



**DOENÇA DE JOHNE: ISOLAMENTO DO *Mycobacterium avium*
SUBSP. *paratuberculosis* (Map) EM UM REBANHO LEITEIRO INFECTADO
NA REGIÃO SUL DO BRASIL ***

JOHNE'S DISEASE: ISOLATION OF *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* (Map) FROM AN INFECTED DAIRY HERD IN SOUTHERN BRAZIL

MARCOS JOSÉ PEREIRA GOMES^{1,2}, DAVID DRIEMEIER³, VINICIUS REZENDE RIBEIRO⁴, ELSIO AUGUSTO WUNDER JR.⁵, WILLIAM ASANOME⁶, LAWRENCE FREDERICK LANZON⁶ & VERA BEATRIZ WALD⁷

RESUMO

A doença de Johne ou paratuberculose é uma enterite granulomatosa crônica causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), acometendo mamíferos, especialmente ruminantes domésticos e silvestres além de sérios prejuízos diretos e indiretos à pecuária leiteira. No Brasil, ela tem sido raramente descrita. Os objetivos do trabalho foram isolar e identificar o Map em amostras de tecido bovino com e sem sinais clínicos da doença de Johne no HEYM e estimar a prevalência da infecção no rebanho infectado, através do ELISA. O Map foi isolado de amostras intestinais e de linfonodos obtidos de 8 vacas Holandesas (3,5%) com doença de Johne, dentre 229 amostras cultivadas provenientes de um único rebanho leiteiro, no Estado do Rio Grande do Sul, Sul do Brasil. Não houve isolamento do agente em 221 amostras intestinais quando processadas, após 2 anos de sua colheita. O teste de IDGA detectou 26 vacas (11,4%) positivas, dentre 228 animais testados e sacrificados em matadouro. O teste de ELISA adsorvido, utilizando o antígeno comercial PPA-3 detectou 125 (39,8%) amostras positivas e 47 (14,9%) suspeitas. O ELISA não adsorvido detectou mais 32 (10,1%) reagentes positivos e mais 18 (5,7%) animais suspeitos, dentre os 314 bovinos testados. É enfatizada a ocorrência da doença de Johne tanto a forma clínica quanto a forma subclínica no Rio Grande do Sul, sugerindo que medidas de controle sejam adotadas para a proteção dos rebanhos leiteiros nacionais.

Descritores: bovinos, rebanho leiteiro, doença de Johne, Map, ELISA.

ABSTRACT

Johne's disease or paratuberculosis is a chronic granulomatous enteritis caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), which affects mammals, especially domestic ruminants and wild animals. In addition, it inflicts direct and indirect damage on dairy farming. This disease, however, has been seldom described in Brazil. The aims of the study were to isolate and identify Map in specimens of bovine tissue with or without clinical signs of Johne's disease, cultured on HEYM, and to estimate the prevalence of infection in the infected herd by way of the ELISA test. Map was isolated in intestinal and lymph node specimens collected from eight Holstein cows (3.5%) with Johne's disease, among 229 inoculated samples obtained from a single dairy herd in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. The causal agent was not isolated in 221 intestinal specimens when these were processed two years after collection. The AGID assay detected 26 positive cows (11.4%) among 228 animals that were tested and killed at a slaughterhouse. The absorbed ELISA test using PPA-3 antigen identified 125 (39.8%) positive samples and 47 (14.9%) suspected samples. The nonabsorbed ELISA test detected another 32 (10.1%) positive reagents and another 18 (5.7%) suspected animals out of 314 tested cows. The occurrence of Johne's disease in both clinical and subclinical forms is evidenced in Rio Grande do Sul, suggesting that control measures should be taken to protect Brazilian dairy herds.

Key words: bovine, dairy herd, Johne's disease, Map, ELISA.

Received: December 2001

Accepted: June 2002

* Trabalho originado da Tese de Doutorado do primeiro autor. ¹Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). ²Setor de Bacteriologia, Departamento de Patologia Clínica Veterinária (DPCV), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). ³Setor de Patologia, DPCV/FAVET-UFRGS. ⁴Departamento de Histologia do Instituto de Biologia - UFRJ. ⁵Acadêmicos da FAVET-UFRGS. ⁶Lander Veterinary Clinics INC., Turlock, CA., EUA. ⁷Departamento de Medicina Animal, FAVET-UFRGS. CORRESPONDÊNCIA: M.J.P. Gomes [e-mail: marcos.gomes@ufrgs.br ; FAX: +55 51 3316 7305]. Setor de Bacteriologia, DPCV/FAVET-UFRGS. Av. Bento Gonçalves 9090; 91540-000, Porto Alegre, RS-Brasil.

INTRODUÇÃO

A doença de Johne ou paratuberculose é uma enterite granulomatosa crônica, tendo como agente o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Ela é economicamente importante nos ruminantes domésticos, especialmente pela redução na produtividade nos rebanhos leiteiros infectados [13] e pela possibilidade do Map ser o agente etiológico da doença de Crohn [12].

Os animais subclínicamente infectados eliminam pequenas quantidades do agente para o ambiente, através das fezes, pondo em risco os animais jovens e outros do mesmo rebanho [14].

No Brasil, a literatura sobre a doença é rara e baseada em achados anatomopatológicos. O primeiro registro foi realizado por Dupont, no Rio de Janeiro, em 1915 [8]. Mais tarde, a doença foi descrita nos estados do Rio de Janeiro [5,23,25], Santa Catarina [20], Rio Grande do Sul [7,21] e Minas Gerais [18].

Os dados de prevalência nos diversos países são variáveis e dependentes da metodologia utilizada. Na Europa varia entre 7 a 55 % e nos Estados Unidos, a prevalência está associada ao número de animais, onde 40% dos rebanhos leiteiros com mais de 300 cabeças estão infectados, enquanto que na Austrália, as taxas variam de 9 a 22% [17].

No Brasil, Rivera [22] encontrou 45,51% de animais positivos, dentre 639 amostras de vacas de corte com problemas reprodutivos no Mato Grosso do Sul e em 65% de reagentes em rebanhos leiteiros de São Paulo. Também em São Paulo, foi registrada a prevalência da paratuberculose em 37,9% das 403 vacas com idade superior a 3 anos [16] e no Rio de Janeiro, em 18% dentre as 1004 amostras examinadas [9].

O diagnóstico da paratuberculose bovina está baseado na detecção do agente etiológico ou na detecção da resposta imune ao agente etiológico. O isolamento do Map apesar de possuir pouca sensibilidade, é a técnica considerada “*gold standard*” no diagnóstico da infecção [2,27].

Existem inúmeros testes sorológicos disponíveis no diagnóstico da doença de Johne, entretanto os mais utilizados no diagnóstico laboratorial são a imunodifusão em gelose de agar (IDGA) e o

ensaio imunoenzimático (ELISA), testes baratos mas com pouca sensibilidade [3, 15, 24].

O tratamento das amostras de soro ou adsorção com o *M. phlei* permite a remoção da maioria dos anticorpos dirigidos aos determinantes antigênicos comuns entre o Map e outras bactérias, enquanto que anticorpos para o *M. bovis* e *M. a. avium* podem permanecer na amostra testada [6, 11, 19, 28].

Os objetivos do trabalho foram isolar e identificar o Map em amostras de tecido de vacas com a doença de Johne e estimar a prevalência da infecção nesse rebanho, através do ELISA, com amostras adsorvidas e não adsorvidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Histórico do rebanho

Rebanho leiteiro localizado no município de Capela de Santana, RS era constituído de 345 bovinos da raça holandesa, incluindo em sua maioria, vacas importadas da Argentina. Este rebanho possuía histórico de tuberculose com eliminação de reagentes com e sem lesões [7].

Colheita das amostras

No final de 1997 e início de 1998 foram necropsiadas 8 vacas com sinais clínicos sugestivos de doença de Johne e as amostras (tecidos) enviadas ao laboratório de bacteriologia da faculdade de veterinária da UFRGS. Posteriormente, a propriedade foi interditada e 234 animais eliminados em matadouro. Desse total foram colhidas 221 amostras de sangue para a sorologia e 229 amostras de vísceras incluindo intestino (íleo, válvula ileocecal e ceco), linfonodos regionais para isolamento do Map. As amostras de soro e vísceras foram congeladas e mantidas a temperatura de 10°C negativos até o seu processamento laboratorial.

Tratamento das amostras e cultivo

As 229 amostras de raspado da mucosa do íleo terminal, válvula ileocecal e linfonodos regionais (2 g) fo-

ram adicionadas a 35mL de água deionizada; misturadas e deixadas sedimentar a temperatura ambiente por 30min. Após a sedimentação, o sobrenadante (20-25mL) foi removido e colocado em outro tubo limpo de 50mL; centrifugadas a 1700 x g por 20 minutos e o sedimento suspenso em 30mL da solução de cloreto de benzalcônio a 0,3%, durante 18 horas em estufa a 37°C. O sedimento resultante foi suspenso com 1mL de solução antimicrobiana (100mg/mL de ácido nalidíxico + 100mg/mL de vancomicina + 50mg/mL de anfotericina B); incubadas durante 18 horas a temperatura de 37°C. A amostra (0,2mL) foi inoculada em tubos, contendo o meio de Herrold com e sem micobactina J (2mg/L) e a adição de 50mg/mL de ácido nalidíxico e 50mg/mL de vancomicina, segundo a técnica descrita em Stabel [26].

Cada uma das 229 amostras processadas foi cultivada em 6 tubos, contendo o meio HEYM, sendo que 4 tubos continham micobactina. Os cultivos permaneceram em estufa a 37°C com observação quinzenal, por um período de 20 semanas. A identificação do Map teve como critérios: o tempo de crescimento colonial, a morfologia e a dependência à micobactina [4, 17].

Sorologia

A técnica de IDGA para diagnóstico sorológico da doença de Johne testou 228 amostras de soro bovino, utilizando antígeno e controles disponíveis comercialmente¹.

O ELISA testou um total de 314 amostras de bovinos. O ELISA indireto utilizou o antígeno protoplasmático (PPA-3) da amostra de *M. paratuberculosis* Strain 18, segundo o protocolo fornecido pelo laboratório fabricante do antígeno².

As placas de ELISA foram sensibilizadas com antígeno (72mg/mL) em 0,05M de tampão carbonato, pH 9,6; incubadas, durante 18 horas a 5°C. Após esse tempo, elas foram lavadas por 3 vezes, com solução salina-Tween₈₀; deixadas secar e preenchidas com as amostras de soro adsorvido bem como seus controles. As amostras foram descongeladas e os soros adsorvidos a igual volume (200mL) de uma suspensão de *M. phlei* (2,0mg/mL)³, onde permaneceram 18 horas sob refrigeração. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos, em seguida, o soro adsorvido (40

mL) foi diluído 1:50 adicionando 2,0 mL de PBS/Tween₈₀/Gelatina (pH 7,6), resultando numa diluição final de 1:100. O soro adsorvido e diluído (100mL) foi colocado em triplicata a cada poço da placa sensibilizada; incubadas por 24 horas a 15°C e, em seguida, lavadas 3 vezes com PBSTG a 6°C e seca. Adicionou-se então (100mL) o conjugado anti-IgG bovino com peroxidase produzido em coelho⁴; diluído (1:5000) e adicionado a cada poço da placa; incubando-a, durante 90 minutos sob refrigeração. Após esse tempo, a placa é lavada rapidamente com PBST₈₀G (3X), e um volume de (100mL) de substrato (ABTS) diluído em tampão citrato pH 4,0 adicionado a cada orifício e incubado a 21°C. Posteriormente, um volume (100mL) de uma solução a 0,1M de HF foi utilizado como solução bloqueadora da reação enzimática e, finalmente procedida a leitura espectrofotométrica, utilizando uma leitora de ELISA⁵ com filtro de 405nm. Controles positivos e negativos foram adicionados a cada placa sensibilizada. A amostra foi considerada positiva quando a média das 3 densidades ópticas (DO) da amostra testada pelos 3 valores do controle negativo foi igual ou superior 2,1. O teste foi considerado suspeito quando obtivermos um índice ELISA entre 1,5 a 2,0 e negativo quando o valor foi 1,0 a 1,4.

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado, onde foram considerados os resultados dos testes de ELISA não adsorvidos e adsorvidos distribuídos em três diferentes faixas etárias. Foi utilizado o programa Minitab for Windows, tendo sido adotado o nível de significância de 0,05 segundo Fleiss [10].

RESULTADOS

O Map foi isolado em todas as 8 amostras dos animais que apresentaram alterações clínicas e anatomopatológicas da doença de Johne, dentre as 221 outras amostras inoculadas e provenientes de animais clinicamente assintomáticos de um único rebanho.

Não houve isolamento do agente nas 221 amostras mantidas congeladas a -10°C quando processadas e inoculadas após 24 meses de sua colheita.

O teste de IDGA detectou 26 (11,40 %) animais positivos além dos doentes dentre as 228 amostras dos animais com idade superior a 2 anos.

A distribuição dos resultados nos teste de ELISA com amostras não adsorvidas e adsorvidas com o *M. phlei*, em diferentes faixas etárias, estão contidas na Tabela 1.

DISCUSSÃO

O isolamento do Map, utilizando o cloreto de benzalcônio não ofereceu aparentemente efeito deletério sobre o agente. Entretanto parece ter ocorrido um efeito importante sobre os contaminantes, pois houve a visualização de colônias típicas após 6-8 semanas de cultivo em HEYM a 37°C.

A tentativa infrutífera de isolamento e cultivo do Map em amostras processadas após 2 anos deveu-se, provavelmente ao excessivo tempo transcorrido entre a colheita e o processamento laboratorial; pela conservação inadequada das amostras congeladas à -10°C ou ainda pela não adaptação da cepa ao meio de cultivo utilizado.

A IDGA detectou outros animais infectados neste rebanho leiteiro, projetando para o futuro, o aparecimento de novos casos da doença, pois a técnica possui boa sensibilidade e excelente especificidade na identificação rápida de animais com sinais clínicos suspeitos da doença de Johne [24].

Foi evidenciado maior número de reagentes positivos nos animais mais velhos utilizando o ELISA não adsorvido ($\chi^2=34,07$; $p<0,001$) assim como pelo ELISA adsorvido ($\chi^2=22,64$; $p<0,001$). A diferença significativa entre o ELISA adsorvido e não adsorvido deveu-se, em parte, às reações cruzadas com outros agentes tais como a *Escherichia coli*, *Nocardia asteroides*, corinebactérias e outras micobactérias [6, 11, 28].

O antígeno PPA-3, extraído da cepa Strain 18 e utilizado neste trabalho, assim como em muitos levantamentos epidemiológicos e provas diagnósticas da doença de Johne, durante décadas, é na verdade, o *M. avium* sorovar 2, fato que pode ter comprometido as estimativas epidemiológicas utilizadas [1]. Talvez isso possa ter contribuído, em parte, para a alta estimativa de prevalência da infecção pelo Map na Dinamarca, mesmo que não tenha sido evidenciada diferença significativa entre os antígenos do Map e do *M. avium* subsp. *avium* sorovar 2 avaliados através do teste de ELISA. Por outro lado, as taxas estimadas neste trabalho poderiam estar superestimadas pelo efeito aditivo da infecção pelo *M. bovis* e/ou *M. avium*, pois o tratamento das amostras com o *M. phlei* poderia não eliminar os anticorpos dirigidos para esses agentes. Os testes sorológicos em uso para diagnóstico da paratuberculose bovina podem dar resultados falso positivos, especialmente na tuberculose bovina e aviária [19].

Tabela 1. Relação entre faixas etárias e os testes de ELISA não adsorvido e adsorvido, em amostras de soro bovino, no RS.

FAIXA	Nº Amostras	E			L			I			S			A			
		NÃO ABSORVIDO			ABSORVIDO			NÃO ABSORVIDO			ABSORVIDO			NÃO ABSORVIDO			ABSORVIDO
		P %	S %	N %	P %	S %	N %	P %	S %	N %	P %	S %	N %	P %	S %	N %	
< 2	103	31 ^a (30,1)	23 (22,3)	49 (47,5)	26 ^a (25,2)	11 (10,6)	66 (64,0)										
2 – 4	69	35 ^b (50,7)	14 (20,2)	20 (28,9)	33 ^b (47,8)	10 (14,4)	26 (37,6)										
> 4	142	91 ^c (64,0)	28 (19,7)	23 (16,2)	66 ^b (46,4)	26 (18,3)	50 (35,2)										
TOTAL	314	157 (50,0)	65 (20,7)	92 (29,3)	125 (39,8)	47 (14,9)	142 (45,2)										

P= positivo

S=suspeito

N=negativo

^{a,b,c} Letras minúsculas designam na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,001$)

As estimativas nacionais relativas à paratuberculose bovina de uma maneira geral, possuem um pequeno número de rebanhos testados, considerando o número de rebanhos leiteiros brasileiros. Entretanto, os levantamentos sorológicos realizados, através do ELISA adsorvido são variáveis, estimando a prevalência entre 18% no Rio de Janeiro [9] e 65% no Mato Grosso do Sul [22]. A estimativa de 39,8% encontrada no Rio Grande do Sul é muito próxima dos 38% de reagentes distribuídos em 20 rebanhos leiteiros paulistas [16].

CONCLUSÕES

O Map foi isolado de todas as vacas leiteiras com sinais clínicos da doença de Johne e anticorpos foram detectados contra o agente com a infecção subclínica nesse rebanho leiteiro.

A prevalência da paratuberculose bovina estimada através do ELISA é alta frente as estimativas internacionais, demandando outros estudos a fim de que se possa dar início a medidas de controle contra a enfermidade em rebanhos leiteiros nacionais, uma vez que não há programa sanitário para a proteção e controle da doença de Johne no rebanho bovino.

NOTAS INFORMATIVAS

- ¹ Antígeno para IDGA comercializado pela Immucell Co., Portland, ME, USA.
- ² Antígeno PPA-3 para ELISA comercializado pela Allied Monitor, Fayette, MI, USA
- ³ Antígeno *M. phlei* comercializado pela Allied Monitor, Fayette, MI, USA
- ⁴ Ig G bovina comercializado pela Sigma, St. Louis, MO, USA
- ⁵ Leitora Labsystems Uniskan II, Finland.

REFERÊNCIAS

- 1 Chiodini R.J. 1993.** Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* Strain 18. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 1956-1957.
- 2 Cocito C., Gilot P., Coene M., De Kesel M., Poupart P. & Vannuffel P. 1994.** Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 7: 328-345.
- 3 Colgrove G.S., Thoen C.O., Blackburn B.O. & Murphy C.D. 1989.** Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Veterinary Microbiology*. 19: 183-187.
- 4 Collins M.T. 1996.** Diagnosis of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 12: 357-371.
- 5 Dacorso Filho P., Campos I.O.N., Faria J.F. & Langenegger J. 1960.** Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. *Arquivos do Instituto de Biologia Animal*. 3: 129-139.
- 6 De Kesel M., Gilot P., Coene M. & Cocito C. 1992.** Composition and Immunological properties of the protein fraction of A36, a major antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 36: 201-212.
- 7 Driemeier D., Cruz C.E.F., Gomes M.J.P., Corbellini L.G., Loretti A.P. & Colodel E.M. 1999.** Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 19: 109-115.
- 8 Dupont O. 1915.** Nota do Jornal do Commercio de 5 de novembro p. 8.
- 9 Ferreira R., Fonseca L.S. & Lilenbaum, W. 2001.** Detecção de anticorpos contra o *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 23: 166-171.
- 10 Fleiss J.L. 1981.** *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2nd edn. New York: John Wiley & Sons, 321p.
- 11 Gilot P. & Missone M. 1994.** *Mycobacterium paratuberculosis* and *Escherichia coli* share common antigenic determinants. *Veterinary Microbiology*. 39: 353-360.
- 12 Hermon-Taylor J., Bull T.J., Sheridan J.M., Cheng J., Stellakis M.L. & Sumar N. 2000.** The causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 14: 521-539.

- 13 **Johnson-Ifeorunlu Y.J. & Kaneene J.B. 1997.** Epidemiologic and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. *Veterinary Bulletin*. 67: 437-447.
- 14 **Jones P.H. 2001.** Bovine paratuberculosis: ongoing challenges, renewed concerns. *In Practice*. 23: 402-411.
- 15 **Kreeger J.M. 1991.** Ruminant paratuberculosis - a century of progress and frustration. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 3: 373-383.
- 16 **Laranja da Fonseca L.F., Olival A.A., Pereira C.C., Heinemann M.B., Richtzenhain L.J. & Santos M.V. 2000.** Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 28: 51-60.
- 17 **Manning E.J.B. & Collins, M.T. 2001.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épidémiologies*. 20: 133-150.
- 18 **Nakajima M., Maia F.C.L. & Mota P.M.P.C. 1991.** Diagnóstico da Paratuberculose em Minas Gerais. [resumo 67]. In: *Anais do IV Simpósio Brasileiro em Micobactérias*. (Bauru, Brasil). Não paginado.
- 19 **Nielsen S.S., Houe H., Thamsborg S.M. & Bitsch V. 2001.** Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13: 164-166.
- 20 **Portugal M.A.S.C., Pimentel J.N., Saliba A.M., Baldassi L. & Sandoval E.F.D. 1979.** Ocorrência de paratuberculose no estado de Santa Catarina. *O Biológico*. 4: 19-24.
- 21 **Ramos E.T., Poester F.P., Correa B.L., Oliveira S.J., Rodrigues N.C. & Canabarro C.E. 1986.** Paratuberculose em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *A Hora Veterinária*. (34): 28-32.
- 22 **Rivera F.E.B. 1996.** Levantamento sorológico utilizando-se a técnica de ELISA em rebanhos apresentando problemas reprodutivos. I. Enterite paratuberculose. In: *Anais do I Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul* (Campo Grande, Brasil). pp.20-22.
- 23 **Santos J.A. & Silva N.L. 1956.** Sobre a 1ª. Observação da paratuberculose no Brasil. *Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*. 24: 5-14.
- 24 **Sherman D.M., Markham R.J.F. & Bates F. 1984.** Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 185: 179-182.
- 25 **Silva N.M. & Pizelli G.N. 1961.** Estudos sobre a paratuberculose I. Diagnóstico de um caso da doença. *Arquivos do Instituto de Biologia Animal*. 4: 169-173.
- 26 **Stabel J.R. 1997.** An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 9: 375-380.
- 27 **Whipple D.L., Callihan D.R. & Jarnagin J.L. 1991.** Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedures. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 3: 368-373.
- 28 **Yokomizo Y., Yugi H. & Merkal R.S. 1985.** A method for avoiding false-positive reactions in a enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japanese Journal of Veterinary Science*. 47: 111-119.

