

ANNA BERTHOLD-PLUTA, ANTONI PLUTA, MICHAŁ OLKOWSKI,  
ANNA OSTROWSKA

## ***MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS* – WYSTĘPOWANIE W MLEKU SUROWYM I W PRODUKTACH MLECZNYCH**

### Streszczenie

Bakterie *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Map*) są etiologicznym czynnikiem choroby Johnego u przeżuwaczy, a także wpływają prawdopodobnie na występowanie choroby Crohna i cukrzycy typu I u ludzi. Drobnoustroje te przeżywają warunki krótkotrwałej pasteryzacji mleka (71,7 °C/15 s. Mleko od krów z paratuberkulozą zawiera komórki *Map*, natomiast do zanieczyszczenia mleka może dojść także przez jego styczność z kałem lub na kolejnych etapach przetwarzania. Odsetek próbek mleka zbiorczego zawierającego *Map* waha się od 2 do 70 %. Obecność *Map* stwierdzono w 6,5 ÷ 12,0 % próbek mleka pasteryzowanego, w około 20 % próbek śmietanki, w 12 ÷ 50 % serów oraz w 35 % próbek mleka w proszku. Nie ma doniesień o wyizolowaniu *Map* z rynkowych mlecznych napojów fermentowanych, ale stwierdzono, że mikroorganizmy te przeżywają w czasie chłodniczego przechowywania jogurtów. W mleku fermentowanym z dodatkiem szczepów probiotycznych liczba *Map* zmniejsza się o 1,2 do > 3,8 rzędów logarytmicznych, w zależności od szczepu *Map* oraz probiotyku.

**Słowa kluczowe:** *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Map*), mleko surowe, mleko pasteryzowane, sery, mleko fermentowane

### Wprowadzenie

Gatunek *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Map*) należy do rodziny *Mycobacteriaceae* i rodzaju *Mycobacterium* tradycyjnie nazywanych prątkami. Są to Gram-dodatnie bakterie o tlenowym metabolizmie i komórkach w kształcie prostych lub lekko zakrzywionych pałeczek o średnicy 0,2 ÷ 0,4 µm i długości 2 ÷ 10 µm.

---

Dr inż. A. Berthold-Pluta, dr hab. A. Pluta, prof. SGGW, mgr inż. M. Olkowski, inż. A. Ostrowska,  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna  
Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa.  
Kontakt: [anna\\_berthold@sggw.pl](mailto:anna_berthold@sggw.pl)

Charakterystyczną cechą prątków jest specyficzna ściana komórkowa, która zbudowana jest głównie z lipidów, dzięki czemu drobnoustroje te charakteryzują się znaczną opornością na czynniki, takie jak: wysuszenie, niskie i wysokie pH oraz wysoka i niska temperatura [2, 23]. *Map* są zdolne przeżyć długi czas poza organizmem zwierzęcym, np. 163 dni w wodzie rzecznej, 270 dni w wodzie stojącej, w glebie – 11 miesięcy, w płynnym nawozie naturalnym – 56 dni, a w nawozie stałym – 3 dni [21, 45].

*Map* są etiologicznym czynnikiem chronicznego zapalenia żołądka i jelit u przeżuwaczy (choroba Johnego), uważanego za jedną z najpoważniejszych chorób dotykających bydło mleczne [23]. Z badań Departamentu Rolnictwa USA przeprowadzonych w 1996 r. wynika, że w Stanach Zjednoczonych od 20 do 40 % stad krów mlecznych było zakażonych *Map*, co prowadziło każdego roku do strat ekonomicznych wynoszących co najmniej 1,5 miliarda dolarów [5].

Pierwsze doniesienia wiążące *Map* z chorobą Crohna pojawiły się już w 1913 r., jednak dopiero w latach 80. XX w. patogeny te wyizolowano od pacjentów z zapaleniem jelit [14]. Choroba Crohna jest przewlekłym stanem zapalnym przewodu pokarmowego, z powodu którego cierpią miliony ludzi na świecie, a częstotliwość jej występowania w krajach rozwiniętych rośnie [29, 32]. Istnieje również hipoteza, że *Map* przyczyniają się do powstania cukrzycy typu I u ludzi [11].

W ostatnich latach zainteresowanie badaczy bakteriami omawianego gatunku wzrosło, gdyż pojawiły się doniesienia o większej oporności cieplnej *Map* niż bakterii, które do tej pory uważano za standardowe przy określaniu skuteczności pasteryzacji krótkotrwałej HTST (71,7 °C/15 s), czyli *Coxiella burnetti* i *Mycobacterium bovis* [20, 26, 37, 39].

### **Występowanie *Map* w mleku surowym**

Występowanie *Map* w mleku surowym zwierząt chorych na chorobę Johnego zostało udowodnione [15, 34], obecnie prowadzi się natomiast badania dotyczące stopnia zanieczyszczenia przez *Map* mleka od krów bez oznak chorobowych. Hodowla tych bakterii metodami klasycznej mikrobiologii jest żmudna i uciążliwa, dlatego też określenie faktycznej liczby *Map* w mleku surowym w warunkach laboratoryjnych jest bardzo trudne i czasochłonne [32]. Szybką i czułą metodą wykrywania *Map* w próbkach środowiskowych i produktach spożywczych, w tym mlecznych, jest PCR (z ang. *polymerase chain reaction*). Opracowano liczne warianty tej metody, ale prawie wszystkie polegają na wykrywaniu sekwencji insercyjnej IS900, którą ustalono jako standardowy marker *Map*. Inne markery stosowane alternatywnie to występujący pojedynczo w genomie – *f57* oraz geny *HspX* i *ISMav2*, oba obecne w trzech kopiach w genomie *Map*. Wadą metod PCR stosowanych do wykrywania *Map* w żywności jest brak możliwości odróżnienia komórek żywych od martwych w próbce [35].

Występowanie *Map* w mleku surowym nie zależy, jak się wydaje, od gatunku zwierzęcia. O'Reilly i wsp. [31] wykryli *Map* w 12,9 % (od 9,9 do 16,5 %) próbek mleka zbiorczego (metodą IMS-PCR, czyli PCR z separacją immunomagnetyczną), natomiast Corti i Stephan [7] stwierdzili te bakterie średnio w 19,7 % próbek mleka zbiorczego, przy czym próbki pochodziły z różnych części Szwajcarii i wyniki z poszczególnych regionów wahały się od 1,7 do 49,2 %. W szeroko zakrojonych badaniach w Wielkiej Brytanii przebadano metodą hodowlaną 244 próbki surowego mleka krowiego i w 2 % z nich stwierdzono obecność komórek *Map* [18]. W Egipcie 69,2 % próbek mleka surowego było pozytywnych w kierunku *Map* (oznaczanych metodą IS900 PCR) [13]. W badaniach przeprowadzonych w Polsce obecność *Map* wykazano w 2,47 % próbek mleka pochodzącego od pojedynczych krów ze stada, w którym wystąpiły odczyny serologiczne dodatnie w kierunku paratuberkulozy [43]. W przypadku innych gatunków zwierząt mlecznych, jak owce i kozy, dane są również rozbieżne. Grant i wsp. [19] stwierdzili, że ze 104 próbki surowego mleka zbiorczego koziego i owczego tylko jedna zawierała *Map*, co stanowiło < 1 % próbek. W Szwajcarii *Map* stwierdzono w 23 % próbek mleka koziego i 23,8 % próbek mleka owczego (metoda IS900 PCR) [30].

Czynnikiem wpływającym na obecność *Map* w mleku surowym jest na pewno praktyka higieniczna podczas dojenia. Zwierzęta zainfekowane *Map* wydają prątki z kałem i w ten sposób, jak potwierdzają badania wielu autorów, patogeny mogą przedostawać się do mleka, które następnie stanowi pośrednie źródło zakażenia dla ludzi. Kał krów z chorobą Johnego może zawierać w 1 g nawet  $10^8$  komórek *Map*. Przy takiej liczbie nawet drobiny kału mogą istotnie zanieczyszczać mleko [18, 22, 44]. Stopień zanieczyszczenia mleka zmienia się znacznie w różnych regionach czy krajach, gdyż zależy od rozpowszechnienia klinicznych przypadków choroby Johnego, które mają największy udział w zanieczyszczeniu surowego mleka [26]. Zakażenie węzłów chłonnych wymienia powoduje bezpośrednie przechodzenie *Map* do mleka, co wskazywać może, że *Map* przenoszone są przez krew lub limfę [42].

Mleko krów niewykazujących objawów chorobowych bywa także zanieczyszczone *Map*, jednak ich liczba w próbkach takiego mleka jest mała. Przypuszcza się, że *Map* występują również w siarce, którą karmione są cielęta i pomimo późniejszego ich karmienia preparatami mlekozastępczymi, siara może stanowić źródło infekcji tych zwierząt [42].

Djönne i wsp. [9] wykazali wpływ wieku krów na obecność *Map* w mleku – im starsze zwierzęta, tym częściej ich mleko jest zanieczyszczone *Map*. Autorzy zauważyli także wpływ sezonowości na liczbę *Map* w mleku. Procent zwierząt, w mleku których wykryto *Map* był najwyższy w maju (13,8 %), natomiast z okresu luty - marzec był znacznie mniejszy (2,9 %).

### Występowanie *Map* w produktach mlecznych

Z danych literaturowych wynika, że produkty mleczne mogą być nośnikiem wprowadzającym *Map* do organizmu człowieka. W badaniach, których celem było określenie rozpowszechnienia *Map* w mleku spożywczym i śmietance w Irlandii wykazano obecność tych patogenów (metoda IMS-PCR) w 19,5 % próbek śmietanki, w 9,0 % próbek mleka pełnego i w 6,5 % próbek mleka częściowo odtłuszczonego, nie wykazano zaś ich obecności w żadnej próbce mleka odtłuszczonego. Posługując się metodami hodowlanymi nie stwierdzono natomiast *Map* w żadnej z 357 badanych próbek produktów. W mleku pasteryzowanym pełnym *Map* stwierdzano najczęściej od stycznia do marca oraz od września do listopada każdego roku badań, a odsetek próbek pozytywnych w tych okresach sięgał 25 % [31]. W innych badaniach przeprowadzonych w Anglii i Walii, stosując metodę IS900 PCR, stwierdzono obecność *M. paratuberculosis* w 7,05 % próbek [28]. W Wielkiej Brytanii obecność *Map*, określonych metodą IMS PCR, wykryto w 12 % próbek, a metodą płytkową – tylko w 1,8 % próbek (w liczbie 2 ÷ 8 jtk/50 ml) [18]. Podobne dane otrzymano w badaniach przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych [12]. W Czechach *Map* stwierdzono w 1,6 % próbek pasteryzowanego mleka rynkowego (metodą IS900 PCR) [1].

Procesy wstępnej obróbki mleka, jak: oczyszczanie i normalizacja, ewentualna mikrofiltracja oraz homogenizacja, mogą wpływać na liczbę *Map* w mleku pasteryzowanym. Łączne zastosowanie wirowania mleka i mikrofiltracji skutkowało usunięciem od 95,0 do 99,9 % komórek *Map* [17]. W niektórych pracach badawczych z tego zakresu wykazano, że homogenizacja mleka po jego pasteryzacji skutkuje mniejszym zniszczeniem *Map* niż przeprowadzenie tego procesu przed obróbką cieplną [16, 27]. Odmienne wyniki otrzymali Rademaker i wsp. [33], którzy nie stwierdzili żadnego wpływu homogenizacji mleka na skuteczność pasteryzacji w stosunku do *Map*.

W krajach rozwiniętych większość serów produkuje się z mleka pasteryzowanego, chociaż w krajach o długiej tradycji serowarskiej nadal znaczną część serów otrzymuje się w warunkach rzemieślniczych z mleka surowego krowiego, owczego lub koziego. Bezpieczeństwo mikrobiologiczne serów osiąga się przez ukwaszenie i solenie masy serowej i poprzez rozwój dodawanych specjalnie (sery z mleka pasteryzowanego) lub naturalnie występujących w mleku (sery z mleka surowego) bakterii kwasu mlekowego. Bakterie te, poprzez wytworzenie kwasu mlekowego i innych kwasów organicznych obniżających pH sera do poziomu około 4,6 - 5,0, uniemożliwiają rozwój bakterii patogennych w czasie dojrzewania i przechowywania serów.

Badania nad inaktywacją *Map* w czasie wyrobu serów są nieliczne (tab. 1). Wartości D (dziesięciokrotny czas redukcji liczby) różnych szczepów *Map* wahały się

od 28 dni (ser twardy) [36] do 107 dni (ser Cheddar) [10], przy czym największą wartością D charakteryzowały się sery o najniższym pH [10]. Wyniki oznaczeń serów półtwardych i twardej dowodzą, że w czasie ich dojrzewania liczba *Map* może obniżyć się o 2 ÷ 4 rzędy wielkości. Wykazano także, że przeżywalność *Map* w serach jest szczerpależna, wartość D wynosiła od 90 do 107 dni w zależności od szczepu [10].

Tabela 1. Dane dotyczące inaktywacji *Map* w czasie dojrzewania sztucznie zanieczyszczonych serów  
Table 1. *Map* inactivation data during ripening of artificially contaminated cheeses

Typ sera Cheese type	Dojrzewanie Ripening		pH	Wartość D [dni] D-value [days]
	Czas [dni] Time [days]	Temperatura [°C] Temperature [°C]		
Miękki Soft	28	4	6,2	60
Twardy Hard	120	12 / 22 / 12 <sup>a</sup>	5,7	28
Półtwardy Semi-hard	120	15	5,7	46
Cheddar Cheddar	189	10	5,2	90 - 107 <sup>b</sup>

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a – sery dojrzewały w warunkach kolejno: 12 °C/10 dni, 22 °C/60 dni, 12 °C/50 dni / ripening of cheeses was under following conditions: 12 °C/10 days, 22 °C/60 days, 12 °C/50 days;

b – wartości D dla 3 badanych szczepów *Map* / D-values for 3 analysed *Map* strains.

Opracowano na podstawie: [10, 36, 39] / Developed based on: [10. 36. 39]

Na podstawie wcześniej przedstawionych wyników badań, dotyczących występowania *Map* w mleku surowym, założyć można, że przeciętna liczba tych bakterii może wynosić około 100 jtk w litrze mleka. W czasie otrzymywania serów z takiego mleka około 90 % początkowej liczby *Map* zostanie „zamknięte” w skrzepie. Po osuszeniu skrzepu i oddzieleniu serwatki te 90 jtk *Map*/l koagulum skoncentruje się w 100 g sera (90 jtk/100 g sera). W ciągu kolejnych 4 miesięcy dojrzewania serów twardej i 3 miesięcy dojrzewania serów półtwardych liczba *Map* zmniejszy się odpowiednio o ponad 4 i 2 rzędy logarytmiczne, co obliczono na podstawie cytowanych wyżej wartości D. W serach gotowych do sprzedaży można zatem przewidzieć obecność nie więcej niż 0,009 jtk *Map*/100 g sera twardego i 0,9 jtk *Map*/100 g sera półtwardego. Sery twarde, przykładowo ser Ementalski spożywa się zwykle po jeszcze dłuższym, niż założono powyżej, dojrzewaniu, np. 6-miesięcznym, co jeszcze bardziej zwiększa bezpieczeństwo zdrowotne tych serów.

Sung i Collins [39] określili wpływ niskiego pH i stężenia soli na przeżywalność *Map* w serach miękkich podczas 60-dniowego okresu ich przechowywania. Stopień niszczenia szczepów *Map* autorzy określili w temp. 20 °C przy różnych wartościach pH i stężeniu soli, ale powszechnie stosowanych w produkcji serów. Stwierdzili, że stężenie NaCl ma mały wpływ na hamowanie rozwoju *Map* lub w ogóle go nie ma, natomiast niższe pH łączy się z szybszym niszczeniem tych patogenów. Średnie wartości D dla badanych szczepów *Map* przy pH 4,0, 5,0 i 6,0 wyniosły odpowiednio: 10, 19 i 33,3 dni. Wzrost pH o jedną jednostkę skutkuje więc w przybliżeniu 2-krotnym wzrostem D.

Ikonomopoulous i wsp. [25] odkryli *Map* w 50 % próbek handlowych serów Feta z Grecji i w 12 % próbek serów tego typu z Czech. Komórki *Map* stwierdzili w 3,6 % badanych próbek (stosując metodę hodowlaną), natomiast metodą IS900 PCR – w 30,9 % próbek. Najwyższy odsetek próbek zawierających *Map* stwierdzono w serach feta o stosunkowo małym stężeniu NaCl (< 2 %), które wyprodukowano w Grecji z mleka otrzymanego od zwierząt z odizolowanej populacji. Obecność materiału genetycznego *Map* w serach wyprodukowanych na Cyprze z mleka owiec, kóz i krów stwierdzono w 25 % próbek [3]. Znacznie mniejszy odsetek próbek dodatnich w kierunku markera IS900 *Map* (< 12 %) wykazano w serach z mleka krowiego i skrzepie serowym w Czechach, Stanach Zjednoczonych i Szwajcarii [6, 25, 38].

Muramyłodipeptydy, uwolnione z peptydoglikanów wchodzących w skład ściany komórkowej prątków, uważa się za potencjalne immunomodulatory i czynniki wywołujące stany zapalne [8], dlatego nawet martwe komórki *Map* obecne w proszku mlecznym lub w preparatach do żywienia niemowląt stanowią potencjalne ryzyko dla zdrowia dzieci. Niepokojące wydają się więc podawane w literaturze przedmiotu informacje na temat występowania *Map* w proszku mlecznym. W badaniach przeprowadzonych w Czechach obecność *Map* stwierdzono w 35 % próbek mleka w proszku dla niemowląt w liczbie od 48 do 32 500 komórek w gramie, przy czym ponad 10 000 komórek na gram obecne było w 4 próbkach (7,8 %). Oznacza to, że jedno opakowanie mleka w proszku, które niemowlęciu karmionemu sztucznie podano w ciągu kilku dni, zawierało 5 milionów komórek *Map* [24].

Opublikowano niewiele wyników badań dotyczących obecności i możliwości rozwoju *Map* w produktach mlecznych innych niż mleko pasteryzowane i sery. Ogólnie, mleko fermentowane jest zabezpieczone przed rozwojem patogenów przez zastosowanie wysokiej temperatury pasteryzacji mleka przeznaczonego do ich produkcji, niskie pH i przechowywanie w warunkach chłodniczych. Chociaż *Map* są bardziej odporne na niskie pH niż większość drobnoustrojów obecnych w mleku surowym [41], to kwasowość mlecznych napojów fermentowanych wpływa na istotne ograniczenie ich rozwoju [10, 36, 40]. Nie ma doniesień o wyizolowaniu *Map*

z rynkowych mlecznych napojów fermentowanych, ale van Brandt i wsp. [4] po przeprowadzeniu badań modelowych stwierdzili, że mikroorganizmy te przeżywały w jogurtach, a ich liczba nie zmieniała się w ciągu 6-tygodniowego przechowywania tych produktów w temp. 6 °C. Jednak w mleku fermentowanym z dodatkiem szczepów probiotycznych (*Bifidobacterium lactis* BB-12, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus casei* shirota, *Lactobacillus rhamnosus* HN001) liczba *Map* zmniejszała się o 1,2 do > 3,8 rzędów logarytmicznych, w zależności od szczepu *Map* oraz probiotyku. Wyniki tych badań są obiecujące, gdyż poza hamującym wpływem kultur probiotycznych na *Map*, wykazanych w warunkach *in situ*, mogą wskazywać na możliwość wykorzystania probiotyków do leczenia paratuberkulozy u zwierząt oraz choroby Crohna u ludzi.

### Podsumowanie

*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, to chorobotwórcze bakterie, których obecność stwierdzono w środowisku pozyskiwania mleka, w organizmach krów i innych zwierząt mlecznych, a także w surowcu mleczarskim. Wyniki publikowane od kilku lat wskazują na obecność *Map* również w produktach mlecznych: w mleku pasteryzowanym, serach i proszku mlecznym. Na obecność tych patogenów w produktach mlecznych podstawowy wpływ wydaje się mieć ich oporność na warunki pasteryzacji HTST, ale także – zwłaszcza w przypadku serów – pewna oporność na niskie pH i niewielkie stężenia soli (< 2 % NaCl) oraz oporność na wysuszenie (proszek mleczny).

Chociaż bywają wyrażane wątpliwości dotyczące etiologicznej roli *Map* w chorobie Crohna, obecność tych patogenów w mleku surowym, pasteryzowanym i w serach jest nadal potwierdzana. Poziomy *Map* oznaczane w mleku krowim, kozim i owczym, pochodzącym z różnych krajów, wskazują na rozpowszechnienie choroby Johnego na świecie. Postępowanie ograniczające rozprzestrzenianie się tej choroby, szczególnie wśród stad bydła mlecznego, jest zatem potrzebne. Jeśli zakażenie *Map* w populacji zwierząt zostanie zredukowane przez odpowiednie programy kontroli, to zmniejszy się też poziom występowania *Map* w żywności pochodzenia zwierzęcego, a tym samym ryzyko zakażenia ludzi. Osiągnięcie zmniejszenia liczby *Map* w żywności wymaga jednak czasu, a także wspólnego wysiłku organizacji rządowych, rolniczych, weterynaryjnych oraz przemysłu mleczarskiego.

### Literatura

- [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] Boone D.R., Castenholz R.W.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Archea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria.* Ed. J.T. Staley. T. I. Springer, New York 2001, pp. 155-164.
- [3] Botsaris G., Slana I., Liapi M., Dodd C., Economides C., Rees C., Pavlik I. : Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, **141**, S87-S90.
- [4] Brandt van L., Coudijzer K., Herman L., Michiels C., Hendrickx M., Vlaemynek G.: Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in yoghurt and in commercial fermented milk products containing probiotic cultures. *J. Appl. Microbiol.*, 2011, **110**, 1252-1261.
- [5] Chiodini R., Rossiter C.: Paratuberculosis: a potential zoonosis ? *Vet. Clin. North. Am.* 1996, **12**, 457-467.
- [6] Clark D., Anderson J., Koziczowski J., Ellingson J.: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol. Cell. Probes*, 2006, **20**, 197-202.
- [7] Corti S., Stephan R.: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiol.*, 2002, **2**, 15-21.
- [8] Coulombe F., Divangahi M., Veyrier F., de Leseleuc L., Gleason J.L., Yang Y., Kelliher M.A., Pandey A.K., Sasseti C.M., Reed M.B., Behr M.A.: Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J. Experimental Med.*, 2009, **206**, 1709-1716.
- [9] Djönne B., Jensen M., Grant I., Holstad G.: Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.*, 2003, **92**, 135-143.
- [10] Donaghy J.A., Totton N.L., Rowe M.T.: Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 4899-4905.
- [11] Dow C.: Paratuberculosis and type I diabetes : is this the trigger ? *Med. Hypotheses*, 2006, **67**, 782-785.
- [12] Ellingson J.L., Anderson J.L., Koziczowski J.J., Radcliff R.P., Sloan S.J., Allen S.E., Sullivan N.M.: Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Prot.*, 2005, **68**, 966-972.
- [13] El-Malek S.A., Mohamed Kh.F.: The use of IS900 PCR and ELISA for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw cow milk in Egypt. *European J. Biol. Sci.*, 2010, **2 (2)**, 39-45.
- [14] Feller M., Huwiler K., Stephan R., Altpeter E., Shang A., Furrer H., Pfyffer G., Jemmi T., Baumgartner A., Egger M.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2007, **7**, 607-613.
- [15] Giese S.B., Ahrens P.: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol.*, 2000, **77**, 291-297.
- [16] Grant I.R., Williams A.G., Rowe M.T., Muir D.D.: Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 2853-2861.
- [17] Grant I.R., Williams A.G., Rowe M.T., Muir D.D.: Investigation of the impact of simulated commercial centrifugation and microfiltration conditions on levels of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. *Int. J. Dairy Technol.*, 2005, **58**, 138-142.
- [18] Grant I., Ball H.J., Rowe M.: Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cow's milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 2428-2435.
- [19] Grant I., O'Riordan L., Ball H., Rowe M.: Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goat's milk in England, Wales and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.*, 2001, **79**, 123-131.



- [20] 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.
- [21] Grewal S.K., Rajeev S., Sreevatsan S., Michel F.C.: Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 565-574.
- [22] Griffiths M.: *Mycobacterium paratuberculosis*. In: *Foodborn pathogens. Hazards, risk analysis and control*. Ed. C.W. Blackburn i P.J. McClure, CRC Press, New York 2002, pp. 489-500.
- [23] Harris N., Barletta R.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, **14**, 489-512.
- [24] Hruska K., Slana I., Kralik P., Pavlik I.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: F57 competitive real time PCR. *Veterinarni Medicina*, 2011, **56**, 226-230.
- [25] Ikonomopoulos J., Pavlik I., Bartos M., Svastova P., Ayele W.Y., Roubal P., Lukas J., Cook N., Gazouli M.: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Retail Cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 8934-8936.
- [26] Klijn N., Herrewegh A.A.P.M., de Jong P.: Heat inactivation data for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for interpretation. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **91**, 697-704.
- [27] McDonald W.L., O'Riley K.J., Schroen C.J., Condrón R.J.: Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 1785-1789.
- [28] 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, **61**, 3466-3452.
- [29] Mishina D., Katsel P., Brown S., Gilberts E., Greenstein R.: On the etiology of Crohn disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1996, **93**, 9816-9820.
- [30] Muehlherr J.E., Zweifel C., Corti S., Blanco J.E., Stephan R.: Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 3849-3856.
- [31] O'Reilly C.E., O'Connor L., Anderson W., Harwy 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.
- [32] Patel A. Shah N.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* – Incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization and role in human health. *J. Microbiol. Imm. Inf.*, 2011, **44**, 473-479.
- [33] Rademaker J.L., Vissers M.M., Te Giffel M.C.: Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected faeces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 4185-4190.
- [34] Ramisz A., Cąkała S., Szańkowska Z., Hoffman H., Damm A., Zahaczewski J., Danileczuk K., Jaremski A.: Przypadek choroby Johnego u bydła na terenie województwa krakowskiego. *Med. Weter.*, 1970, **26**, 203-206.
- [35] Slana I., Paolicchi F., Janstova B., Navratilova P., Pavlik I.: Detection methods for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*, 2008, **6 (53)**, 283-306.
- [36] Spahr U., Schafroth K.: Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard manufactured from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4199-4205.
- [37] Stabel I.: Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4975-4977.
- [38] Stephan R., Schumacher S., Tasara T., Grant I.: Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90**, 3590-3595.

- [39] Sung N., Collins M.T.: Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. Appl. Environ. Microbiol., 2000, **66**, 1334-1339.
- [40] Sung N., Collins M.T.: Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**, 999-1005.
- [41] Sung N., Collins M.T.: Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. Appl. Environ. Microbiol., 2003, **69**, 6833-6840.
- [42] Sweeney R., Whitlock R., Rosenberg A.: *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J. Clin. Microbiol., 1992, **1**, 166-171.
- [43] Sztejn J., Wiszniewska-Łaszczyk A., Rusczyńska A.: Występowanie *Mycobacterium paratuberculosis* w mleku surowym. Med. Weter., 2006, **62**, 1186-1187.
- [44] 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, **24**, 532-533.
- [45] Żórawski C.: Paratuberkuloza przeżuwaczy (choroba Johnego). Med. Weter., 1991, **47**, 103-107.

#### **MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS – THE OCCURRENCE IN RAW MILK AND IN DAIRY PRODUCTS**

##### **S u m m a r y**

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) bacteria are an etiological agent of the Johne's disease in ruminants and they have, likely, their role in the occurrence of the Crohn's disease and type I diabetes in humans. Those microorganisms are able to survive under the conditions of milk pasteurization of short duration (71.7°C/15 s). Milk from cows infected with paratuberculosis contains *Map* cells, however, milk could also be contaminated by contacting faeces or in the successive phases of milk processing. The sample percentage of cumulative milk with *Map* ranges between 2 and 70 %. It was reported that the *Map* cells were present in 6.5 to 12.0 % of pasteurized milk samples, in ca. 20 % of cream samples, in more than 12 to 50 % of cheese samples, and in 35 % of milk powder samples. There are no reports regarding the *Map* cells isolated from fermented milk beverages in the market, but those microorganisms were found to survive in the cold stored yoghurts. In the fermented milk with added probiotic strains of bacteria, the count of *Map* decreased from 1.2 to more than 3.8 log depending on both the *Map* strain and the probiotic.

**Key words:** *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (*Map*), raw milk, pasteurized milk, cheeses, fermented milks ☒