شناسایی *مایکوباکتریوم اویوم* تحت گونه *پاراتوبرکولوزیس* (MAP) درآغوز تعدادی از گاوداری‌های شیری اطراف مشهد به روش IS900 Nested-PCR

حامد فیض بخش [۱]، فائزه اسکوییان [۱]، غلامرضا محمدی [۲]*و محمدمحسن زاده [۳]

[۱]دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
[۲]گروه علوم درمانگاهی ، بهداشت وپیشگیری بیماری های دامی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
[۳]گروه بهداشت مواد غذایی وآبزیان دانشکده دامپزشکب دانشگاه فردوسی مشهد
* ایران - مشهد - میدان آزادی دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده دامپزشکی
کدپستی: ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴
صندوق پستی: ۱۷۹۳
پست الکترونیکی: gmohamad@um.ac.ir

چکیده

پاراتوبرکلوزیس یا بیماری یون یک عفونت پیشرونده ی مزمن در تمام گروه های نشخوارکنندگان اهلی و وحشی شامل گاو، بز، شتر، بوفالو و آهو محسوب می شود.این بیماری توسط یک باکتری اسید فست به نام مایکوباکتریوم *آویوم* تحت گونه ی *پاراتوبرکولوزیس* ایجاد می شود. شکل بالینی این بیماری باعث اسهال مزمن، لاغری، ضعف ودر نهایت مرگ می گردد. در شکل تحت بالینی هم باعث کاهش وزن پیشرونده، کاهش تولید شیر، کاهش ارزش لاشه و حذف زودهنگام می شود.

این مطالعه با هدف تعیین میزان آلودگی و شناسایی مستقیم *مایکوباکتریوم آویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* در آغوز گاوهای شیری در تعدادی ازگاوداری‌های صنعتی مشهد با استفاده از روش Nested-PCR انجام شد. بدین منظور تعداد ۱۰۰ نمونه آغوز از ۴ گاوداری صنعتی مشهد جمع آوری گردید. DNA نمونه ها استخراج و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Nested PCR گردید. از مجموع ۱۰۰ نمونه آغوز جمع آوری شده، تعداد ۱۶ نمونه (۱۶٪) به باکتری *مایکوباکتریوم آویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* آلوده بودند که با استفاده از PCR تایید گردید. نمونه های آلوده به ۳ گاوداری مورد مطالعه تعلق داشتند.

جداسازی *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* از آغوز گاوهای شیری گاوداری های مورد مطالعه نشان دهنده اهمیت آغوز در اپیدمیولوژی بیماری یون و نقش آن در انتقال بیماری به گوساله های نوزاد حساس در معرض خطرمی باشد.

کلیدواژگان: گاوداری شیری ، گوساله نوزاد ، آغوز ، Nested PCR ، بیماری یون

مقدمه

پاراتوبرکلوزیس که با عنوان بیماری یون هم شناخته می شود، بیماری عفونی گرانولوماتوز مزمن روده نشخوار کنندگان می باشد. این بیماری توسط یک باکتری اسید فست به نام مایکوباکتریوم اویوم و تحت گونه پاراتوبرکلوزیس ایجاد می شود. هر چند پاراتوبرکلوزیس می تواند نشخوارکنندگان مختلف از جمله گاو، گوسفند، بز و نشخوار کنندگان وحشی مختلف را درگیر کند اما بیشتر در گاو ها دیده و گزارش شده است[۱]. بیماری زایی عامل بیماری با ورود باکتری به دستگاه گوارش آغاز می شود و از طریق تعامل با سلول های M و اپیتلیال از سد های روده ای عبور می کنند و می تواند در ماکروفاژ های زیر اپتلیالی با مهار آپاپتوز و اسیدی شدن فاگوزوم و همچنین با جلوگیری از ارائه آنتی ژن به سیستم ایمنی زنده بمانند[۲]. چهار مرحله از بیماری پاراتوبرکلوزیس در گاو توضیح داده شده است: عفونت خاموش، بیماری تحت بالینی، بیماری بالینی و بیماری بالینی پیشرفته،در عفونت خاموش، هیچ علائم بالینی و هیچ تاثیری بر وزن گرفتن و وضعیت بدنی حیوان ندارد. در وضعیت تحت بالینی، گاو های بالغ حامل هیچ علائم بالینی خاصی نشان نمی دهند اما ممکن است بوسیله ناهنجاری های دیگری مثل ورم پستان یا ناباروری تحت تاثیر قرار بگیرند. در حالت بالینی بیماری، با وجود اشتهای طبیعی کاهش وزن رخ می دهد و چند هفته بعد اسهال می شود. تولید شیر کاهش می یابد اما علائم حیاتی در محدوده طبیعی می باشند. در بیماری بالینی پیشرفته، لاغری بارزترین ناهنجاری همراه با ادم بین فکی است که تمایل به محو شدن دارد در حالی که اسهال در این حالت در حال پیشرفت است. دوره بیماری از هفته ها تا ماه ها متفاوت می باشد اما همیشه به دهیداتاسیون شدید، لاغری و ضعف منجر می شود که در نهایت مرگ حیوان را به همراه دارد[۳]. این بیماری از این نظر که عامل آن با بیماری کرون انسانی، مولتیپل اسکلروزیس و بیماری های دیگر ارتباط دارد و ممکن است سلامت انسان را به خطر بیاندازد هم اهمیت ویژه ای دارد اگر چه هنوز شواهد قطعی برای این ارتباط وجود ندارد[۴, ۵]. راه اصلی انتقال آلودگی با این پاتوژن از راه مدفوعی – دهانی بصورت مستقیم یا غیر مستقیم می باشد. گوساله ها در هفته اول بعد از تولد نسبت به این پاتوژن بسیار حساس هستند و مقاومت به این عفونت تا یک سالگی افزایش می یابد. علت این حساسیت ناشناخته باقی مانده است اما سیستم ایمنی نابالغ و یکپارچگی آسیب دیده روده از جمله دلایلی فرضی هستند[۴] گوساله ها بصورت افقی از طریق مصرف آغوز یا بصورت عمودی از طریق رحمی آلوده می شوند. انتقال پاتوژن از مادر به جنین در حال حاضر مهم ترین مسیر انتقال محسوب می شود و برنامه های کنترلی بیشتر بر اساس این مورد می باشد. امکان انتقال پاتوژن اط طریق مایع سمن گاو های نر آلوده هم وجود دارد[۶]. در بالغین بلع پاتوژن عموما منجر به عفونت نمی شود اما برخورد مکرر ممکن است باعث عفونت شود. انتقال بالغین به بالغین و گوساله به گوساله ممکن است وجود داشته باشد اما مورد توجه ویژه قرار نمی گیرد[۷, ۸].

برای تشخیص و کنترل بیماری در حال حاضر از روش های کشت مدفوع، بررسی هیستوپاتولوژی، ELISA و PCR استفاده می شود. کشت باکتری از بافت های آلوده دقیق ترین روش تشخیص پاتوژن در نظر گرفته می شود اما پروسه کشت و جداسازی MAP گران و نیازمند آزمایشگاه، زمان طولانی کشت نمونه های بافتی مختلف می باشد. در بررسی هیستوپاتولوژی از رنگ آمیزی های اسید فست استفاده می شود که دارای محدودیت از نظر غیر اختصاصی بودن برخی از باکتری ها و نیاز به $۱۰^{۶}$ ارگانیسم در هر گرم بافتی می باشد. ELISA و PCR به دلیل سادگی نسبی، سرعت و هزینه مناسب به عنوان روش های جایگزین استفاده می شوند[۹].

لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی امکان انتقال عامل بیماری از راه آغوز و تشخیص عامل بیماریزا با استفاده از روش PCR دربرخی گاوداری‌های اطراف مشهد بوده است. تا به این وسیله کیفیت آغوزهای خورانده شده به گوساله‌های شیری از نظر آلودگی و نقش آن در اپیدمیولوژی بیماری یون بررسی شود.

۲ . مواد و روش ها:

۱.۲ . نمونه گیری و جمع آوری نمونه

در این مطالعه روش نمونه گیری، روش مبتنی برهدف است. طی یک مطالعه مقطعی و توصیفی تعداد ۱۰۰ نمونه آغوز از ۴ گله گاو شیری (جدول۱) اطراف مشهد به روش غیر تصادفی (convenience) طی فصل زمستان و بهار جمع آوری شد. در هر بار نمونه گیری مقدار ml ۵۰ آغوز از ظرف خوراندن آغوز گوساله و درست پیش از خوراندن با استفاده از سرنگ استریل اخذ و در لوله‌های در پیچ دار استریل جمع آوری شدند. سپس بر روی هر یک از نمونه‌ها اطلاعات لازم از جمله نام گله، تاریخ تولد گوساله، جنس، هویت مادر و تعداد زایش ثبت گردید و در کنار یخ و در اسرع وقت به آزمایشگاه مواد غذایی دانشکده دامپزشکی منتقل شد و تا اتمام زمان نمونه گیری، نمونه‌های آغور در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از اتمام نمونه گیری همه نمونه‌ها به آزمایشگاه اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی منتقل و در فریزر ۷۰- درجه نگهداری گردید.

۲.۲ . جمعیت مورد مطالعه

در جدول ۱ خصوصیات ۴ گله گاو شیری که ۱۰۰ نمونه آغوز در این مطالعه از آنها جمع آوری شده است را نشان می‌دهد.

جدول ۱: خصوصیات گله‌های گاو شیری مورد استفاده در این مطالعه

خصوصیات	گله (۱)	گله (۲)	گله (۳)	گله (۴)
نژاد	هلشتاین	هلشتاین	هلشتاین	هلشتاین
تعداد گاو دوشا	۲۴۳	۶۳۶	۷۵۰	۱۴۵
تعدادکل دام	۶۴۵	۱۷۱۳	۲۱۰۰	۴۰۰
درمان گاو خشک	+	+	+	+
نمونه تعداد(%)	۸(۸٪)	۵۷(۵۷٪)	۱۴(۱۴٪)	۲۱(۲۱٪)
مدیریت گله	خصوصی	دولتی	دولتی	دولتی

۳.۲ . پرایمر های مورد استفاده

برای شناسایی باکتری *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* از پرایمرهای معرفی شده توسط مطالعه Vansnck و همکاران استفاده گردید و پرایمرهای مورد نظربا توجه به جدول۲ توسط کمپانی تکاپوزیست تهیه گردید.

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

PCR primers	Nucleotide sequence	Target gene	Annealing positions	Product length	References
IS*900* S1	5-GGGTTGATCTGGACAATGACGGTTA-3	*IS900*	202–226	572	[۱۰]
IS*900* R3	5-AGCGCGGCACGGCTCTTGTT-3	*IS900*	751–771	452	[۱۰]
IS*900* S2	5-GGAGGTGGTTGTGGCACAACCTGT-3	*IS900*	228–251		[۱۰]
IS*900* R1	5-CGATCAGCCACCAGATCGGAA-3	*IS900*	657–677		[۱۰]

۴.۲ . انجام PCR

جهت انجام PCR ، در ابتدا یک مخلوط واکنش[1] از مواد مورد نیاز بر اساس جدول ۲-۳ تهیه و پس از یکنواخت سازی به میکروتیوب‌های ۰.۲ میلی لیتری انتقال داده و با دقت هرچه تمام تر ۰.۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده از هر نمونه را به آنها اضافه گردید و PCR در دستگاه ترمال سایکلر- primus 96 plus - با پروتکل دمایی جدول ۴ انجام شد.

[1]Master mix

جدول ۳: مقادیر مواد مورد استفاده جهت انجام PCR

Materials	Volume
Tris–HCl	10mM
KCl	50mM
MgCl2	1.6mM
dNTP	200µM
Primer	20 pM
Taq polymerase	0.5U
bacterial DNA	5µl

جدول ۴: برنامه دمایی واکنش PCR

Temperature	Time	Cycle number	
94 °c	4 min	1	واسرشته سازی اولیه
94 °c	45 s	40	واسرشته سازی
68 °c	45 s	1	اتصال
72 °c	45 s	1	بسط
72 °c	10 min	1	بسط نهایی

نتایج حاصل از PCR توسط ژل آگارز ۱.۵ درصد الکتروفورز شد و جهت تفسیر نتایج با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن - SYNGENE BIO IMAGING - عکس ژل ثبت می‌شد.

۵.۲ . انجام Nested PCR

جهت انجام **Nested PCR** ، در ابتدا یک مخلوط واکنش[۲] از مواد مورد نیاز بر اساس جدول۵ تهیه و پس از یکنواخت سازی و تقسیم آن در میکروتیوب‌های ۰.۲ میلی لیتری آنها را به اتاق PCR انتقال داده و ۱ میکرولیتر

[2]Master mix

از نمونه حاصل از PCR را به آنها اضافه کرده و مخلوط گردید سپس در دستگاه ترمال سایکلر- primus 96 plus - با پروتکل دمایی جدول ۶ قرار داده می‌شد.

جدول ۵: مقادیر مواد مورد استفاده جهت انجام Nested PCR

Materials	Volume
Tris–HCl	**10mM**
KCl	**50mM**
MgCl2	**1.6mM**
dNTP	**200µM**
Primer	**20 pM**
Taq polymerase	**0.5U**
bacterial DNA	**1µl**

جدول ۶: برنامه دمایی Nested PCR

Temperature	time	cycle	
94°c	**4 min**	**25**	**واسرشته سازی اولیه**
94 °c	**45 s**	**1**	**واسرشته سازی**
68 °c	**45s**	**1**	**اتصال**
72 °c	**45s**	**1**	**بسط**
72 °c	**10 min**	**1**	**بسط نهایی**

نتایج حاصل از **Nested PCR** توسط ژل آگارز ۱.۵ درصد الکتروفورز گردید و جهت تفسیر نتایج با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن - SYNGENE BIO IMAGING - عکس ژل ثبت می‌شد.

۳ . نتایج

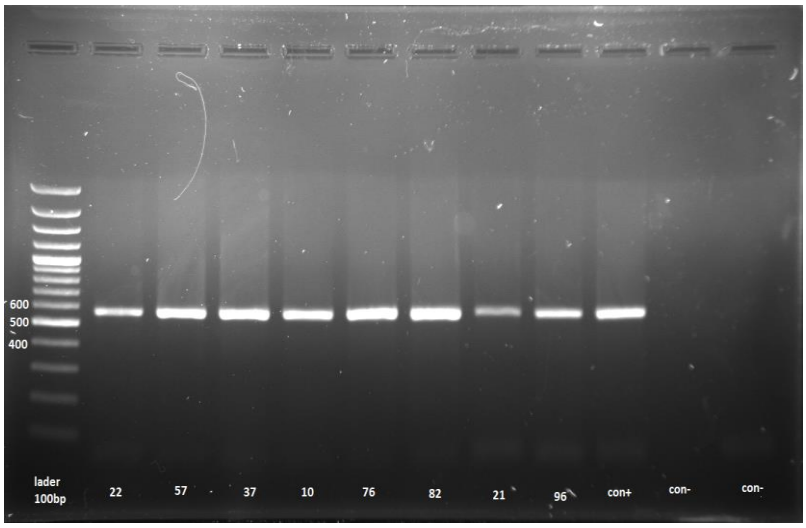
۱.۳ . استخراج DNA

صحت استخراج DNA از نمونه‌های آغوز با نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت .و نیز انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد اکثر نمونه‌ها تایید گردید. پس از استخراج DNA و نانودراپ از کلیه نمونه‌ها برخی از نمونه‌ها که عدد نانودراپ پایینی داشتند(کمتر از ۷۰) مجددا روندااستخراج DNA از این نمونه‌ها تکرار گردید.

۲.۳ . واکنش PCR

تمامی نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای S1 و R3 ، PCR گردیدند. تصویر شماره ۱ نشان دهنده واکنش PCR جهت نشخیص باکتری MAP در نمونه‌های آغوز می‌باشد.

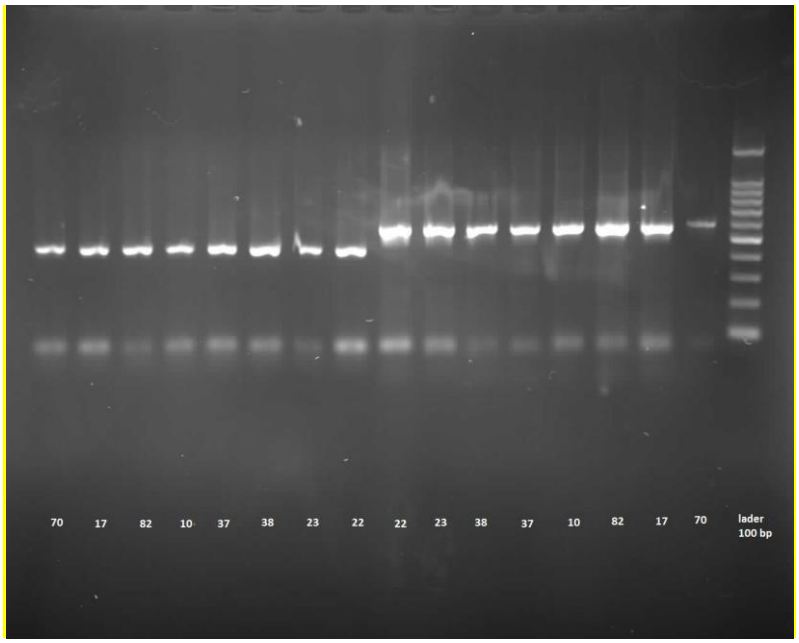
در تصویر زیر نتیجه حاصل از PCR نشان داده شده است. نمونه‌های مثبت تشکیل باند با طول bp۵۷۲ را دادند.



شکل :۱ تصویری از واکنش PCR

۳.۳ واکنش Nested PCR

تمامی نمونه‌هایی که در PCR معمولی مثبت تشخیص داده شده بودند و باند 572 bp تشکیل داده بودند، مورد آزمایش قرار گرفتند. در این مرحله ۱ قطعه با طول 432 bp تشکیل شد که تایید کننده MAP در نمونه‌های مورد آزمایش بود. در مجموع از تعداد ۱۰۰ نمونه آغوز اخذ شده از ۴ گاوداری صنعتی حومه مشهد تعداد ۱۶ نمونه(۱۶٪) به باکتری *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* (MAP) آلوده بودند که در انجام واکنش‌های PCR و Nested PCR مورد تایید قرار گرفتند. نتایج حاصل از انجام Nested PCR در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: تعدادی از نمونه‌های مثبت در PCR و Nested PCR.

۴ . بحث

نشخوارکنندگان دارای جفت اپی تلیوکوریال هستند، جفت آن ها تشکیل یک غشای سین دسموکوریال می دهد که از عبور ماکرومولکول ها مثل ایمونوگلوبولین ها جلوگیری می کند. در نتیجه گوساله ها کاملا آگاماگلوبولونمیک بدنیا می آیند. ایمنی این حیوانات بصورت غیر مستقیم و از طریق مصرف آغوز بدست می آید. به این منظور آغوز باید در زمان مناسب، به میزان کافی و با کیفیت بالا به گوساله ها خورانده شود. یکی از عوامل تعیین کننده کیفیت آغوز حضور باکتری ها می باشد. حضور باکتری ها در آغوز باعث کاهش ایمونوگلوبولین ها و افزایش خطر FPT و انتقال بیماری های مختلف به گوساله ها می شود. آغوز علاوه بر انتقال ایمنی غیر فعال از طریق ایمونوگلوبولین‌ها و لکوسیت ها، نقش بیولوژیک مهمی در تامین مواد مغذی و سایر فاکتورهای اصلی نیز دارد **(۱۱-۱۴)**.کارشناسان توصیه کرده اند که آغوز تازه ای که به گوساله‌ها خورانده می‌شود بایستی حاوی کمتر از ۱×۱۰^{۵} CFU/ml بار کلی میکروبی و کمتر از ۱×۱۰^{۴}CFU/ml کلی‌فرم باشد. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که میانگین سطح آلودگی باکتریایی در اکثر گله‌ها بطور قابل توجهی از میزان استاندارد تعیین شده بالاتر می‌باشد**(۱۵)**.

با توجه به این که گوساله‌ها حساس ترین عضو گله می‌باشند, حضور*مایکوباکتریوم* در سرپستانک‌ها، شیر و آغوز باعث می گردد که حیوان شیرخوار دوز بالایی ازباکتری را ببلعد. مرتع، آب و غذای آلوده هم می توانند در ایجاد عفونت مسئول باشند. درمراتع

و سیستم های با مدیریت ضعیف که گوساله در تماس بامدفوع حیوان دفع کننده ویا شیرآلوده باشند خطر عفونت بالاست. مطالعات نشان داده‌اند حیوانات یک دوز بالایی از باکتری را در مدفوع دفع می کنند، در آغوزشان مقادیر باکتری هم بالاتر است. و آغوز بعنوان اولین منبع آلودگی در بدو تولد محسوب می‌شود. گوساله‌هایی که از مادران سالم بدنیا می آیند باکتری را از طریق بلع آب و غذای‌آلوده و ظروف کثیف در روزهای اولیه‌ی زندگی کسب می‌کنند(**۹**).

بعد از دوره ی‌کمون طولانی، گاوهای آلوده شروع به دفع مقدار قابل تشخیص باکتری از راه مدفوع می‌نمایند که در ابتدا این مقدار به سختی قابل تشخیص است و با تثبیت بهتر عفونت، به تدریج برمقدار باکتری‌های دفع شده افزوده می‌شود. عموما گوساله‌های جوان نسبت به این باکتری حساس‌تر هستند. بدون شک آلودگی به سن و تعداد ارگانیسم بلعیده شده بستگی دارد. در اغلب گله‌های آلوده تصور بر این است که در بیشتر موارد، زمان آلودگی گاوها احتمالا در بدو تولد بوده است. این مساله توجیه کننده‌ی موفق نبودن برنامه‌های کنترلی درسطح گله است و باید به دامداران این نکته را یادآوری نمود که احتمالا زمان عفونی شدن گاوهایی که امروزه آلوده تشخیص داده می‌شوند، دو یا چند سال پیش و قبل از شروع برنامه‌های کنترلی بوده است. محتمل ترین منبع عفونی شدن گوساله‌دانی، با مدفوع آلوده‌ی مادر گوساله و یا گاو قبلی است که ارگانیسم را دفع می کرده و دامدار هیچ اطلاعی از آن نداشته‌است. دیگر منبع احتمالی انتقال، پستان آلوده به مدفوع عفونی گاو مادر است. اگر گوساله از این پستان شیر بخورد، احتمال بلع باکتری توسط گوساله خیلی زیاد است. احتمال ایجاد آلودگی در گوساله‌هایی که با گاوها در یک بهاربند نگهداری می‌شوند، یا آنهایی که به وسیله‌ی غذای پای آخور گاوهای بالغ تغذیه می شوند، زیاد است. آلودگی آخور یا ظروف تغذیه با مدفوع عفونی گاوها و یا آلوده شدن کفش و لباس کارگران گوساله‌دانی به وسیله‌ی مدفوع آلوده نیز احتمالا می تواند به عنوان یک راه انتقال محسوب شود. از دیگر راه‌های احتمالی انتقالی می توان به آلودگی مستقیم مواد غذایی با مدفوع، نفوذ مدفوع به سیلو و آلوده کردن آن و استفاده از وسایل مشترک برای تراشیدن مدفوع و جابه‌جا کردن مواد غذایی اشاره کرد.در مراحل پیشرفته‌ی عفونت، احتمال انتشار باکتری از دستگاه گوارش به پستان افزایش می‌یابد. بنابراین در صورتی که آغوز این گاوهای آلوده به مصرف گوساله‌ها برسد، می تواند به عنوان یک منبع بالقوه‌ی عفونت عمل کند و در همان ابتدای تولد گوساله را آلوده به MAP نماید لذا این مسأله اهمیت شناسایی آغوز آلوده را نشان می‌دهد(**۱۶**).

۵. نتیجه گیری

آغوز بدلیل دارا بودن ایمونوگلوبولین‌ها و لکوسیت‌ها و مواد مغذی نقش مهمی در انتقال ایمنی غیر فعال، جلوگیری از بروز بیماری‌ها و رشد و سلامت گوساله‌ها دارد. اما در صورتی که بدلایل مختلف کیفیت و کارایی لازم را نداشته باشد باعث بیماری

و مرگ و میر گوساله‌ها و در نتیجه ضررهای اقتصادی قابل توجه به پرورش دهندگان گاو شیری می‌شود. آلودگی آغوز بویژه آلودگی باکتریایی آن، مهم ترین دلیل کاهش کیفیت آغوز می‌باشد که با جذب غیر فعال آنتی بادی‌های آغوز تداخل ایجاد می‌کند. بدین جهت ارزیابی کیفی و بهداشتی آغوز و بررسی و حذف عواملی که در آلودگی آغوز نقش دارند از اهمیت بسزایی برخوردار است. در مطالعات صورت گرفته مشخص شده که مشکلات مدیریتی، عمده ترین دلیل آلودگی باکتریایی آغوز می‌باشند. زیرا بطور کلی پاتوژن‌های آغوز با منشاء محیطی می‌باشند و حضور این عوامل در آغوز نشان دهنده عدم رعایت کافی بهداشت در فرآیند جمع آوری و خوراندن آغوز می‌باشد. بنابراین استراتژی تولیدکنندگان باید بر محور مدیریت کاهش میزان آلودگی باکتریایی آغوز مورد استفاده در تغذیه گوساله‌ها متمرکز گردد. همه تولیدکنندگان باید به رعایت بهداشت در طی مراحل جمع آوری، ذخیره سازی و تغذیه توجه نمایند تا آلودگی باکتریایی آغوز به حداقل ممکن برسد. با توجه به هدف مطالعه حاضرکه شناسایی مایکو باکتریوم پاراتوبر کلوزیس در آغوز خورانده شده به گوساله‌های در بدو تولد می‌باشد بر اهمیت منشاء پستانی در کنار منشاء محیطی آلودگی آغوزتاکید می‌گردد.با توجه به اپیدمیولوژی بیماری یون بدیهی است جهت کنترل بیماری در گله‌های آلوده توجه به نقش حامل آغوز در همان ابتدای زندگی اهمیت بسزایی دارد.

۴. مراجع

1. Bates, A., et al., *Estimation of the sensitivity and specificity of four serum ELISA and one fecal PCR for diagnosis of paratuberculosis in adult dairy cattle in New Zealand using Bayesian latent class analysis.* Preventive veterinary medicine, 2020. **185**: p. 105199.
2. Badia-Bringué, G., et al., *MicroRNAs modulate immunological and inflammatory responses in Holstein cattle naturally infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.* Scientific Reports, 2024. **14**(1): p. 173.
3. Pourmahdi Borujeni, M., et al., *Comparison of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle, sheep and goats in the Khuzestan Province of Iran: Results of a preliminary survey.* Veterinary Medicine and Science, 2021. **7**(5): p. 1970-1979.
4. Elmagzoub, W.A., et al., *Faecal microbial diversity in a cattle herd infected by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: a possible effect of production status.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024. **40**(9): p. 276.
5. Nunney, E., et al., *Effect of tuberculin skin testing on serological results against Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP): Evidence of distinct effects in MAP-infected and noninfected cows.* Journal of Dairy Science, 2022. **105**(10): p. 8354-8363.
6. Mallikarjunappa, S., et al., *Johne's disease in dairy cattle: An Immunogenetic perspective.* Frontiers in veterinary science, 2021. **8**: p. 718987.
7. Nigsch, A., et al., *Who infects whom?—Reconstructing infection chains of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in an endemically infected dairy herd by use of genomic data.* PLoS One, 2021. **16**(5): p. e0246983.
8. Bulun, H., et al., *Interferon-gamma producing CD4+ T cells quantified by flow cytometry as early markers for Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection in cattle.* Veterinary Research, 2024. **55**(1): p. 69.

9. Ha, S., et al., *Comparison of blood parameters according to fecal detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in subclinically infected Holstein cattle.* Journal of Veterinary Science, 2023. **24**(5).
10. Elke Vansnick., et al., *Newly developed primers for the detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis.* Veterinary Microbiology, 2004. **100**: p. 197-204.
11. Renaud, D., et al., *Risk factors associated with failed transfer of passive immunity in male and female dairy calves: A 2008 retrospective cross-sectional study.* Journal of dairy science, 2020. **103**(4): p. 3521-3528.
12. Bragg, R., et al., *Prevalence and risk factors associated with failure of transfer of passive immunity in spring born beef suckler calves in Great Britain.* Preventive veterinary medicine, 2020. **181**: p. 105059.
13. Chen, B., et al., *Detection of the Core bacteria in colostrum and their association with the rectal microbiota and with Milk composition in two dairy cow farms.* Animals, 2021. **11**(12): p. 3363.
14. Denholm, K., *A review of bovine colostrum preservation techniques.* Journal of Dairy Research, 2022. **89**(4): p. 345-354.
15. Puppel, K., et al., *Relationship between the quality of colostrum and the formation of microflora in the digestive tract of calves.* Animals, 2020. **10**(8): p. 1293.
16. Orpin, P., D. Sibley, and K. Bond, *Johne's disease in dairy herds 1. Understanding the disease.* In Practice, 2020. **42**(1): p. 39-46.

Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) in colostrum from a number of dairy farms around Mashhad using the IS900 Nested-PCR method

Paratuberculosis, also known as Johne's disease, is a chronic progressive infection affecting all groups of domestic and wild ruminants, including cattle, goats, camels, buffaloes, and deer. The disease is caused by an acid-fast bacterium called Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. The clinical form of the disease results in chronic diarrhea, weight loss, weakness, and ultimately death. The subclinical form also leads to progressive weight loss, reduced milk production, decreased carcass value, and premature culling. This study aimed to determine the prevalence and directly identify Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in colostrum of dairy cows in several industrial dairy farms in Mashhad using the Nested-PCR method. For this purpose, 100 colostrum samples were collected from four industrial dairy farms in Mashhad. DNA was extracted from the samples and subjected to Nested PCR using specific primers. Out of the 100 colostrum samples collected, 16 samples (16%) were found to be infected with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, which was confirmed by PCR. The infected samples belonged to three of the studied dairy farms. The isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the colostrum of dairy cows in the studied farms highlights the importance of colostrum in the epidemiology of Johne's disease and its role in transmitting the disease to susceptible newborn calves at risk.

Keywords: Dairy farm, Newborn calf, Colostrum, Nested PCR, Johne’s disease