

## DETEKSI *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* PADA SUSU FORMULA LANJUTAN DI BOGOR

[Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Formula Milk in Bogor]

Widagdo Sri Nugroho<sup>1,2</sup>, Mirnawati Sudarwanto<sup>3</sup>, Denny Widaya Lukman<sup>3</sup>, Rochman Naim<sup>3</sup>, Surachmi Setyaningsih<sup>3</sup>, Abdulwahed Ahmed Hassan<sup>4</sup>, dan Ewald Usleber<sup>4</sup>

<sup>1</sup>) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>2</sup>) Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Indonesia

<sup>3</sup>) Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Indonesia

<sup>4</sup>) Professur für Milchwissenschaften Institut für Tierärztliches Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig Universität, Giessen, Germany.

Diterima 2 Januari 2008 / Disetujui 21 Mei 2008

### ABSTRACT

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) becomes a public health concern in developed countries which is usually associated to Crohn's disease (CD) in human. The disease shows similarities in clinical signs and pathology characteristic with John's disease (JD) in ruminants which is infected by MAP. Researchers in Europe, USA, and Australia detected MAP in their dairy products and showed the relationship among MAP, CD, and JD. Meanwhile Indonesia imported milk and milk products from those countries to cover the national demand. This situation keeps MAP as potential-problem in national dairy herd and human health in the future. The aim of this study was to detect MAP in the formula milk for toddler. Fifty samples from five established milk producers were taken on August 2006 at the supermarket in Bogor. Two separate diagnostic methods were used parallel in this study i.e.: polymerase chain reaction method (PCR) with insertion sequence F 57 as the primer and the Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT). Neither MAP grew in MGIT after 20 weeks of incubation period but 5 samples were found positive by nested PCR. Although there was no evidence whether MAP grew from the samples in this study, the comprehensive and sustainable studies on MAP should be carried out with more extensive and varied samples, as well as in human to provide data on MAP in Indonesia.

**Key words:** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, growing up milk formula, PCR F57

### PENDAHULUAN

Infeksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) menjadi perhatian kesehatan masyarakat di Eropa dan Amerika. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* termasuk bakteri dalam keluarga *Mycobacteriaceae*, spesies *Mycobacterium avium* complex (Harris & Barletta, 2001). Mikroba ini merupakan bakteri yang dapat ditemui di alam, tergolong Gram positif, berbentuk batang dengan ukuran 0.2-0.7 X 1-10 µm, non-motil, tahan asam dan alkohol, suhu pertumbuhan 25-45°C dan optimal 39°C, tumbuh lambat 4 -24 minggu (Anonim, 2000) dan membutuhkan *mycobactin J* yaitu senyawa hidroksimat pengikat besi, mampu tumbuh pada konsentrasi garam < 5 % pada pH 5.5 atau lebih (Griffiths, 2003). Bakteri MAP mampu bertahan dalam sel makrofag dan patogen intraseluler yang menyerang sel epitel sapi dan hewan mamalia lainnya (Bannantine & Stabel, 2002). Selain tahan asam bakteri ini juga tahan terhadap alkohol dan suhu tinggi yang merupakan faktor penting terkait dengan peran MAP dalam penyebaran penyakit melalui makanan

(foodborne disease) yaitu yang dikenal sebagai Crohn's disease (CD) (Chiodini, 1989; Sung & Collins, 2003).

Crohn's disease adalah peradangan usus granuloma pada manusia. Tampilan peradangan ini memiliki banyak kemiripan dengan *Johnes disease* (JD) yaitu penyakit kronis saluran pencernaan pada ruminansia karena infeksi MAP (Chiodini, 1989; Bull et al., 2003; Harris and Barletta, 2001). Kedua penyakit tersebut berpengaruh pada ekonomi dan kesehatan manusia seperti yang dilaporkan *Europe Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare* bahwa di Swedia biaya pengobatan kasus CD pada tahun 1994 mencapai 4 juta € dan tingkat kejadian penyakit ini di Eropa mencapai 5,6 kasus per 100.000 orang per tahun (Anonim, 2000). Di sisi lain JD menimbulkan kerugian pada peternakan sapi perah di Amerika Serikat hingga \$ 1,5 miliar pada tahun 1998 dan peternakan-peternakan yang mengalami kasus tersebut meningkat hingga 70% di beberapa negara Eropa, AS, dan Kanada (Stabel, 1998).

Kemungkinan adanya keterkaitan antara MAP, JD, dan CD memacu para peneliti untuk menggali

informasi dalam rangka memahami dan mengantisipasi permasalahan ini. Hewan-hewan penderita JD meskipun dalam kondisi subklinis dapat mengeluarkan MAP melalui susu, sehingga hal ini memungkinkan menjadi media penularan MAP pada manusia. Cara penularan ini menjadi perhatian serius meskipun belum ada bukti-bukti yang disepakati untuk mengaitkan bakteri ini dengan CD (Hermon-Taylor & Bull, 2002). Beberapa data memperlihatkan adanya MAP di dalam susu dan hasil olahannya, 7% susu pasturisasi yang dijual dipasar swalayan di Inggris dan Wales terdeteksi mengandung MAP (Millar et al., 1996). Di Inggris bakteri tersebut terdeteksi pada 2% susu segar, 2,1% susu pastuerisasi, 1,4% susu skim dan tidak ditemukan pada susu *Ultra Heat treatment* (UHT) (Griffits, 2003). Kondisi serupa juga ditemui pada produk pasturisasi, keju, dan susu formula instan di Irlandia, Amerika, Republik Ceko (Grant et al., 2002; Stabel, 1998; O'Reilly et al., 2004; Donaghy et al., 2004; Hruska et al., 2005; Ikonomopoulos et al., 2005), bahkan di Australia MAP dapat terdeteksi dalam air susu ibu (Whittington et al., 2000) sehingga fakta-fakta ini memperkuat dugaan penularan bakteri tersebut pada manusia dapat terjadi melalui makanan (Chamberlin et al., 2001).

Semua fakta tersebut memperlihatkan kejadian di negara-negara Eropa, Amerika, dan Australia sementara sebagian besar komponen susu formula yang dijual di Indonesia diimpor dari negara - negara tersebut. Bayi dan anak-anak merupakan target konsumen utama dari produk industri susu, sehingga resiko keterpaparan anak-anak dengan bakteri MAP menjadi lebih besar sementara patogenesis penyakit berlangsung sangat lambat dan akan tereksresi pada saat anak-anak itu menginjak remaja atau dewasa. Pada saat usia produktif inilah kerugian yang bertingkat ditimbulkan akibat infeksi MAP, kerugian karena gangguan kesehatan dan kerugian ekonomi karena turunnya produktivitas sumber daya manusia.

Deteksi adanya bakteri MAP pada produk pangan khususnya susu formula lanjutan belum pernah dilakukan di Indonesia sehingga penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi MAP pada susu formula lanjutan yang dijual di pasar swalayan Bogor.

## METODOLOGI

### Pengumpulan sampel

Lima puluh kotak susu formula (120-200g/kotak) dikumpulkan selama bulan Agustus 2006. Sampel berupa susu formula lanjutan yang diperuntukan bagi bayi usia 6 bulan hingga 2 tahun, diproduksi oleh 5 produsen yang berbeda. Seluruh sampel dibeli di pasar swalayan di wilayah Bogor. Pengujian sampel dilakukan di laboratorium kesehatan susu Universitas Justus Liebig, Jerman.

**Penyiapan sampel:** duapuluh (20) gram dari masing-masing sampel dilarutkan dalam 100 ml aquades steril dan dihomogenkan. Seluruh larutan setiap sampel kemudian dituang ke dalam 2 buah tabung gelas sentrifus steril (ukuran 50 ml) dan disentrifus (Hereaeus Multifuge 3-SR Centrifuge, Kendro Laboratory Products, Osterode Germany) pada kecepatan 2500xg selama 15 menit 4°C. Fraksi krim dan whey dibuang sedangkan pelet pada masing-masing tabung diresuspensi dengan 1 ml aquadest steril dan selanjutnya disatukan (dari asal sampel yang sama) dan diaduk hingga rata, satu ml larutan diambil dan ditempatkan pada tabung ependorf 1,5 ml untuk analisis PCR sedangkan sisanya digunakan untuk analisis MGIT.

### Deteksi MAP dari susu formula lanjutan dengan metode *Mycobacterial Growth Indicator Tube* (MGIT)

Dekontaminasi dan proses inokulasi: satu ml suspensi seperti dijelaskan di atas dipindahkan ke dalam tabung gelas steril dan ditambahkan 10 ml 0.75% *hexadecilpyridinium chloride* (HPC) dan didiamkan pada suhu kamar selama 5 jam. Suspensi disentrifus pada kecepatan 2500xg selama 15 menit, selanjutnya supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 500 µl sterile PBS mengandung 0.05% *Tween 20* (PBS-T) (Sigma, Steinheim, Germany). Sebanyak 250 µl diinokulasikan ke dalam 1 tabung *Mycobacterial Growth Incubator Tube* (MGIT) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 minggu untuk mengetahui adanya pertumbuhan bakteri dalam media. Pengamatan dilakukan setiap minggu mulai 4 minggu pertama menggunakan transluminator/sinar ultra violet (UV). Semua koloni terduga positif pada media MGIT dibuat preparat dan diwarnai dengan *Ziehl-Neelsen acid fast stain* (Becton Dickinson) untuk konfirmasi spesies.

### Deteksi MAP dengan analisis PCR F57

Ekstraksi DNA : sebanyak 500 µl suspensi yang diperoleh dari tahap di atas, dipindahkan ke dalam tabung ependorf 2 ml dan disentrifus pada kecepatan 10.000xg selama 30 menit. Supernatan dibuang dan 400 ml larutan penyangga TE *lysis* ditambahkan pada pelet dan divorteks hingga homogen. Selanjutnya suspensi dimasukkan ke dalam freezer -80°C selama 5 menit dan segera dipindahkan ke dalam penangas air suhu 95°C selama 1 menit, tahap ini diulang satu kali kemudian suspensi diinkubasi di dalam penangas air suhu 80°C selama 20 menit. Kemudian suspensi didinginkan pada suhu 4°C dan selanjutnya ditambahkan 35 µl proteinase K dan 400 µl AL *Lysis buffer* (Qiagen, Hilden, Germany), dikocok rata dengan vortek dan diinkubasi pada suhu 56°C selama satu malam. Tahap selanjutnya suspensi diekstraksi menggunakan DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) sesuai petunjuk dari perusahaan.

**Amplifikasi PCR menggunakan primer DNA spesifik F 57**

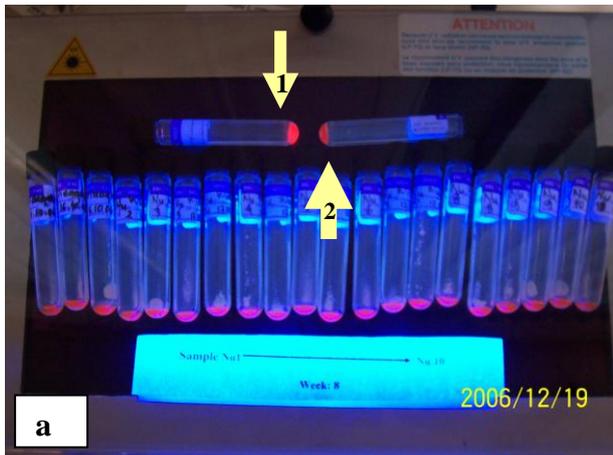
Metode PCR dengan primer spesifik F57 dilakukan dengan menggunakan primer oligonukleotida F57/R57 dan dilanjutkan dengan PCR semi-nested dengan primer F57 and F57Rn seperti dijelaskan oleh Vansnick et al., (2004). Amplifikasi PCR F57 dilakukan dengan menformulasikan 50 µl larutan reaksi yang tersusun dari: 1.5 µl masing-masing primers (10 pmol/µl), 1.5 µl dNTP-mix (10 mmol/ µl) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 5 µl GeneAmp 10x PCR Gold Buffer (150 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, pH 8.0) (Applied Biosystem, Darmstadt, Germany), 3.0 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Applied Biosystem), 0.35 µl AmpliTaq Gold® polymerase (5 U/µl, Applied Biosystem), 32.15 µl aquades steril, dan ditambahkan 5.0 µl DNA template. Kondisi amplifikasi PCR F57 putaran pertama yang digunakan adalah 1 siklus pada 94°C selama 10 min kemudian 40 siklus pada 94°C selama 1 min, 58°C selama 1 min, dan 72 °C selama 3 min, dan dilanjutkan dengan 1 siklus pada 72 °C selama 7 min. Pada putaran kedua digunakan 1 siklus pada 94°C selama 10 min kemudian 30 siklus pada 94°C selama 1 min, 58°C selama 1 min, dan 72°C selama 3 min, dan dilanjutkan dengan 1 siklus pada 72°C selama 7 min. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR iCycler-Biorad thermocycler (Biorad, Munich, Germany).

Produk PCR (amplikon) F57 (13 µl) dicampur dengan 2 µl loading dye solution (MBI Fermentas) dan

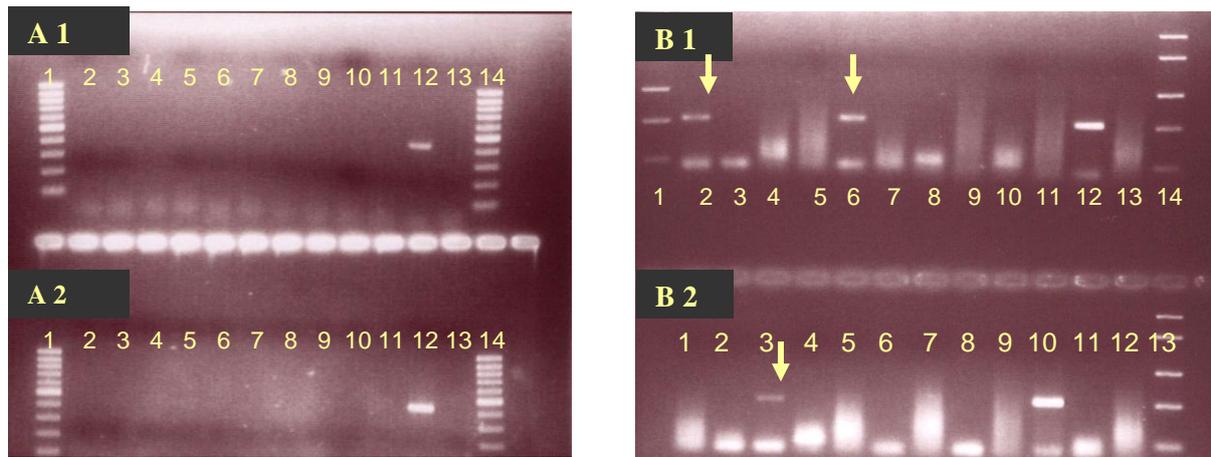
sebagai marker digunakan 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) selanjutnya diseparasi menggunakan 2% gel agarose elektroforesis (Biozym, Hessisch-Oldendorf, Germany) pada tegangan 120 V di dalam larutan 1x TAE buffer (0.04 mol/l Tris, 0.001 mol/l EDTA, pH 7.8). Setelah dielektroforesis selama 50 menit, gel agarose direndam dalam larutan pewarna ethidium bromide 5 µl/ml (Sigma, Taufkirchen, Germany) selama 5 menit, dan gambar didokumentasikan dengan menggunakan UV (245 nm) trans-illuminator (Biorad).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Setelah MGIT diinkubasi selama 20 minggu, tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Mycobacterium*. Hal tersebut terlihat dengan tidak adanya cairan yang berpendar dalam tabung (Gambar 1). Hasil analisis PCR dapat dilihat pada Gambar 2, PCR konvensional menggunakan primer F57 menunjukkan tidak adanya pita DNA MAP dari semua sampel yang diperiksa tetapi pada *nested* PCR dihasilkan pita spesifik DNA MAP dari beberapa sampel yaitu dari produsen 2 (2 sampel), produsen 3 (1sampel), dan produsen 4 (2 sampel). Hasil ini menunjukkan jejak keberadaan bakteri MAP pada sampel tersebut. Hasil analisis lengkap sampel dengan metode MGIT dan PCR dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 1. Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *mycobacterium* pada media MGIT dengan sinar UV pada minggu ke 8 (a) dan minggu ke 19 (b), seluruh sampel tidak ada yang positif (berpendar). Kontrol positif (tanda panah 1) dan kontrol negatif (tanda panah 2).



Gambar 2. (A) Hasil PCR F57 konvensional (A1: produsen 4, A2: produsen 3) tidak ada pita DNA, kolom 12 kontrol positif, kolom 1 dan 14 marker bp 100 ladder. (B) Hasil nested PCR F57, ada pita DNA pada kolom 2 dan 6 (B1: produsen 4) dan kolom 3 (B2: produsen 3), kolom 12 (B1) dan kolom 10 (B2) kontrol positif, kolom 1 & 12 (B1) dan kolom 13 (B2) marker DNA mid range

Table 1. Hasil analisis MAP menggunakan MGIT dan PCR F57 pada susu formula lanjutan di Bogor

Produsen (Jumlah sampel)	MGIT		F57		F57 nested	
	+	-	+	-	+	-
1 (10)	0	10	0	10	0	10
2 (10)	0	10	0	10	2	8
3 (10)	0	10	0	10	1	9
4 (10)	0	10	0	10	2	8
5 (10)	0	10	0	10	0	10
<b>Total (50)</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>5</b>	<b>45</b>

Penelitian ini tidak menemukan bakteri MAP yang tumbuh pada media MGIT dan tidak mendeteksi DNA MAP dengan metode PCR F57 konvensional tetapi dengan uji nested PCR ditemukan pita DNA MAP dari 5 sampel. Munculnya pita pada hasil nested PCR memperlihatkan adanya fragmen DNA target hasil amplifikasi dari amplicon PCR konvensional. Keberadaan fragmen DNA ini berarti membuktikan adanya jejak bakteri MAP pada sampel tersebut. Dapat dipahami pula bahwa bakteri MAP mencemari produk susu formula lanjutan tersebut dalam kondisi mati atau keberadaan bakteri sangat sedikit sehingga tidak dapat berkembang yang terbukti dengan tidak tumbuhnya bakteri pada media MGIT. Temuan ini memiliki kemiripan dengan hasil penelitian Hruska et al., (2005) yang menguji cemaran MAP pada susu formula di Republik Ceko menggunakan primer IS 900 dan F57. Penelitian tersebut melaporkan, dari 51 sampel susu formula bayi terdeteksi 25 sampel mengandung MAP berdasarkan PCR dengan primer IS 900 sedangkan hasil pengujian dengan primer F57 diperoleh 18 sampel yang positif.

Kemampuan bakteri MAP yang tahan terhadap panas diteliti oleh Sung et al., (2004) yang mengindikasikan adanya 3 protein terkait dengan kemampuan tersebut yaitu *GroES heat shock protein*, *antigen 85 complex B*, dan *alpha antigen*. Informasi ini

dapat menjelaskan temuan beberapa peneliti yang masih mendapatkan MAP pada beberapa produk susu olahan seperti susu pasturisasi, susu *high temperature short time* (HTST). Pada skala laboratorium Grant et al., (1996) melakukan pasturisasi terhadap susu yang telah dikontaminasi MAP dengan dosis  $10^4 - 10^7$  cfu/ml. Pasturisasi dilakukan dengan metode *high temperature short time* (HTST) dan *low temperature long time* (LTLT) dan hasilnya mampu mengurangi 4-50% bakteri. Hal ini berarti masih ada bakteri yang mampu bertahan dalam susu yang telah dipasturisasi. Hasil penelitian tahun 1996 diketahui bahwa susu pasturisasi yang dijual di supermarket di Inggris dan Wales ternyata masih mengandung bakteri MAP (Millar et al., 1996). Metode diagnosis MAP menggunakan PCR dapat meningkatkan kepekaan diagnosis, khususnya untuk pemeriksaan susu dan produk olahannya. Berdasarkan metode PCR dan isolasi bakteri dapat terdeteksi MAP pada susu pasturisasi di United Kingdom (Grant et al., 2002), di Irlandia pada susu segar dan pasturisasi (O'Reilly et al., 2004) dan pada keju *cheddar* (Donaghy et al., 2004). Data menunjukkan bahwa frekuensi cemaran MAP yang cukup tinggi terjadi pada susu dan produk olahannya, hal ini memperkuat alasan untuk menghubungkannya dengan kasus *Crohn's disease* (CD) pada manusia.

Hasil kajian ini juga memperkuat pendapat bahwa primer F57 memiliki sensitivitas yang tinggi seperti dikemukakan oleh Vansnick et al., (2004) bahwa primer ini memiliki kinerja yang sangat baik dengan sensitivitas uji yang mampu mendeteksi MAP hingga 1 CFU namun untuk menguatkan hasil perlu dilakukan simulasi program PCR agar spesifisitasnya juga tinggi.

Penggunaan sekuen IS 900 sebagai primer MAP dilaporkan oleh Vary et al., yang diacu Harris & Barletta (2001) diketahui meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas diagnosis PCR terhadap MAP bahkan dapat membedakannya dengan subspecies lain dari *M. avium complex* dan *M. silvaticum*. Bull et al., (2003) memperlihatkan sekuen IS 900 (primer TJ1-4) memiliki tingkat akurasi yang cukup tinggi namun beberapa peneliti masih mendapati beberapa hasil positif palsu sehingga pengembangan primer untuk meningkatkan ketepatan diagnosis primer IS 900 terhadap bakteri MAP tetap dilakukan. Primer F57 merupakan satu hasil pengembangan dari sekuen yang sudah ada. Tasara & Stephan (2005) menguji primer ini dengan metode *real-time* PCR dan mampu mendeteksi MAP di dalam susu yang di kontaminasi dengan MAP sebanyak 10 sel/ml. Metode ini direkomendasikan untuk digunakan sebagai metode rutin pengujian MAP pada susu dan akan lebih akurat apabila diparalel dengan penggunaan primer IS 900.

Hasil nested PCR kajian ini paralel dengan hasil uji serologis yang mengindikasikan penyebaran penyakit JD pada sapi perah nasional. Tiga ekor sapi perah di Jawa Barat dilaporkan seropositif pada tahun 2004 (Adji, 2004) dan pada tahun 2007 ditemukan 6 ekor seropositif dari kelompok sapi perah di daerah lain (hasil survei Balai Besar Veteriner Bogor, tidak dipublikasi). Kedua data di atas walaupun tidak dapat dikaitkan secara langsung telah memberikan informasi dini bahwa masalah MAP di bidang usaha sapi perah, susu dan hasil olahannya adalah nyata dan sangat potensial berkembang di Indonesia.

Kajian lanjut secara komprehensif terhadap keberadaan MAP baik dari aspek kesehatan hewan dan ekonomi peternakan, keamanan pangan serta kesehatan manusia harus dilakukan dalam rangka menjamin kesehatan masyarakat pada umumnya. Kajian lanjutan dapat dilakukan dengan mendeteksi/mengisolasi MAP dari hewan, produk pangan asal hewan seperti susu dan olahannya dengan memperbesar jumlah sampel, variasi jenis sampel baik komoditas, spesies hewan serta lingkungan seperti air, tanah, khususnya di lingkungan peternakan.

Kajian MAP pada manusia perlu mulai dikembangkan mengingat bakteri ini masih satu keluarga dengan *Mycobacterium tuberculosis* yang kasusnya hingga saat ini menempatkan Indonesia pada posisi ke tiga di dunia (Anonim, 2003). Kondisi ini memperkuat kecurigaan bahwa kasus CD juga terjadi di Indonesia namun belum menjadi perhatian pemerintah dan masyarakat secara lebih baik. Isolasi MAP dapat

dilakukan terutama pada pasien-pasien penderita radang usus bagian bawah (*inflammatory bowel diseases*) data ini akan sangat bermanfaat dalam mengungkap penyakit CD. Langkah tersebut mengacu pada penelitian Naser et al., (2004) yang mendeteksi MAP dari darah 14 orang dari 28 penderita CD, 2 orang penderita *ulcerative colitis* tetapi tidak menemukannya pada 15 orang yang tidak menderita infeksi usus bagian bawah. Sejalan dengan data tersebut, Bull et al., (2003) mendeteksi MAP pada 34 dari 37 (92%) pasien CD dan 9 dari 34 (26%) orang bukan penderita CD. Informasi mengenai status bakteri MAP pada manusia ini akan sangat membantu dalam melacak sumber dan proses penularannya di Indonesia sehingga dapat diketahui cara penanganan dan penanggulangannya yang efektif di masa mendatang.

## KESIMPULAN

Tidak ditemukan *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) yang tumbuh dari susu formula lanjutan di wilayah Bogor meskipun diperoleh indikasi adanya bakteri MAP di dalamnya. Penelitian lanjutan harus dilakukan untuk memperoleh data yang lengkap dan komprehensif mengenai MAP di Indonesia dalam rangka mengantisipasi permasalahan ini di masa mendatang.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang membiayai pendidikan pascasarjana bagi penulis pertama serta kepada *Deutsche Akademische Austauschdienst* (DAAD) yang telah membantu membiayai penelitian ini melalui program *sandwich*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adji RS. 2004. Isolasi dan uji serologi terhadap *Mycobacterium paratuberculosis* pada sapi perah. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 4-5 Agustus 2004. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian, pp.281-284.
- Anonim 2000. Possible Links Between Crohn's Disease and Paratuberculosis. Scientific Committee Health and Animal Welfare, European Commission, Directorate-General Health & Consumer Protection.
- Anonim 2003. Increasing Investments in Health Outcomes for The Poor. Second Consultation on Macroeconomics and Health. World Health Organisation.
- Bannantine JP, and Stabel JR. 2002. Killing of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* within

- macrophages. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/2> [15 Juli 2005]
- Bull, T.J., E.J. McMinn, K. Sidi-Boumedine, A. Skull, D. Durkin, P. Neild, G. Rhodes, R. Pickup And J. Hermon-Taylor. 2003.** Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2915-2923
- Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity MT, Schwartz MR, Naser S, Shafraan I, El-Zataari FAK. 2001.** Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Chron's diseases. *Aliment Pharmacol. Ther.* 15: 337-346
- Chiodini RJ, 1989.** Crohn's disease and the *Mycobacterioses*: review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Review.* 2: 90-177
- Donaghy JA, Totton NL, Rowe MT. 2004.** Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 8:4899-4905
- Grant IR, Ball HJ, Neill SD, Rowe MT. 1996.** Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl. and Environ. Microbiol.* 62:631-636
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. 2002.** Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2428-2435
- Griffiths M. 2003.** *Mycobacterium paratuberculosis*. Di dalam: *Food-borne Pathogenes*, 1<sup>st</sup> ed. Woodhead Pub.Ltd. and CRC press. pp. 489-500
- Harris NB, and Barletta RG. 2001.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 489-512
- Hermon-Taylor J and Bull T.J. 2002.** Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* : a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J.M. Microbiol.* 51: 3-6
- Hruska K, Bartos M, Kralik P, Pavlik I. 2005.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: Paratuberculosis in cattle-the public health problem to be solved. *Vet. Med. Czech.* 50. 8: 327-335
- Ikonomopoulos, J., I. Pavlik, M. Bartos, P. Svastova, W.Y. Ayele, P. Roubal, J. Lukas, N. Cook and M. Grazouli. 2005.** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 12:8934-8936
- Millar, D., J. Ford, J. Sanderson, S. Withey, M. Tizard, T. Doran and J. Hermon-Taylor. 1996.** IS 900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurised cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3446-3452
- Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. 2004.** Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Chron's disease. *Lancet* 364: 1039-1044
- O'Reilly, C.E., L. O'connor, W. Anderson, P. Harvey, I.R. Grant, J. Donaghy, M. Rowe and P. O'Mahony, P. 2004.** Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5138-5144
- Stabel J.R. 1998.** Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy. Sci.* 81:283-288
- Sung N, and Collins MT. 2003.** Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6833-6840
- Sung N, Takayama K, Collins MT. 2004.** Possible associatin of GroES and antigen 85 protein with heat resistance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1688-1697
- Tasara T, and Stephan R. 2005.** Development of an F 57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 10:5957-5968.
- Vansnick, E., P. De Rijk, F. Vercammen, D. Geysen, L. Rigouts And F. Portaels. 2004.** Newly developed primers for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 100:197-204
- Whittington RJ, Hope AF, Marshall DJ, Taragel CA, Marsh I. 2000.** Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and human in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 38:3240-3248