

Zastosowanie substancji chemicznych w izolacji *Mycobacterium paratuberculosis* z mleka

AGNIESZKA WISZNIEWSKA, JOANNA SZTEYN, MARIA MONIKA FUS

Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn

Wiszniewska A., Szteyn J., Fus M. M.

Preliminary processing of milk samples in isolation of *Mycobacterium paratuberculosis*

Summary

Research on the occurrence of MAP cells in food of animal origin, especially in milk, was initiated after taking into consideration that paratuberculosis could be a zoonosis and reports that *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) survive pasteurization. Isolation of MAP from milk is difficult because of the composite milk structure and the low number of MAP cells in comparison with the number of cells of other bacteria.

The aim of the experiment was to find a method of preliminary processing of milk samples for the isolation of viable MAP cells. In the first part of the experiment the sensitivity of *Mycobacterium* sp. cells to effect of chemical substances like ammoniac, diethylether, petroleum ether, isopropanol, n-propanol, ethanol, urea and SDS was examined. The second part of the experiment was to specify how the mixture of select substances affects the viability of *M. smegmatis* in milk samples. For the analysis of the results of the preliminary processing of milk samples 4 substances were chosen: ammoniac 0.5%, diethylether 6%, petroleum ether 10% and SDS 0.1%.

Keywords: *Mycobacterium paratuberculosis*, milk

Wykrycie *Mycobacterium paratuberculosis* (MAP) w błonie śluzowej chorych na zapalenie końcowej części jelita krętego zwanej chorobą Crohna (3-5) przyczyniło się do rozwoju badań nad występowaniem tego drobnoustroju w środowisku i drogami zakażenia człowieka. Biorąc pod uwagę fakt, że zwierzęta są pierwotnym i głównym rezerwuarem prątków, przenoszenie zarazka ze zwierząt na ludzi jest bardzo prawdopodobne. Wykazano obecność *M. paratuberculosis* w sianie i mleku krów wykazujących objawy kliniczne paratuberkulozy oraz zakażonych bezobjawowo. MAP izolowano z 34% próbek mleka pochodzącego od krów zakażonych i ze 100% próbek mleka od krów chorych (19, 22). Uznanie paratuberkulozy za chorobę odzwierzęcą, jak i dane potwierdzające możliwość przeżycia przez ten drobnoustrój pasteryzacji przemysłowej skłaniają do podjęcia badań nad występowaniem pałeczek kwasoopornych w żywności zwierzęcego pochodzenia, a w szczególności w mleku. Badania te napotykają jednak na duże trudności wynikające ze złożonej struktury mleka, w obrębie której zachodzi wiele oddziaływań zarówno pomiędzy poszczególnymi fazami samego mleka, jak i mikroorganizmami w nim obecnymi. Dodatkową trudnością jest fakt, że MAP występuje w niewielkiej liczbie w porównaniu z ogólną liczbą drobnoustrojów w mleku (21), co wymaga zastosowania odpowiedniej metody koncentracji

drobnoustrojów w próbce. Jak wynika z raportu opublikowanego w Biuletynie FIL/IDF (10), powszechnie stosowanymi metodami koncentracji drobnoustrojów w mleku są procesy wirowania, sedymentacji i filtracji. Wydaje się jednak, że przy złożonej strukturze mleka i powinowactwie komórek MAP do tłuszczu, wynikającym z hydrofobowego charakteru ściany komórkowej i otoczki chroniącej komórki patogennych mykobakterii (17), procesy te nie gwarantują odpowiedniej koncentracji MAP w wykorzystywanym do dalszych badań osadzie. Herman (13), w celu zwiększenia czułości, wykorzystwała do wykrywania MAP w mleku metodą PCR wcześniej opracowaną metodę chemicznego przygotowania próbek mleka, stosowaną przy izolacji *Listeria monocytogenes*.

Rodzaj *Mycobacterium*, dzięki otoczce i dużej zawartości wosków w ścianie komórkowej, cechuje znaczna oporność na czynniki fizyczne i chemiczne (4, 11, 18, 20). Istnieje zatem prawdopodobieństwo, że zastosowanie substancji chemicznych może zwiększyć koncentrację żywych komórek MAP w badanym osadzie mleka.

Celem badań było opracowanie metody wykorzystującej substancje chemiczne w celu przygotowania próbek mleka do wykrywania obecności żywych komórek bakterii z rodzaju *Mycobacterium*, w tym także MAP.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na próbkach mleka surowego pobranych bezpośrednio w gospodarstwie oraz zawiesinę bakterii *Mycobacterium smegmatis*. Zawiesinę komórek bakterii użytą do inokulowania próbek mleka przygotowywano w następujący sposób: *M. smegmatis* posiewano na podłoże stałe BHI i inkubowano 72 godziny w temperaturze 37°C. Po okresie inkubacji zmyto z hodowle 0,05% roztworem Tween 20. Otrzymano zawiesinę bakterii o koncentracji komórek 10^6 - 10^7 w 1 ml. W badaniach użyty został szczep *Mycobacterium smegmatis*. O wyborze tego drobnoustroju zdecydowały takie cechy, jak: szybki wzrost na podłożach nie wymagający mykobaktyny i brak cech patogenności. Należy on bowiem do grupy prątków szybko rosnących, których hodowla *in vitro* zamiast minimum 4 tygodni, jak w przypadku MAP, wymaga od 3 do 5 dni. Brak konieczności dodatku mykobaktyny w znacznym stopniu obniża koszty badań.

W pierwszym etapie badań określono wrażliwość bakterii z rodzaju *Mycobacterium* na działanie substancji chemicznych (amoniaku, eteru dietylowego, eteru naftowego, izo-propanolu, n-propanolu, etanolu, mocznika i siarczanu sodowo-laurylowego – SDS).

Do próbek zawierających po 1000 μ l zawiesiny bakterii *M. smegmatis* dodano pojedynczo roztwory poszczególnych substancji chemicznych w stężeniach: amoniak (5; 4; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1%), eter dietylowy (25; 20; 16; 15; 13; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 2,5; 1,5; 1%), eter naftowy (15; 13; 10; 8; 5; 2,5; 1,5; 1%), izo-propanol (20; 16,5; 15; 13; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 2,5; 1,5; 1%), n-propanol (10; 7; 5; 2,5%), etanol (50; 44,5; 37,5; 31,5; 16,5%), mocznik 10M (45; 40; 35; 30; 25; 20; 15; 10; 5; 2,5%) i SDS (0,15; 0,1; 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04%). W badaniach wykorzystano koncentracje substancji chemicznych stosowane w izolacji *Brucella sp.* oraz stężenia niższe i wyższe. Tak przygotowane próbki inkubowano w 37°C przez 30 minut.

Po inkubacji próbki trzykrotnie wirowano (15 minut 14 000 obr./min). Powstały osad płukano: po pierwszym wirowaniu w 500 μ l płynu fizjologicznego, po drugim – w 250 μ l płynu fizjologicznego, a po ostatnim wirowaniu rozprowadzono w 0,05% roztworze Tween 20.

Z uzyskanej zawiesiny sporządzono rzędy rozcieńczeń dziesiętnych (10^{-1} - 10^{-7}). Każde rozcieńczenie wysiano następnie na 3 płytki ze stałym podłożem BHI. Posiewy inkubowano w 37°C przez 72 godziny, a następnie określono liczbę wyrosłych na płytkach kolonii bakteryjnych. Wynik podano w odniesieniu do 1 ml zawiesiny. Próbę kontrolną stanowiło 1000 μ l wyjściowej zawiesiny bakteryjnej poddanej tej samej procedurze bez dodatku badanych substancji chemicznych.

Drugim etapem badań było określenie wpływu mieszaniny wybranych substancji chemicznych na przeżywalność *M. smegmatis* w próbkach mleka.

Cztery próbki mleka surowego i cztery próbki mleka pasteryzowanego o objętości 150 ml umieszczono w próbkach wirówkowych (Beckman) o pojemności 250 ml. Z zawiesiny *M. smegmatis* wykonano trzy rozcieńczenia dziesiętne, którymi następnie inokulowano znajdujące się w próbkach mleko, tak aby uzyskać różną koncentrację komórek *M. smegmatis* w 1 ml. Do każdej uzyskanej w ten sposób próbki dodawano kolejno po 4 ml 25% roztworu NH_3 , 9,75 ml eteru dietylowego, 22,5 ml eteru naftowego i 2,1 ml SDS. Całość lekko wymieszano. Bezpośrednio po wymieszanu próbki wirowano dwukrotnie przez 15 minut przy 12 000 obr./min. Po pierwszym wirowaniu usunięto supernatant, a osad rozprowadzono w 10 ml płynu Ringera i przeniesiono do

mniej próbków. Po kolejnym wirowaniu powtórnie usunięto supernatant, a osad rozprowadzono w 10 ml 0,75% roztworu chlorku cetylopirydyny (CPC) i inkubowano przez 15 minut w celu wyeliminowania mikroflory saprofitycznej mleka. Następnie próbki wirowano dwukrotnie przez 15 minut przy 12 000 obr./min, a osad rozprowadzono w 10 ml płynu Ringera po pierwszym wirowaniu i w 10 ml 0,05% roztworu Tween 20 po drugim. Z tak przygotowanych próbek sporządzono rzędy rozcieńczeń dziesiętnych (10^{-1} - 10^{-7}). Każde rozcieńczenie wysiano na 3 płytki z podłożem BHI. Posiewy inkubowano w 37°C przez 72 h, a następnie policzono wyrosłe kolonie bakteryjne. Końcową liczbę komórek bakteryjnych podano w odniesieniu do 1 ml mleka. Doświadczenie powtórzono cztery razy.

Liczba komórek *M. smegmatis* w 1 ml zawiesiny określono metodą płytkową. Z zawiesiny bakterii *M. smegmatis*, która posłużyła do inokulowania próbek mleka, sporządzono rząd rozcieńczeń dziesiętnych (10^{-1} - 10^{-7}). Każde rozcieńczenie wysiano zostało na 3 płytki z podłożem BHI i inkubowane przez 72 h w temperaturze 37°C. Wyrosłe kolonie bakteryjne zostały policzone, a uzyskany wynik podawano, określając liczbę komórek bakterii w 1 ml.

Określono także wpływ mieszaniny wybranych substancji chemicznych na mikroflorę mleka.

Do trzech próbek mleka surowego o objętości 150 ml dodano substancje chemiczne, tak aby uzyskać stężenie w mieszaninie: amoniaku 0,5%, eteru dietylowego 6%, eteru naftowego 10% i SDS 0,1%. Następnie próbki poddano trzykrotnemu wirowaniu. Z uzyskanej zawiesiny sporządzono rozcieńczenia dziesiętne od 10^{-1} do 10^{-4} i każde z nich wysiano na 3 płytki z podłożem BHI. Posiewy inkubowano w 37°C przez 24 godziny. Po zakończonej inkubacji wyrosłe kolonie policzono, a wynik podano, określając liczbę komórek bakteryjnych w 1 ml próbki mleka. Doświadczenie powtórzono trzy razy. Ogólną liczbę drobnoustrojów w 1 cm^3 próbki mleka oznaczono metodą płytkową wg PN-93/A-86036 (15).

Wyniki i omówienie

Mleko, jako pierwszy pokarm ssaków, zawiera wszystkie niezbędne do rozwoju organizmu składniki: białko, tłuszcz, cukry, związki mineralne i witaminy. Wymienione składniki tworzą trzy fazy mleka: emulsyjną, którą stanowi rozproszony w wodzie tłuszcz mlekowy, koloidalną złożoną z miceli kazeinowych i molekularną zawierającą rozpuszczone w wodzie minerały, witaminy i drobnocząsteczkowe białka, takie jak np. albuminy. Obecna w mleku surowym flora bakteryjna ulega siłom oddziaływania poszczególnych faz. Drobnoustroje, w zależności od ich gęstości i budowy ściany komórkowej w warunkach podstoju, który jest jedną z naturalnych właściwości mleka, rozmieszczone są w objętości mleka nierównomiernie. Część unoszona jest przez kuleczki tłuszczu, część zaś ulega sedymentacji. Dlatego też chcąc wykryć szczególnie niewielką liczbę komórek bakterii występujących w mleku, potrzebna jest ich koncentracja w jak najmniejszej objętościowo wielkości próbki. Podczas poddawania mleka procesowi wirowania czy sedymentacji następuje rozdzielanie poszczególnych faz mleka. Większość drobnoustrojów, zarówno saprofitycznych, jak i patogennych obecnych w mle-

ku, w trakcie tych procesów zachowuje się podobnie jak białko i pozostaje w osadzie. W przypadku drobnoustrojów z rodziny *Mycobacteriaceae* część komórek zostaje unoszona wraz z tłuszczem mlecznym i pozostaje w śmietance, część zaś ulega sedymentacji (9, 14). Powinowactwo komórek bakterii z rodziny *Mycobacteriaceae* do fazy tłuszczowej mleka ma prawdopodobnie związek z obecnością w ich ścianie komórkowej długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, zwanych kwasami mukolidowymi (łańcuchy zawierają 60-90 cząsteczek węgla), tworzących wokół komórek patogennych mykobakterii, takich jak *M. tuberculosis complex* czy *M. avium complex*, otoczkę – kapsułę ochronną (7, 8, 16). Wydaje się, że przy wykrywaniu mykobakterii występujących w mleku w małej liczbie ujednoczenie struktury mleka może pomóc w podniesieniu czułości ich izolacji.

Zdolność rozpuszczania kuleczek tłuszczowych w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: eter, chloroform czy alkohole wykorzystano w metodzie chemicznej obróbki próbek mleka. W badaniach analizowano wrażliwość bakterii z rodzaju *Mycobacterium* na następujące związki chemiczne: amoniak, mocznik, eter naftowy, eter dietylowy, SDS oraz alkohole: n-propanol, iso-propanol i etanol.

Badane stężenia amoniaku w próbkach na poziomie 0,1-0,2% nie hamowały wzrostu *M. smegmatis*. Stężenia wyższe (0,3-1%) powodowały redukcję liczby komórek o jeden rząd logarytmiczny. Przy stężeniu 1,5% do 3% zawartości amoniaku w próbkach redukcja zwiększała się odpowiednio: 1,5% o 2 rzędy log; 2% o 3 rzędy log; 3% o 4 rzędy log. Wykorzystane w metodzie izolacji *L. monocytogenes* (12) 4% stężenie amoniaku okazało się zabójcze dla *M. smegmatis*. W ocenie wizualnej próbek mleka okazało się, że już przy stężeniu 0,5% widoczne są pierwsze zmiany w jego strukturze, brak oddzielenia fazy tłuszczowej.

Mocznik w zakresie stężeń 2,5%-15% nie wpływał na spadek liczby komórek *M. smegmatis*. Wyższe koncentracje – od 20% do 30% – obniżały liczbę bakterii w zawiesinie o jeden rząd logarytmiczny. Stężenia zaś 45% i wyższe działały na obecny w zawiesinie prątek bakteriobójczo. W metodzie opracowanej przez Herman i wsp. (12) mocznik stosowany był w celu precipitacji białek mleka, co pozwalało na lepsze oczyszczenie DNA bakteryjnego, niezbędnego do reakcji PCR. Właściwość ta nie jest konieczna przy izolacji żywych komórek MAP z mleka. Mocznik dodany do próbek mleka w stężeniach, które nie powodowały redukcji liczby komórek *M. smegmatis*, nie wywoływał zauważalnych wzrokowo zmian struktury mleka.

Eter dietylowy w stężeniach od 1,0% do 9,0% nie zmniejszał liczby komórek *M. smegmatis*. Liczba żywych komórek po 30-minutowym działaniu eteru kształtowała się na tym samym poziomie logarytmicznym, co liczba komórek w próbce kontrolnej. Począwszy od stężenia 10% eteru dietylowego w próbkach następuje gwałtowna redukcja liczby komórek bada-

nego szczepu. Stężenie, które było stosowane w metodzie wykrywania *L. monocytogenes*, tj. 20%, obniżało liczbę *M. smegmatis* o 4 rzędy log. Widoczne zmiany struktury mleka można było zauważyć już przy stężeniu rzędu 6%.

Eter naftowy nie wykazywał działania redukcyjnego w stosunku do *M. smegmatis* w stężeniach niskich, tj. do 10%, zaś stężenia wyższe od 13% do 15% powodowały zmniejszenie liczby komórek o 1 rząd log. Ocena wzrokowa próbek wykazała, że 10% zawartość eteru naftowego zmieniała już strukturę mleka.

Kolejnym wykorzystanym w badaniach związkiem był SDS. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że użyte w doświadczeniu stężenia SDS w różny sposób działały na komórki *M. smegmatis*. W zakresie stężeń od 0,04% do 0,1% nie wykazano wpływu na liczbę komórek MAP po 30-minutowej inkubacji w roztworze SDS. Wyjątkiem jest tu stężenie 0,07% SDS, w którym to we wszystkich sześciu powtórzeniach doświadczenia następowała redukcja liczby komórek o jeden rząd logarytmiczny. Tendencję tę obserwowano również przy inkubacji zawiesiny w stężeniu 1,5% SDS. W metodzie izolacji *L. monocytogenes*, która podobnie jak MAP jest patogenem wewnątrzkomórkowym, stosowano stężenia SDS rzędu 0,07% (12).

Wpływ użytych w doświadczeniu alkoholi: iso-propanolu, n-propanolu i etanolu na *M. smegmatis* był zróżnicowany. Stężenia iso- i n-propanolu niższe niż 8% i 7% nie wpływały na obniżenie liczby komórek *M. smegmatis*. Redukcja ta następowała w stężeniach wyższych, a działanie bakteriobójcze stwierdzono w zawiesinie, w której zawartość iso-propanolu wynosiła 13% i więcej. Użyte w badaniach stężenia etanolu były znacznie wyższe. Nawet stosowane w metodzie wykrywania *L. monocytogenes* w mleku stężenie 16,6% nie wpływało negatywnie na komórki badanego prątka. Wyższe koncentracje etanolu (31,4%; 37,44% i 50%) wykazywały działanie bakteriobójcze. Użyte stężenia alkoholi nie powodowały zmiany struktury mleka w temperaturze pokojowej. Wy tłumaczeniem tego zjawiska jest fakt, że alkohole są dobrym rozpuszczalnikiem tłuszczu mlekowego, ale dopiero po uprzednim jego podgrzaniu do temperatury obróbki wstępnej stosowanej w przemyśle mleczarskim, tj. 55°C (23).

Analizując uzyskane wyniki działania substancji chemicznych na komórki mykobakterii i obserwacje wpływu badanych związków na tłuszcz mlekowy, w celu przygotowania próbek mleka do izolacji MAP wybrano cztery związki chemiczne: amoniak w stężeniu 0,5%, eter dietylowy w stężeniu 6%, eter naftowy w stężeniu 10% i SDS w stężeniu 0,1%. Dokonując wyboru kierowano się wpływem tych substancji i ich stężeń zarówno na przeżywalność bakterii z rodziny *Mycobacteriaceae*, jak i na strukturę mleka. Założono także, że *M. avium subsp. paratuberculosis* dzięki polisacharydowej otoczce, która stanowi dodatkową

barierę ochronną, jest organizmem bardziej opornym na działanie czynników chemicznych i fizycznych niż *M. smegmatis* (8, 16). Zrezygnowano z zastosowania w metodzie mocznika i alkoholu: izo-propanolowego, n-propanolowego i etylowego.

Wpływ mieszaniny związków, wytypowanych w pierwszej części badań na strukturę mleka, dał pożądaną efekt jej ujednoczenia w procesie obróbki wstępnej. W tab. 1 przedstawiono wyniki doświadczenia przeprowadzonego w celu określenia przeżywalności *M. smegmatis* w próbkach mleka poddanych chemicznemu przygotowaniu. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że zastosowanie: amoniaku w stężeniu 0,5%, eteru dietylowego w stężeniu 6%, eteru naftowego w stężeniu 10% i SDS w stężeniu 0,1% jest efektywną metodą ujednoczenia struktury mleka i może być wykorzystana w procesie izolacji bakterii z rodzaju *Mycobacterium*. Dlatego też kolejnym etapem badań było określenie wpływu tych substancji na mikroflorę mleka.

Mleko surowe, bez względu na sposób pozyskiwania, zawiera pewną liczbę drobnoustrojów. Większość z nich do wytworzenia kolonii na podłożach mikrobiologicznych potrzebuje zwykle 24-48 h. Fakt ten utrudnia izolację ewentualnie występujących w mleku wolno rosnących bakterii MAP (1). Dodatkowo niewielka liczba MAP w 1 ml powoduje konieczność zagęszczenia większych objętościowo próbek mleka. Wiąże się z tym zwiększenie liczby pozostałej mikroflory. Dlatego też w dotychczasowych metodach izolacji MAP stosowano dekontaminację. Jak wykazały przeprowadzone badania, zastosowanie opisanych substancji chemicznych znacznie redukuje florę bakteryjną występującą w mleku (tab. 2). Uzyskano obniżenie ogólnej liczby drobnoustrojów średnio o dwa-trzy rzędy logarytmiczne. Redukcja mikroflory mleka nawet na tym poziomie nie jest jednak wystarczająca dla stworzenia dobrych warunków do izolacji *M. avium subsp. paratuberculosis* z mleka. Dlatego też konieczne jest nadal stosowanie dekontaminacji próbek mleka w roztworze CPC, ale proces ten można skrócić do 15 minut.

Tab. 1. Wpływ wybranych substancji chemicznych na przeżywalność *M. smegmatis* w próbkach mleka

próbki kontrolnej	mleka surowego poddanego działaniu substancji chemicznych
$3,35 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$
$5,55 \times 10^5$	$3,05 \times 10^5$
$2,60 \times 10^6$	$9,55 \times 10^5$
$2,80 \times 10^7$	$1,03 \times 10^7$

Tab. 2. Wpływ wybranych substancji chemicznych na mikroflorę mleka surowego

Ogólna liczba drobnoustrojów w 1 ml mleka surowego	
przed dodaniem substancji chemicznych	po dodaniu substancji chemicznych
$6,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$
$4,9 \times 10^4$	$4,6 \times 10^1$
$2,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^2$

Wnioski

1. Chemiczne przygotowanie próbek mleka z użyciem: amoniaku w stężeniu 0,5%, eteru dietylowego w stężeniu 6%, eteru naftowego w stężeniu 10% i SDS w stężeniu 0,1% powoduje ujednoczenie jego struktury i nieznaczną redukcję liczby bakterii z rodzaju *Mycobacterium*.

2. Zastosowanie substancji chemicznych pozwala na skrócenie czasu dekontaminacji próbek mleka do 15 minut.

Piśmiennictwo

1. Anon.: European Commission, Directorate – General Health and Consumer Protection.: Possible links between crohn's disease and paratuberculosis. Rep. Sci. Comm. Anim. Health Anim. Welfare. Brussels 2000, SANCO/B3/R16/2000.
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Group 21. The Mycobacteria (ed. Stanley J. T.) Williams & Wilkins, Baltimore 1989.
3. Chiodini R. J., Van Kruiningen H. J., Thayer W. R., Coutu J. A.: The spheroplastic phase of Mycobacteria isolated from patients with crohn's disease. J. Clin. Microbiol. 1986, 24, 357-363.
4. Chiodini R. J., Hermon-Taylor J.: The thermal resistance of Mycobacterium paratuberculosis in raw milk under conditions simulating pasteurization. J. Vet. Diagn. Invest. 1993, 5, 629-631.
5. Chiodini R. J., Rossiter C. A.: Paratuberculosis: a potential zoonosis? Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.) 1996, 12, 457-467.
6. Clarkston W. K., Presti M. E., Petersen P. F., Zachary P. E. Jr., Fan W. X., Leonard C. L., Vernava A. M., Lango W. E., Kreeger J. M.: Role of Mycobacterium paratuberculosis in crohn's disease – a prospective controlled study using polymerase chain reaction. Dis. Colon Rectum 1998, 41, 195-199.
7. Frehel C., de Chastellier C., Lang T., Rastogi N.: Evidence of inhibition of fusion of the lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with the pathogenic Mycobacterium avium. Infect. Immun. 1986, 52, 252-262.
8. Frehel C., Ryter A., Rastogi N., David H. L.: The electron transparent zone in phagocytized Mycobacterium avium and other Mycobacteria: formation, persistence and role in bacterial survival. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 1986, 137B, 239-257.
9. Giese S. B., Ahrens P.: Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk from clinically affected cows by per and culture. Vet. Microbiol. 2000, 77, 291-297.
10. Grant I. R., Rowe M. T.: Report on methods for the detection and enumeration of viable Mycobacterium paratuberculosis in milk and milk products. Bull. IDF 2001, 362, 41-52.
11. Grant I. R., Rowe M. T., Dundee L., Hitchings E.: Mycobacterium paratuberculosis: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. Int. J. Dairy. Tech. 2001, 54, 2-13.
12. Herman L., De Block J., Moermans R.: Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 24 milliliters of raw milk by two-step PCR with nested primers. Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61, 817-819.
13. Herman L., Reybroeck W., D'Haese E., Zorman T., Nelis H.: Detection and enumeration of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk. Proc. 6th Internat. Colloquium on Paratuberculosis, International Association for Paratuberculosis, Melbourne 1999, s. 543-552.
14. Millar D., Ford J., Sanderson J., Withey S., Tizard M., Doran T., Hermon-Taylor J.: IS900 PCR to detect Mycobacterium paratuberculosis in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales. Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62, 3446-3452.
15. Polska Norma PN-93 A-86036. Mleko surowe do skupu. Badania mikrobiologiczne i cytologiczne.
16. Rastogi N., Hellio R.: Evidence that the capsule around mycobacteria grown in axenic media contains mycobacterial antigens: implications at the level of cell envelope architecture. FEMS Microbiol. Lett. 1990, 70, 161-166.
17. Rastogi N., Legrand E., Sola C.: The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2001, 20, 21-54.
18. Schulze-Roebecke R., Buchholtz K.: Heat susceptibility of aquatic Mycobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 1992, 58, 1869-1873.
19. Sung N., Collins M. T.: Thermal tolerance of Mycobacterium paratuberculosis. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64, 999-1005.
20. Stabel J. R., Steadham E. M., Bolin C. A.: Heat inactivation of Mycobacterium paratuberculosis in raw milk: are current pasteurization conditions effective? Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63, 4975-4977.
21. Sweeney R. W., Whitlock R. H., Rosenberger A. E.: Mycobacterium paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J. Clin. Microbiol. 1992, 30, 166-171.
22. Taylor T. K., Wilks C. R., McQueen D. S.: Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the milk of a cow with johnes's disease. Vet. Rec. 1981, 109, 532-533.
23. Ziarka S. (red.): Mleczarstwo – zagadnienia wybrane. T. 1, ART, Olsztyn 1997.

Adres autora: dr Agnieszka Wiszniewska, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn; e-mail: aga@uwm.edu.pl