

Występowanie *Mycobacterium paratuberculosis* w mleku surowym^{*)}

JOANNA SZTEYN, AGNIESZKA WISZNIEWSKA-ŁASZCZYCH, ALEKSANDRA RUSZCZYŃSKA

Zespół Higieny Produktów Zwierzęcych Katedry Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 14, 10-718 Olsztyn

Szteyn J., Wiszniewska-Łaszczych A., Ruszczyńska A.

Occurrence of *Mycobacterium paratuberculosis* in samples of raw milk

Summary

The aim of the study was to determine the frequency of *Mycobacterium paratuberculosis* occurrence in raw milk samples from north-eastern Poland. Samples of udder milk were collected from herds in which seropositive reactions on paratuberculosis had been confirmed in samples of bulk tank milk from production farms. Standardization and decontamination of milk samples from fast growing microflora was carried out prior to research which was performed by using the culture method. PCR technique was used to distinguish MAP from other mycobacterium, thus enabling the IS-900 fragment to be detected. The presence of MAP was confirmed in 2.4% of udder milk samples from north-eastern Poland, but none was confirmed in bulk tank milk samples from this region.

Keywords: *Mycobacterium paratuberculosis*, raw milk

Mycobacterium paratuberculosis (MAP) kwasooporny prątek należący do grupy wewnątrzkomórkowych patogenów (MAIS – *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum*) jest przyczyną przewlekłej, zakaźnej i zaraźliwej choroby przeżuwaczy – paratuberkulozy. MAP posiada powinowactwo do błony śluzowej i podśluzowej jelita czczego i biodrowego, gdzie wywołuje przewlekły, przerostowy stan zapalny (5, 7, 20). Podobnie jak inne prątki, dostaje się do komórek M w nabłonku pokrywającym kępkę Peyera na drodze endocytozy, a po sfagocytowaniu przez makrofagi zasiedla jelito. Głównym siedliskiem MAP jest przewód pokarmowy, prątek może jednak bytować w innych narządach – wątrobie, śledzionie, węzłach chłonnych nadwymiennych, wymieniu, narządach płciowych (8, 12, 18, 19, 21, 31). Główną drogą transmisji MAP do środowiska jest kał zwierząt chorych i zakażonych bezobjawowo. Obecność zarazka w gruczole mlekowym wiąże się też z jego wydalaniem przez siałkę i mleko, które może stanowić źródło zakażenia nie tylko dla cieląt, ale także dla innych gatunków zwierząt i człowieka. Wyizolowanie MAP z błony śluzowej ludzi dotkniętych chorobą Crohna nasunęło podejrzenie, że może być on jednym z czynników przyczynowych choroby (3, 4). Rola prątka w powstawaniu schorzenia u ludzi nie jest dotychczas w pełni wyjaśniona (11, 25), znana jest natomiast duża oporność zarazka na czynniki fizyczne i chemiczne uwarunkowana swoją, trzwarstwową budową ściany komórkowej. Charakteryzuje się ona dużą zawartością lipidów, wynoszącą około 30-40% całkowitego jej składu (1, 2, 16). Patogenne szczepy prątków zawierają oprócz ściany komórkowej, dodatkową strukturę otoczkową – CAP (23), zbudowaną z cukrów oraz lipoarabinianu i liposacharydów zakotwiczonych resztami kwasów tłuszczowych w warstwie elektronowo-transparent-

nej ściany komórkowej bakterii, co determinuje łączenie się komórek MAP w skupiska (clump). Dzięki temu wzrasta oporność prątka na czynniki fizyczne i chemiczne (23). Badania potwierdziły znaczną oporność MAP na działanie zarówno niskich, jak i wysokich temperatur oraz antybiotyków i środków dezynfekcyjnych (13-15, 17, 24). Wysoka termooporność prątka (26, 30) powoduje, że może on przeżywać warunki przemysłowej pasteryzacji mleka HTST (high-temperature short-time) (9). Ocena ryzyka zagrożenia, jakie niesie obecność MAP w mleku, wymaga podjęcia badań nad jego występowaniem w mleku surowym i poddanym działaniu wysokiej temperatury.

Celem badań było określenie, przy użyciu metod hodowlanych, częstości występowania MAP w próbkach mleka surowego z północno-wschodnich terenów Polski.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 81 próbkach mleka surowego, wymieniowego, pobranego od krów w wieku powyżej 3 lat, ze stada o udokumentowanym występowaniu dodatnich odczynów serologicznych w kierunku paratuberkulozy i 56 próbkach mleka zbiorczego, oborowego z gospodarstw produkcyjnych. Próbkę pobrano zgodnie z zasadami zawartymi w normie (22) i dostarczono do laboratorium. Izolacja MAP z mleka wymagała ujednolicenia jego struktury poprzez określone postępowanie chemiczne. Do 150 ml mleka dodawano: 4 ml amoniaku 25%, 9,75 ml eteru dwuetylowego, 22,5 ml eteru naftowego i 2,1 ml siarczanu sodowolaurylowego (SDS), a następnie wirowano przy 8 tys. obrotów na minutę przez 15 minut w temperaturze 20°C. Supernatant zlewano, a do osadu dodawano 10 ml jałowej wody destylowanej po czym poddawano wirowaniu w tych samych warunkach jak poprzednio. Po powtórny oddzieleniu supernatantu przeprowadzano dekontaminację mikroflory szybko rosnącej w osadzie poprzez dodanie 10 ml 0,75% wodnego roztworu chloru cetylopirydyny. Po 15 minutach próbki ponownie odwirowywano, zlewano supernatant, a do pozostałości dodawano 5 ml

^{*)} Badania wykonane w ramach projektu badawczego KBN nr: 2 PO6T 025 27.

jałowej wody destylowanej. Zawiesinę o objętości 100 µl wysiewano na podłoże HEYM z dodatkiem mykobaktyny J. Hodowlę inkubowano przez 16 tygodni w temperaturze 37°C. Na podstawie cech morfologicznych kolonii wytypowano szczepy do dalszych badań w celu potwierdzenia przynależności do MAP. Ze skosów pobrano eż kolonie i zawieszono je w 50 µl płynu Ringera. Dla uzyskania materiału genetycznego zawiesinę poddawano działaniu mieszaniny NaOH/SDS, poprzez dodanie 25 µl 0,1 M NaOH i 25 µl 0,25% SDS i inkubację w temp. 90°C przez 17 minut. Tak przygotowaną próbkę przetrzymywano w lodzie do momentu przeprowadzenia reakcji PCR, którą wykonywano zgodnie z opisaną metodyką (33).

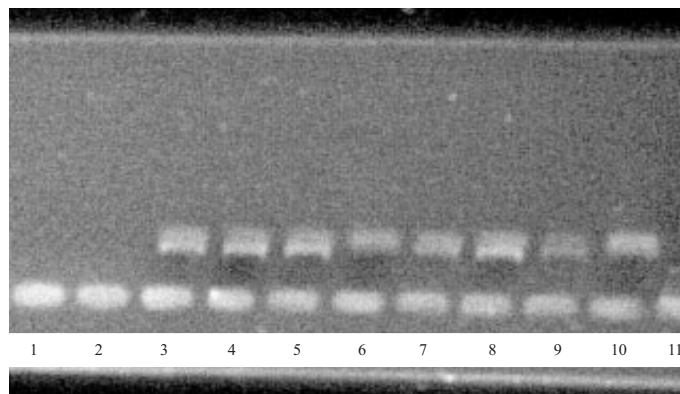
Wyniki i omówienie

Stosując opisaną metodę dekontaminacji i hodowli na podłożu HEYM z dodatkiem mykobaktyny J, wyizolowano 43 szczepy o charakterystycznych dla rodzaju *Mycobacterium* cechach morfologicznych. Kolonie po 4-miesięcznej inkubacji były bardzo drobne, regularne, mierzące około 1-2 mm, gładkie, koloru białło-kremowego. Dla odróżnienia MAP od innych prątków konieczne było zastosowanie techniki PCR, gdyż MAP wykazuje znaczne podobieństwo fenotypowe i genotypowe (zgodność wynosi 99%) do *Mycobacterium avium*. Wykrycie w 1984 r. elementu insercyjnego – IS 900, typowej tylko dla MAP sekwencji kwasu DNA (6), pozwala na odróżnienie obu prątków (10). Stwierdzenie w dwóch wyizolowanych szczepach fragmentu insercyjnego IS-900 potwierdziło występowanie MAP w próbkach mleka wymieniowego, pobranych ze stada, w którym występowały dodatnie odczyny serologiczne w kierunku paratuberkulozy (ryc. 1). Prątki z rodzaju *Mycobacterium* izolowano metodą hodowlaną z próbek mleka wymieniowego i siary pobranych od zwierząt wykazujących kliniczne objawy choroby (8, 28, 32), lecz nie potwierdzano wówczas obecności w wyizolowanych komórkach fragmentu IS-900, co jest obecnie konieczne dla stwierdzenia obecności MAP. Obecnie jednak paratuberkuloza występuje znacznie częściej w postaci podklinicznej, która może przebiegać w dwóch stadiach z wydalaniem lub bez wydalania prątków (27). MAP stwierdzano w 30% próbek mleka i siary pobranych od zwierząt nie wykazujących klinicznych objawów paratuberkulozy, a wydających prątki z kałem (29). W badaniach własnych wykazano obecność MAP w 2,47% próbek mleka wymieniowego ze stada, w którym wystąpiły odczyny serologiczne dodatnie w kierunku paratuberkulozy, nie stwierdzono natomiast obecności prątków w próbkach mleka zbiorczego z rejonu północno-wschodniej Polski.

Ze względu na potencjalne zagrożenie dla ludzi, jakie może stwarzać obecność *Mycobacterium paratuberculosis*, celowe wydaje się przeprowadzenie badań stad byłą mlecznego w kierunku paratuberkulozy.

Piśmiennictwo

- Asselienau J., Laneelle G.: Mycobacterial lipids: A historical perspective. *Frontiers Biosci.* 1998, 3, 164-174.
- Azuma I., Yamamura Y., Misaki A.: Isolation and characterization of arabinose mycolate from firmly bound lipids of mycobacteria. *J. Bact.* 1969, 98, 331-333.
- Chiodini R. J., Rossiter C. A.: Paratuberculosis: a potential Zoonosis? *Vet. Clin. N. Am.* 1996, 12, 457-467.
- Chiodini R. J.: Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989, 2, 90-117.
- Cocito C., Gilot P., Coene M., De Kesel M., Poupart P., Vannuffel P.: Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994, 7, 328-345.
- Collins D. M., Gabric D. M., de Lisle G. W.: Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989, 60, 175-178.
- Corpa J. M., Garrido J. F., Marin G., Perez V.: Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. compl. Path.* 2000, 122, 255-265.



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny produktów PCR otrzymanych z DNA szczepów *M. paratuberculosis*

Objaśnienia: Poszczególne ścieżki: 1, 2 – kontrola negatywna reakcji PCR; 3, 4 – kontrola pozytywna reakcji PCR (DNA otrzymane ze szczepu ATCC 19698); 5, 6 – kontrola pozytywna ekstrakcji DNA z komórek szczepu ATCC 19698; 7, 8 – szczep I wyizolowany z próbki mleka wymieniowego; 9, 10 – szczep II wyizolowany z próbki mleka wymieniowego; 11 – reakcja negatywna

- Doyle T. M.: Isolation of Johne's bacilli from the udders of clinically affected cows. *Br. vet. J.* 1954, 110, 215-218.
- Grant I. R., Hitchings E. L., McCartney A., Ferguson F., Rowe M. T.: Effect of commercial scale high-temperature, short-time pasteurisation on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 602-607.
- Green E. P., Tizard M. L., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J., Hermon-Taylor J.: Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 9063-9073.
- Greenstein R. J., Collins M. T.: Emerging pathogens: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* zoonotic? *Lancet* 2004, 364, 396-397.
- Hines S. A., Buerget C. D., Wilson J. H., Bliss E. L.: Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1987, 190, 681-683.
- Johnson-Jfeurulundu Y., Kameene J. B.: Management related risk factors for *M. paratuberculosis* infection in Michigan, USA, dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 1998, 37, 41-54.
- Johnson-Jfeurulundu Y., Kameene J. B.: Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Am. vet. Res.* 1997, 210, 1735-1740.
- Johnson-Jfeurulundu Y., Kameene J. B., Gardiner J. C., Lloyd J. W.: The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in Michigan dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2001, 84, 2188-2194.
- Kanetsuna F., San Blas G.: Chemical analysis of mycolic acid-arabinogalactan-mucopeptide complex of mycobacteria cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* 1970, 208, 434-443.
- Larsen A. B., Merkall R. S., Vardaman T. H.: Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. vet. Res.* 1956, 31, 255-258.
- Larsen A. B., Stalheim O. H. V., Hughes D. E., Appell L. H., Richards W. D., Himes E. M.: *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen – donor bull. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1981, 179, 169-171.
- Lawrence W. E.: Congenital infection with *Mycobacterium johnei* in cattle. *Vet. Rec.* 1956, 68, 312-314.
- Lipiec M.: Paratuberkuloza jako zoonoza. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 191-194.
- Matthews F. P.: Liver lesions in Johne's disease. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1930, 29, 248-249.
- PN-EN ISO 707: Mleko i przetwory mleczne. Wytyczne do pobierania próbek.
- Rastogi N., Lengrand E., Sola C.: The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2001, 20, 21-54.
- Reviriego F. J., Moreno M. A., Dominguez L.: Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Prev. Vet. Med.* 2000, 43, 43-51.
- Saleh A. N., Ghobrial G., Romero C., Valentine J. F.: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bacteriemia in patients with inflammatory bowel disease. *Lancet* 2004, 364, 1013-1014.
- Schulze-Roebbecke R., Buchholtz K.: Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 59, 1869-1873.
- Sherman D. M.: Current concepts in Johne's disease. *Vet. Med.* 1985, 80, 77-84.
- Smith H. W.: The examination of milk for the presence of *Mycobacterium johnei*. *J. Path. Bact.* 1960, 80, 440-442.
- Streeter R. N., Hoffsis G. F., Bech-Nielsen S., Shulaw W. P., Rings D. M.: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrums and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* 1995, 56, 1322-1324.
- Sung N., Collins M. T.: Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 999-1005.
- 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.
- 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.
- Wisniewska A.: Porównanie różnych metod izolacji i identyfikacji *Mycobacterium paratuberculosis* w mleku. Praca dokt. Biblioteka UWM, Olsztyn, s. 31-32.

Adres autora: prof. dr hab. Joanna Sztępn, ul. Oczapowskiego 14, 10-718 Olsztyn; e-mail: sztepn@uwm.edu.pl