

Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares

Liquid culture medium for diagnosis of bovine paratuberculosis. Usefulness and comparative analysis with Herrold medium: preliminary results

ROMERO M^{1,2*}, ALVARADO PINEDO M², MOYANO R^{3,4}, PERALTA L², SOSA P², SANTANGELO M^{3,4}, TRAVERÍA G²

1. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). 2. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias, FCV, UNLP (CEDIVE, Chascomús). 3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). 4. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Biotecnología, Castelar. Argentina

* Correo electrónico de la autora de contacto: mromero@fcv.unlp.edu.ar

Resumen

La paratuberculosis es una enfermedad crónica producida por un bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR), el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). No existe tratamiento ni vacuna aprobada por SENASA para esta enfermedad, por lo que es imprescindible el diagnóstico de los animales positivos para controlar la enfermedad antes de que infecten a otros. Se probó la implementación de un medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, modificado a partir del medio Middlebrook M7H9 caldo. Para probar la efectividad del medio se realizó la siembra pareada de muestras de materia fecal y tejidos animales en el medio de cultivo sólido de Herrold con micobactina (HEYM) y en el medio de cultivo líquido modificado a partir del M7H9 caldo. Además, se lograron comparar el tiempo de detección de colonias en el medio sólido con el de detección de BAAR formando grupos en el medio de cultivo líquido en estudio. Se corroboró que hay diferencias significativas entre el medio de cultivo líquido y el medio HEYM, tanto en el tiempo de detección como en la cantidad de muestras positivas detectadas, observando BAAR en el medio líquido o colonias bacterianas en el medio HEYM. Sobre la base de estos resultados se concluye que el medio líquido probado posee una mayor sensibilidad analítica y un tiempo de detección del crecimiento menor con respecto a los del medio HEYM.

Palabras clave

Micobacterias, medio de cultivo líquido, Ziehl-Neelsen, micobactina

Abstract

Paratuberculosis is a chronic disease caused by acid-fast bacilli (AFB) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). There is neither an effective treatment nor any vaccine approved by the sanitary authority (SENASA) in Argentina. Diagnosis and segregation of positive animals are essential for the control of the disease. For the diagnosis of cattle paratuberculosis, a modified Middlebrook M7H9 broth medium was developed. To test the effectiveness of the medium, fecal and tissue samples were cultured in Herrold with mycobactin and liquid culture media, and time to growth was compared by direct observation of colonies and microscopic grouped AFB observation, respectively. Significant differences were observed between liquid tested and Herrold media, both in time to grow and in the number of positive animals detected. Based on these results, it is concluded that liquid medium offers greater analytical sensitivity and faster detection than Herrold medium.

Key words

Mycobacterium, liquid culture medium, Ziehl-Neelsen, mycobactin

Fecha de recepción: 01/12/2017

ANALECTA VET 2018; 38(1): 50-55

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

Fecha de aprobación: 16/03/2018

doi.org/10.24215/15142590e025

Introducción

La paratuberculosis, causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), se caracteriza por provocar una ileocolitis granulomatosa, crónica y debilitante en los animales que la padecen. Es una enfermedad que tiene un gran impacto productivo y económico en el ámbito mundial y en nuestro país, principalmente en producciones lecheras (Morsella & Paolicci, 2008; Soto *et al.*, 2002). La particularidad de esta enfermedad es que no cuenta con tratamientos eficaces ni métodos profilácticos aprobados por el SENASA hasta el momento, debido a que podrían interferir con el diagnóstico de la tuberculosis. Por lo tanto, su control se basa en el diagnóstico de los animales infectados y su segregación. El diagnóstico puede realizarse determinando la magnitud de la respuesta inmune celular o humoral y, de forma directa, mediante estudios microbiológicos. Entre las posibilidades diagnósticas, el cultivo bacteriológico es considerado la técnica de oro, aun con las dificultades que presentan las micobacterias de crecimiento lento. El medio de cultivo utilizado comúnmente es el de Herrold con yema de huevo y el agregado de micobactina (HEYM), ya que cumple con las exigencias del Map para su crecimiento *in vitro* (Merkal & Curran, 1974). Este medio de cultivo presenta una especificidad del 99 % y una sensibilidad cercana al 50 %. La decontaminación previa con cloruro de hexadecil-piridinio (HPC) elimina la mayoría de las micobacterias no patógenas, con escasos efectos dañinos sobre el Map (Collins *et al.*, 1996; Whipple *et al.*, 1991). Otro inconveniente que se suma a la baja sensibilidad del medio HEYM es que la aparición de colonias requiere entre dos y cuatro meses de incubación, y solo luego de seis meses es posible asegurar un resultado negativo (Stabel *et al.*, 1997; Whipple *et al.*, 1991). Los tiempos de incubación prolongados limitan la implementación del cultivo bacteriológico, incluso cuando se lo usa con fines de investigación. Debido a todas las dificultades que presenta el cultivo micobacteriano, en un intento por abreviar el lapso hasta la constatación del crecimiento bacteriano y por mejorar la sensibilidad del método, se han probado diversos medios de cultivo, habiéndose obtenido mejores resultados con el uso de medios de cultivo líquidos (Pozzato *et al.*, 2011; Stabel *et al.*, 1997; Whittington, 2009). Así se han logrado incluso tipificar las cepas aisladas a partir de ellos (Motiwala *et al.*, 2005). Sin embargo, estos medios comerciales no están disponibles en el país y su adquisición resulta actualmente difícil y de alto costo.

En este trabajo se probó la preparación e implementación de un medio de cultivo líquido modificado a partir del medio líquido M7H9C (Whittington *et al.*, 2013). Se comparó su eficacia, con respecto al tiempo hasta la constatación del

crecimiento bacteriano y la sensibilidad analítica, en comparación con el medio sólido HEYM.

Descripción metodológica

Medios de cultivo

-Medio de Herrold con yema de huevo y micobactina (HEYM):

Los componentes de la preparación se detallan en la tabla 1. Se fraccionó en botellas de cultivo celular de 50 ml colocando 10 ml de medio en cada una de ellas.

-Medio de cultivo líquido:

Se preparó según los componentes detallados en la tabla 1. Se basó en el medio de cultivo descrito por Whittington *et al.* (2013) al que se le agregó agar al 0,185 % para que se mantuviera el estado líquido del medio, pero colaborara con la homogeneidad de la yema de huevo en la columna. Además, se agregó ácido nalidíxico y nistatina para evitar la contaminación. Este medio se fraccionó en tubos de vidrio de 30 ml conteniendo 10 ml de medio cada uno.

Se procesaron 47 muestras provenientes de bovinos con y sin signos de la enfermedad (Tabla 2). Las muestras de materia fecal se recolectaron directamente del recto de los animales. También se procesaron muestras de tres órganos (íleon, yeyuno y linfonódulo) obtenidas durante la necropsia de animales con signos compatibles con la enfermedad. Las necropsias fueron realizadas por nuestro grupo de trabajo en el establecimiento.

Procesamiento de las muestras

Se realizó la decontaminación de acuerdo con el método de doble incubación (Stabel, 1997) colocando 2 g de muestra (materia fecal o tejido, según el caso) en 30 ml de agua destilada estéril. Estas muestras luego se agitaron y dejaron reposar durante 30 minutos. Posteriormente se colocaron 5 ml del sobrenadante en 25 ml de solución de HPC y esta solución se mantuvo en estufa a 37 °C durante 24 h. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1000 rpm, se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de mezcla antibiótica y se conservó 24 h a 37 °C. Las muestras así procesadas se sembraron, en forma pareada, colocando 800 µl en las botellas con HEYM y 100 µl (Whittington *et al.*, 2013) en los tubos con el medio de cultivo líquido en estudio. Ambos fueron incubados en estufa a 37 °C.

Seguimiento de las muestras en ambos medios de cultivo y criterios de positividad

Se observaron ambos medios de cultivo semanalmente. En el HEYM se consideraron positivas aquellas muestras que evidenciaron al

menos una colonia blanquecina, lisa, brillante y visible macroscópicamente (Fig. 1). La observación del medio de cultivo líquido se realizó microscópicamente, utilizando la coloración de Ziehl-Neelsen para poner de manifiesto bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Se consideraron positivas aquellas muestras que mostraron BAAR agrupados y morfológicamente compatibles con Map (Fig. 2). Las coloraciones se realizaron semanalmente y se inspeccionaron 50 campos de observación, como mínimo, cada semana.

Ingredientes	A	B	C
base medio M7H9C	3,1 g	3,1 g	
albúmina bovina	1,34 g	1,6 g	
dextrosa	0,52 g	0,64 g	
catalasa	0,8 mg	0,96 mg	
Bacto Casitone®	666 mg	680 mg	
cloruro de sodio	0,22 g	0,22 g	15,3 g
yema de huevo	167 ml	170 ml	120 ml
Micobactina J®	0,8 mg	1 mg	2 mg
Panta plus®	30 ml	30 ml	
ácido nalidíxico		200 mg	100 mg
nistatina		800 mg	400 mg
vancomicina			100 mg
agar		1,8 g	15,3 g
peptona de carne			9 g
piruvato de sodio			4,1 g
extracto de carne			2,7 g
glicerol			34 ml
verde de malaquita al 2 %			5,2 ml
agua tridestilada	800 ml	770 ml	840,9 ml

Tabla 1. Composición (por litro) de cada medio. A. Medio descripto por Whittington *et al.* (2013). B. Medio líquido experimental del trabajo. C. Medio sólido HEYM.

Confirmación de resultados

Para el caso del medio de cultivo líquido se procedió a confirmar la presencia de Map en las muestras positivas mediante la técnica de análisis molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El segmento de inserción que se buscó amplificar fue IS900 (Collins *et al.*, 1993). Las muestras positivas en el HEYM fueron coloreadas con la técnica de Ziehl-Neelsen y procesadas mediante PCR IS900.

Recuperación y extracción de ADN para PCR IS900

Debido a la presencia de inhibidores del crecimiento en el huevo, componente del medio de cultivo líquido en estudio, se debió realizar un repique en medio Löwenstein-Jensen (con micobactina), donde se observó el desarrollo de colonias entre los 5 y los 10 días. A partir de este medio se tomó una colonia y se diluyó en 200 µl de agua ultra pura para PCR, sometiéndola a 3 ciclos de hervido/congelación (shock térmico) para la extracción de ADN. Las muestras fueron procesadas mediante PCR IS900 siguiendo el protocolo de Collins *et al.* (1993). Los cebadores utilizados fueron: hacia adelante (F) GATCGGAAC-GTCGGCTGGTCAGG y reverso (R) GATCGCCTT-GCTCATCGCTGCCG, utilizando DNA Polymerase

BIOLINE® (Londres, Reino Unido) y termociclador Evo MPI M-02® (La Plata, Argentina). Se obtuvo un producto de 218 pb.



Figura 1. Colonias típicas de Map, blanquecinas, lisas, brillantes. Medio HEYM, 70 días posincubación (muestra N° 43).

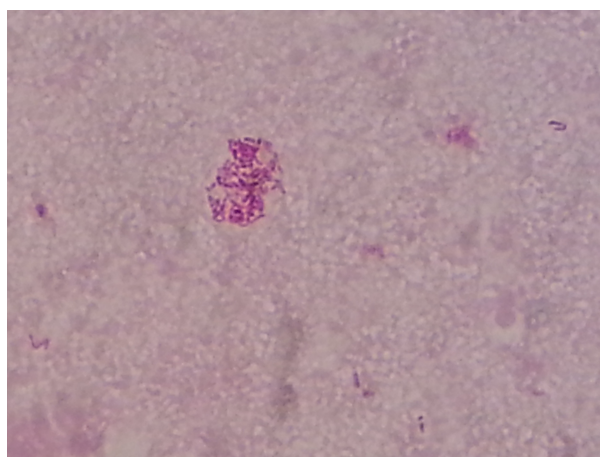


Figura 2. Bacilos ácido-alcohol resistentes compatibles con Map, medio líquido, 17 días posincubación. Coloración de Ziehl-Neelsen (muestra N° 43).

Análisis de datos

Se analizó los resultados en el medio de cultivo líquido en estudio respecto del HEYM mediante la prueba de chi cuadrado con corrección de Yates, y se obtuvo un valor de $p = 0,002$ (intervalo de confianza -IC- 95 %). También se utilizó la prueba de T de Student para analizar las diferencias en cuanto al tiempo de detección de crecimiento en ambos medios de cultivo, mediante la cual se encontraron diferencias con valor de $p = 0,0000000005$ (IC 95 %). Tanto el chi cuadrado como la prueba de T fueron realizadas mediante programa Excel, Windows 8.1. Para las mismas muestras se puso en evidencia una mayor cantidad de casos positivos en el medio líquido que en el medio sólido. Las muestras positivas en el medio líquido fueron 34 y, en el medio HEYM, 22 (diferencias estadísticas con un valor de $p = 0,002$, IC 95 %). Mediante la técnica de PCR IS900 se confirmaron 25 de las 34 muestras positivas en el medio líquido, 8 de las cuales habían resultado negativas en el medio HEYM.

N°	Tipo de muestra	Año*	Categoría	Raza	Signos clínicos	Zona de procedencia	Medio líquido		Medio de Herrold	
							Rdo	Tiempo (días)	Rdo	Tiempo (días)
1	MF	2016	Vaca	AA	Si	Magdalena, Bavio	POSITIVO	8	POSITIVO	60
7	MF	2016	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	19	POSITIVO	111
13	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	12	POSITIVO	50
14	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	19	POSITIVO	70
15	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	8	POSITIVO	67
17	MF	2016	Vaca	AA	Si	Magdalena, Bavio	POSITIVO	4	POSITIVO	70
19	MF	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	17	POSITIVO	58
32	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	POSITIVO	5	POSITIVO	40
33	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	POSITIVO	32
34	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	6	POSITIVO	58
35	MF	2016	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	19	POSITIVO	49
36	MF	2016	Vaquillona	AA	Si	La Plata	POSITIVO	12	POSITIVO	49
37	MF	2016	Vaca	AA	Si	Brandsen	POSITIVO	7	POSITIVO	106
38	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	POSITIVO	14	POSITIVO	72
39	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	POSITIVO	13	POSITIVO	58
40	MF	2015	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	8	POSITIVO	56
41	MF	2015	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	8	POSITIVO	58
43	Yeyuno	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	17	POSITIVO	52
44	Íleon	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	17	POSITIVO	122
45	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	12	POSITIVO	87
46	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	8	POSITIVO	50
47	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	POSITIVO	60
2	MF	2016	Vaquillona	AA	No	Gral. Belgrano	POSITIVO	35	NEGATIVO	
3	MF	2016	Vaquillona	AA	No	Gral. Belgrano	POSITIVO	49	NEGATIVO	
4	MF	2016	Vaquillona	AA	No	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	NEGATIVO	
5	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	NEGATIVO	
6	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	NEGATIVO	
8	MF	2016	Vaca	AA	No	Vieytes	POSITIVO	14	NEGATIVO	
9	MF	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	17	NEGATIVO	
10	Linfonodo	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	50	NEGATIVO	
11	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	20	NEGATIVO	
12	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	13	NEGATIVO	
16	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	6	NEGATIVO	
18	MF	2016	Vaca	AA	Si	La Plata	POSITIVO	12	NEGATIVO	
42	MF	2015	Vaca	AA	Si	Chascomús	NEGATIVO		POSITIVO	69
20	MF	2015	Vaca	AA	Si	Chascomús	NEGATIVO		NEGATIVO	
21	MF	2016	Vaca	AA	Si	Vieytes	NEGATIVO		NEGATIVO	
22	MF	2016	Vaca	AA	Si	Luján	NEGATIVO		NEGATIVO	
23	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	NEGATIVO		NEGATIVO	
24	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	NEGATIVO		NEGATIVO	
25	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
26	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
27	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
28	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
29	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
30	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	NEGATIVO		NEGATIVO	
31	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	NEGATIVO		NEGATIVO	

Tabla 2. Origen y características de las muestras, resultados y tiempos de detección en medio de cultivo líquido y medio de cultivo de Herrold. MF: Materia fecal. Rdo: Resultado. AA: Aberdeen Angus. HA: Holando Argentino. *Año en el que se tomó y procesó la muestra.

Las 9 muestras restantes se contaminaron, dieron resultado negativo y no pudieron ser recuperadas para un nuevo procesamiento mediante PCR. Sin embargo, todas ellas mostraron características morfológicas típicas de Map con la coloración de Ziehl-Neelsen, incluyendo el agrupamiento clásico de BAAR. Cinco de ellas, además, resultaron positivas en el medio HEYM, con el desarrollo de colonias de morfología clásica. A su vez, las muestras positivas en el medio HEYM fueron corroboradas en su totalidad mediante la coloración de Ziehl-Neelsen y con la amplificación del segmento IS900, aunque en dos de los casos (muestras 37 y 44) la banda resultante en el gel de corrida electroforética fue débil respecto de las demás y podrían considerarse negativas.

En cuanto al tiempo de detección de crecimiento, el promedio para el medio HEYM fue de 65 días, mientras que para el medio de cultivo líquido fue de 11 días (Tabla 2). Estos datos arrojaron un grado de significancia de $p=0,00000000005$ (IC 95 %) mediante la prueba de T, mostrando que existen diferencias significativas también para esta variable.

Discusión y conclusiones

Con el uso del medio líquido modificado a partir del medio M7H9C (Whittington *et al.*, 2013) fue posible mejorar notablemente, tanto la sensibilidad analítica del cultivo como así también el tiempo de incubación, marcadamente menor que el requerido con el medio HEYM, utilizado de rutina. Estos resultados son coincidentes con los de trabajos previos que demuestran la mayor sensibilidad de los medios de cultivo líquidos y que también describen un desarrollo en menor tiempo (Pozzato *et al.*, 2011; Stabel *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2007; Whittington, 2009, 2013). La observación de crecimiento diagnóstico de Map en el cultivo en un promedio de 11 días fue algo destacable, teniendo en consideración que se trata de una micobacteria de crecimiento lento. Sin embargo, Shin *et al.* (2007) describen los tiempos de detección de crecimiento y consignan que, en los sistemas BACTEC 460 y MGIT, muestras con 105 UFC/ml resultan positivas 7 u 8 días posincubación. Teniendo en cuenta este dato y considerando que la mayor parte de las muestras de este trabajo provenían de animales con signos clínicos (y que, por lo tanto, se encuentran eliminando micobacterias en grandes cantidades), es posible afirmar que los resultados del trabajo aquí presentado se encuentran dentro de lo esperable.

En cuanto a la mayor sensibilidad analítica que mostró el medio de cultivo líquido respecto del sólido, cabe aclarar que la utilización de la presencia de BAAR como criterio de positividad posibilita la inclusión errónea de otros BAAR (diferentes de Map), alterando la especificidad del cultivo. Para determinar la presencia de Map se utilizó la técnica de PCR IS900, que nos permitió

corroborar los resultados de gran parte de las muestras y confirmar alrededor del 66 % de las muestras que resultaron positivas en el medio líquido, pero no en el HEYM, utilizado de rutina como técnica de oro. Si bien es necesario aumentar la cantidad de muestras procesadas para robustecer el soporte estadístico, los resultados obtenidos son prometedores, y permitirían dar respuesta a la necesidad de mejorar las características del cultivo micobacteriano para poder brindar un mejor servicio de diagnóstico. Una mayor cantidad de muestras procesadas eventualmente permitirán decidir si es factible proponer al cultivo en este medio líquido como una alternativa superadora del realizado en medio HEYM, con respecto al tiempo de incubación y a la sensibilidad, sin disminuir su especificidad.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado mediante beca de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses que declarar.

Bibliografía

- Andrews AH. 2004. Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle. 2° Ed. Reimp. Reino Unido, Blackwell Publishing Company.
- Collins DM, Stephens DM, de Lisle GW. 1993. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Veterinary Microbiology*. 36(3-4):288-99.
- Collins, MT. 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 12(2):357-71.
- Merkal RS, Curran BJ. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied Microbiology*. 28:276-9.
- Morsella C, Paolicchi F. 2008. Aplicación de métodos de diagnóstico y control de paratuberculosis en Argentina. XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Guadalajara, México, pp. 37-43.
- Motiwala AS, Strother M, Theus NE, Stich RW, Byrum B, Shulaw WP, Kapur V, Sreevatsan S. 2005. Rapid detection and typing of strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

from broth cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(5):2111-7.
[doi: 10.1128/JCM.43.5.2111-2117.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2111-2117.2005)

Pozzato N, Gwozdz J, Gastaldelli M, Capello K, Ben CD, Stefani E. 2011. Evaluation of a rapid and inexpensive liquid culture system for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faeces. *Journal of Microbiological Methods*. 84(3):413-7.
[doi: 10.1016/j.mimet.2011.01.019](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.019)

Shin SJ, Han JH, Manning EJ, Collins MT. 2007. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(6):1941-8.
[doi:10.1128/JCM.02616-06](https://doi.org/10.1128/JCM.02616-06)

Soto JP, Kruze J, Leiva S. 2002. Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de fecas en rebaños lecheros infectados mediante el método de Cornell modificado. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 34(2):275-82.
[doi: 10.4067/S0301-732X2002000200013](https://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200013)

Stabel JR. 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(4) 375-80.

Whipple DL, Callihan DR, Jarnagin JL. 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 3(4):368-73.
[doi: 10.1177/104063879100300424](https://doi.org/10.1177/104063879100300424)

Whittington RJ. 2009. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(3):614-22.
[doi: 10.1128/JCM.01986-08](https://doi.org/10.1128/JCM.01986-08)

Whittington RJ, Whittington AM, Waldron A, Begg DJ, De Silva K, Purdie AC, Plain KM. 2013. Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to replace modified Bactec 12B medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(12):3993-4000.
[doi: 10.1128/JCM.01373-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01373-13)