

PCR w wykrywaniu *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.

PCR method for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk samples

Summary

The aim of the study was to detect *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in raw milk samples. DNA from 103 udder milk samples was isolated using the eQIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). IS-900 – a part of genome characteristic for MAP – was detected in 21 samples.

Keywords: *Mycobacterium paratuberculosis*, PCR, raw milk

Mycobacterium paratuberculosis (MAP) jest czynnikiem etiologicznym choroby Johnego, występującej w stadach bydła mlecznego i mięsnego w wielu krajach świata (12). Dotychczas niewyjaśniona rola prątka w powstawaniu i przebiegu choroby Crohna u ludzi nasuwa wiele pytań, dotyczących, między innymi, drogi przenoszenia zarazka na ludzi. Głównym rezerwuarem MAP w środowisku są zwierzęta, zatem jednym z wektorów może być mleko pozyskiwane od krów zarówno chorych, jak i zakażonych bezobjawowo. Prątki dostają się do mleka dwiema drogami: wraz z makroflagami (21), gdy zwierzęta są zakażone i poprzez zanieczyszczenie kałem (16). W praktyce zanieczyszczenie kałowe jest bardziej prawdopodobne i w znacznym stopniu zwiększa liczbę komórek MAP w mleku. Badania mikroskopowe kału zakażonych zwierząt wykazały w nim obecność skupisk (clump) złożonych z kilku do kilku tysięcy komórek MAP (10). Udowodniono także, że powszechnie stosowany w przemyśle mleczarskim proces pasteryzacji przemysłowej HTST (high-temperature short-time) nie gwarantuje unieszkodliwienia prątków i potwierdza ich znaczną oporność na działanie wysokich temperatur (5, 8, 15).

Izolacja MAP z mleka napotyka szereg trudności związanych ze złożoną, trójfazową strukturą mleka z jednej strony i różnorodnością mikroorganizmów w nim obecnych z drugiej. Dotychczas opisane metody (21, 23) można podzielić na dwie grupy: bezpośrednie wykrywanie komórek w badanym materiale oraz tradycyjną hodowlę na podłożach odżywczych. Ze względu na niewielką liczbę prątków, które mogą się znajdować w mleku niezbędna jest wstępna koncentracja drobnoustrojów. Stosowane i opisane sposoby koncentracji bakterii w próbkach mleka nie gwarantują odpowiedniego zagęszczenia, ponieważ prątki MAP wykazują powinowactwo do tłuszczu (7). Konieczność uwzględnienia tej właściwości była powodem zastosowa-

nia różnego rodzaju preparatów chemicznych i enzymatycznych dla ujednoczenia próbek mleka (24), z których następnie izolowano prątki MAP, stosując metodę tradycyjnej hodowli. Zasadniczymi mankamentem tej metody są: długi czas inkubacji (od 4 do 16 tygodni) i konieczność użycia specyficznych, wzbogaconych mykobaktyną J podłoży. Nowoczesną metodą, która pozwala szybciej uzyskać wynik i która może być wykorzystywana do wykrywania MAP, jest technika PCR. Podstawą reakcji jest poddanie amplifikacji charakterystycznego fragmentu genomu IS-900, sekwencji kwasu DNA typowej tylko dla MAP (3).

Celem badań było wykrycie obecności DNA *Mycobacterium paratuberculosis* w próbkach mleka surowego za pomocą metody PCR.

Materiał i metody

Izolacja DNA. W gospodarstwie produkcyjnym pobrano sto trzy próbki mleka surowego, wymieniowego, które następnie poddano reakcji z użyciem zestawu QIAamp DNA Mini Kit firmy Qiagen zgodnie z instrukcją producenta. Otrzymany roztwór zawierający wyizolowany z próbki DNA poddano reakcji PCR.

Reakcja PCR. W celu przeprowadzenia reakcji przygotowano mieszaninę z użyciem: Hot Star Taq Master Mix (Qiagen) 20 µl; 0,2 µl 100 pmol primeru P90+ (5'-GAAGGTGTTCGGG-GCCGTCGCTTAGG-3'); 0,2 µl 100 pmol primeru P91+ (5'-GGCGTTGAGGTCGATCGCCACGTGAC-3') (6) 15,6 µl wody wolnej od DNA'z. Do 36 µl mieszaniny reakcyjnej dodawano 4 µl badanego materiału i bezpośrednio po połączeniu przenoszono do termocyklera (Mastercykler – Eppendorf) poddając amplifikacji. Przebieg reakcji był następujący: denaturacja przez 15 minut w temperaturze 94°C; 60 cykli – 1 min. w 94°C, 0:45 min. w 67°C i 2 min. w 72°C; zakończenie reakcji – 2 min. w 72°C. Następnie produkt PCR przetrzymywany był w temp. 4°C do momentu wykonania elektroforezy.

Elektroforeza. Uzyskany produkt reakcji PCR analizowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym LSI, w buforze TAE (0,4 g LSI Agarose ME + 25 ml 1 × bufor TAE). 8 µl produktu PCR wymieszano z 2 µl loading buffer i nanoszono na żel, poddając elektroforezie przy 100 V przez 60 min. w obecności markera 1 kb ladder (Gibco).

^{*)} Badania wykonane w ramach projektu badawczego KBN nr: 2 P06T 025 27.

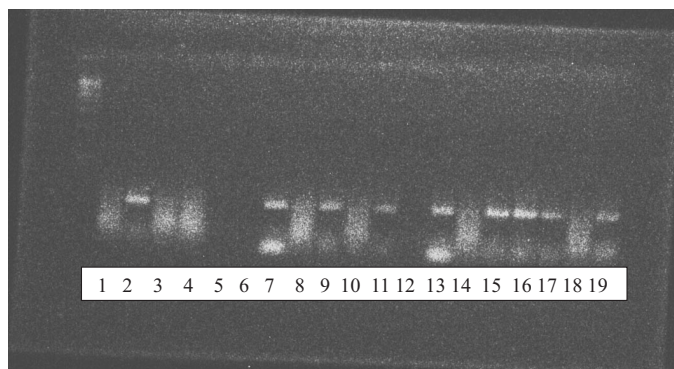
Wyniki i omówienie

Dwadzieścia jeden (20,39%) ze 103 próbek mleka wymieniowego, poddanych reakcji PCR dało wynik pozytywny. Amplifikacja fragmentu insercyjnego i późniejsza analiza produktów amplifikacji na żelu agarozowym wykazały charakterystyczne prążki w każdej z dodatnich próbek mleka, co jest dowodem na obecność MAP. Rycina 1 przedstawia przykładowy obraz elektroforetyczny uzyskany z reakcji PCR.

Charakterystyczny dla genomu MAP fragment IS-900, występujący w 14-18 kopiach po raz pierwszy został opisany w latach 80. przez dwa niezależne zespoły badaczy: Collinsa z Nowej Zelandii (3) i McFadden z Anglii (9, 13, 14). Wykrycie IS-900 w badanym materiale pozwala na potwierdzenie obecności MAP i jest wykorzystywane w celu odróżnienia MAP od innych wolno rosnących prątków kwasoopornych. Od przełomowego momentu odkrycia różnic w genomach MAP i innych prątków *Mycobacterium avium complex* opublikowano niewiele danych dotyczących występowania tego drobnoustroju w mleku. Obecność MAP wykazano w mleku surowym zwierząt chorych i zakażonych (1, 6, 19), w mleku zbiorczym z gospodarstw produkcyjnych (4, 11) i w mleku zbiorczym z mleczarni (8, 17, 18). Badania przesiewowe 1384 próbek mleka zbiorczego przeprowadzone na terenie Szwajcarii udowodniły występowanie IS-900 w 19,7% próbek (4). Różnice pomiędzy 18 regionami były znaczne. Najmniejszy odsetek wyników dodatnich wynosił 1,7%, a największy 49,2% w regionie. Doświadczenia przeprowadzone na 20 próbkach mleka zbiorczego, z których każda zawierała mleko od czterech krów i 211 próbkach mleka wymieniowego sugerowały, że MAP może być wykrywany bezpośrednio zarówno z mleka zbiorczego, jak i z mleka ćwiartkowego (19). Analiza próbek mleka, pochodzącego od zwierząt nie wykazujących dodatnich odczynów serologicznych w kierunku paratuberkulozy, wykazała w nich obecność MAP (6). Późniejsze wyniki badań, przeprowadzone w tym samym ośrodku udowodniły, że technika PCR nie powinna być stosowana do bezpośredniego wykrywania IS-900 w próbkach mleka zbiorczego (11). Stwierdzono również, że metoda hodowlana izolacji MAP jest bardziej czuła niż technika PCR. Przepuszczalnie jest to wynikiem obecności w próbkach mleka inhibitorów reakcji PCR (2). Pojawiły się też informacje o występowaniu fałszywie dodatnich reakcji IS-900 – PCR (22). Pomimo wad obu stosowanych technik oraz różnic w czułości wykrywania MAP, istotne jest przeprowadzanie badań nad występowaniem tego prątka w żywności, szczególnie w mleku. Tak długo, jak rola MAP w chorobie Crohna u ludzi nie będzie do końca wyjaśniona, stosowanie „zasady ostrożności” wskazuje na konieczność monitorowania obecności tego prątka w żywności, a szczególnie w mleku i jego przetworach.

Piśmiennictwo

1. Ayele W. Y., Svastova P., Roubal P., Bartos M., Pavlik I.: *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 1210-1214.
2. Bickley J., Short J. K., Mc Dowell D. G., Parkes H. C.: Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 1996, 22, 153-158.
3. 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.
4. Corti S., Stephan R.: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* specific IS 900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology* 2002, 2, 15.



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny produktów PCR otrzymanych z DNA izolowanego z próbek mleka surowego
Poszczególne ścieżki: 1 – kontrola negatywna reakcji PCR; 2 – kontrola pozytywna reakcji PCR (DNA otrzymane ze szczepu ATCC 19698); 7, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19 – reakcje pozytywne uzyskane z izolatów z mleka wymieniowego; 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 18 – reakcje negatywne

5. 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.
6. Giese S. B., Arens P.: Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol.* 2000, 77, 291-297.
7. Grant I. R., Ball H. J., Rowe M. T.: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 3153-3158.
8. Grant I. R., Ball H. J., Rowe M. T.: Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulked raw and commercially pasteurized cow's milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2428-2435.
9. Green E. P., Tizard M. L., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J., Hermon-Taylor J.: Sequence and characteristics of IS 900, an insertion element identified in human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 9063-9073.
10. Hammer P., Kiesner H., Walte G., Knappstein K., Teufel P.: Heat resistance of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in raw milk tested in a pilot-plant pasteurizer. *Bull. IDF* 2004, 392, 53-61.
11. Jayarao B. M., Pillai S. R., Wolfgang D. R., Griswold D. R., Rossiter C. A., Tewari D., Burns C. M., Hutchinson L. J.: Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathog. Dis.* 2004, 1, 17-26.
12. Lipiec M.: Paratuberkuloza jako zoonoza. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 191-194.
13. McFadden J. J., Butcher P. D., Chiodini R., Hermon-Taylor J.: Crohn's disease isolated *Mycobacteria* are identical to *Mycobacterium paratuberculosis* as determined by DNA probes that distinguish between *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25, 796-801.
14. McFadden J. J., Butcher P. D., Thompson J., Chiodini R., Hermon-Taylor J.: The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphism to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol. Microbiol.* 1987, 1, 283-291.
15. Millar D., Ford J., Sanderson J., Withey S., Tizard M., Doran T., Hermon-Taylor J.: IS 900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 3446-3452.
16. Nauta M. J., Giessen J. W. B.: Human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* via pasteurized milk: A modeling approach. *Vet. Rec.* 1998, 143, 293-296.
17. O'Doherty A., O'Grady D., Smith T., Egan J.: *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in pasteurized and unpasteurized milk in the ROI. *Ir. J. Agric. Food Res.* 2002, 41, 117-121.
18. O'Reilly C. E., O'Connor L., Anderson W., Harwey P., Grant I. R., Donaghy J., Rowe M., O'Mahony P.: Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cow's milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 5138-5144.
19. Pillai S. R., Jayarao B. M.: Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis directly from raw milk. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 1052-1057.
20. Stabel J. R., Wells S. J., Wagner B. A.: Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 525-531.
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. Taddei R., Pacciari M. L., Arrigoni N., Cammi G., Belletti G. L.: An IS900-like sequence in *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: implications for diagnosis. *Eighth Internat. Coll. Paratuberculosis. Copenhagen* 14-18.08. 2005, s. 431-437.
23. 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.
24. Wiszniewska A., Sztejn J.: Detection methods of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Pol. J. Vet. Sci.* 2002, 5, 203-205.

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