

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، پروژه‌های طراحی و به‌مورد اجرا گزارده شد. بر طبق روش توصیه شده مجری طرح، نمونه مدفوع از گاوهای مشکوک به بیماری یون (بر اساس 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 توپرکولین موسسه رازی حصارک کرج و بر مبنای پروتکل رسمی O.I.E، عملیات جداسازی *Mycobacterium paratuberculosis* (عامل بیماری یون) شامل مراحل: آماده سازی نمونه‌ها، آلودگی زدائی (Decontamination) توسط محلول (Hexadecyl Pridinium Chloride = H.P.C) و تلقیح بر روی محیط‌های کشت اختصاصی (Herrold's egg yolk with Mycobactin) و (Mycobactin Herrold's egg yolk without) انجام گردید. محیط‌های کشت تلقیح شده به انکوباتور انتقال داده شد. باکتری *M. paratuberculosis* بسیار کند رشد بوده و سویه گاوی آن در بهترین شرایط نیاز به حداقل ۱۴ هفته انکوباسیون در گرم خانه ۳۷ درجه دارد بنابراین هر نمونه 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 و سپس به روش ذیل - نلسون رنگ آمیزی و مورد بررسی میکروسکوپی قرار داده شد (۴). در راستای این پژوهش، بر روی تعداد ۲۲۷ 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: مایکوباکتین، *Mycobacterium paratuberculosis*، بیماری یون، بیماری کرون، ذیل نلسون

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 82 pp: 13-17

Study of John's disease in industrial & semi industrial cattle husbandry 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 Institute 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 paratuberculosis is one of the most important of *Mycobacterium tuberculosis* complex family. This pathogen can infect all ruminant animals like cattle, sheep and goat. This research was done with cooperation of Esfahan Agricultural 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 (O. 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 Egg Yolk without Mycobactin Before culture, we took 227 smears (after decontamination stage). During this project we cultured 227x4=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 subcultured 71x4=284 on: Herrold's egg Yolk with mycobactin media. In this stage we found 32 positive & 39 negative samples of 227 total faeces samples.

Key words: Ziehl neelsen John's disease, *Mycobacterium paratuberculosis*

مقدمه

در سال ۱۸۹۵ یک محقق آلمانی بنام یون، از گاوهای با علائم (اسهال، کم خونی پیش رونده، لاغری شدید و در نهایت مرگ)، گونه‌ای از مایکوباکتریوم را جدا نمود. بعدها این باکتری را *M. paratuberculosis* و بیماری حاصل را بیماری یون (John's Disease) نام نهادند.

در سال ۱۹۳۲ دانشمندی آلمانی بنام کرون و همکارانش بیماری مزمنی را که سبب بروز تب، اسهال، کم خونی پیش رونده 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 نشانه‌های 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 و در شرایط خاصی از قبیل حدت باکتری و تعداد آن، تغذیه، بهداشت محیط و یا حالت دفاعی دام، نشانه‌ها و ضایعاتی از بیماری دیده شود. براساس پروتکل (O. I. E) محیط کشت انتخابی جهت *M. paratuberculosis* Herrold's Egg 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 اگر مایکوباکتین دار این باکتری بسیار کوچک (به قطر یک میلی متر)، بدون رنگدانه، نیم گرد (Hemispherical) سطح باکتری صاف و درخشان می‌باشد. اگر

کشت ادامه یابد، به تدریج پرگنه‌ها بزرگتر (۴ تا ۵ میلی متر) 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 اسفروبلستیک)، هواز، اسید فسف، 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. به دلیل 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 و مورد 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 آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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، هم چنین افزودن CO_۲ به محیط کشت رشد

گاو‌داری‌های صنعتی و نیمه صنعتی، تعداد دام هریک و نیز سابقه وجود بیماری یون در آنها جمع آوری شد (۲).

فاز اجرایی 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 و ۳۰ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه بر روی مخلوط کن برقی قرار می‌دهیم، 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 Egg Yolk with Mycobactin) (و یک لوله محیط جامد شیبدار Herrold's Egg 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 سانتی گراد منتقل و به طور 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 حذف نمود (۶).

۴ - تهیه گسترش میکروسکوپی (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 میکروسکوپی 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، بر روی لوله‌های کشت ۷۱ نمونه، کلنی‌های مشکوک دارای باسیل‌های اسید فست (۳۱/۲۲٪) ظاهر گردید که از این ۷۱ نمونه کشت

باکتری را تسریع می‌نماید. این باکتری قادر به زندگی در خارج سلول نبوده و به علت دارا بودن دیواره سلولی ویژه، دارای دو فرم -Baci-lary 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 حالی که فرم اسفروپلاستیک آن به علت متغیر بودن شکل و خصوصیات آن، به سختی در محیط کشت رشد می‌نماید. شناسائی فرم اسفروپلاستی باکتری حتی به وسیله 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 برابر حرارت 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 موبید 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 قرار گذاشته شد.

پژوهش‌های مبتنی بر موفقیت در جداسازی و شناسائی *M. paratuberculosis* 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 اتکا 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 Egg Yolk with Mycobactin) (Herrold's Egg Yolk without Mycobactin)
- ۶ - پودر محرک 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

در الایزای جذبی (۷۵/۶۸) و در الایزای گاما انترفرون (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 تجارتي کشت داد و سپس پرکنه‌های مشکوک روی این محیط‌ها را روی محیط کشت جامد هرولدز آگ مایکوباکتین دار کشت نمود که پس از ۴ هفته پرکنه‌ها ظاهر شدند ولی انکوباسیون محیط‌ها تا ۸ هفته ادامه یافت. این محقق هم چنین تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع دام دارای علائم بالینی که در تست الایزای جذبی مثبت شده بودند را به محیط کشت هرولد آگ 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 هم چنان از اعتبار بالائی برخوردار می‌باشد به طوری که هنوز هم OIE این روش را به عنوان 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 با 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 نشانه‌های آن بسیار نزدیک با علائم بیماری یون می‌باشد و حتی در برخی از موارد در افراد مبتلا به کرون، *M. paratuberculosis* 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 پیش گیری 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 توبرکلین موسسه رازی به دلیل 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 - دکتر مسعود 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.

مجدد (ساب کالچر) تهیه شد ($284 = 4 \times 71$).

در نهایت از تعداد ۷۱ 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

تعداد کل نمونه‌های دریافتی: ۲۲۷

تعداد گسترش‌های گرفته شده قبل از کشت: ۲۲۷

تعداد گسترش‌های مثبت قبل از کشت: ۴۶

تعداد گسترش‌های منفی قبل از کشت: $908 = 4 \times 227$

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: $284 = 71 \times 4$ (subculture)

تعداد گسترش مجدد: ۲۸۴

تعداد نمونه‌هایی که در کشت مجدد مثبت شدند: ۳۲

تعداد نمونه‌هایی که در کشت مجدد منفی شدند: ۳۹

تعداد نمونه‌هایی که در محیط کشت ماکوباکتین دار رشد کردند: ۲۵

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

تعداد کل لوله‌های محیط کشت شده در طول اجرای طرح:

$1192 = 284 + 908$

تعداد کل گسترش‌های بررسی شده در طول مدت اجرای طرح:

$511 = 284 + 227$

بحث

در ابتدای اجرای طرح، اکثر گاوداری‌های 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. بنابراین توافق به عمل آمده، به جای 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 کد بندی 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 هم چنین 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

Nielsen Tubercule 51 , pp; 196 – 206.

5 – Laboratory methods in medical Mycobacteriology center for disease control (1988) (C D C) U.S.A.

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 – *Veterinary Practice*. 1977; PP: 74 – 84.

منابع مورد استفاده

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-*

