

# Häufigkeit von Paratuberkulose-Erregern in Schweizer Rohmilch

Jörg Hummerjohann, Brigitte Ulmann und Melchior Schällibaum, Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, CH-3003 Bern

Auskünfte: Jörg Hummerjohann, E-Mail: joerg.hummerjohann@alp.admin.ch, Fax +41 31 323 82 27, Tel. +41 31 323 82 56

## Zusammenfassung

**Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP), der Erreger der Paratuberkulose bei Rindern und anderen Tieren, steht seit einiger Zeit unter dem Verdacht, an einer entzündlichen Darmkrankheit des Menschen (Morbus Crohn) mitbeteiligt zu sein. Da das Bakterium sowohl die Milch-Pasteurisation als auch die Käse-Reifung teilweise überleben kann, ist es wichtig zu wissen, wie gross das Vorkommen von vermehrungsfähigen MAP in Schweizer Rohmilch ist. In der vorliegenden Studie wurden 232 Sammelmilchproben aus verschiedenen Landesteilen auf die Anwesenheit von lebenden MAP mittels Kultivierung untersucht. In keiner Probe waren kultivierbare MAP nachweisbar, daher ist davon auszugehen, dass Schweizer Rohmilch nicht weitverbreitet mit MAP kontaminiert ist. Eine abschliessende Risikobeurteilung kann allerdings erst dann vorgenommen werden, wenn Studien mit einer noch zu entwickelnden Referenzmethode für MAP vorliegen.**

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose bei Rindern und anderen Tieren. Die Krankheitssymptome sind eine chronische Darmentzündung mit Durchfall und Abmagerungserscheinungen. Sowohl subklinisch infizierte als auch erkrankte Rinder scheiden MAP mit dem Kot und der Milch aus. Da der Keim bei der Pasteurisierung der Milch nicht vollständig abgetötet wird, kann der Mensch beim Konsum von Milch MAP aufnehmen.

## Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn?

Zurzeit wird kontrovers diskutiert, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP, das übrigens auch im Trinkwasser und in gedüngtem Gemüse und Salat vorkommen kann, und dem sogenannten Morbus Crohn, einer entzündlichen Darmerkrankung des Menschen, gibt. Deren Ursache ist bislang wenig bekannt und wahrscheinlich von mehreren Faktoren abhängig (Greenstein 2003; Naser *et al.* 2004;

Korzenik 2005; Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2007; Feller *et al.* 2007).

## MAP in Milch und Milchprodukten

In Grossbritannien wurden in vier von 244 Proben (1,6 %) roher Molkereimilch MAP per kulturellem Verfahren und 7,8 % per IMS-PCR detektiert (Grant *et al.* 2002). In kommerzieller, pasteurisierter Milch wurden lebende MAP mit einer relativen Häufigkeit von 1,8% (UK), bzw. 2,8 % (USA) nachgewiesen (Grant *et*

*al.* 2002; Ellingson 2005). In einer früheren Studie von Agroscope Liebefeld-Posieux konnte anhand von mit hohen MAP-Konzentrationen kontaminierten Modellkäsen gezeigt werden, dass die Anzahl der Mykobakterien während der Käseherstellung um mehrere Zehnerpotenzen verringert wird, aber nach 120 Tagen Reifungszeit im Halbhart- und Hartkäse noch nachweisbar ist (Spahr und Schafroth 2001).

Für eine umfassende Risikobeurteilung ist es daher notwendig zu wissen, ob vermehrungsfähige MAP über die Milch in die Lebensmittelkette gelangen. In der Schweiz hatte man eine Häufigkeit von 8,0 % von MAP im Serum auf Herden-Niveau (Stärk *et al.* 1997) bestimmt. Ausserdem wurden in 19,7 % der Sammelmilch ab Landwirtschaftsbetrieb MAP-Erbsubstanz mittels IS900-PCR nachgewiesen (Corti und Stephan 2002), diese Zahl lässt aber kaum Rückschlüsse auf die Häufigkeit vermehrungsfähiger MAP-Zellen zu.

Tab. 1. Herkunft der Milchproben, die auf MAP untersucht wurden

Anzahl	Kanton	Probenahme
98	Zug	April 03 – Nov.03
19	Thurgau	April 03 – Nov. 03
32	Appenzell	April 03 – Nov. 03
19	Waadt	Juli 03 – Nov. 03
14	Freiburg	April 03 – Nov. 03
48	Bern	April 03 – Nov.03
2	Genf	April 03

# ttel

Wie hoch die Häufigkeit (Prävalenz) von vermehrungsfähigen MAP in Schweizer Rohmilch ist, war bislang unbekannt und wurde daher in der vorliegenden Studie untersucht.

## Aufwendige Analytik

232 Sammelmilchproben des Sommers 2003, repräsentativ für weite Teile der Schweiz (Tab. 1), wurden nach der Methode von Grant *et al.* (2002) auf die Anwesenheit von MAP getestet, wobei auf den Einsatz des BACTEC Systems verzichtet wurde. Dabei wurden 50 ml pro Probe zuerst mit 0,75 % Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC; Fluka Chemie AG, Buchs) dekontaminiert und in 1 ml PBS-T resuspendiert. Dann wurde mit 10 µl anstelle von 250 µl eine Anreicherung auf HEYM-Schrägagar (mit 2 µg/ml Mycobactin J; BD AG, Basel) durchgeführt. Parallel dazu erfolgte eine Anreicherung in flüssigem Middle-brook 7H9-Medium (BD AG, Basel), die mit 500 µl Resuspension angeimpft worden war. Da MAP zu den langsam wachsenden Mykobakterien gehört, wurde eine Inkubationszeit von 18 Wochen bei 37°C gewählt. Das Flüssigmedium wurde nach neun und 18 Wochen auf die Anwesenheit von säurefesten Stäbchen mit Ziehl-Neelsen-Färbung (Chemie Brunschwig AG, Basel) geprüft (Abb. 1), positive respektive verdächtige Proben wurden auf HEYM-Schrägagar umgezüchtet. Die Schrägagarkulturen wurden wöchentlich auf das Wachstum von kleinen, transparenten Kolonien kontrolliert,

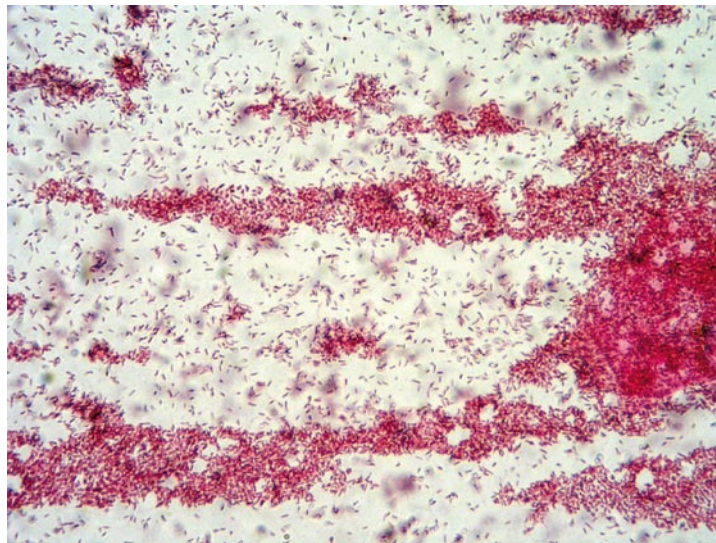
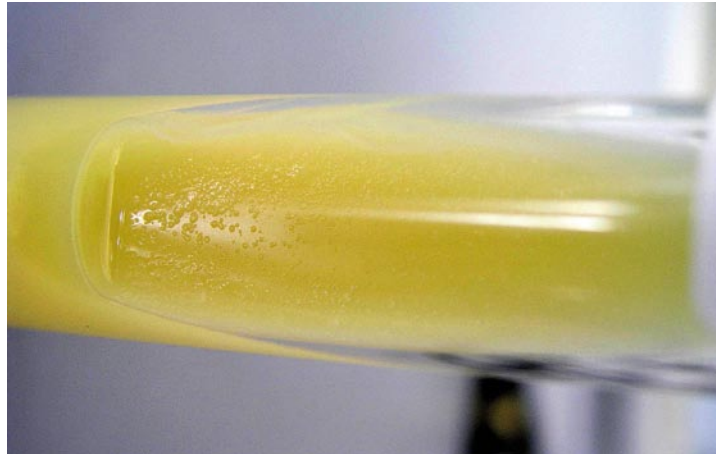


Abb. 1. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP): Koloniemorphologie auf HEYM-Schrägagar (oben) und Ziehl-Neelsen-Färbung im Lichtmikroskop (säurefeste, rote Stäbchen, unten). Gezeigt ist der Referenzstamm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DSM 44135. (Fotos: Philipp Ritter, ALP)

die nach einigen Tagen weisslich und langsam «schrumpelig» werden (Abb. 1). Diese Kolonien wurden ebenfalls auf Säurefestigkeit getestet. Mykobakterien verdächtige Isolate wurden dankenswerterweise am Institut für Infektionskrankheiten der Universität Bern oder am Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Universität Zürich mit klassischen und molekularbiologischen Methoden differenziert.

## Keine MAP in Schweizer Rohmilch nachgewiesen

In den 232 getesteten Milchproben konnten keine MAP nachgewiesen werden. Bei 16 Proben wurde verdächtiges Wachstum auf HEYM-Schrägagar festgestellt, von denen allerdings nur drei eine reproduzierbare Säurefestigkeit aufwiesen (Tab. 2). Diese Mykobakterien wurden als «andere Mykobakterien» (z.B. *Mycobacterium porcinum*) differenziert.

**Tab. 2. Resultate der mikrobiologischen Analysen von Rohmilch auf MAP**

Probenanzahl	Wachstum auf HEYM-Schrägagar	Ziehl-Neelsen-Färbung	Endresultat
216	-	-	keine Mykobakterien
8	+/-	-	keine Mykobakterien
5	+	+/-	keine Mykobakterien <sup>1</sup>
3	+	+	andere Mykobakterien <sup>1</sup>

- = negativ, + = positiv, +/- = schwach positiv

<sup>1</sup> nach Differenzierung bzw. wiederholtem Test auf Koloniemorphologie und Säurefestigkeit

Der Referenzstamm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DSM 44135, der als Positiv-Kontrolle in einer Milchprobe pro Untersuchungsserie künstlich zugegeben wurde, wurde stets anhand von Koloniemorphologie und Säurefestigkeit reisoliert und bestätigt.

#### Dringend benötigt: Referenzmethode für MAP-Nachweis

In der vorliegenden Studie konnten keine MAP nachgewiesen werden. Daraus kann man schließen, dass die Anzahl vermehrungsfähiger Zellen auf jeden Fall deutlich unter der Häufigkeit des MAP-DNA-Nachweises der Studie von Corti und Stephan (2002) liegt. Die Schweizer Situation ist vergleichbar mit derjenigen in Irland, da dort nur aus einer von 389 Rohmilchproben MAP kultiviert werden konnte, und das trotz des Nachweises von 12,9% PCR-positiver Proben (O'Reilly *et al.* 2004).

Kann man jetzt behaupten, dass die Schweizer Rohmilch vollständig frei von vermehrungsfähigen MAP ist? Sicherlich nicht, da zum einen für eine solche absolute Aussage sehr viel mehr Proben analysiert werden müssten und zum anderen, und das ist viel wichtiger, weist die vorhandene Methode auch Schwachstellen auf. Eine Unterbestimmung gegenüber dem «reellen» Wert ist möglich durch den allerdings unerlässlichen Dekontaminations-schritt und wegen eines möglichen Überwachsens der lang-

sam wachsenden Mykobakterien durch schnell wachsende Begleitflora (Methodenübersicht: Grant und Rowe 2001). Diese Probleme machen deutlich, dass eine Standardisierung der Untersuchungsmethoden dringend notwendig ist. Dasselbe gilt übrigens auch für die verwendeten PCR-Methoden zum Nachweis von MAP-DNA. Es wurde nämlich gezeigt, dass die IS900-PCR nicht vollständig spezifisch für MAP ist (Cousins *et al.* 1999). Damit besteht auch die Möglichkeit, dass die von Corti und Stephan (2002) bestimmte Häufigkeit von 19,7 % überbestimmt ist. Eine Suche nach spezifischeren PCR-Methoden zur Detektion von MAP hat daher begonnen (Englund 2003; Tasara und Stephan 2005). Die letztgenannte Arbeitsgruppe wies mit dem neuen PCR-System Erbsubstanz von MAP in nur 3 von 100 Proben von Schweizer Sammel-Rohmilch nach (Bosshard *et al.* 2006).

#### Schlussfolgerungen und Ausblick

Ein massives Vorkommen kultivierbarer MAP in Schweizer Rohmilch lässt sich nach dem bisherigen Erkenntnisstand ausschliessen. Allerdings kann erst nach Studien mit einer noch zu entwickelnden international anerkannten Referenzmethode eine gesicherte Risiko-Beurteilung bezüglich MAP in Milch- und Milchprodukten auch für die Schweiz vorgenommen werden. Dabei ist zu beachten, dass mög-

lichst auch Gehalte (also quantitative Angaben) von MAP in Rohmilch erfasst werden, damit z. B. anhand der Daten von Spahr und Schafroth (2001) berechnet werden kann, ob ein Vorkommen von MAP im verkaufsfertigen Halbhart- beziehungsweise Hartkäse in der Schweiz überhaupt potenziell möglich ist. In einer aktuellen Studie konnten keine vermehrungsfähigen MAP in Schweizer Rohmilchkäse aus dem Einzelhandel nachgewiesen werden (Stephan *et al.* 2007).

Weiterhin gilt es abzuklären, wie hoch der MAP-Eintrag in die Nahrungsmittelkette über andere Wege wie z.B. Trinkwasser, Gemüse oder Fleisch ist (z.B. Pickup *et al.* 2005). Und dies alles unter der Voraussetzung, dass sich der Verdacht auf den Zusammenhang zwischen Morbus Crohn und MAP in der Zwischenzeit erhärtet hat.

#### Literatur

- Bosshard C., Stephan R. & Tasara T., 2006. Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J. Food Prot.* 69 (7), 1662-67.
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2007. Zugang: [http://www.bmelv.de/cIn\\_045/mn\\_749972/DE/07-SchutzderTiere/Tierseuchen/Weitere/ParatuberkuloseRind.html](http://www.bmelv.de/cIn_045/mn_749972/DE/07-SchutzderTiere/Tierseuchen/Weitere/ParatuberkuloseRind.html) [13.11.2007].
- Corti S. & Stephan R., 2002. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology* 2, Zugriff: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/15> [13.11.2007]
- Cousins D.V., Whittington R., Marsh I., Masters A., Evans R.J. & Kluver P., 1999. *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants pos-



sess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol. Cell. Probes* **13** (6), 431-42.

■ Englund S., 2003. IS900/ERIC-PCR as a tool to distinguish *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from closely related mycobacteria. *Vet. Microbiol.* **96** (3), 277-87.

■ Ellingson J.L., Anderson J.L., Koziczkowski J.J., Radcliff R.P., Sloan S.J., Allen S.E. & Sullivan N.M., 2004. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food. Prot.* **68** (5), 966-72.

■ Feller M., Huwiler K., Stephan R., Altpeter E., Shang A., Furrer H., Pfyffer G.E., Jemmi T., Baumgartner A. & Egger M., 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **7** (9), 607-13.

■ Grant I.R., Ball H.J. & Rowe M.T., 2002. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (5), 2428-35.

■ Grant I.R. & Rowe M.T., 2001. Methods for the detection and enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk and milk products. *Bull. Int. Dairy Fed.* **362**, 41-52.

■ Greenstein R.J., 2003. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect. Dis.* **3** (8), 507-14.

■ Korzenik J.R., 2005. Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. *J. Clin. Gastroenterol.* **39** (4 Suppl 2), S59-65.

■ Naser S.A., Ghobrial G., Romero C. & Valentine J.F., 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364** (9439), 1039-44.

■ O'Reilly C.E., O'Connor L., Anderson W., Harvey P., Grant I.R., Donaghy J., Rowe M. & O'Mahony P., 2004. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (9), 5138-44.

■ Pickup R.W., Rhodes G., Arnott S., Sidi-Boumedine K., Bull T.J.,

Weightman A., Hurley M. & Hermon-Taylor J., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (4), 2130-9.

■ Spahr U. & Schafroth, K., 2001. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (9), 4199-205.

■ Stärk K.D., Frei-Stäheli C., Frei P., Pfeiffer D.U., Danuser J., Audi-ge L., Nicolet J., Strasser M., Gottstein B. & Kihm U., 1997. Frequency and cost of health problems in Swiss dairy cows and their calves (1993-1994). *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **139**, 343-353.

■ Stephan R., Schumacher S., Tasara T. & Grant I.R., 2007. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J. Dairy Sci.* **90** (8), 3590-5.

■ Tasara T. & Stephan R., 2005. Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (10), 5957-68.

## RÉSUMÉ

### Fréquence de l'agent de la paratuberculose dans le lait cru suisse

Depuis quelque temps, on soupçonne *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), l'agent de la paratuberculose chez les bovins et d'autres animaux, de jouer un rôle dans la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin chez l'homme. La bactérie étant en mesure de survivre à la pasteurisation du lait et à la maturation du fromage, il est important de connaître dans quelle ampleur les MAP capables de se multiplier sont présentes dans le lait cru en Suisse. Dans la présente étude, 232 échantillons de lait de collecte provenant de différentes régions de Suisse ont été analysés au moyen de cultures quant à la présence de MAP vivantes. Dans aucun échantillon, on n'a détecté des MAP cultivables. C'est pourquoi on peut en conclure que le lait cru suisse n'est pas contaminé massivement et à large échelle par des MAP. Une évaluation définitive des risques ne pourra toutefois être effectuée que lorsque l'on disposera d'études effectuées avec une méthode de référence - qui doit encore être mise au point - pour la détection des MAP.

## SUMMARY

### Incidence of paratuberculosis pathogens in Swiss raw milk

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), cause of paratuberculosis in cattle and other animals, is meant to be suspicious for being involved in Crohn's disease, an inflammatory bowel disease of humans. As the bacterium is able to partially survive the pasteurization of milk and the process of cheese ripening, it is important to know the presence of living MAP in Swiss raw milk. In the current study, 232 bulk milk samples from different parts of Switzerland were analysed for the presence of living MAP by cultural method. As MAP was not able to be detected in any sample, one can conclude, that Swiss raw milk is not massively and widespread contaminated with MAP. However, a final risk assessment can only be performed, if studies are present using a reference method for MAP detection which is still needed to be developed.

**Key words:** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, raw milk, Crohn's disease