

# Porównanie wzrostu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* na trzech podłożach mikrobiologicznych

AGNIESZKA WISZNIEWSKA, JOANNA SZTEYN, MARIA MONIKA FUS

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

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

## Comparison of growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on three microbiological media

### Summary

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) growth is difficult under laboratory conditions. Despite significant progress in research on the isolation of MAP, the only method to reveal viable cells in samples is cultivation on microbiological media. O.I.E recommends three media for isolation and cultivation of MAP: Herrold egg yolk medium (HEYM), Löwenstein–Jensen medium and Middlebrook medium, all of them with the addition of mycobactin J. The aim of the study was to compare the rapidity and intensity of the growth of MAP isolated from contaminated milk samples on the above-mentioned media with and without the addition of antibiotics. The fastest growth of MAP (after 5 weeks of incubations) was obtained on HEYM slops, a little slower MAP growth was on Löwenstein–Jensen slops (6–9 weeks). There was no growth on Middlebrook medium with antibiotics after 16 weeks of incubation. Chemical preparation and decontamination of milk samples allow for the application of microbiological media without antibiotics, which increases the time of MAP growth.

**Keywords:** *Mycobacterium paratuberculosis*, milk

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), czynnik etiologiczny choroby Johnego bydła, wymieniany jest również jako jeden z czynników mogących wywołać u ludzi chorobę Crohna – przewlekłe wrzodziejące zapalenie końcowej części jelita krętego (2, 3, 12, 17). Uważa się, że głównym źródłem zakażenia ludzi mogą być zwierzęta i żywność zwierzęcego pochodzenia. Jak wynika z danych piśmiennictwa, około 34% krów mlecznych jest zakażonych bezobjawowo i do 100% krów chorych wydała żywe prątki z mlekiem (19–21). Wyniki badań skuteczności pasteryzacji przemysłowej wskazują, że działanie temperatury 63°C przez 30 minut oraz 72°C przez 15 sekund nie wystarcza do całkowitej inaktywacji komórek MAP występujących w zakażonych próbkach mleka surowego (4, 6–11, 14, 18). Okazało się bowiem, że *M. paratuberculosis* jest jednym z najbardziej termoopornych drobnoustrojów i obecność żywych prątków MAP w mleku może stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi.

Mimo znacznego postępu w badaniach nad izolacją MAP, dotychczas jedyną metodą pozwalającą stwierdzić obecność żywych komórek bakteryjnych w badanych próbkach jest hodowla drobnoustrojów na podłożach mikrobiologicznych. MAP jest organizmem

trudnym do hodowli *in vitro*. Czas potrzebny do uzyskania kolonii jest długi i wynosi nie mniej niż 4 tygodnie (najczęściej 12–14 tygodni). Hodowla na podłożach z dodatkiem mycobactin J jest istotnym czynnikiem pozwalającym na odróżnienie MAP od innych drobnoustrojów należących do *Mycobacterium avium* complex (1, 13).

Większość dotychczasowych badań nad izolacją MAP dotyczyła wykrywania komórek prątków w kale. Potwierdzeniem obecności był wzrost na jednym z podłoży, po wcześniejszym przeprowadzeniu dekontaminacji próbek kału. Standardową procedurę stosowaną do tego celu opisali badacze holenderscy (15). Nieliczne laboratoria, dodatkowo, dla szybkiego potwierdzenia wzrostu MAP wykorzystują system BACTEC. Jest to radiometryczny system hodowli pozwalający uzyskać odczyt wzrostu MAP już po 2–3 tygodniach inkubacji. Po raz pierwszy systemu stworzonego przez firmę Becton Dickinson użyli do wykrywania MAP Collins i wsp. (5). Wymaga on specjalistycznej aparatury i zastosowania radiometrycznie znakowanego węgla C18, co jest przyczyną nieznacznej dostępności metody (16).

Międzynarodowy Urząd Epizooecji (O.I.E.) zaleca do izolacji i hodowli MAP trzy podłoża: Herrolda

z żółtkiem jaja kurzego (HEYM), Middlebrook 7H9 oraz Löwensteina-Jensena, wszystkie z dodatkiem mycobactin J. W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji dotyczących porównania przydatności wymienionych podłoży do badań nad występowaniem MAP w mleku. Dlatego celem badań było porównanie szybkości i intensywności wzrostu MAP na wymienionych podłożach.

### Materiał i metody

*M. avium subsp. paratuberculosis* szczep nr 2276 posiadano na skosy podłoża Herrolda z żółtkiem jaja kurzego (HEYM) i mycobactin J (Synbiotics Europe). Hodowle inkubowano 6 miesięcy w temperaturze 37°C. Po tym czasie zmywano je 0,05% roztworem Tween 20. Koncentrację komórek MAP w 1 ml uzyskanej zawiesiny określano metodą instrumentalną z użyciem aparatu BactoScan.

Cztery 150 ml próbki mleka surowego inoculowano zawiesiną *M. paratuberculosis* tak, aby uzyskać koncentrację komórek MAP odpowiednio  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  i  $10^2$  w 1 ml mleka. Każdą z próbek poddano działaniu związków chemicznych i dekontaminacji. Do każdej próbki mleka dodawano kolejno po: 4 ml 25% roztworu  $\text{NH}_3$ , 9,75 ml eteru dietylowego, 22,5 ml eteru naftowego i 2,1 ml siarczanu sodowo-laurylowego (SDS) i lekko wymieszano. Następnie poddano dwukrotnemu wirowaniu przez 15 minut przy 12 000 obr./min. Po pierwszym wirowaniu usunięto supernatant, a osad rozprowadzono w 10 ml płynu Ringera i przeniesiono do mniejszej probówki. Po kolejnym wirowaniu powtórnie usunięto supernatant, a osad rozprowadzono w 10 ml 0,75% roztworu chlorku cetylopirydyny (CPC). Tak przygotowane próbki inkubowano przez 15 minut w celu wyeliminowania mikroflory saprofitycznej mleka, po czym 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. Uzyskaną zawiesinę wysiewano na skosy z podłożami: Löwensteina-Jensena, Middlebrook 7H9 i HEYM (po 3 skosy z każdą pożywką). Pożywki użyto w wersji bez i z antybiotykami (wankomycyna i kwas nalidyksowy w ilości 20 mg na 1 litr podłoża). Wszystkie zawierały dodatek mycobactin J w ilości 5 mg w 1 litrze podłoża. Hodowle inkubowano w temperaturze 37°C. Równocześnie dla potwierdzenia zależności wzrostu MAP od obecności czynnika chelatującego żelazo, każdą próbkę wysiano na 2 skosy HEYM, 2 skosy Middlebrook 7H9 oraz 2 skosy z podłożem Löwensteina-Jensena bez dodatku mycobactin J. Obserwację wzrostu rozpoczęto od 4. tygodnia inkubacji. Rejestrowano moment pojawienia się pierwszych kolonii, ich wygląd oraz szybkość wzrostu.

### Wyniki i omówienie

Pierwsze kolonie zaobserwowano po 5 tygodniach inkubacji na skosach podłoża HEYM bez dodatku antybiotyków. Widoczne bardzo drobne, mierzące około 1 mm, gładkie kolonie koloru biało-kremowego stwierdzono zarówno na skosach, na których zostały posiane próbki mleka o początkowej koncentracji komórek MAP na poziomie  $10^5$ , jak i  $10^2$  w 1 ml. W ba-

Tab. 1. Porównanie intensywności i szybkości wzrostu *M. avium subsp. paratuberculosis* po 16 tygodniach inkubacji

Podłoże	Koncentracja komórek MAP w 1 ml mleka			
	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$
HEYM	+++	+++	+++	+++
HEYM + antyb.	+++	+++	+++	++ +/-
Löwensteina-Jensena	++ +/-	++ +/-	++ +/-	++
Löwensteina-Jensena + antyb.	++	++	+	+
Middlebrook 7H9	+/-	+/-	+/-	-
Middlebrook 7H9 + antyb.	-	-	-	-

Objaśnienia: +++ kolonie bardzo dobrze widoczne, duże (do 2 mm średnicy) i w dużej liczbie odpowiadającej poziomowi zakażenia próbki; +++/- kolonie bardzo dobrze widoczne, nieco mniejsze, w dużej liczbie odpowiadającej poziomowi zakażenia próbki; ++ kolonie dobrze widoczne, drobne (1-1,5 mm), w mniejszej liczbie; + kolonie widoczne, drobne w liczbie znacznie mniejszej niż poziom zakażenia próbki; +/- kolonie bardzo drobne (ok. 0,5 mm), pojedyncze; - brak wzrostu

daniach przeprowadzonych przez Żórawskiego i wsp. (22) na próbkach kału także uzyskano wzrost *M. paratuberculosis* na podłożu HEYM po pięciu tygodniach od inokulacji. Tydzień później zaobserwowano wzrost na skosach podłoża HEYM z dodatkiem antybiotyków i Löwensteina-Jensena bez antybiotyków. Podobnie jak na podłożu HEYM, widoczny wzrost nastąpił zarówno z próbek, w których koncentracja MAP w 1 ml mleka wynosiła  $10^5$ , jak i  $10^2$ . Wzrost na skosach z podłożem Löwensteina-Jensena z dodatkiem antybiotyków uzyskano dopiero po dziewięciu tygodniach inkubacji. Na zmodyfikowanym podłożu Middlebrook 7H9 bez antybiotyków uzyskano wzrost po dwunastu tygodniach inkubacji. Kolonie były drobne, o nierównej, chropowatej powierzchni, przypominające wyglądem kolonie *M. tuberculosis*. Po szesnastu tygodniach prowadzonych obserwacji nie uzyskano wzrostu w posiewach z próbek o najniższej koncentracji MAP ( $10^2$ ). Na podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem antybiotyku nie było widocznego wzrostu w wymienionym okresie.

Obserwacje prowadzone do szesnastego tygodnia inkubacji wykazały nieznaczne różnice w intensywności wzrostu MAP na podłożu HEYM zarówno z dodatkiem, jak i bez antybiotyków. Uzyskano duże, do 2 mm średnicy, kolonie w liczbie odpowiadającej poziomowi kontaminacji próbki mleka. Jedynie w przypadku próbki zakażonej najmniejszą liczbą komórek MAP na skosach z dodatkiem antybiotyków kolonie były nieco mniejsze. Na podłożu Löwensteina-Jensena bez dodatku antybiotyków wzrost był podobny, a kolonie tylko nieco mniejsze od tych na podłożu HEYM. Wzrost MAP na podłożu Löwensteina-Jensena z dodatkiem antybiotyków był widocznie słabszy niż na pozostałych podłożach, kolonie były mniejsze i mniej liczne. Na podłożu Middlebrook 7H9 uzyskano pojedyncze, bardzo drobne kolonie nie przekraczające

1 mm średnicy. Porównanie intensywności wzrostu MAP na poszczególnych podłożach po szesnastu tygodniach inkubacji przedstawiono w tab. 1.

Biorąc pod uwagę fakt, że próbki mleka zakażonego doświadczalnie szczepem MAP wysiano na znaczną liczbę skosów z podłożem mikrobiologicznym, a w omawianym okresie inkubacji stwierdzono tylko na jednym skosie obok charakterystycznych dla MAP kolonii również i inne, można stwierdzić, że dodatek antybiotyków do podłoża przy izolacji MAP nie jest konieczny. Poddanie próbek mleka przygotowaniu chemicznemu i dekontaminacji pozwala zatem na zastosowanie do hodowli podłoży bez antybiotyków, co skraca czas oczekiwania na wzrost MAP.

Potwierdzeniem przynależności wyhodowanych kolonii do *M. avium subsp. paratuberculosis* był brak wzrostu drobnoustrojów na podłożu nie zawierającym mycobactin J. Zależność wzrostu od obecności czynnika chelatującego żelazo jest, obok morfologii kolonii i czasu wzrostu, cechą pozwalającą na przypisanie drobnoustroju do *M. avium subsp. paratuberculosis* (1, 13).

### Wnioski

1. Najbardziej przydatne do izolacji MAP z próbek mleka jest podłoże Herrolda z żółtkiem jaja kurzego (HEYM).
2. Na podłożu Löwensteina-Jensena wzrost MAP jest wolniejszy niż na podłożu HEYM.
3. Przygotowanie chemiczne i dekontaminacja próbek mleka pozwala na zastosowanie do hodowli podłoży bez dodatku antybiotyków, co skraca czas uzyskania widocznego wzrostu MAP.

### Piśmiennictwo

1. Anon.: European Commission, Directorate – General Health and Consumer protection: Possible Links Between Crohn's Disease and Paratuberculosis. Raport of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Bruksela 2000, SANCO/B3/R16/2000.
2. Chiodini R. J.: Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two diseases entities. Clin. Microbiol. Rev. 1980, 2, 90-117.
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. Collins D. M., Gabric D. M., de Lisle G. W.: Identification of two groups of Mycobacterium paratuberculosis strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 1990, 28, 1591-1596.
6. Gao A., Mutharia L., Chen S., Rahn K., Odumeru J.: Effect of pasteurization on survival of Mycobacterium paratuberculosis in milk. J. Dairy Sci. 2002, 85, 3198-3205.
7. Grant I. R., Ball H. J., Neill S. D., Rowe M. T.: Inactivation of Mycobacterium paratuberculosis in cow's milk at pasteurization temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62, 631-636.
8. Grant I. R., Ball H. J., Rowe M. T.: Effect of high temperature, short time (HTTS) pasteurisation on milk containing low numbers of Mycobacterium paratuberculosis. Lett. Appl. Microbiol. 1998, 26, 166-170.
9. Grant I. R., Ball H. J., Rowe M. T.: A pilot survey of raw and commercially pasteurised cows' milk in Northern Ireland. Paratuberculosis. Newsletter 1998, 10, 5-8.
10. Hope A. F., Tulk P. A., Condron R. J.: Pasteurization of Mycobacterium paratuberculosis in whole milk. Proc. Fifth Internat. Colloquium on Paratuberculosis, Madison, Wisconsin 1996, 377-382.
11. Keswani J., Frank J. F.: Thermal inactivation of Mycobacterium paratuberculosis in milk. J. Food Prot. 1998, 61, 974-978.
12. Lipiec M.: Paratuberkuloza jako zoonoza. Medycyna Wet. 2003, 59, 191-194.
13. Manning E. J. B., Collins M. T.: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2001, 20, 133-150.
14. Meylan M., Rings D. M., Shulaw W. P., Kowalski J. J., Bech-Nielsen S., Hoffsis G. F.: Survival of Mycobacterium paratuberculosis and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. Am. J. Vet. Res. 1996, 57, 1580-1585.
15. Muskens J., Man M. H., Elbers A. R. W., Van Maanen K., Bakker D.: The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle. J. Vet. Med. 2003, B 50, 231-234.
16. Nielsen S. S., Nielsen K. K., Huda A., Condron R., Collins M. T.: Diagnostic techniques and practices with regard to milking animals. IDF Task Force on Mycobacterium paratuberculosis. Bull. IDF 2000, 1999-2000.
17. Sajduda A., Dela A., Dziadek J.: Współczesne problemy epidemiologii gruźlicy. Post. Mikrobiol. 1997, 4, 383-404.
18. 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.
19. Streeter R. N., Hoffsis G. F., Bech-Nielsen S., Shulaw W. P., Rings D. M.: Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am. J. Vet. Res. 1995, 56, 1322-1324.
20. Sung N., Collins M. T.: Thermal tolerance of Mycobacterium paratuberculosis. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64, 999-1005.
21. Taylor T. K., Wilks C. R., McQueen D. S.: Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the milk of a cow with Johne's disease. Vet. Rec. 1981, 109, 532-533.
22. Żorawski C., Lipiec M.: Przydatność różnych podłoży i preparatów czynnika wzrostowego mycobactin do hodowli Mycobacterium paratuberculosis. Medycyna Wet. 1993, 49, 377-379.

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

## STAN ZAKAŻNYCH CHOROBY ZWIERZĄT W POLSCE

według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii z czerwca 2004 r.\*)

1. **Gąbczasta encefalopatia bydła (BSE)** – wystąpiła w województwie łódzkim (1-1).
2. **Wścieklizna zwierząt domowych** – wystąpiła w województwie lubelskim (1-1) i mazowieckim (1-1). Zanotowano ją u 2 kotów.
3. **Wścieklizna zwierząt dzikich** – wystąpiła w 3 województwach: dolnośląskim (1-1), warmińsko-mazurskim (1-1) i wielkopolskim (1-2). Zanotowano ją u 1 lisa, 1 jenota i 2 nietoperzy.
4. **Zgnielec amerykański pszczoł** – wystąpił w 4 województwach: lubelskim (5-6), małopolskim (2-3), warmińsko-mazurskim (1-1) i zachodniopomorskim (1-1).
5. **Wirusowa posocznica krwotoczna (VHS)** – wystąpiła w województwie pomorskim (1-1).

\*) W nawiasach podano liczbę powiatów i miejscowości, w których choroba została stwierdzona w okresie sprawozdawczym.