

**CROHN HASTALIĞININ ETİYOLOJİSİNDE MYCOBACTERİUM
PARATUBERCULOSİS (MYCOBACTERİUM AVİUM SBSP.
PARATUBERCULOSİS)'İN ROLÜ VE BESİNLERLE BULAŞMA RİSKİ
The Role of Mycobacterium paratuberculosis (Mycobacterium avium sbsp.
paratuberculosis) in the Etiology of Crohn's Disease and Infection Risk via Food**

Ahmet GÜNER¹

Özet : *Mycobacterium paratuberculosis*'in (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*) Crohn hastalığının etiolojisinde yer alıp almadığı kültür, PCR ile mikobakteri DNA'sının belirlenmesi ve immunolojik yöntemlerle ortaya konulmaya çalışılmaktadır. Hastalığın etiolojisindeki varlığı kesin olarak doğrulanmamış fakat insan patojeni olduğu kabul edilmiştir. Çiğ ve pastörize sütlerde varlığının belirlenmesi ve pastörizasyon sıcaklıklarına diğer patojenlerden daha dayanıklı olmasından dolayı, enfekte hayvanlardan elde edilen besinler vasıtasıyla bulaşma ihtimali oldukça yüksektir.

Anahtar kelimler: Crohn hastalığı, *Mycobacterium paratuberculosis*, besin enfeksiyonu

Crohn hastalığı, insanların gastrointestinal sistemini ağızdan anüse kadar etkileyen, etiolojisi bilinmeyen kronik iltihabi bir hastalıktır (1-3). Hastalık adını, 1932 yılında hastalığı bağırsak tüberkülozundan ayırt eden araştırmacıdan almıştır (4). Granulomatoz enterokolitis olarak da bilinen bu hastalık, sindirim sisteminin ağızdan anüse kadar herhangi bir bölümünü etkileyebilmesine karşın, en sık bulunduğu yerler ileumun son kısımları (terminal ileum) ve kolondur. En çok ileumu etkilemesi nedeniyle "regional enteritis" veya "terminal ileitis" olarak da adlandırılır (1-3). Hastalık, bağırsağın bütün katmanlarına yayılan (transmural) derin ülserlerin, abse ve fistüllerin bulunduğu yangıyla karakterizedir (2, 3). Bununla birlikte hastaların % 25'inde oküler ve kutanöz form da görülür (3, 5).

Crohn hastalığının klinik tanısı genellikle güçtür. Hastalığın klinik bulgularında kronik ishal, kilo kaybı, iştahsızlık, ateş, yangı ve fibrotik olaylar dikkati çekmektedir (1). Akut safhada ortaya çıkan

Summary : *In the etiology of Crohn's disease of Mycobacterium paratuberculosis (Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis) has being determined by bacterial culture, PCR and immunological methods. Presence in the etiology of Crohn's disease has not been confirmed yet, but it has been accepted a human pathogen. Because of the existence in raw and pasteurized milk and higher survival rate than the other pathogens to pasteurization temperature, contamination risk is very high via food produced from infected animals.*

Key words: Crohn's disease, *Mycobacterium paratuberculosis*, food infection

iştahsızlık, kusma ve ishal bazen apandisit andrabilir. Kronik semptomlar, diyare ve nonspesifik karın ağrısı şeklindedir (2).

Crohn hastalığının insidensinde son 50 yılda önemli artış olduğu, (5, 6) genellikle bütün yaş gruplarındaki insanlarda tespit edilmiş olmasına rağmen, gelişme dönemlerindeki gençlerde ve yirmili yaşların ilk yıllarında daha sık rastlanıldığı, 50-60 yaşları arasındaki insanlarda ise son yıllarda tekrar bir artış gösterdiği bildirilmektedir (5). Ayrıca hastalığın kuzey bölgelerinde güney bölgelerine göre daha fazla görüldüğü ileri sürülmektedir (5). Nitekim Acheson (2001), Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'nın kırsal bölgelerindeki bazı etnik gruplarda prevalansının yüksek olduğu ve hastaların %30'dan daha fazlasının aile bireylerinde de tespit edildiğini ifade etmektedir (6). Ayrıca hastalığın Yahudilerde daha çok görüldüğü fakat bunun da bölgesel olarak değişim gösterdiği, bunun yanı sıra beyaz insanlarda, zenci ve Asyalılardan daha fazla görüldüğü belirtilmektedir (5).

¹ Yrd.Doç.Dr.Selçuk Ün.Vet.Fak.Besin Hij.ve Tek.AD, Konya

Etiyolojisi

Birçok faktörler öne sürülmüşse de etiolojisi tam olarak bilinmemektedir. Tanımlandığı ilk dönemlerde, hastalığının bağırsak duvarındaki zayıf immun yanıt ve yangından kaynaklandığı zannedilmekteydi (7). Günümüzde öne sürülen olası nedenler arasında bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, diyet, sigara dumanına maruz kalma, genetik bozukluk ve immun sistem yetersizliği bulunmaktadır (5).

Crohn hastalığının etiolojisi ile ilgili öne sürülen teorilerden birisi de hayvanlarda da benzer hastalık oluşturan *Mycobacterium paratuberculosis*' in (*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*) neden olduğu enfeksiyondur (8). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) dışında Crohn hastalığının etiolojisinde yer alabileceği düşünülen farklı tür bakteriler (örn., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumonia*, *Yersinia* spp., *Streptococcus* spp. ve *Helicobacter pylori*) de bulunmaktadır (5, 9). *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* ile çok benzerdir ve birçok kaynaktan bu mikroorganizma *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* olarak adlandırılmaktadır (9). Nitekim bu ifadeleri doğrular şekilde, Barbezat (1998) ve Selby (2000), düzenli antibiyotik tedavisine yanıt vermesi nedeniyle hastalığın intestinal bir bakteri ile ilişkili olabileceğini

ileri sürmüşlerdir (3, 11).

Crohn hastalığının etiolojisinde mikobakterilerin de etkili olabileceği fikri, ilk defa bir Crohn hastasından *M.kansassi*'nin izolasyonunu takiben kabul edilmiştir. Ancak daha sonra 11 hastadan MAP'ın izole edilmesi bu bakteri üzerine dikkatleri yoğunlaştırmıştır (3). Son zamanlarda Amerika Birleşik Devletleri, Hollanda, Fransa ve Avustralya'da Crohn hastalarından patojen MAP ile identik olan bakterinin üretilmesini takiben; Crohn hastalığının etiolojisinde bu bakterinin olası varlığını belirlemek üzere birçok araştırma yapılmıştır (7, 12-15).

MAP, ilk defa 1895 yılında Johne ve Frothingham tarafından, günümüzde Johne hastalığı olarak bilinen sığırlardaki paratüberkülozis (kronik enteritis) hastalığının etkeni olarak tanımlanmıştır (8, 16). Paratüberkülozis sığır, koyun ve keçilerde bağırsak duvarının kalınlaşması, kronik ishal ve zayıflama ile karakterize enfeksiyöz bir hastalık olarak saptanmasının (17) yanı sıra maymun, tavşan ve şempanzelerde de tespit edilmiştir (4, 8). Crohn hastalığının etiolojisinde MAP'ın yer alabileceği fikri; Crohn hastalığı ile sığır paratüberkülozisinin klinik görünümü (6, 17) ve patolojik bulguların (5) benzer olmasına dayanır. Tablo I'de Crohn hastalığı ve paratüberkülozun karşılaştırmalı klinik bulguları yer almaktadır (6).

Crohn Hastalığı'nda MAP'ın Varlığını Doğrula-

Tablo I. Crohn hastalığı ve paratüberküloz'un karşılaştırmalı klinik görünümü

Klinik Bulgu	Crohn Hastalığı	Paratüberküloz
Hastalığın görülme yaşı	Erken yaşlar	Erken yaşlar
Etkilenen anatomik bölge	Bağırsakların herhangi bir kısmı	İleumun son kısmı
Aralıklı lezyonların varlığı	Genellikle	Olabilir, fakat nadir
Yangı	Sıklıkla; transmural, ülserleşme, polip ve kanama yaygın	Genellikle çok yüzeysel ülserasyonlar, kanama çok nadir
Komplikasyon	Tıkanma, yırtılma ve fistül sıklıkla görülür	Tıkanma, yırtılma ve fistül nadir görülür
Granulomların varlığı	Evet	Evet
Bağırsak dokusunda aside dayanıklı bakterilerin varlığı	Nadir	Genellikle
MAP'a karşı immun cevap	Zayıf	İyi

yan Bazı Laboratuvar Bulguları

Obbligat hücre içi bir patojen olan MAP bazı Crohn hastalarından izole edilmekle birlikte, bu hastalıkta ilişkili olduğuna dair açık kanıtlar bulunmamaktadır (4). Ancak, 1988 yılında genç bir çocuğun servikal lenf tüberkülozundaki varlığı, PCR yöntemiyle tespit edildikten sonra insan patojeni olarak da kabul edilmiştir (8).

Bazı araştırmacılar (5, 12, 13) Crohn hastası kişilerin bağırsak dokularında MAP'ın varlığını tespit etmişlerdir. Chiadini ve ark. (1984), üç Crohn hastasından izole ettikleri fakat sınıflandıramadıkları, üremesi zor olan *Mycobacterium* türünün mycobactine bağımlı olduğunu ve izolasyon için yaklaşık 18 aylık inkübasyon periyoduna ihtiyaç duyduğunu, koloni morfolojilerinin düz, ve katalaz pozitif olduklarını bildirmişlerdir (12). Aynı araştırmacılar elde ettikleri bulguların ışığında, bunların MAP'ın alt türlerinin ve biyovariyetlerinin olabileceğini ve bu *Mycobacterium* türünün Crohn hastalığının etiyolojisinde bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Gitnick ve ark. (1989), 27 Crohn hastasından yaptıkları mikrobiyolojik kültürlerde 4 tanesinin mikobakteri olarak izole edildiğini ve elde edilen sonuçların; mikobakterinin Crohn hastalığı ile ilişkili olabileceği yönündeki önceki araştırmalarda ortaya konulan bulguları güçlendirdiğini bildirmişlerdir (18).

MAP, spesifik besin öğelerine ihtiyaç göstermesi ve uzun inkübasyon periyoduna sahip olması nedeniyle, kültürlerde zor üretilir (6, 8, 18). MAP, "mycobactin-p" olarak adlandırılan üretime faktörünün sıvı veya katı ortamlara katılmasıyla üretilmektedir (17). Demirle şelat oluşturan mycobactin ortamda bulunmadığında, gelişmesini ancak demir temin eden hücrelerde gerçekleştirebilir (8). Oysa, Millar ve ark. (1996), kültürel yöntemlerin mikroorganizmanın varlığını tespit için tek başına yeterli olmadığını bildirmişlerdir (19).

MAP'ın Crohn hastalığının potansiyel bir nedeni olarak aranmasında, kültür yöntemlerinden başka

yöntemler de kullanılmıştır (5). 1989'da 1.4 primer sırası olan IS900, *M. paratuberculosis*'de tanımlanmış ve bu mikroorganizma için spesifik olduğu ileri sürülmüştür. Crohn hastalarının 2/3'ünde IS900 PCR ile yapılan araştırmada MAP DNA'sının varlığı ortaya konmuştur (16). Lisby ve ark. (1994), 24 Crohn hastasının 11'inde, ülserli kolon yangısı olan 10 hastanın 2'sinde ve diğer kolon bozukluğu olan 28 hastanın 3'ünde, spesifik MAP DNA'sını tespit etmişlerdir (20). Mishina ve ark. (1996), 8 Crohn hastasının ileal mukoza örneklerinin PCR incelenmesinde bütün örneklerin RNA ve DNA sıralanışlarının MAP ile aynı olduğunu ileri sürmüşlerdir (21). Crohn'lu hastalar ve kontrol gruplarının DNA ekstraktlarında PCR ile IS900 tanımlanması için girişimler devam etmektedir (8).

Crohn hastalığından şüpheli 10 hastanın dokuz tanesinin kanında çoğunlukla MAP'ta görülen ve HupB olarak isimlendirilen mikobakteriyel bir protein olan IgA tespit edilmiştir (16). Suenega ve ark. (1999), Crohn hastalarında MAP antijenlerine karşı, serum antikorlarından (IgG, IgA ve IgM) özellikle IgG'nin ülseratif kolitisili ve tüberkülozlu hastalara göre önemli düzeyde arttığını ve bundan ötürü bu bakterinin Crohn hastalığının patogenezinde bazı rolleri olabileceğini bildirmişlerdir (22).

Crohn hastalığına yakalanmış insanlardan yapılan kültür, PCR ile mikobakteri DNA sıralanışın ortaya konulması, MAP antijenlerine karşı immün yanıt alınması gibi birçok bulgu MAP'ın Crohn hastalığına yakalanmış insanların bağırsaklarındaki varlığını desteklemektedir (8). Bu bilgilerin ışığında, MAP'ın Crohn hastalığının etiyolojisinde rol oynayan bir etken olduğuna dair hipotezin yanında ve karşısında olan bulguların mevcut olduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgular Tablo II'de özetlenmiştir (3).

Crohn Hastalığı'nın Etiyolojisinde Map'ın Varlığını Doğrulayan Bazı Tedavi Bulguları

Crohn hastalığının tedavisi, genellikle 5-amino sali-

Tablo II. Crohn hastalığının etiolojisinde map'ın varlığı hipotezinin yanında ve karşısında olan bulgular

	Yanında	Karşısında
Epidemiyolojisi	Toparlanmış	Toparlanmamış
İzolasyon	%2-15	%0 yada kontrol grubu pozitif
PCR sonuçları	%65-100	%0; kontrol grubunda %0-100
MAP'a karşı antikor	Pozitif	Negatif ya da kontrol grubu da pozitif

silik asit bileşikleri, kortikosteroidler, immün sistemi baskılayıcılar ve antibiyotiklerle yapılır. Son yıllarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin kortikosteroidler kadar etkili olduğu gösterilmiştir (3). Crohn hastalığının tedavisinde antibakteriyel tedavinin uygulanmasından sonuç alınması buraya kadar ifade edilen bağlantıyı güçlendirmektedir. Taylor ve ark. (1998), 7 yaşında servikal lenfadenitise yakalanan bir çocuğun etkilenen lenf düğümünün çıkarılmasına ve mycobactin içermeyen kültür bulgularında negatif sonuç çıkmasına rağmen, beş yıl sonra Crohn hastalığı şüphesiyle tedaviye alındığını ve iki yıllık ilaç tedavisi (rifabutın ve clarithromycin) sonucunda iyileştiğini, ilaç tedavisi sırasında şişen servikal lenf düğümlerinden alınan örneklerin IS900 PCR yöntemiyle pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir (24). Ayrıca Crohn hastaları üzerinde tüberküloz tedavisi uygulanmasından elde edilen sonuçlar, MAP'ın tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlara duyarlı olmadığını ortaya koymuştur (6, 23).

Besinlerde Bulunma ve Bulaşma Riski

El-Zaataria ve ark. (2001), MAP'ın enfekte hayvanlardan insanlara kontamine su, et ve süt ürünlerinin tüketimiyle bulaşabileceğini ileri sürmektedirler (8). Linnabary ve ark. (2001) Amerika Birleşik Devletleri'nde süt besiciliğindeki sığırların %25, et besiciliğindeki %8 oranında enfekte olabileceğini bildirmişlerdir (10). Bunun yanı sıra etkenin enfekte hayvanların sütlerinde mevcut olduğu (10, 16, 24) ve pastörizasyon sıcaklık-zaman düzenlerinde canlı kaldığı belirtilmektedir (5, 10, 25, 26).

Taylor ve ark. (2001), sublinik enfekte sığırların sütleriyle bu bakteriyi salgıladıklarını bildirmişlerdir (23). Nitekim, Çetinkaya ve ark. (1999), MAP'a bir sekans olan IS900 ile kombine edilmiş

polimeraz zincir reaksiyonu ile inceledikleri 500 süt numunesinin 25'inde (%5) pozitif reaksiyon elde etmişlerdir. Araştırmacılar pozitif süt numunelerinden mycobactin ilaveli Middlebrook 7H11+OADC vasatına yapılan ekimlerde 25 örneğin 17 tanesinde (% 68) üreme tespit etmişlerdir (24).

Millar ve ark. (1996), PCR ile iki yıllık periyotta inceledikleri 312 süt ve ürünleri örneğinin 22'sinde MAP'a rastlandıklarını, 18 PCR pozitif süt örneğinin 9'undan, 36 PCR negatif örneğin 6'sından, sıvı besi yerlerinde 13 ile 40 haftalık inkübasyon sonrasında, pozitif sonuç aldıklarını ifade etmişlerdir (19). Aynı araştırmacılar yavaş gelişen ve kültüre edilmesi zor olan MAP'ın pastörize sütlerdeki varlığının tespiti için kültürel yöntemin yeterli olmadığını ve MAP'ın pastörize sütlerde, özellikle sığırlarda paratüberküloz hastalığının pik yaptığı dönemlerde (Ocak-Mart ve Eylül-Kasım), bulunabileceğini ileri sürmektedirler (19).

Bradbury (1998), MAP ile Crohn hastalığının oluşumu konusunda henüz tam manasıyla bir görüş birliği olmasa da bu bakterinin İngiltere'de sütlerde tespit edildiğini ve varlığının dikkatle incelenmesi gerektiğini vurgulamaktadır (27). Nitekim Brooks (1998), İngiltere Tarım Bakanlığı'nın çığ ve pastörize sütlerde MAP'ın varlığının araştırılması ile ilgili çok büyük bir projeyi (320.000 Dolarlık) desteklediğini bildirmelidir (28). Buna karşın Doherty ve ark. (2002), inceledikleri 86'sı pastörize 396 süt numunesinde MAP'a rastlamadıklarını ifade etmişlerdir (29).

MAP, pastörizasyon sıcaklık derecelerindeki işlemlerine *M. tuberculosis*'ten daha dayanıklıdır. Merkál ve Whipple (1980), et ürünlerinde MAP'ın *M. bovis*'ten 6-7°C daha yüksek sıcaklık dere-

celerinde yıkımlandığını bildirmişlerdir (26). Grant ve ark. (1996), MAP ile 10^7 ve 10^4 düzeyinde kontamine ettikleri sütleri standart metod (63.5°C 'de 30 dakika) ve çabuk yöntemle (71.7°C 'de 15saniye) pastörize etmişlerdir. Araştırmacılar 10^7 düzeyinde kontamine edilen sütlerde etkenin yavaş pastörizasyonda %96, çabuk pastörizasyonda %85 düzeyinde canlı kaldığını, bu sayının 10^4 düzeyinde kontamine edilen sütlerde sırasıyla % 50 ve % 58 olduğunu saptamışlardır (25). Taylor (2001), İngiltere'de marketlerde satılan sütlerde %1.7 oranında mycobactine bağımlı kolonilerin izole edildiğini bildirmiştir (23).

Sonuç olarak, MAP'ın Crohn hastalığının etiyolojisi ile ilişkisi kesin olarak ortaya konulmasa da, insanlarda patojen olarak kabul edilmesi ve pastörizasyon sıcaklık-zaman düzenlerine diğer patojenlerden çok daha dayanıklı olması nedeniyle, enfekte hayvanlardan elde edilen besinlerle bulaşma olasılığının oldukça yüksek olması nedeniyle, besinlerdeki varlığı konusunda detaylı araştırmaların yapılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Arslan S. Crohn Hastalığı. Alınmıştır "Temel Medikal Hastalıklar ve Tedavileri". Editör Gürler İliçin, İkinci Baskı. Duygu Ofset, , Ankara 1996, pp 347-351.
2. Özer Ş. Genel Cerrahi. Merhaba Ofset, Konya, 1994.
3. Selby W. Pathogenesis and therapeutic aspects of Crohn's disease. *Veterinary Microbiol* 2000, 77: 505-511.
4. Chiodini R.J. Crohn's disease and mycobacterioses: A review and comparison of two diseases entities. *Clin Microbiol Rev* 1989, 2: 90-117.
5. Harris JE, Lammerding AM. Crohn's disease and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: *J Food Protect* 2001, 12: 2103-2110.
6. Acheson DWK. An alternative perspective on the role of Mycobacterium paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease. *Food Control* 2001, 12: 335-338.
7. Hodgson HJF. Pathogenesis of Crohn's disease. *Bailliere's Clin Gastroentr* 1998, 12: 1-17.
8. El-Zaataria FAK, Osatob MS, Graham DY. Etiology of Crohn's disease: the role of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Trends in Molecular Medicine* 2001, 7: 247-252.
9. Lamps LW, Madhusudhan KT, Havens JM, et al. Pathogenic Yersinia DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *The American Journal of Surgical Pathology* 2003, 27: 220-227.
10. Linnabary RD, Meerdink GL, Collins MT, et al. Johne's disease in cattle. *CAST (Council for Agricultural Science and Technology)*, 2001, 17: 1-10.
11. Barbezat GO. Recent advances. *Gastroenterology*. *BMJ* 1998, 316: 125-128.
12. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, et al. Characteristics of an unclassified Mycobacterium

- species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 1984, 20: 966-971.
13. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, et al. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984, 29: 1073-1079.
 14. Thompson DE. The role of mycobacteria in Crohn's disease. *J Med Microbiol* 1994, 41: 74-94.
 15. Horowitz EA, Lien EA. *Mycobacteria and Crohn's disease*. *Infect Med* 1997, 14: 569-573.
 16. Taylor JH. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: The nature of the problem. *Food Control* 2001, 12: 331-334.
 17. Arda M, Minbay A, Aydın N. Özel Mikrobiyoloji Bakteriyel ve Enfeksiyöz Hastalıklar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 386, Ders Kitabı: 284, Ankara, 1982, pp 367-376.
 18. Gitnick G, Collins J, Beaman B, et al. Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1989, 34: 925-932.
 19. Millar D, Ford J, Sanderson J, et al. IS900PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62: 3446-3452.
 20. Lisby G, Andersen J, Engbaek K, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. *Scandinavian J Gastroentr* 1994, 29: 923-929.
 21. Mishina D, Katsel P, Brown ST, et al. On the etiology of Crohn's disease. *Medical Sci* 1996, 93: 9816-9820.
 22. Suenega K, Yokoyama Y, Nishimori I, et al. Serum antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1999, 44: 1202-1207.
 23. Taylor JH, Bares N, Clarke C, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* cervical lymphadenitis, followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease. *British Medical Journal* 1998, 316: 449-453.
 24. Çetinkaya B, Muz A, Ertuş HB, et al. Süt ineklerinde paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanması. *Turk J Vet Anim Sci* 1999, 24: 371-379.
 25. Grant IR, Ball HJ, Neil SD, et al. Inactivation of *Mycobacterium* in Cow's milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol* 1996, 62: 631-636.
 26. Merkal RS, Whipple DL. Inactivation of *Mycobacterium bovis* in meat products. *Appl. Environ. Microbiol* 1980, 40: 282-284.
 27. Bradbury J. Need we add milk to list of worrying foods. *Lancet* 1998, 352: 549.
 28. Brooks A. Quality of UK milk to be studied. *British Medical Journal* 1998, 317: 491.

29. *Doherty AO, Grady DO, Smith T, et al. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in pasteurised and unpasteurised milk in the Republic of Ireland. Irish Journal of Agricultural and Food Research 2002, 41: 117-121.*