بررسی میزان شیوع بیماری یون در استان مرکزی و ارزیابی آزمون الیزای جذبی به عنوان یک روش تشخیصی

سیدشمس‌الدین قائم‌مقامی[۱]، محمد خسروی[۲]، مهدی احمدی[۳]، علی دنیکو[۴]، محمدمهدی حقدین[۴] و علیرضا کوچک‌زاده[۵]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۹

خلاصه

بیماری یون یا پارا توبرکولوزیس توسط باکتری *مایکوباکتریوم پاراتوبرکولوزیس* ایجاد می‌گردد و در گونه‌های متعدد نشخوار کنندگان گزارش شده است. در گاو بالاتر از ۱۹ ماه، اسهال مزمن، لاغری مفرط و هیپوپروتئینمی در حیوانات از علائم اختصاصی این بیماری است. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع بیماری یون در استان مرکزی و ارزیابی آزمون الیزا به عنوان یک روش تشخیصی جهت مشخص نمودن پادتن ضد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکولوزیس* بود.

این مطالعه در طی سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ بر روی ۱۷۲۴ راس گاو با سن بیش از ۲ سال متعلق به ۱۲ گله گاو شیری در حومه شهرستان اراک انجام شد. اندازه‌گیری میزان شیوع بیماری با روش الیزای جذبی و با استفاده از کیت تجاری برای جستجوی پادتن ضد *مایکوباکتریوم پاراتوبرکولوزیس* انجام شد. براساس نتایج حاصل از آزمایش الیزای جذبی تعداد ۲۷۴ راس دام (۱۵/۵٪) مثبت تشخیص داده شدند. حداقل و حداکثر آلودگی در گله‌ها به ترتیب ۴ و ۵۸/۶ درصد بود. نمونه بافتی و سرم خون از ۸۷ راس گاو مشکوک به بیماری یون در کشتارگاه جمع‌آوری گردید، حساسیت و ویژگی آزمون الیزای جذبی جهت تشخیص بیماری در مقایسه با آزمون هیستوپاتولوژی به ترتیب ۴۷/۳۶ و ۱۰۰ درصد بود. با توجه به یافته‌های این مطالعه آزمون الیزای جذبی به دلیل هزینه اندک و سهولت کاربرد در تشخیص بیماری یون به عنوان یک آزمون غربالگری مناسب مطرح می‌باشد.

کلمات کلیدی: پاراتوبرکلوزیس، گاو، شیوع، استان مرکزی، الیزا

مقدمه

بیماری یون توسط باکتری اسید فست *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*، عارض می‌گردد و موجب التهاب مزمن گرانولوماتوزی روده می‌شود (۴). بیماری درگاو با اسهال مزمن و متناوب و کاهش وزن مشخص می‌شود و در نشخوارکنندگان کوچک، کاهش وزن اولین نشانه درمانگاهی است. طیف وسیعی از گونه‌های وحشی و اهلی نشخوارکنندگان نسبت به بیماری حساس هستند. جداشدن عامل بیماری از برخی از بیماران انسانی مبتلا به Crohn's disease، بیماری را از دیدگاه بهداشت عمومی نیز در کانون توجه قرار داده است. در حال حاضر وجود بیماری در اکثر مناطق ایران اثبات شده است (۱).

انتقال این بیماری از راه دهانی- مدفوعی می‌باشد و بسیاری از حیوانات قبل از شش ماهگی به باکتری آلوده می‌گردند و بیشترین استعداد ابتلا در سنین زیر ۳۰ روزگی است (۱). بیماری می‌تواند به مدت ۶ ماه تا ۳ سال به

[۱] مربی پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی منطقه جنوب کشور- اهواز
[۲] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۳] کارشناس موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی منطقه مرکزی کشور- اراک
[۴] کارشناس علوم آزمایشگاهی، اراک
[۵] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

E-mail: Khosravi.m@ut.ac.ir (نویسنده مسئول)

حالت مخفی در آید. خسارات اقتصادی بیماری چشم‌گیر می‌باشد. با توجه به این که بعضی از دام‌ها حتی در آخرین مرحله عفونت هم از نظر وجود آنتی‌بادی در سرم منفی هستند، به منظور تأیید تشخیص توصیه می‌شود، از چند روش استفاده گردد (۲). آزمایش مستقیم میکروسکوپی به عنوان انتخاب بعد از کشت مورد توجه می‌باشد. در این روش از نمونه مدفوع یا مخاط ناحیه دریچه ایلئوسکال گسترش تهیه می‌شود و با روش زیل نلسون رنگ‌آمیزی انجام می‌گیرد، وجود باسیل‌های اسید فست که به تعداد زیاد و به صورت تجمع در سلول‌های اپی‌تلیوئید مشاهده می‌شوند، نشانه مثبت بودن گسترش خواهد بود. هدف از این مطالعه، بررسی سرمی میزان شیوع بیماری یون در استان مرکزی و همچنین ارزیابی حساسیت و ویژگی آزمون الیزای جذبی جهت کاربرد در تشخیص بیماری در مقایسه با آزمون هیستوپاتولوژی به عنوان آزمون استاندارد بود.

مواد و روش کار

در این مطالعه طی سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ به ۱۲ مزرعه پرورش گاو شیری در حومه اراک مراجعه و از ورید وداج ۱۷۲۴ راس گاو بالای ۲ سال، به صورت استریل نمونه خون اخذ گردید و فرم‌های مربوط به وضعیت سلامت دام و نوع سیستم پرورشی از نظر باز و بسته بودن تکمیل گردید. دام‌های مورد آزمایش به صورت تصادفی و با توجه به حجم گله انتخاب شدند. نمونه‌های اخذ شده به موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اراک منتقل شد و پس از سانتریفیوژ، سرم آنها جدا گردید و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از اتمام نمونه‌گیری از کیت ID.vet (فرانسه) جهت انجام آزمون الیزای جذبی برای بررسی میزان شیوع سرمی بیماری یون استفاده شد. همچنین با رجوع به کشتارگاه‌های صنعتی استان اراک از ۸۷ راس گاو بالغ مشکوک به بیماری یون که دچار لاغری مفرط بودند، نمونه سرم قبل از ذبح دام برای انجام آزمون الیزای جذبی اخذ شد، از دام‌های فوق پس از کشتار نمونه‌های هیستوپاتولوژی (از ناحیه ایلئوسکال و ناحیه انتهایی قولون و غدد لنفاوی مزانتر) نیز برداشت شد و به همراه نمونه سرم مربوط به هر دام جهت انجام آزمون الیزای جذبی و بررسی هیستوپاتولوژی به موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اراک منتقل شد.

الیزای جذبی

آزمون الیزا طبق دستورالعمل کیت ID.vet (محصول شرکت پاراس مونت پولیه فرانسه) پس از مرحله انکوبه شدن نمونه‌های سرم با آنتی‌ژن *مایکوباکتریوم فلئی* انجام شد. با استفاده از دستگاه قرائت کننده در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب نوری هر گوده قرائت شد و با یک میکروپلیت خالی، قرائت کننده الیزا تنظیم شد. جهت تفسیر برای هر نمونه درصد S/P، طبق فرمول زیر محاسبه و با توجه به دستورالعمل کیت موارد مثبت، مشکوک و منفی در آزمون به صورت ذیل تفکیک شدند.

OD کنترل منفی – OD کنترل مثبت / OD کنترل منفی - OD نمونه = S/P %

منفی	$S/P\ \% \leq 60\ \%$
مشکوک	$60 \leq S/P\ \% \leq 70\ \%$
مثبت	$S/P\ \% \geq 70\ \%$

هیستوپاتولوژی

نمونه‌های بافتی در فرمالین ۱۰ درصد به آزمایشگاه موسسه رازی شعبه اراک ارسال و رنگ‌آمیزی زیل نیلسون بر روی نمونه‌ها انجام شد. پس از تثبیت، مراحل معمول تهیه مقاطع بافتی توسط دستگاه اتوتکنیکون انجام و به وسیله پارافین قالب‌های بافتی تهیه گردید، سپس مقاطع بافتی با برش توسط دستگاه میکروتوم با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. نمونه‌ها به روش زیل نیلسون و هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شدند و وجود باکتری

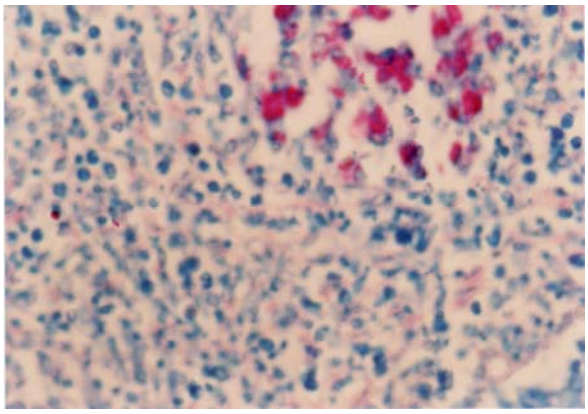
در سلول‌های فاگوسیتوز کننده بوسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده باکتری‌های قرمز رنگ در رنگ‌آمیزی اسید فست مؤید عفونت دام به باکتری مولد بیماری یون تلقی گردید.

نتایج

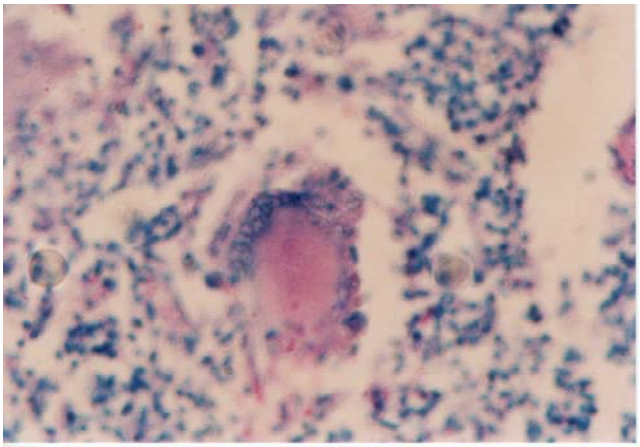
پس از انجام آزمون الیزای جذبی از تعداد ۱۷۲۴ راس گاو مورد آزمایش ۲۷۴ راس دارای عیار سرمی با درصد S/P بالای ۶۰ درصد بودند (میزان شیوع ۱۵/۵ درصد)، که ۲۳۸ راس مثبت (درصد S/P بالای ۷۰ درصد) و ۳۶ راس مشکوک (درصدS/P بین ۶۰ تا ۷۰ درصد) ارزیابی شدند، همچنین با توجه به نتایج و فرم‌های تهیه شده در زمان نمونه‌گیری حداقل آلودگی در گله‌ها ۴ و حداکثر آن ۵۸/۶ درصد بود. نتایج حاصل از بررسی فراوانی بیماری در سیستم‌های پرورشی باز و بسته در جدول ۱ ذکر شده است. نتایج حاصل از بررسی ۸۷ نمونه اخذ شده از گشتارگاه به این صورت بود که ۳۸ نمونه (۴۳/۶۷ درصد) پس از انجام آزمون هیستوپاتولوژی از نظر حضور اجرام اسید فست مثبت تشخیص داده شدند. در مقاطع بافت‌شناسی تغییرات بافتی مشاهده شده از قبیل نفوذ لنفوسیت و پلاسماسل، تعداد زیاد ائوزینوفیل و ماکروفاژ در پارین تا نفوذ گسترده ماکروفاژ به درون پارین و بروز ظاهر چماقی شکل پرزها متفاوت بود. ماکروفاژها همچنین به بافت زیر مخاطی نفوذ کرده بودند. ماکروفاژها و سلول‌های چند هسته‌ای اکثرا با باسیل‌های اسید فست انباشته شده بودند ولی در لایه‌های عضلانی مشاهده نشدند. در عقده‌های لنفاوی علائم التهاب مشاهده گردید. در نگاره ۱ و ۲ به ترتیب تصویر میکروسکوپی عقده لنفاوی و ناحیه روده بزرگ در دام مبتلا به پاراتوبرکلوزیس نشان داده شده است. در آزمون الیزای جذبی ۱۶ مورد مثبت و ۲ مورد مشکوک نشان داده شد. طبق نتایج، این نمونه‌های کشتارگاهی حساسیت آزمون الیزای جذبی ۴۷/۳۶ و ویژگی آن ۱۰۰ درصد برآورد گردید.

جدول ۱: مقایسه فراوانی بیماری یون در سیستم‌های پرورشی باز و بسته استان مرکزی با روش الیزا

سیستم جایگزینی در گله	فراوانی مطلق		فراوانی نسبی		جمع
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	
میزان شیوع بیماری در گله های با سیستم باز	۱۵۱	۴۵۲	۲۳	۶۷	۱۰۰
میزان شیوع بیماری در گله های با سیستم بسته	۱۲۳	۹۹۸	۱۱	۸۹	۱۰۰



تصویر ۱: پاراتوبرکلوزیس در عقده لنفاوی مزانتریک گاو، وجود ماکروفاژهای مملو از باکتری‌های اسید فست در ناحیه مرکزی عقده در فرم لپروماتوز بیماری (رنگ‌آمیزی زیل-نلسون، ۴۰×).



تصویر ۲: پاراتوبرکلوزیس در ناحیه روده بزرگ گاو، وجود باکتری اسید فست در فرم توبرکلوئید بیماری (رنگ‌آمیزی زیل نلسون، ۴۰×).

بحث

جستجوی آنتی‌بادی‌های سرمی با استفاده از الیزا بعد از حذف آنتی‌بادی‌های با واکنش متقاطع توسط عصاره *میکوباکتریوم فلئی* حساسترین و اختصاصی‌ترین آزمون سرولوژیک یون می‌باشد و بر روش‌های ایمونودیفیوژن و تثبیت عامل مکمل برتری دارد. آزمون الیزای جذبی با یک کیت تشخیصی تجارتی قابل دسترس است و با استفاده از آن استاندارد شدن کار در بین آزمایشگاه‌ها آسان‌تر انجام می‌گیرد. در یون همزمان با پیشرفت عفونت مقادیر آنتی‌بادی افزایش می‌یابد، به طوری که مقادیر بالای پادتن حاکی از آن است که در آینده نزدیک علائم بالینی بیماری بروز خواهد کرد. بنابراین می‌توان از نتایج کمی الیزا در جهت اولویت‌بندی گاوها برای حذف استفاده کرد (۴).

گزارش چندانی در ارتباط با وضعیت بیماری یون در نقاط مختلف کشور موجود نمی‌باشد. در مطالعه شاهمرادی و همکاران در سال ۱۳۸۸ از ۲۲۷ راس گاو مشکوک به بیماری یون نمونه مدفوع اخذ و پس از تهیه گسترش و کشت نمونه‌ها در کل ۲۷/۳۱٪ از دام‌ها مثبت ارزیابی شده‌اند (۳). Fathi و همکاران در سال ۲۰۱۱ طی یک بررسی در آذربایجان غربی بر روی صد نمونه شیر مربوط به گاوهای سالم حضور ملکولی عامل بیماری یون را ۱۲ درصد اعلام نمودند و همچنین میزان حضور ملکولی عامل یون در گاوهای آلوده را (با روش PCR روی نمونه‌های شیر) ۴۴ درصد بیان داشتند (۸).

تحقیقات انجام شده در سایر نقاط دنیا آمار و ارقام متفاوتی از میزان آلودگی سرمی دام‌ها به یون را نشان می‌دهد. مطالعات اپیدمیولوژیک در انگلستان نشان داده است که حداقل ۱۷/۴ درصد از گاوها بعضی از علائم بیماری یون را نشان می‌دهند، در بلژیک شیوع سرمی بیماری یون ۶/۶ درصد (۶) و در هلند این میزان بین ۲/۷ تا ۶/۹ درصد گزارش شده است. در اسلونی در یک مطالعه ۲ ساله شیوعی به میزان ۱۱/۵۹ درصد برای بیماری گزارش شده است. در آمریکا ۲/۹ درصد از گله‌های شیری و ۸ درصد از گله‌های گوشتی آلوده به یون تشخیص داده شده‌اند. در کل شیوع بیماری در آمریکا بین ۱/۸ تا ۱۸ درصد تخمین زده می‌شود (۱۱). در انتاریو ۲/۶ درصد (۱۰)، در کالیفرنیا ۴/۶ درصد (۵)، در گالیسیای اسپانیا ۳/۰۲ درصد (۷)، در مکلنبورگ آلمان ۱۲/۲ درصد (۹) از دام‌ها از نظر سرمی آلوده به بیماری تشخیص داده شده‌اند. گزارشات فوق و نتایج به دست آمده از این مطالعه حاکی از گسترش آلودگی در نقاط مختلف دنیا و ایران می‌باشد.

تغییرات مشاهده شده در مقاطع بافت‌شناسی سبب از دست رفتن کارایی پرزهای ایلئوم و جذب نامناسب و نفوذ پروتئین به درون روده که حاصل از این تغییرات می‌باشد سبب بروز اسهال می‌گردد (۱). مطالعات بافت‌شناسی نشان داده است که در مراحل اولیه بیماری نفوذ تعداد کمی باکتری و سلول‌های لنفوئیدی در ضایعات وجود دارد در حالی که در مراحل پیشرفته بیماری، ماکروفاژها حاوی تعداد زیادی باکتری هستند. در تمام دام‌ها با پیشرفت بیماری علائم بالینی بروز می‌یابد، اما چگونگی روند بروز از دامی به دام دیگر متفاوت است.

Sockett وهمکاران تست‌های سرولوژیک را برای تشخیص بیماری در ۱۷۷ گاو با بیماری تحت کلینیکی و ۱۹۶ گاو غیر عفونی بررسی کردند، حساسیت الیزای جذبی در ۱۷۷ مورد گاو ۴۳/۴ و حساسیت AGID، ۲۶ درصد بود (۱۳). که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت می‌کند. مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۶ توسط Speer و همکاران صورت گرفت که روش‌های جدیدی از آزمون الیزا به نام‌های WEliSA و SEliSA ابداع شده است که حساسیت مشابه داشته‌اند. ایشان نمونه‌ها را قبل از استخراج آنتی‌ژن تحت تأثیر فرمالدئید با غلظت‌های متفاوت (از ۳/۷ تا ۳۷ درصد) قرار داده‌اند و حساسیت و ویژگی آزمون را بیش از ۹۵ درصد گزارش کرده‌اند که بسیار بهتر از روش‌های معمول آزمون الیزا می‌باشد (۱۵). در حال حاضر آزمون الیزای جذبی جهت تشخیص بیماری یون در گاو به عنوان آزمونی استاندارد، مورد پذیرش می‌باشد. حساسیت این آزمون در بررسی‌های مختلف، متفاوت می‌باشد، ولی ثابت شده است که حساسیت این آزمون از مراحل اولیه عفونت تا بروز حداکثر علائم بالینی افزایش می‌یابد و حساسیت تشخیص از ۱۵ درصد تا ۸۷ درصد برای این آزمون گزارش شده است (۱۶). حساسیت الیزا وابسته به مرحله بیماری می‌باشد و حساسیت آزمون در دام‌های با علائم بالینی و مراحل انتهایی بیماری بالاتر می‌باشد (۱۴). پاسخ ایمنی حیوانات متعاقب عفونت متغیر بوده و بستگی به مرحله عفونت و وجود یا عدم وجود بیماری بالینی دارد (۱۲). حساسیت الیزای جذبی در این بررسی ۴۷/۳۶ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد بود که با مطالعات صورت گرفته در دیگر کشورها مطابقت و همخوانی دارد. در کل می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که انجام آزمون الیزا در جهت شناسایی دام‌های با عفونت پاراتوبرکلوزیس و کنترل بیماری مفید است و دام‌های با آزمون الیزای مثبت قطعاً آلوده می‌باشند و این تست می‌تواند به همراه علائم بالینی بیماری و یا سایر آزمون‌ها به عنوان تائید تشخیص نهایی مورد استفاده قرار گیرد. در دام‌های الیزا منفی انجام سایر آزمون‌ها جهت اعلام نمودن عاری بودن دام از عفونت ضروری می‌باشد. با توجه به ماهیت پیچیده بیماری آزمون الیزا می‌تواند دیدی در رابطه با وضعیت گله و یا در موارد تکی در رابطه با مرحله بیماری نشان دهد.

همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود میزان آلودگی سرمی در گله‌های با سیستم جایگزینی باز ۲ برابر آلودگی در گله‌های با سیستم بسته می‌باشد، این مسئله نقش مهم دام‌های وارداتی در انتشار آلودگی را نشان می‌دهد. همچنین در این مطالعه مشخص گردید که در ۶۰ درصد از گله‌های مورد بررسی در طی چند سال گذشته وجود بیماری یون به تایید آزمایشگاهی رسیده است، ولی اقدامات کافی در جهت پیشگیری از بروز موارد جدید و یا کاهش میزان آلودگی صورت نگرفته است. با توجه به این حقیقت که آزمون‌های سرمی کلیه حیوانات آلوده را در بر نمی‌گیرد، میزان واقعی بیماری بیش از میزان به دست آمده تخمین زده می‌شود که نیازمند اقدامات جدی در این زمینه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از کارکنان موسسه رازی شعبه اراک و مسئولین گاوداری‌های استان مرکزی کمال تشکر را بنمایند.

منابع

۱- حسنی‌طباطبایی عبدالمحمد و فیروزی رویا (۱۳۸۴). بیماری‌های باکتریایی دام، انتشارات دانشگاه تهران، جلد اول، چاپ دوم، شماره ۲۴۹۲، صفحات ۴۲۲-۴۱۲.

۲- سیفی حسام‌الدین، رئوفی افشین، گرجی‌دوز مرتضی و مخبردزفولی محمدرضا (۱۳۸۷). ترجمه طب داخلی دام‌های بزرگ، اسمیت ب، پ. انتشارات نوربخش، جلد دوم، چاپ دوم، صفحات، ۴۲۵-۴۲۰.

۳- شاهمرادی امیرحسین، مصوری نادر، عارف‌پژوهی رضا، حیدری محمدرضا، نعمان وحید، نبی‌نژاد عبدالرضا و همکاران (۱۳۸۸). بررسی بیماری یون در دامداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی اصفهان. مجله پژوهش‌های دامپزشکی در پژوهش و سازندگی، شماره ۸۲، صفحات ۱۷-۱۳.

۴- یگانی مجتبی (۱۳۷۷). بیماری یون، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور، جلد اول، چاپ اول. صفحات ۷۶-۶۸، ۸۰-۷۸.

5- Adaska J.M. and Anderson R.J. (2003). Seroprevalence of Jonhnes disease infection in dairy cattle in California. Veterinary medicine Preview, 60(3):255-261.

6- Boelaert F., Walravens K., Biront P., vermeersch P., Berkavens D. and Froid G. (2000). Prevalence of Paratuberculosis in the Beljian cattle population. Veterinary Microbiology Journal, 77: 269-281.

7- Dieguez F.J., Sanjuan M.L., Vilar M.J., Lopez M. and Yus E. (2007). Prevalence of serum antibodies to Mycobacterium avium sub.sp. Paratuberculosis in cattle in Galicia (North West Spain). Veterinary Medicine Preview, 82(4):321-326.

8- 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.

9- Hacker U., Huttner K. and Konow M. (2005). Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the state of Mecklenburg-Westpommerania, Germany. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 117(3-4):140-144.

10- Hendrick S., Duffield T., Leslie K., Archambault M. and Kelton D. (2005). The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* sub.sp. *Paratuberculosis* in dairy herds in Ontario. Canadian Veterinary Journal, 46(12):1126-29.

11- Lilenbaum W., Mavassi C.D. and Oelemann W.M.R. (2007). Paratuberculosis, an update. Brazilian Journal of Microbiology, 38:580-590 .

12- Pinedo J.P., Williams J.E., Monif G.R.G., Owen Rae D. and Buergelt C.D. (2008). Mycobacterium paratuberculosis Shedding In to Milk: Association of ELISA Seroreactivity With DNA Detection inmilk. Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, 6(2):137-144.

13- Sockett D.C., Carr D.J., Richards W.D. and Collins M.T. (1992). A repository of specimens for comparison of diagnostic procedures for bovine paratuberculosis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 4: 188-191.

14- Speer C.A., Scott M.C., John P.B., Waters W.R., Yasuyaki M., Lock R.H. and et al. (2006). A novel ELISA for Diagnosis of *Mycobacterium Paratuberculosis* infections (John's disease) in cattle. Journal of Clinical and Vaccine Immunology, 13 (5): 535-540.

15- Sockett D.C., Conarad T.A., Thomas C.B. and Collins M.T. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine Para tuberculosis. Clinical Microbiology Journal, 30: 1134-39.

16- Swceney R.W., Whitlock R.H., Buckley C.L., Spencer P.A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immune sorbent assay for the diagnosis of Paratuberculosis in dairy cattle. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 7: 488-49.