سطح آلودگی (۷/۳۲ درصد) و گله ۵ بیشترین میزان آلودگی (۲۲/۲۲ درصد) مشاهده شد. بررسی نمونه‌های شیر

همان گونه که در جدول (۳) نشان داده شده است، بررسی نمونه‌های شیر خام نشان داد که مطابق انتظار، آلودگی در همه گله‌های مورد مطالعه وجود داشت



درصد از نمونه‌های شیر پاستوریزه مورد بررسی به ترتیب با استفاده از روش‌های کشت، PCR و nested PCR به‌عنوان نمونه‌های آلوده به MAP شناسایی شدند. میزان مثبت MAP در روش کشت در این مطالعه با نتایج دیگر مطالعات که میزان آلودگی در شیر خام را ۲ درصد (Hanifian *et al.*, 2013) و ۳/۸ درصد (Hanifian and Khani, 2016) گزارش کردند قابل مقایسه بود. در مقابل در مطالعات دیگر میزان آلودگی بیشتری گزارش شد (آذربایجان شرقی ۷/۵ درصد (Anzabi *et al.*, 2006) و تهران (۹ درصد) (Fathi *et al.*, 2011). از جمله عوامل دخیل در تفاوت نتایج روش کشت بین مطالعات می‌توان به تعداد نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه، سطح آلودگی در گاوها، محله بیماری، مرحله شیرواری گاوها، سن گاوها، وضعیت بهداشتی قبل و پس از دوشش و نحوه انجام مراحل آلودگی‌زدایی در روش کشت اشاره کرد. برخی از محققین کاهش موارد مثبت کشت MAP در نمونه‌های شیر پاستوریزه را حاصل اثر پاستوریزاسیون بر کاهش جمعیت MAP می‌دانند در حالی که برخی دیگر معتقدند این کاهش ناشی از حساسیت بسیار پایین تر روش کشت نسبت به روش‌های مبتنی بر PCR است (Anzabi *et al.*, 2006). البته باید خاطر نشان کرد که احتمالاً استفاده از محیط کشت مایع بتواند به شناسایی تعداد بیشتری از موارد آلودگی به MAP منجر گردد (Ellingson *et al.*, 2005).

حساسیت سنجش‌های مولکولی به دلیل مقاومت زیاد دیواره سلولی مایکوباکتری‌ها و وجود مهارکننده‌های PCR کاهش می‌یابد (Alajmi *et al.*, 2016) لذا با استفاده از روش‌های بهتر استخراج DNA می‌توان

پاستوریزه نیز نشان داد که شرکت ۱ کم‌ترین سطح آلودگی (۲/۲۲ درصد) و شرکت ۴ بیشترین میزان آلودگی (۱۱/۱۱ درصد) را داشتند.

### بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به تفاوت توانایی آزمایشگاه‌ها برای استفاده از روش کشت (Slana *et al.*, 2008b) و محدودیت‌های این روش به‌عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص MAP، میزان نتایج مثبت حاصل از کشت MAP نشان‌دهنده حداقل میزان آلودگی است. زیرا آلودگی‌زدایی شدید شیمیایی در این روش باعث از بین رفتن قابلیت زنده‌مانی سلول‌های MAP می‌شود (Garg *et al.*, 2015). در بسیاری از موارد، طولانی شدن زمان موردنیاز برای مشاهده پرگنه‌های باکتری در محیط کشت منجر به افزایش احتمال آلودگی ثانویه آزمایشگاهی و ناکارآمدی و خشک شدن محیط کشت می‌شود که بر میزان نتایج واقعی تأثیرگذار است (Anzabi *et al.*, 2006). در مطالعه حاضر نیز چند نمونه (دو نمونه شیر پاستوریزه و یک نمونه شیر خام) به سبب ایجاد آلودگی ثانویه در محیط کشت از مسیر تحقیق خارج شدند. درون‌سلولی بودن باکتری MAP به‌ویژه در موارد تحت بالینی بیماری یون باعث می‌شود تا تعداد باکتری در دسترس برای شناسایی با استفاده از روش کشت بسیار کم‌تر شود و افت قابل توجه توان این روش را در تشخیص MAP در پی دارد (Anzabi *et al.*, 2006).

در این مطالعه که اولین ارزیابی وضعیت آلودگی شیر به MAP در استان کرمان بود، ۴/۳۸، ۹/۱۶ و ۱۳/۵۵ درصد از نمونه‌های شیر خام و ۱/۱۲، ۳/۹۳ و ۶/۱۸

جواب مثبت دادند و در مقابل شیرهای پاستوریزه آزمایشگاهی در ۱۰ درصد به کشت و در ۱۵ درصد به PCR جواب مثبت دادند. این محققین اختلاف زیاد بین نتایج PCR و کشت میکروبی را ناشی از حساس تر بودن روش PCR اعلام کردند. برخلاف روده، پستان شرایط مناسبی برای رشد *MAP* ندارد و بیشتر سلول‌های *MAP* دفع شده در شیر به سبب نقص در دیواره سلولی قابل کشت نیستند، بنابراین تشخیص آلودگی با استفاده از روش کشت بسیار مشکل است (Beran et al., 2006). البته کاهش میزان چربی در شیر پاستوریزه نیز می‌تواند یکی از دلایل کاهش میزان باکتری *MAP* در شیرهای پاستوریزه باشد (Anzabi, 2014).

مطابق انتظار، در این مطالعه تعداد نمونه‌های مثبت به دست آمده در روش PCR به میزان قابل توجهی بیشتر از روش کشت بود. همچنین، نتایج روش IS900 PCR در نمونه‌های شیر خام نشان داد که وجود *MAP* در نمونه‌های شیر خام در این مطالعه با مقادیر اعلام شده از تهران (Fathi et al., 2011) و البرز (Eftekhari and Mosavari, 2016) قابل مقایسه است. در حالی که سایر محققان میزان آلودگی بالاتری را از آذربایجان شرقی (Anzabi et al., 2006)، خراسان رضوی (Soltani et al., 2012; Nassiri et al., 2008) و تهران (Tohidi Moghadam et al., 2010) گزارش کردند. بررسی نمونه‌های شیر خام مخزن شیردوش گاوداری‌های صنعتی و نیمه‌صنعتی منطقه شهرکرد نیز نشان داد از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر خام مورد مطالعه ۳ نمونه (۳ درصد) در آزمون PCR مثبت بودند (Sharafati-chalesshtori et al., 2009). در مطالعه‌ای دیگر وجود

حساسیت این آزمون‌ها را افزایش داد (Nasiri et al., 2018). استخراج DNA از مایکوباکتری‌ها نیازمند تیمار فیزیکی (تضعیف دیواره سلولی)، تیمار شیمیایی (تجزیه دیواره سلولی) و تیمار با پروتئیناز K (حذف پروتئین‌ها) است (Amrita et al., 2002). روش به کاررفته در مطالعه حاضر، با استفاده از تیمارهای فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی موجب شکسته شدن کارآمد دیواره سلولی مایکوباکتریایی و افزایش حساسیت PCR و nested PCR شد.

از آنجا که تعداد بسیار کمی *MAP* در شیر دفع می‌شود، مقدار بسیار کمی از DNA برای روش‌های تشخیص مولکولی در دسترس خواهد بود. از طرف دیگر، با توجه به ماهیت آب‌گریز *MAP* (با دیواره سلولی غنی از چربی) و تمایل زیاد این باکتری برای حضور در بخش چربی شیر، استفاده از هر دو بخش رسوب و خامه شیر برای بررسی وجود باکتری می‌تواند توان آزمون‌های تشخیصی را افزایش دهد (Anzabi, 2014). در برخی از مطالعات، با دور ریختن بخش خامه شیر نتایج گزارش شده است که احتمالاً کم‌تر از میزان واقعی آلودگی باشد.

در مطالعه‌ای دیگر روش‌های کشت و PCR را به منظور بررسی وضعیت آلودگی شیر گاو به باکتری *MAP* مقایسه شد (Anzabi et al., 2006). در مطالعه آنان شیر گاوهای مشکوک به بیماری یون در ۲۱/۲۵ درصد به کشت و در ۳۱/۲۵ درصد به PCR جواب مثبت دادند در حالی که شیر گاوهای سالم در ۷/۵ درصد با روش کشت و در ۱۷/۵ درصد با روش PCR آلوده تشخیص داده شدند. از طرف دیگر شیرهای پاستوریزه تجاری در ۱۵ درصد به کشت و در ۳۵ درصد به PCR

PCR و به‌ویژه کمتر از nested PCR است، اما تعداد کم از موارد مثبت گزارش شده از روش کشت در مقایسه با روش مولکولی می‌تواند سطوح باکتری‌های زنده دارای قابلیت بیماری‌زایی را نشان دهد.

برای تعیین وضعیت سلامت حیوانات و میزان شیوع بیماری یون در گله، استفاده از نمونه شیر کارتیبه مفیدتر از نمونه مخزن نگهداری شیر فله (BTM) است. تعداد اندک سلول‌های دفع شده در شیر در مقایسه با مدفوع و رقیق شدن ناشی از تجمع شیر در مخازن منجر به کاهش حساسیت آزمون‌های مبتنی بر PCR می‌شود (Jayarao *et al.*, 2004). آزمایش نمونه شیر مخزن نمی‌تواند روشن کند که منبع MAP در نمونه شیر از حیوانات آلوده است یا آلودگی شیر از طریق پستان‌ها یا دستگاه‌های شیردوشی آلوده به وجود آمده است (Slana *et al.*, 2008a).

با توجه به مطرح شدن احتمال ترمیم و بازسازی باکتری MAP پس از پاستوریزاسیون صنعتی (Grant *et al.*, 2002a) و با در نظر گرفتن خطر بیماری کرون، آلودگی به MAP نگرانی جدی را برای صنایع لبنی ایجاد کرده است چراکه این باکتری در شیر پاستوریزه (مخصوصاً در شیرهای پاستوریزه شده به روش درجه حرارت بالا در طی زمان کوتاه HTST) شناسایی و جداسازی شده است (Grant *et al.*, 2002b; Ellingson *et al.*, 2005; Grant *et al.*, 2005).

محققین بالا بودن آلودگی شیر به MAP در ایران را به دوشش دستی در بیشتر دامداری‌های کشور مرتبط می‌دانند (Anzabi and Khaki, 2017). از طرف دیگر مقاومت زیاد MAP به شرایط نامناسب محیطی و عدم شناسایی دام‌های بیمار تحت بالینی در سطح گله

توالی IS900 در ۳۳۰ نمونه شیر پاستوریزه با روش PCR با استفاده از آغازگرهای مختلفی مورد بررسی قرار گرفت و بین ۳ تا ۱۰ درصد از نمونه‌ها آلوده به MAP شناسایی شدند. این محققین عنوان کردند که در این مورد خاص نوع آغازگری که استفاده می‌شود نیز مهم بوده و دارای نقش اختصاصی است (Anzabi and Khaki, 2017).

در مقایسه با میزان ۱۳/۵۵ درصد آلودگی در نمونه‌های شیر خام به دست آمده با روش nested PCR در مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای (Tohidi Moghadam *et al.*, 2010) ۴۵/۳ درصد نمونه‌های شیر خام گرفته شده از حیوانات مشکوک به بیماری یون را با استفاده از روش nested PCR مثبت گزارش کردند در حالی که در یک بررسی دیگر (Sadati *et al.*, 2012) محققین اعلام کردند که تنها ۵/۹ درصد موارد مثبت را در نمونه‌های شیر خام گرفته شده از حیوانات ظاهراً سالم مشاهده کرده‌اند. در کمال تعجب، محققین در یک مطالعه با استفاده از روش nested PCR IS900 نشان دادند که ۳۹ درصد از نمونه‌های شیر پاستوریزه تجاری به MAP آلوده بودند در حالی روش کشت تنها قادر به شناسایی MAP در ۴/۹ درصد موارد بود (Sadeghi *et al.*, 2020). در مطالعه حاضر قدرت nested PCR در هنگام بررسی نمونه‌های شیر پاستوریزه بیشتر مشهود بود. به‌نحوی که موجب بیش از ۵۰ درصد بهبود در تشخیص MAP در نمونه‌های شیر پاستوریزه در مقایسه با روش PCR شد. در مطالعه‌ای دیگر MAP در ۱۰ درصد از نمونه‌های شیر پاستوریزه با استفاده از روش nested PCR IS900 تشخیص داده شد (Anzabi and Khaki, 2017). گرچه حساسیت روش کشت کمتر از

شیرهای خام و پاستوریزه) بایستی از دیدگاه بهداشت عمومی از اهمیت زیادی برخوردار گردد. گنجاندن آزمایش‌های تشخیصی حساس (مانند روش‌های مبتنی بر PCR) در کارخانه‌های شیر در مراحل قبل از پاستوریزاسیون برای غربالگری اولیه شیر وارد شده به کارخانه و جدی گرفتن آزمون‌های کیفی (کشت باکتری و PCR) در محصول تولیدی کارخانه‌های شیر می‌تواند به‌عنوان راهکاری جهت کنترل پراکنش این باکتری در سطح جوامع انسانی مطرح گردد. به‌هر حال، مقایسه روش‌های تشخیصی IS900 nested PCR و کشت در مطالعه حاضر برای شناسایی باکتری MAP نشان داد روش nested PCR برای تشخیص آلودگی MAP در نمونه‌های شیر خام و شیر پاستوریزه از قابلیت بهتری برخوردار است و می‌توان از آن به‌عنوان یک روش معمول در تشخیص MAP بهره برد.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

موجب افزایش بار آلودگی در محیط و در نتیجه افزایش احتمال ایجاد آلودگی ثانویه شیر می‌شود که ضرورت رعایت بهداشت قبل، حین و پس از شیردوشی را گوشزد می‌نماید (Hanifian et al., 2013).

در دسترس نبودن داده‌های واقعی شیوع MAP به‌دلیل عدم وجود برنامه کنترل ملی برای بیماری یون در ایران منجر به عدم توجه کافی به این بیماری و در نهایت کمترین اولویت برای کنترل آن می‌شود. از آن‌جا که از روش HTST برای پاستوریزاسیون شیر در ایران استفاده می‌شود، بررسی مؤثر بودن استفاده از این روش برای غیرفعال کردن MAP ضرورت دارد. چرا که مصرف شیر پاستوریزه حاصل از حیوانات آلوده به MAP ممکن است منجر به گسترش آلودگی MAP و بیماری کرون در انسان شود (Anzabi and Khaki, 2017; Sadeghi et al., 2020).

با توجه به ارتباط احتمالی MAP با ایجاد بیماری کرون در انسان و با عنایت به بالا بودن سطح آلودگی به MAP در گله‌های گاو شیری در ایران و مقاومت ذاتی این باکتری نسبت به عوامل نامناسب محیطی، تعیین سطح آلودگی در فرآورده‌های لبنی مصرفی (به‌ویژه

### منابع

- Alajmi, A., Klein, G., Grabowski, N.T., Fohler, S., Akineden, Ö. and Abdulmawjood, A. (2016). Evaluation of a Commercial Real-Time PCR Kit for the Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Milk. *Current Microbiology*, 73(5):668-675.
- Amita, J., Vandana, T., Guleria, R. and Verma, R. (2002). Qualitative evaluation of mycobacterial DNA extraction protocols for polymerase chain reaction. *Molecular Biology Today*, 3(2):43-49.
- Anzabi, Y. (2014). Comparison of culture and PCR methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk of apparently healthy cattle. *Food Hygiene*, 4(1):1-12. [In Persian]

- Anzabi, Y. and Hanifian, S. (2012). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pasteurized milk by IS900 PCR and culture method. African Journal of Microbiology Research, 6(7):1453-1456.
- Anzabi, Y. and Khaki, A. (2017). Detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in pasteurized milk by PCR according to the search of IS900 gene sequence. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services, 39(3):7-14. [In Persian]
- Anzabi, Y., Tabatabayi, A. and Asgharzade, M. (2006). A survey of the infection status of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in dairy cattle using PCR and culture of Tabriz region. Iranian Journal of Veterinary Science, 2(4):297-310. [In Persian]
- Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, J., Dvorska, L. and Pavlik, I. (2006). Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. Veterinarni Medicina, 51(7): 365-389.
- Corti, S. and 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 Microbiology, 2(1):1-7.
- Cousins, D., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R. and Kluver, P. (1999). Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS 900-like sequences detectable by IS 900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. Molecular and Cellular Probes, 13(6): 431-442.
- Eftekhari, M. and Mosavari, N. (2016). Isolation and molecular identification of *Mycobacterium* from commercially available pasteurized milk and raw milk samples collected from two infected cattle farms in Alborz Province, Iran. International Journal of Mycobacteriology, 5: S222-S223.
- Ellingson, J.L., Anderson, J.L., Koziczowski, J.J., Radcliff, R.P., Sloan, S.J. *et al.* (2005). Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. Journal of Food Protection, 68(5):966-972.
- Fathi, R., Sarkarati, F., Eslami, M., Rezavand, B. and Nourizadeh, A. (2011). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow milk using culture and PCR methods. Archives of Razi Institute, 66(2): 95-100.
- Garg, R., Patil, P.K., Singh, S.V., Sharma, S., Gandham, R.K., Singh, A.V. *et al.*, (2015). Comparative evaluation of different test combinations for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infecting dairy herds in India. BioMed Research International, 1-6.
- Grant, I.R., Ball, H.J. and Rowe, M.T. (2002a). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. Applied and Environmental Microbiology, 68(5): 2428-2435.
- Grant, I.R., Hitchings, E.I., McCartney, A., Ferguson, F. and Rowe, M.T. (2002b). Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. Applied and Environmental Microbiology, 68(2):602-607.
- Grant, I.R., Williams, A.G., Rowe, M.T. and Muir, D.D. (2005). Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Applied and Environmental Microbiology, 71(6): 2853-2861.
- Hanifian, S. and Khani, S. (2016). Tracking of *Mycobacterium avium paratuberculosis* Load in Milk Production Chain: A Real-Time qPCR and Culture Assay. Journal of Food Safety, 36(1): 136-141.
- Hanifian, S., Khani, S., Barzegari, A. and Shayegh, J. (2013). Quantitative real-time PCR and culture examination of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at farm level. Veterinary Microbiology, 162(1): 160-165.

- Jayarao, B., Pillai, S., Wolfgang, D., Griswold, D., Rossiter, C., Tewari, D. *et al.*, (2004). Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1(1): 17-26.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T. *et al.* (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3446-3452.
- Nasiri, A., Anzabi, Y. and Mashayekhi, M.R. (2018). Comparing qualitative and quantitative results of some DNA extraction methods from genome of pathogenic and saprophytic mycobacteria. *Veterinary Clinical Pathology*, 12(1): 79-95. [In Persian]
- Nassiri, M., Jahandar, M., Soltani, M., Mahdavi, M. and Doosti, M. (2012). Identification and strain determination of *M. paratuberculosis* (MAP) by PCR and REA methods based on IS900 and IS1311 insertion segments. *Agricultural Biotechnology* 4(1): 83-96. [In Persian]
- Patel, A. and Shah, N. (2011). *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* - Incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44(6): 473-479.
- Piras, C., Soggiu, A., Bonizzi, L., Greco, V., Ricchi, M., Arrigoni, N. *et al.*, (2015). Identification of immunoreactive proteins of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proteomics*, 15(4): 813-823.
- Sadati, R., Jafarpour, M., Mirinargesi, M., Nazemi, A. and Barghi, A. (2012). Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle bred in northern Iran by nested PCR. *Global Veterinaria*, 8(3): 259-263. [In Persian]
- Sadeghi, N., Jamshidi, A. and Seyyedini, M. (2020). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in pasteurized milk samples in northeast of Iran by culture, direct nested PCR and PCR Methods. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 39(6): 251-258.
- Sharafati-chalesshtori, R., Shakerian, A., Momtaz, H. and Sharafati-chalesshtori, F. (2009). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* using polymerase chain reaction (PCR) in cow raw milk samples in shahre-kord. *Medical Laboratory Journal*, 3(1):15-19. [In Persian]
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A. and Pavlik, I. (2008a). On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2): 250-257.
- Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P. and Pavlik, I. (2008b). Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*, 53(6): 283-306.
- Soltani, M. (2018). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Kerman Province's Dairy Cows using Microbial Culture, PCR and Nested PCR Methods. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 10(2): 263-273. [In Persian]
- Soltani, M., Nassiry, M.R., Shahroudi, F.E. and Bassami, M.R. (2008). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in feces and milk samples from Holstein dairy cows by PCR. *Biotechnology*, 7(3): 582-585.
- Taghipour Bazargani, T., Charkhkar, S., Sadeghi, F., Khalaj, M., Rashtibaf, M., Bagheri, M. *et al.*, (2007). Protective effect of Johne's disease attenuated vaccine in an intensive non-tuberculosis free dairy. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8(2): 161-165.
- Tohidi Moghadam, M., Sarv, S., Moosakhani, F. and Badiie, A. (2010). Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in milk and fecal samples in dairy cattle by PCR and nested-PCR. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(24): 3055-3061.