

## Ege Bölgesi'ndeki sığırlarda paratüberküloz seroprevalansının belirlenmesi

Hatice Zeynep Kaymaz Kanat<sup>1\*</sup>, Çağatay Nuhay<sup>2</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 18.04.2024, Kabul Tarihi / Accepted: 14.06.2024

**Özet:** Sığır paratüberkülozu (PTB) sığırların granulomatoz gastroenteritle karakterize kronik seyirli, bulaşıcı, zoonoz bir hastalıdır. Süt sığırcılığı sektöründe önemli ekonomik kayıplara sebep olmakla birlikte zoonotik karakterli olması insanlarda görülen Chron's hastalığının temelini oluşturabilme olasılığını düşündürmektedir. Bu çalışmada paratüberküloz hastalığının Ege Bölgesi'nde yetiştirilen süt sığırlarındaki seroprevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır. 2022 yılı içerisinde İzmir, Muğla, Denizli, Aydın, Kütahya ve Uşak illerinden tesadüfi örnekleme ile seçilip Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen 2 yaşından büyük aşılanmamış süt sığırlarına ait 1000 adet kan serumu üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla diğer tanı yöntemlerinden avantajlı olduğu belirlenen ELISA yöntemi kullanılmıştır. Çalışma materyalinin ELISA ile incelenmesi sonucunda toplamda 84 (%8,4) örnek pozitif; 28 (%2,8) örnek şüpheli bulundu. 888 (%88,8) serum örneği ise negatif olarak tespit edildi. Elde edilen veriler ışığında serumlarda seropozitifliğin görülmesi hastalığın bölgede halen varlığını koruduğunu, koruma, kontrol ve eradikasyon yöntemlerinin belirlenerek uygulanmasının gerekli olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Ege Bölgesi, ELISA, paratuberculosis, paratüberküloz, sığır

### Determination of paratuberculosis seroprevalence in cattle in the Aegean Region

**Abstract:** Bovine paratuberculosis (PTB) is a chronic, infectious, zoonotic disease of cattle characterized by granulomatous gastroenteritis. Although it causes significant economic losses in the dairy cattle industry, its zoonotic character suggests the possibility that it may form the basis of Chron's disease seen in humans. This study aimed to determine the seroprevalence of paratuberculosis disease in dairy cattle raised in the Aegean Region. In 2022, 1000 blood serum samples of unvaccinated dairy cattle over 2 years old, selected by random sampling from the provinces of İzmir, Muğla, Denizli, Aydın, Kütahya and Uşak and sent to Bornova Veterinary Control Institute, were studied. For this purpose, the ELISA method, which was determined to be advantageous over other diagnostic methods, was used. As a result of examining the study material with ELISA, a total of 84 (8.4%) samples were positive; 28 (2.8%) samples were found suspicious. 888 (88.8%) serum samples were detected as negative. In the light of the data obtained, the presence of seropositivity in serum suggests that the disease still exists in the region and that prevention, control and eradication methods should be determined and implemented. Key Words: Aegean Region, cattle, ELISA, paratuberculosis

**Keywords:** Yok

### Giriş

Paratüberküloz (PTB), *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*'in geviş getiren hayvan türlerinde ilerleyici granülatöz enterit sonucu oluşan kronik enfeksiyöz bir sürü hastalıdır (Beard ve ark. 2001; Manning ve ark. 2001; Gilardoni ve ark. 2012). Hastalık, kronik gastroenteritis, ishal ve canlı ağırlık kaybı ile karakterize olup hastalığa genç sığırlar daha duyarlıdır (Liu ve ark. 2017; Fawzy ve ark. 2018). Hastalık verim düşüklüğü, ciddi ölçüde kilo kaybı, tedavi masrafları gibi giderler yönünden dünya çapında önemli ekonomik sorunlara neden olabilmektedir (Selim ve ark. 2013). Etkenin insanlarda görü-

len Crohn's hastalığının etiolojisinde rol oynaması gerekçesiyle paratüberküloz, halk sağlığı yönünden dikkate alınması gereken önemli hastalıklardandır.

Paratüberkülozun teşhisinde, mikroorganizma kültürü başta olmak üzere, kültür dışında bakteriyolojik inceleme, serolojik testler, immünolojik test yöntemleri kullanılmaktadır. Kültür yönteminin spesifitesinin yüksek, sensitivitesinin düşük olması ve aynı zamanda laboratuvar sonuçların üç aya kadar uzaması önemli dezavantajlardır (Ayele ve ark. 2005; Öztürk Kalın ve ark. 2019; Whitlock ve ark. 2000). Bu sebeple paratüberküloz hastalığının teşhisinde serolojik yöntemler (Komplament Fikzasyon Testi (CFT),

Agar Gel Immunodiffusion (AGID), Enzyme-linked Immunosorbent assays (ELISA), moleküler metodlar (PCR, Real Time-PCR vb.) ve hücrel immun yanıt testlerinden (gama interferon, alerjik deri testi vb.) faydalanılmaktadır (Ayele ve ark. 2001; Harris ve Barletta 2001; Singh ve ark. 2007). Strick Enzim Bağlantılı İmmüno-Sorbent Testi (ELISA), MAP(*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*) enfeksiyonunun subklinik aşamasında ve sonrasında serum ve sütteki MAP antikorlarını tespit etmek için tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan bir serolojik testtir. Kan serumunda MAP'a karşı oluşan antikorların tespitinde ELISA'ya sıkça başvurulmaktadır. Bunun nedeni olarak ELISA yönteminin diğer serolojik yöntemlerden daha kolay uygulanabilir ve tekrarlanabilir olması, maliyet olarak daha ucuz olması, çok sayıda örneğin bir arada çalışılabilmesi ve elde edilen verilerin tarafsız bir şekilde yorumlanabilmesi gibi avantajları gösterilebilir. Özellikle subklinik enfekte hayvanların belirlenmesinde diğer testlere göre daha güvenilir bir metot olduğu bildirilmiştir (Strickland ve ark. 2005; Mecitoğlu ve ark. 2012).

Bu testlerden başka immunité testleri de tanı yöntemleri arasında bulunmaktadır. Enfekte hayvanlarda gelişen humoral ve hücrel yanıtlar esas alınarak *M. paratuberculosis* ekstraktlarının enjekte edildiği hayvanlarda gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarının değerlendirildiği intradermal testlerdir ancak son yıllarda düşük spesifite ve sensitivite gibi dezavantajları nedeniyle önerilmemektedir (Mecitoğlu ve ark. 2012).

Bu çalışmada ciddi ekonomik kayıplara neden olan paratüberküloz hastalığının Ege Bölgesi'nde yetiştirilen sığırlardaki seroprevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmada 2022 yılı içerisinde Ege Bölgesi'nde bulunan İzmir, Muğla, Denizli, Aydın, Kütahya ve Uşak illerinden tesadüfi örnekleme ile seçilen 2 yaşından

büyük süt sığırlarına ait kan serumlarından 1000 adet çalışıldı. Çalışılan kan serumları paratüberküloz yönünden aşılammış hayvanlardan seçildi. Anti-koagülansız jelli tüplerde gelen kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek serumları ayırdı ve serumlar çalışma için -20 °C'de saklandı. Anti-MAP antikorların belirlenmesi amacıyla kan serumu örneklerinden ticari ELISA kiti (IDEXX Paratuberculosis Screening Ab Test, Netherlands) kullanıldı. Test üretici firmanın gösterdiği biçimde uygulandı. Pozitif ve negatif kontroller ile serum örnekleri mikropleyt kuyucuklarına 1/19 oranında dilüsyon buffer ile sulandırılarak 10'ar µl olacak şekilde konuldu. Mikropleytlar oda ısısında (18-26 °C) 15 dakika tutulduktan sonra kuyucuklarda bulunan solüsyonlar antijen kaplı pleytlere aktarıldı. Oda ısısında 45 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklar 3 kez 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı ve her birine 100 µl konjugat ilave edildi. Mikropleytlar oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 300 µl yıkama sıvısı ile 3 kez yıkama işlemi uygulandıktan sonra, tüm kuyucuklara 100 µl TMB substrat ilave edildi. Daha sonra mikropleytlar oda ısısında karanlık ortamda 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu konularak 450 nm'de kuyucuklardaki solüsyonların absorbans değerleri ELISA Reader (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC, Germany) ile ölçüldü. Çıkan sonuçlar ELISA kitine uygun olacak şekilde değerlendirildi.

## Bulgular

Çalışma materyalinin ELISA yöntemi ile incelenmesi sonucunda toplamda 84 (%8,4) örnek pozitif; 28 (%2,8) örnek şüpheli bulunmuştur. 888 (%88,8) serum örneği ise negatif olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kan örneklerinin gönderildiği illere göre seropozitiflik oranları İzmir ilinde %16, Muğla ilinde %16, Aydın ilinde %16 ve Manisa ilinde %16 iken; Denizli, Kütahya ve Uşak illerinde bu oranlar %12 olarak saptanmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Paratüberküloz hastalığının Ege Bölgesi illerine göre seroprevalansı

Yerleşim yeri	İncelenen serum sayısı n (%)	Pozitif serum sayısı n (%)	Şüpheli serum sayısı n (%)	Negatif serum sayısı n (%)
İzmir	160 (16)	16 (10)	4 (2,5)	140 (87,5)
Muğla	160 (16)	16 (10)	-	144 (90)
Denizli	120 (12)	8 (6,6)	8 (6,6)	104 (86,6)
Aydın	160 (16)	4 (2,5)	4 (2,5)	152 (95)
Kütahya	120 (12)	20 (16,6)	12 (10)	88 (73,3)
Uşak	120 (12)	16 (13,3)	-	104 (86,6)
Manisa	160 (16)	4 (2,5)	-	156 (97,5)
<b>Toplam</b>	<b>1000</b>	<b>84</b>	<b>28</b>	<b>888</b>

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada Ege Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan sığırlarda paratüberküloz hastalığı seroprevalansı ELISA yöntemi ile araştırıldı. Paratüberküloz hastalığı kronik zayıflıkla karakterize gastroenterik bir hastalık olup ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Abdellrazeq ve ark. 2014; Selim ve ark. 2021a). Paratüberküloz kronik seyirli bir enfeksiyon olduğundan diğer seroprevalans çalışmalarında olduğu gibi bu çalışmada da 2 yaş üstü hayvanlar tercih edildi. 2 yaşından küçük sığırlarda ELISA'nın sensitivitesi ve spesifitesinin düşük olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Çetinkaya ve ark. 2000; Diequez ve ark. 2009; Nielsen ve Toft 2009; Öztürk ve ark. 2010). Enzimin antikora bağlanma özelliğinden yararlanılarak hastalığın teşhisinde kullanılan ve serolojik bir ölçüm yöntemi olan ELISA tekniği kullanıldı. Bu teknik ile hayvanların serumunda MAP'a karşı oluşan antikorlar araştırıldı.

Dünya genelinde paratüberkülozun seroprevalansı ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olması hastalığın güncelliğini koruduğunun ve problem olarak görüldüğünün göstergesidir. Makav ve ark. (2013), Kars yöresinde sığırlarda subklinik paratüberkülozun prevalansını belirlemek amacıyla rastgele 13 odak seçmiş ve bu odaklardaki 24 işletmeden 2 yaş ve üzeri toplam 400 sığır üzerinde çalışmışlardır. Çalışmalarının sonunda subklinik paratüberkülozun seroprevalansını %3.5 (14/400), çiftlik prevalansını ise %46.1 (10/24) olarak bulmuşlardır. Elde edilen bu farkın Kars bölgesinin içinde ve bölgeden başka yerlere hayvan transferinin sık olması nedeniyle olabileceği, yüksek çiftlik prevalansının (%46.1) hastalığın yayılmasında ciddi bir risk faktörü olması açısından önemli olduğu sonucuna varmışlardır. Başka bir çalışmada Karatay ve ark. (2020), Ardahan çevresinde yetiştirilen süt sığırlarında paratüberkülozun prevalansının belirlenmesi amacıyla 400 adet sığır kan serumunu araştırmışlardır. Çalışmada, ELISA yöntemini kullanmışlar ve uyguladıkları test sonucunda 400 hayvandan 17'sinde MAP yönünden pozitiflik tespit etmişlerdir. Karakaş ve ark. (2018), Kırklareli ve yöresinde yaptıkları bir çalışmada yaşları 3-4 arasında değişen 400 adet süt sığına ait kan serumunda, seroprevalans oranlarını sırasıyla %1.5 pozitif, %1.5 şüpheli ve %97 negatif olarak tespit etmişlerdir. Bir diğer araştırmada Çelik ve ark. (2022) Şanlıurfa ve yöresinde tesadüfi örnekleme yöntemi ile Şanlıurfa'nın merkez ilçelerinden, 465 sığırdan alınan kan serumlarını ELISA yöntemini kullanarak incelemişlerdir. Serumdaki anti-MAP antikorlarını tespit etmek amacıyla çalıştıkları 465 serumun 21'ini (%4,51) pozitif, 16'sını (%3,4) şüpheli ve 428'ini (%92) ne-

gatif bulmuşlardır. Manisa ilinde Berberoğlu ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada 442 adet Holstein süt sığına ait kan serumlarını ELISA yöntemi ile paratüberküloz hastalığı yönünden taramış, çalışmalarının sonucunda hastalığın seroprevalansını %21.72 olarak belirlemişlerdir.

Dünyada yapılan çalışmalara bakıldığında Good ve ark. (2009), İrlanda'da paratüberkülozun ELISA seroprevalansını belirlemek için 639 sürüden rastgele seçtikleri 12 aylıktan büyük 20.322 süt sığına tammından serum örnekleri toplamışlardır. Tüm numuneleri ELISA ile test etmişler, en az bir ELISA pozitif hayvanın varlığına dayalı olarak enfekte sürülerin genel prevalansını %21,4 bulmuşlardır. Belçika'da yapılan Aralık 1997'den Mart 1998'e kadar yürütülen bir serolojik araştırmada Boelaert ve ark. (2000) rastgele yaptıkları bir örneklemede 24 aylık veya daha büyük sığırların serumlarını antikorların varlığı açısından ELISA kiti kullanılarak test etmişlerdir. PTB sürü içi seroprevalansını (seropozitif sürüler içindeki tespit edilen hayvanların oranı) ve PTB bireysel hayvan seroprevalansını (tespit edilen hayvanların oranı) sırasıyla %2,9 ve %0,87 olarak bulmuşlardır. Park ve ark. (2006), Kore'deki çalışmalarında tüm illerde yetiştirilen 1261 adet süt sığına kan serumlarını toplamışlar, 2.161 serumun 71'i pozitif çıkmıştır. Ulusal PTB prevalansının %7,1 olduğu tahmin edilmiştir.

Çalışmamızda Ege Bölgesi'nin birbirinden farklı 7 ilinde yetiştirilen sığırların paratüberküloz hastalığı yönünden seroprevalanslarının belirlenmesi amaçlanmıştır. İzmir ilinde 16 (%10), Manisa ilinde 16 (%10), Denizli'de 8 (%6,6), Aydın 4 (%2,5), Kütahya 20 (%16.6), Uşak 16 (13,3), Manisa 4 (%2,5) bireysel seroprevalans saptanmıştır. Kars, Ardahan, Kırıkkale ve Şanlıurfa'da yapılan çalışmalarda bu çalışmadan daha düşük seroprevalans saptansa da Manisa ilinden yapılan çalışmada daha yüksek oranda bir seroprevalans tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılan bu çalışmalardaki seropozitiflik oranları arasındaki farklılıkların hayvan nakilleri, besleme ve bakım koşulları farklılıkları, çalışma materyali alınırken mevsim dönemi ve iklim gibi farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu araştırmada Ege Bölgesi illerinde yetiştirilen sığırlarda paratüberküloz seroprevalansı üzerinde çalışılmıştır. Sonuç olarak yapılan çalışma sonucunda Ege bölgesi yöresinde paratüberküloz enfeksiyonunun seroprevalansı %8,4 belirlenmiştir. Çalışmanın kapsamı genişletilerek bölge ve ülke çapında yapılacak araştırmalarla hastalık ile mücadele açısından enfeksiyonun gerçek boyutlarının düzenli aralıklarla belirlenmesi ve hastalığın koruma, kontrol ve eradi-

kasyon yöntemlerinin belirlenerek uygulanmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

**Etik kurul onayı:** Çalışmamızın etik kurul izni gerektirmediğine dair beyan formu ek dosyalar kısmında imzalanıp yüklenmiştir.

## Kaynaklar

- Abdellrazeq GS, El-Naggar MM, Khaliel SA and Gamal-Eldin AE. (2014) Detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from cattle and buffaloes in Egypt using traditional culture, serological and molecular based methods. *Veterinary World*, 7(8).
- Ayele WY, Macháčková M and Pavlik I. (2001) The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinari Medicina*. 46(7-8), 205-224.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M and Pavlik I. (2005) *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied and environmental microbiology*. 71(3), 1210-1214.
- Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Stevenson K, Sharp JM. (2001) Paratuberculosis Infection of Nonruminant Wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol*. 39.
- Berberoğlu M. (2016) Manisa yöresi süt sığırlarında subklinik paratüberküloz seroprevalansı. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Boelaert F. et al. (2000) Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Veterinary Microbiology*. 77.3-4 (2000): 269-281.
- Cetinkaya B, Karahan M, Atıl E, Kalın R, De Baere T and Vaneechoutte, M. (2002) Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary microbiology*. 88(1), 75-83.
- Chapter, W. O. A. H. (2022) Paratuberculosis (Johne's Disease)(version adopted in May 2021). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.
- Çelik A ve Tel Y. (2022) Şanlıurfa Bölgesinde Sığırlarda Paratüberküloz Seroprevalansının Belirlenmesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 11.1,100-105.
- Diéguez FJ, González AM, Menéndez S, Vilar MJ, Sanjuán ML, Yus E and Arnaiz I. (2009) Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 180(2), 231-235.
- Fawzy, A et al. (2018) Genotyping methods and molecular epidemiology of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). *International journal of veterinary science and medicine*. 6.2, 258-264.
- Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL. (2012) Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Rev Argent Microbiol*. 44.3, 201-215.
- Good M et al. (2009) Prevalence and distribution of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle herds in Ireland. *Irish Veterinary Journal*. 62,1-10.
- Harris NB and Barletta RG. (2001) *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clinical microbiology reviews*. 14(3), 489-512.
- Karakaş, B ve Civelek T. (2018) Kırklareli yöresi süt sığırlarında subklinik paratüberküloz seroprevalansı. *Kocatepe Veterinary Journal*. 11.2, 160-164.
- Kalın MÖ, Gümüşsoy KS ve Hızlısoy H. (2019) Kayseri İlinde Satışa Sunulan Sokak Sütlerinde *Mycobacterium paratuberculosis* Varlığının Konvansiyonel ve Serolojik Yöntemlerle Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 16(3), 190-197.
- Karatay, M, Akyüz E, Gökçe G. (2020) Ardahan Yöresindeki Sığırlarda Paratüberküloz'un Seroprevalansı. *Kocatepe Veterinary Journal*. 13.4, 327-331.
- Liu X et al. The seroprevalence of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in dairy cattle in Xinjiang, Northwest China. *Irish Veterinary Journal*. 70, 1-5.
- Makav, M ve Gokce E. (2013) Kars yöresi sığırlarında subklinik paratüberküloz seroprevalansı. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 19.5.
- Manning, EJB. (2001) *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* a review of current knowledge. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 32.3,293-304.
- Mecitoglu Z, Cihan H, Demir G, Temizel EM ve Senturk S. (2012) Evaluation of Faecal Shedding of Acid-fast *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (map) in both Intradermal Johnin Test-and Serologically (Elisa) Map-positive Cattle. *Journal of Biological and Environmental Sciences*. 6(18).
- Nielsen SS and Toft N. (2009) A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive veterinary medicine*. 88(1), 1-14.
- Ozturk D, Pehlivanoglu F, Tok AA, Gunlu S, Guldali Y and Turutoglu H. (2010) Seroprevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Israel J Vet Med*. 65(2), 53-7.
- Park, KT et al. (2006) Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field sample testing in Korea. *Journal of Veterinary Science*. 7.4,349.
- Selim A, El-Haig M ve Galila ES. (2013) Direct detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in bovine milk by multiplex Real-time PCR. *Biotechnology in animal husbandry*. 29(3), 513-525.
- Selim A, Halim R, Galila E and Hamouda F. (2021) Seroprevalence and associated risk factors for bovine paratuberculosis in dairy cattle. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 72(1), 2647-2652.
- Singh UP, Singh S, Singh R, Karls RK, Quinn FD, Potter ME and Lillard Jr JW. (2007) Influence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* on colitis development and specific immune responses during disease. *Infection and immunity*. 75(8), 3722-3728.
- Strickland SJ. (2005) Effects of seasonal heat stress on the diagnosis of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in Texas dairy cattle. Doctoral dissertation, Texas A&M University, Texas.
- Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW and Van Tiem J. (2000) ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary microbiology*. 77(3-4), 387-398.