

## Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* de fecas en rebaños lecheros infectados mediante el Método de Cornell modificado

Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from bovine feces of infected dairy herds by the Cornell's Method modified

J. P. SOTO, M.V.; J. KRUIZE, M.V., Ph.D.; S. LEIVA, B.M. M.Sc.

Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Casilla 167, Valdivia, Chile.  
(jkruze@uach.cl)

### SUMMARY

In order to improve the isolation rate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) from bovine feces a new bacteriological procedure for decontamination and cultivation of fecal samples was evaluated in 250 samples collected from asymptomatic animals in 14 infected dairy herds in southern Chile. Before culture all samples were treated with a decontaminant solution containing 0.9% hexadecylpyridinium chloride and an antibiotic solution containing amphotericin B, vancomycin and nalidixic acid. Herrold Egg Yolk Medium (HEYM) and mycobactin J supplemented with the same antibiotics mentioned above was used for the isolation of the agent. *Map* was isolated from 40 (16%) fecal samples and fungi contamination was observed only in 7.6% of cultures after the eighth week of incubation. The identification of the isolated strains was confirmed in all cases by PCR technology using specific primers for this pathogen (P90 and P91). The high rate of isolation and low rate of contamination as well as the specificity of the culture medium makes this procedure a good diagnostic tool of bovine Paratuberculosis.

*Palabras claves:* Paratuberculosis, diagnóstico, cultivo fecal.

*Key words:* Paratuberculosis, diagnosis, fecal culture.

### INTRODUCCION

La Paratuberculosis (Enfermedad de Johne) es una enfermedad crónica y debilitante que afecta los intestinos de todos los rumiantes, causada por la infección con *Map* (Gilmour, 1985; Stabel, 1998; Gasteiner y col., 2000; Whitlock y col., 2000). Esta enfermedad está virtualmente presente en todos los países del mundo, especialmente en los rebaños lecheros (Gilmour, 1985; Blood y col., 1992), siendo descrita por primera vez en Chile en 1958 (Grinbergs y Caorsi).

Desde que se descubrió el agente etiológico, hace ya más de un siglo (Johne y Frothingham, 1895), el cultivo y aislamiento de *Map* ha sido un problema, por ser una bacteria nutricionalmente exigente, micobactina dependiente y de crecimiento lento, requiriendo generalmente más de 12 semanas para obtener colonias visibles (Gilmour, 1985; Whipple y col., 1991; Stabel, 1997).

Dos son los principales problemas que dificultan el aislamiento del agente a partir de muestras de fecas: la contaminación de los medios de cultivo por el largo período de incubación, especialmente con hongos, y la baja concentración del agente en las fecas. Es por esto que la descontaminación de las muestras de

fecas, previo a la inoculación de los medios de cultivo, es esencial para facilitar el aislamiento de *Map* (Whipple y col., 1991; Collins, 1996; Stabel, 1997). Diversos han sido los productos químicos utilizados como agentes descontaminantes, entre los que se encuentran la formalina, ácido oxálico, hidróxido de sodio, cloruro de alquilbenzilmetil amonio o Zefirán y, más recientemente, el cloruro de hexadecilpiridinio (HPC), producto que ha mostrado la mejor capacidad descontaminante y un mínimo daño a la bacteria (Faune, 1970; Gilmour, 1985; Whipple y col., 1991; Collins, 1996).

La detección de *Map* por medio del cultivo de fecas (o tejidos) ha sido el método tradicional de diagnóstico por casi 100 años y sigue siendo el método más ampliamente utilizado para diagnosticar la infección. El aislamiento de esta bacteria se debe realizar en un medio apropiado, siendo el más ampliamente difundido el Medio de Herrold con yema de huevo y micobactina J (HEYM), en tubos de agar inclinado. El cultivo fecal con este medio posee una especificidad superior al 99% si se realiza correctamente, eliminándose el riesgo de resultados falsos positivos. Sin embargo, la sensibilidad es baja, alcanzando aproximadamente a un 50%, lo cual depende fundamentalmente de las técnicas empleadas, tanto para descontaminar la muestra fecal (eliminación de la microflora contaminante) como del método empleado para concentrar selectivamente el agente en la muestra (Gilmour, 1985; Collins, 1996, Stabel, 1997; Stabel, 1998).

A pesar de que el cultivo fecal es una técnica ampliamente utilizada en todos los países, no existe un protocolo de cultivo internacionalmente estandarizado, existiendo muchas diferencias entre laboratorios respecto a la eficiencia para aislar *Map* (Whipple y col., 1991; Collins, 1996; Whitlock y Buergelt, 1996). El objetivo del presente trabajo fue evaluar un nuevo procedimiento para el aislamiento de *Map* a partir de muestras de fecas de animales provenientes de rebaños infectados, tomando como base el método de Cornell (Shin y col., 1990) y el procedimiento recomendado por el National Animal Disease Center, USA (Stabel, 1997).

## MATERIAL Y METODOS

*Rebaños.* Se seleccionaron 14 rebaños lecheros de las provincias de Valdivia y Osorno (X Región, Chile), con antecedentes clínicos, bacteriológicos y/o serológicos de Paratuberculosis.

*Muestras.* De cada rebaño se recolectaron muestras de fecas de un número representativo de animales hasta completar un total de 250 muestras, las que fueron obtenidas por vía rectal mediante una manga de palpación rectal desechable.

*Medio de cultivo.* Para el aislamiento de *Map* a partir de las muestras de fecas se utilizó el Medio de Herrold con yema de huevo (HEYM) y micobactina J (Allied Monitor, Inc., USA) (Cuadro 1), en tubos de agar inclinado con tapa rosca, conforme a las recomendaciones del Laboratorio de Diagnóstico de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cornell, USA (Shin y col., 1990).

*Procesamiento de la muestra.* Todas las muestras de fecas fueron examinadas y procesadas el mismo día de su recolección según las recomendaciones del National Animal Disease Center, USA (Stabel, 1997), de acuerdo al siguiente procedimiento: 1 g de fecas de cada

### CUADRO 1. Composición del Medio de Herrold (HEYM).

#### Composition of the Herrold Egg Yolk Medium (HEYM).

Peptona	9	g
NaCl	4.5	g
Agar Noble	15.3	g
Extracto de Carne	2.7	g
Piruvato de Sodio	4.1	g
Glicerina	27	ml
Yema de Huevo (SPF)	100	ml
Micobactina J	2	mg
Verde Malaquita 2%	5.1	ml
Acido Nalidixico (10 mg/ml)	5	ml
Vancomicina (10mg/ml)	5	ml
Amfotericina B (10mg/ml)	5	ml
Agua desionizada	870	ml

muestra se suspendió en 35 ml de agua destilada desionizada en tubos cónicos de centrifuga de 50 ml de capacidad; se agitaron en posición horizontal por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se dejaron reposar en posición vertical por 30 minutos; el sobrenadante de cada tubo (25-30 ml) se transfirió a otro tubo estéril y se centrifugó a 1700 xg por 20 minutos, y después de eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 30 ml de una solución al 0.9% de cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) (SIGMA) para descontaminar las muestras, las cuales se incubaron a 37°C por 16-24 hr. Posteriormente se centrifugaron, nuevamente, las muestras a 1700 xg por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de una solución antibiótica conteniendo 100 µg/ml de ácido nalidíxico, 100 µg/ml de vancomicina y 50 µg/ml de amfotericina B, incubándose a 37°C por 16-24 hr.; a partir de esta suspensión se tomaron 0.2 ml y se inocularon 3 tubos HEYM con micobactina J y 1 tubo HEYM sin micobactina J.

*Inoculación e incubación de los medios de cultivo.* Todos los medios fueron inoculados partiendo con el inóculo desde el fondo hacia la boca del tubo, y se incubaron en posición horizontal durante una semana a 37°C, con las tapas sueltas, para permitir la evaporación de la humedad residual de la superficie del medio; posteriormente, se apretaron las tapas cerrando herméticamente los tubos y se continuó la incubación en posición vertical hasta completar 16 semanas.

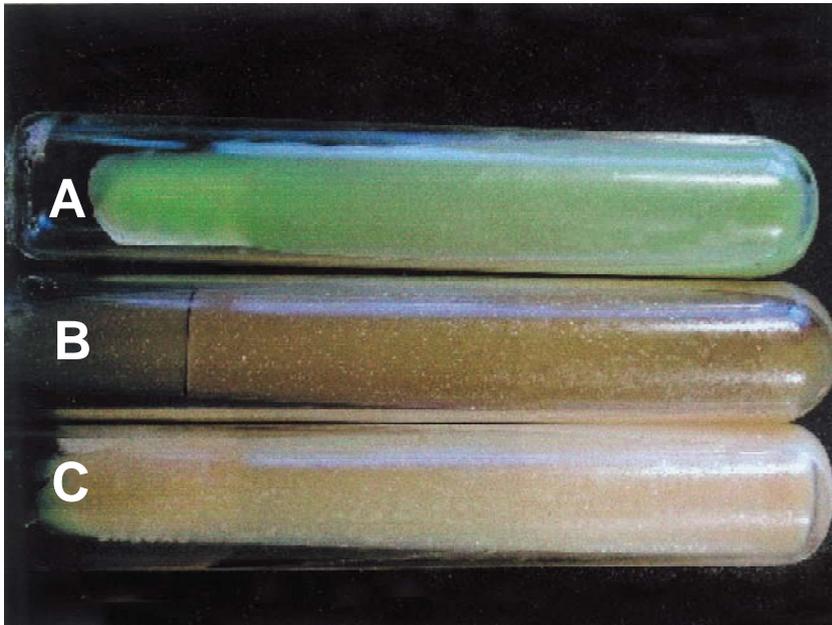
*Identificación de las cepas.* Los medios inoculados fueron examinados visualmente cada semana para verificar la presencia de colonias. Las colonias que requirieron más de 3 semanas de incubación para ser visibles, que presentaron la morfología típica de *Map*, y se desarrollaron en el medio HEYM con micobactina pero no en HEYM sin micobactina, se consideraron positivas, aun en presencia de contaminación. Además, las muestras que presentaron desarrollo de colonias atípicas, pero que se desarrollaron sólo en el medio HEYM con micobactina y que

requirieron más de 3 semanas de incubación, fueron consideradas sospechosas. Para que una muestra sea válida, a lo menos 2 de los 3 tubos inoculados debieron estar libres de contaminantes. Tanto colonias típicas de *Map* como las colonias sospechosas, fueron sometidas a la confirmación de la identidad del agente mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), basada en la amplificación del elemento de inserción IS900, específico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, utilizando los partidores P90<sup>+</sup> (5'-GAAGGGTGTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3') y P91<sup>+</sup> (5'-GGCGTTGAGGTCGATCGCCACGTGAC-3') (Dra A. M. Zárraga, Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Proyecto FONDEF D99I1096).

## RESULTADOS Y DISCUSION

El empleo del medio HEYM con micobactina permitió el aislamiento de *Map* en 40 (16.0%) de las 250 muestras de fecas analizadas. Los cultivos positivos a *Map* se caracterizaron por el desarrollo de colonias típicas, a partir de la 7<sup>a</sup> semana de incubación, morfológicamente muy pequeñas (1-2 mm de diámetro), blanquecinas, rugosas y de bordes irregulares. A medida que los cultivos se envejecían el tamaño de las colonias aumentaba formando una elevación central con desarrollo de pigmento amarillento (Figura 1).

El número de cultivos positivos a *Map* es elevado si se considera que en un rebaño infectado normalmente más del 70% de los animales se encuentran en un estado "silente" o asintomático, y que la excreción del agente por las fecas es intermitente y en escaso número, especialmente en los animales subclínicos, dificultando su detección por cultivo bacteriológico (Collins y Sockett, 1993; Collins, 1996; Stabel, 1998). Una de las desventajas del cultivo fecal es la baja sensibilidad, generalmente por debajo del 50% (Sockett y col., 1992), debido al bajo *Límite Mínimo de Detección* de este método; en efecto, de acuerdo con Merkal (1970), el cultivo fecal sólo detecta animales infectados que excretan >100 ufc de *Map*/g de fecas y los animales infectados



**FIGURA 1. Colonias de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en HEYM a distintos periodos de incubación A) colonias con 7 semanas de incubación, B) colonias con 12 semanas de incubación, C) colonias con 16 semanas de incubación.**

**Macroscopic appearance of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* colonies on HEYM after different incubation periods. A) colonies after 7 weeks, B) colonies after 12 weeks, C) colonies after 16 weeks.**

subclínicamente están por debajo de este nivel de excreción. En consecuencia, tanto el procedimiento para concentrar las micobacterias presentes en las muestras de fecas como el medio de cultivo empleado son esenciales para aumentar la sensibilidad del método.

Una manera de aumentar la sensibilidad del cultivo fecal es concentrando el agente en la muestra previo al cultivo; se han intentado diferentes alternativas para concentrar el agente y facilitar su aislamiento, demostrándose que la centrifugación de la muestra previo al cultivo es el procedimiento con mejores resultados (Nielsen y col., 2001). La doble centrifugación a 1700 xg previo al cultivo empleada en el presente estudio podría explicar, en gran medida, la elevada tasa de aislamiento obtenida. Estudios realizados por Kalis y col. (1999), demostraron que las muestras centrifugadas a alta velocidad (3000 rpm.) resultaban positivas al cultivo antes que aquellas centrifugadas a baja velocidad (1000 rpm.); sin embargo, esta diferencia no fue significativa a

partir de la semana 12. Además, estos mismos autores demostraron que las muestras centrifugadas a alta velocidad presentaron un mayor número de colonias que las centrifugadas a baja velocidad, diferencia que no se observó en las muestras con bajo número de colonias (1-10 ufc/g). También es posible incrementar la tasa de aislamiento aumentando la cantidad de muestra a procesar. Normalmente, la mayoría de los autores recomiendan utilizar 1 g de fecas por muestra, cantidad que se utilizó en este estudio; sin embargo, se ha demostrado que utilizando 2 g de fecas por muestra se puede incrementar la tasa de aislamiento, pero también aumenta el grado de contaminación (Whipple y col., 1991; Stabel, 1997).

Otra de las dificultades que atentan contra el aislamiento del agente de la Paratuberculosis, a partir de muestras fecales, es el crecimiento más rápido y exuberante de agentes contaminantes, especialmente hongos. Durante muchos años se utilizó hidróxido de sodio como descontaminante

para el aislamiento de *Mycobacterium* a partir de muestras clínicas (Metchock y col., 1999); sin embargo, aunque es altamente selectivo, está demostrado que este compuesto es tóxico para las micobacterias y el tiempo de contacto debe restringirse al máximo para evitar efectos adversos en el crecimiento (Collins y col., 2001). Esto ha motivado a muchos investigadores a ensayar nuevos productos químicos como descontaminantes para aumentar la tasa de aislamiento a partir de tejidos y muestras fecales y disminuir los niveles de contaminación, entre los cuales, actualmente el más utilizado es el HPC, con o sin adición de antibióticos (Whipple y col., 1991; Collins, 1996; Stabel, 1997; Stabel, 1998) En el presente estudio, para la descontaminación de las muestras fecales, se utilizó en forma simultánea HPC y una solución antibiótica conteniendo ácido nalidíxico, vancomicina y amfotericina B, con excelentes resultados para la obtención de cultivos puros, ya que no sólo fue posible aislar un elevado número de cepas de *Map* (40 cepas), sino que,

además, la tasa de contaminación con hongos no superó el 7.6 % de los cultivos al completar las 16 semanas de incubación, contaminación que sólo se hizo evidente a partir de la 8ª semana y que aumentó gradualmente hasta el término del período de incubación (Cuadro 2). Estos resultados son similares, o mejores, que los obtenidos por otros autores que han tenido tasas de contaminación que varían entre 5.7% y 13.0% (Stabel, 1997; Reichel y col., 1999).

Un aspecto importante de destacar en este estudio es el uso de la técnica de PCR para la identificación de *Map*, por su alta especificidad y rapidez. La identificación bioquímica de las micobacterias no sólo requiere de pruebas y medios especiales, no siempre disponibles en un laboratorio de diagnóstico no especializado, sino que además no permite obtener un resultado rápido debido al lento crecimiento de esta micobacteria. El ADN purificado, extraído de cada cultivo positivo y sospechoso, utilizado como templado para amplificar por PCR el elemento de inserción IS900 específico para *Map*,

**CUADRO 2. Nivel de contaminación de los tubos con medio de Herrold inoculados con 250 muestras de fecas, en los diferentes periodos de incubación (semanas).**

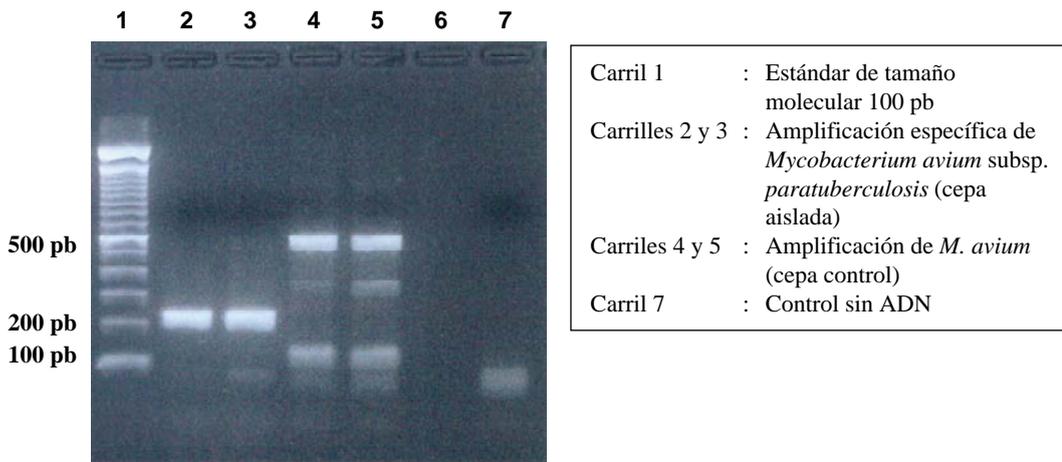
Level of contamination of the HEYM tubes inoculated with fecal samples at different incubation periods (weeks).

Rebaño N°	Semanas de incubación								
	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0	0	1	2	2	2	2	3	3
2	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	1	1	1	1	1	1	1	2	3
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	0	0	1	1	1	1	1	1	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	1	1	1	2	3	4	5	6
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	6	7	9	10	11	12	13	16	19
<b>%</b>	<b>2.4 %</b>	<b>2.8 %</b>	<b>3.6 %</b>	<b>4 %</b>	<b>4.4 %</b>	<b>4.8 %</b>	<b>5.2 %</b>	<b>6.4 %</b>	<b>7.6 %</b>

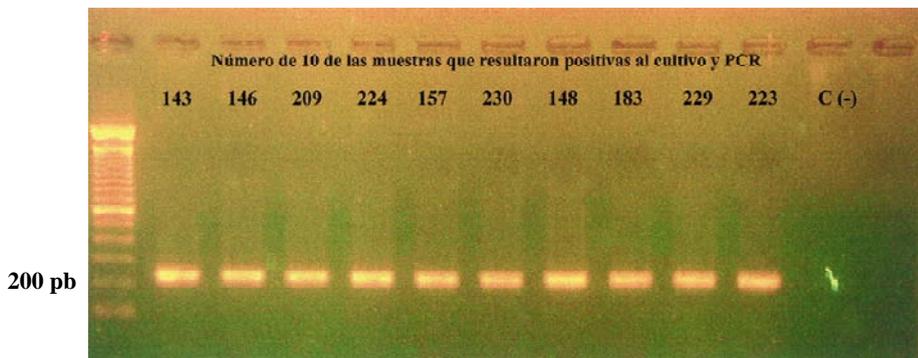
confirmó la identidad del agente en el 100 % de los casos (Figuras 2 y 3). El empleo de esta metodología diagnóstica no sólo permitió ahorrar tiempo y costos en la identificación de las colonias sospechosas, sino que además permitió confirmar la identidad del agente en aquellas colonias que a la inspección visual no tenían las características típicas descritas para la especie (1-2 mm de diámetro, blanquecinas, deslustradas, romas y de bordes irregulares) (Figuras 2 y 3), lo que demuestra la alta especificidad del PCR

como técnica diagnóstica. Estos resultados también demuestran la alta especificidad del Medio de Herrold con micobactina empleado para el aislamiento de *Map*, ya que sólo permitió el crecimiento de esta especie de *Mycobacterium*.

La alta tasa de aislamiento, la especificidad del medio de cultivo, y la baja tasa de contaminación de los cultivos durante el prolongado período incubación, hacen del procedimiento aquí descrito una buena alternativa de diagnóstico de Paratuberculosis bovina.



**FIGURA 2. Detección de los productos de amplificación (PCR) de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (200pb) y *Mycobacterium avium* (500pb) mediante electroforesis en gel de agarosa 1.8%. Agarose gel electrophoresis of the amplification products from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (200bp) and *Mycobacterium avium* genome (500bp), respectively.**



**FIGURA 3. Tipificación de cultivos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aislados de fecas bovinas. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa 1.8% de 10 cepas y control negativo** Typing of 10 strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from bovine faeces. Agarose gel electrophoresis of the PCR products.

## RESUMEN

Con la finalidad de aumentar la tasa de aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), a partir de muestras de fecas bovinas, se evaluó un nuevo procedimiento de descontaminación y cultivo de muestras fecales en 250 animales clínicamente sanos, provenientes de 14 rebaños infectados del sur de Chile. Para la descontaminación de las muestras previo al cultivo se utilizó una solución al 0.9% de cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) y una solución antibiótica con amfotericina B, vancomicina y ácido nalidíxico. Para el aislamiento del agente se utilizó el medio de Herrold con yema de huevo y micobactina J adicionado de una solución antibiótica similar a la empleada para la descontaminación de las muestras. En el 16% (40) de las muestras analizadas fue posible aislar *Map* con un 7.6% de contaminación con hongos sólo a partir de la octava semana de incubación. La identidad de las cepas aisladas fue confirmada en el 100% de los casos mediante PCR, utilizando partidores específicos para este agente (P90 y P91). La alta tasa de aislamiento, la especificidad del medio de cultivo y la baja tasa de contaminación de los cultivos, durante el prolongado período de incubación, hacen de este procedimiento una buena alternativa de diagnóstico de Paratuberculosis bovina.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos a la Dra. Ana María Zárraga, Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile, por la valiosa y desinteresada colaboración prestada en la identificación del agente mediante la técnica de PCR.

## BIBLIOGRAFIA

- BLOOD, D. C., O. M. RADOSTITS, J. H. ARUNDEL, C. C. GAY. 1992. Enfermedades causadas por bacterias (IV). En: Medicina Veterinaria, Vol. 1, capítulo 19. D.C. Blood y O.M. Radostits (eds.). 7ª ed. Nueva Editorial Interamericana, Atlampa D.F. México. pp. 851.
- COLLINS, M. T. 1996. Diagnosis of Paratuberculosis. *Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.* 12: 357-371.
- COLLINS, M. T., D. C. SOCKETT. 1993. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbant assay for bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 203: 1456-1463. (original no disponible). Citado por Whitlock y col. 2000. *Vet. Microbiol.* 77: 387-398.
- COLLINS, M. T., U. SPAHR, P. M. MURPHY. 2001. Ecological Characteristics of *M. paratuberculosis*. En: *Mycobacterium paratuberculosis. FIL/IDF Bull.* 362: 32-40.
- FAUNE, C. 1970. Uso del Zefirán como descontaminante fecal en el diagnóstico por coprocultivo del *Mycobacterium paratuberculosis*. Tesis. M.V., Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- GASTEINER, J., M. AWAD-MASALMET, W. BAUMGARTNER. 2000. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet. Microbiol.* 77: 339-349.
- GILMOUR, N. J. L. 1985. *Mycobacterium paratuberculosis*. En: Handbuch der Bakteriellen Infektionen bei Tieren. Tomo V. H. Blobel y T. Schlisser (eds.). Ed. Gustav Fisher, Jena, Alemania. pp.658.
- GRINBERGS, J., I. CAORSI. 1958. Enfermedad de Johne o Paratuberculosis en Chile. Publicaciones Científicas de la Universidad Austral de Chile. 4: 9-13.
- JOHNE, N., I. FROTHINGHAM. 1895. Ein eigentümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Dtsch. Z. Tiermed.* 21: 438-454.
- KALIS, C. H., W. HESSELINK, E. W. BARKEMA, M. T. COLLINS, I. J. VISSER. 1999. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 345-351.
- MERKAL, R. S. Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease). *Proc. 74<sup>th</sup> Ann. Mtg. US Anim. Hlth. Ass.* 74: 620-623.
- METCHOCK, B. G., F. S. NOLTE, R. J. WALLACE. 1999. In: P. R. Murray (ed.), Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D. C., USA.
- NIELSEN, S. S., K. K. NIELSEN, A. HUDA, R. CONDRON, M. T. COLLINS. 2001. Diagnostic Techniques for Paratuberculosis. In: *Mycobacterium paratuberculosis. FIL/IDF Bull.* 261: 5-17.
- REICHEL, M. P., R. KITTELBERGER, M. E. PENROSE, R. M. MEYNELL, D. COUSINS, T.

- ELLIS, L. M. MUTHARIA, E. A. SUGDEN, A. H. JOHNS, G. W. LISLE. 1999. Comparison of serological test and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. *Vet. Microbiol* 66: 135-150.
- SHIN, S. J., V. PATTEN, D. H. LEIN. 1990. New Cornell Method for Laboratory Protocol for *M. paratuberculosis* Culture from Feces. Diagnostic Laboratory, N.Y.S. College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, N.Y., USA. pp. 8
- SOCKETT, D. C., D. J. CARR, M. T. COLLINS. 1992. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in cattle. *J. Vet. Res.* 56: 148-153.
- STABEL, J. R. 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 375-380.
- STABEL, J. R. 1998. Johne's Disease: A Hidden Threat. Symposium: Biosecurity and Disease. *J. Dairy. Sci.* 81: 283-288.
- WHIPPLE, D. L., D. R. CALLIHAM, J. L. JARNAGIN. 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 368-373.
- WHITLOCK, R. H., C. BUERGELT. 1996. Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Vet. Clin. North. Amer. Food Anim. Pract.* 12: 345-356.
- WHITLOCK, R. H., S. J. WELLS, R. H. SWEENEY, J. VAN TIEM. 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77: 387-398.