

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

CIEPŁOOPORNOŚĆ *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*

Streszczenie

W latach 90. XX w. ukazały się pierwsze publikacje wskazujące, że *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) są bardziej ciepłooporne niż *M. bovis* i przeżywają pasteryzację mleka HTST. Od tego czasu ukazało się wiele prac potwierdzających obecność *Map* w produktach mlecznych. Obecność żywych komórek tych drobnoustrojów stwierdzono w próbkach rynkowego mleka pasteryzowanego, a także w serach. Badania nad ciepłoopornością *Map* są niełatwe ze względu na uciążliwość hodowli, a porównanie i interpretacja danych literaturowych z tego zakresu są utrudnione z uwagi na różnice w stosowanych metodach eksperymentalnych. W badaniach przeprowadzanych z użyciem mleka ogrzewanego w probówkach, kapilarach lub w pasteryzatorach laboratoryjnych wykazano, że pasteryzacja w temp. 63 °C/30 min, jak i HTST zmniejszają liczbę *Map* o 4 - 7 rzędów logarytmicznych. Rozbieżne wyniki otrzymano w doświadczeniach prowadzonych w warunkach pasteryzacji przemysłowej. Istnieje kilka hipotez oporności cieplnej *Map* w mleku, m.in. tworzenie skupisk komórek, adaptacja fizjologiczna prowadząca do nabycia ciepłooporności oraz fizykochemiczne zmiany we wnętrzu komórki.

Słowa kluczowe: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, obróbka cieplna, pasteryzacja, HTST

Wprowadzenie

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) jako pierwsi wyizolowali Johne i Frottingham w 1895 r. w badaniach przyczyn przewlekłej biegunki u bydła, nazwanej chorobą Johnego. Uważa się za prawdopodobne, że drobnoustroje te odpowiadają także za przewlekły stan zapalny przewodu pokarmowego człowieka (chorobę Crohna). Cechą charakterystyczną *Map* jest szczególna budowa 3-warstwowej ściany komórkowej złożonej w 30 ÷ 40 % z lipidów, dzięki której drobnoustroje te są odporne

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 159C, 02-776 Warszawa.
Kontakt: anna_berthold@sggw.pl

na czynniki fizyczne i chemiczne. Wśród kwasów tłuszczowych ściany komórkowej występują kwasy nasycone spotykane u innych mikroorganizmów, jak: masłowy, palmitynowy, stearynowy, kapronowy, jak również charakterystyczne tylko dla omawianego gatunku: tuberkulostearynowy i ftionowy. Komórki *Map* mają także otoczkę z cukrów, lipoarabinianu i liposacharydów, która ułatwia im tworzenie skupisk [21, 32].

Pasteryzacja jest głównym procesem gwarantującym bezpieczeństwo i jakość mleka oraz produktów mlecznych. Pasteryzacja mleka spożywczego stała się obowiązkowa w pierwszej połowie XX w. Początkowo parametry pasteryzacji były tak ustalone, aby zniszczyć *Mycobacterium bovis*. Bakterie te uważano wówczas za najbardziej ciepłooporne drobnoustroje wśród patogenów obecnych w mleku. Dopiero w 1957 r., na podstawie wyników badań nad efektywnością niszczenia komórek *Coxiella burnetii*, które okazały się bardziej ciepłooporne od *M. bovis*, ustalono minimalne parametry pasteryzacji, tj. 71,7 °C przez 15 s (HTST) [21].

W 1996 r. Grant i wsp. [13] opublikowali jako pierwsi wyniki dowodzące, że *Map* są bardziej ciepłooporne niż *M. bovis* i mogą przeżyć pasteryzację mleka HTST (72 °C/15 s), jeśli ich liczba przekracza 10^3 jtk/ml. Od końca lat 90. XX w. ukazało się także wiele prac potwierdzających obecność *Map* w produktach mlecznych. Obecność żywych komórek tych drobnoustrojów stwierdzono w próbkach rynkowego mleka pasteryzowanego w Czechach, Wielkiej Brytanii, Stanach Zjednoczonych i Indiach [2, 6, 16, 28], a także w próbkach serów w Czechach i Grecji [19].

Z uwagi na dane dotyczące występowania *Map* w mleku surowym i przypuszczalnego ich związku z chorobą Crohna oraz izolowania żywych komórek *Map* z próbek rynkowych produktów mlecznych bliżej zainteresowano się skutecznością pasteryzacji mleka przy stosowanych wówczas jej parametrach.

Skuteczność różnych wariantów obróbki cieplnej mleka wobec *Map*

Prowadzenie badań nad opornością cieplną *Map* jest uciążliwe ze względu na trudności w hodowli tych drobnoustrojów w warunkach laboratoryjnych. Również interpretacja i porównanie danych literaturowych są trudne ze względu na różnice w metodach eksperymentalnych, stosowanych przez autorów.

W większości badań nad ciepłoopornością *Map* określano ich przeżywalność przy różnych wariantach obróbki cieplnej mleka, dodając te drobnoustroje do mleka w postaci pojedynczych szczepów lub mieszaniny kilku szczepów. Początkowa liczba *Map* wynosiła od 2 do 8 log jtk/ml. W nielicznych badaniach [np. 16] zastosowano mleko surowe naturalnie zainfekowane *Map* lub jako inokulum użyto kału krów z kliniczną postacią choroby Johnego [26]. W najwcześniejszych badaniach nad ciepłoopornością *Map* prowadzono ogrzewanie sztucznie zanieczyszczonego mleka w próbkach lub szklanych kapilarach [4, 13, 30]. W badaniach tych mleko poddawano pasteryzacji

długotrwałej (LTLT; 63 °C/30 min) lub krótkotrwałej (HTST; 72 °C/15 s) i osiągnięto stopień redukcji *Map* poniżej 2 rzędów logarytmicznych. Stabel i wsp. [30] stwierdzili, że *Map* przeżywały ogrzewanie mleka w próbkach w temp. 76 °C, natomiast w czasie doświadczeń przeprowadzonych w pasteryzatorze laboratoryjnym zniszczenie *Map* przekraczało 6 rzędów logarytmicznych nawet podczas łagodniejszej obróbki cieplnej mleka (65 °C/15 s).

W badaniach prowadzonych z użyciem mleka ogrzewanego w próbkach, kapi-larach lub pasteryzatorach laboratoryjnych wykazano, że zarówno pasteryzacja LTLT (63 °C/30 min), jak i HTST (72 °C/15 s), powoduje redukcję liczby *Map* o 4 do 7 rzędów logarytmicznych podczas pasteryzacji długotrwałej [8, 29] i o 6 rzędów logarytmicznych – w przypadku pasteryzacji krótkotrwałej [14, 15]. Gdy mleko pasteryzowano w urządzeniach przemysłowych, w temp. ≥ 72 °C przez ≥ 6 s, uzyskiwano zmniejszenie liczby *Map* do poziomu < 1 jtk/40 ml, przy początkowej ich liczbie $\leq 5 \log$ jtk/ml [22, 25, 26]. W innych badaniach, w podobnych warunkach doświadczalnych, w niektórych próbkach mleka pasteryzowanego wykrywano żywe komórki *Map* [11, 16, 23]. Z kolei Hammer i wsp. [17] stwierdzili obecność *Map* w próbkach mleka pasteryzowanego bez względu na początkową ich liczbę, temperaturę (68 ÷ 90 °C) oraz czas obróbki cieplnej (18 ÷ 60 s). Grant i wsp. [11] wykazali, że zwiększenie temperatury z 72 do 82 °C miało mały wpływ na stopień zniszczenia *Map*, a wydłużenie czasu obróbki cieplnej z 15 do 60 s nie miało żadnego wpływu na stopień ich zniszczenia. Grant i wsp. [15] podają, że przy liczbie ponad 100 jtk *Map* w 1 ml mleka drobnoustroje te przeżywiają pasteryzację HTST (72 °C/15 s). W wielu badaniach wykazano, że obróbka cieplna mleka w temp. 65 ÷ 70 °C stosowana czasami podczas produkcji serów (tzw. subpasteryzacja lub termizacja) nie jest wystarczająca do całkowitego zniszczenia *Map* [8, 23, 25, 26, 29].

Trudności w interpretacji wyników badań dotyczących ciepłooporności *Map* wynikają z faktu, że wprowadzanie do surowego mleka inokulum komórek wybranego szczepu *Map* nie oddaje w pełni warunków przypadkowego, naturalnego zanieczyszczenia mleka tymi drobnoustrojami. Szczepy laboratoryjne mogą wykazywać się mniejszą lub większą opornością na ogrzewanie, a także nie występować w skupiskach, a to uważa się za istotny czynnik ciepłooporności tych drobnoustrojów.

Pearce i wsp. [25] zastosowali pasteryzator laboratoryjny, zapewniający burzliwy przepływ mleka, co miało symulować warunki panujące w przemysłowym płytowym wymienniku ciepła. Do mleka surowego wprowadzili taką ilość inokulum, aby liczba *Map* wynosiła $10^3 \div 10^4$ jtk/ml. Mleko poddawali ogrzewaniu przez 15 s w temperaturze [°C]: 72, 69, 66 lub 63. Żaden z badanych szczepów *Map* nie przetrwał ogrzewania w temp. 72 °C, a tylko jeden – w temp. 69 °C. Osiągnięto redukcję liczby bakterii o 7 rzędów logarytmicznych. Podobne wyniki uzyskali McDonald i wsp. [23] oraz Stabel i Lambertz [29]. Ci ostatni autorzy [29] stwierdzili redukcję liczby *Map* w mleku

ogrzewanym w laboratoryjnym pasteryzatorze HTST (71,7 °C/15 s) na poziomie średnio 5 log przy liczbie w mleku surowym – 10⁵ jtk/ml i 7,7 log przy liczbie – 10⁸ jtk/ml. W mleku pasteryzowanym w minimalnych warunkach HTST *Map*. mogą więc przeżyć w niewielkiej liczbie.

Doświadczenia z zastosowaniem pasteryzatora przemysłowego pracującego w burzliwym przepływie cieczy, ale z mlekiem naturalnie zanieczyszczonym komórkami *Map*, przeprowadzili Grant i wsp. [16]. Część próbek mleka poddanych pasteryzacji w temp. 72 °C przez 15 lub 25 s zawierała *Map*. Badacze podkreślają, że wpływ na otrzymane wyniki mogło mieć przetrzymanie próbek mleka po pasteryzacji przez 24 ÷ 72 h, a przed wykonaniem oznaczeń liczby *Map*, co mogło spowodować regenerację komórek, które uległy subletalnemu uszkodzeniu w czasie obróbki cieplnej.

Wartości D (czas 10-krotnej redukcji liczby bakterii w danej temperaturze) wyliczane na podstawie badań nad termiczną inaktywacją *Map* w mleku podawane w różnych publikacjach znacznie różnią się między sobą. Wartość D_{63 °C} zawiesiny komórek występujących w skupiskach wahała się od 2,7 do 2,9 min, a komórek poddanych dokładnemu rozbiciu i występujących pojedynczo – od 1,6 do 2,5 min [20]. Wyraźnie niższe wartości D otrzymali Foddai i wsp. [7] (D_{63 °C} – 81,8 s). Rozbieżności pojawiają się nawet w badaniach nad tymi samymi szczepami. Przykładowo, dla szczepu *Map* ATCC 19698 Lynch i wsp. [22] podają wartość D_{65 °C} równą 20 s, Pearce i wsp. [25] – D_{66 °C} – 5 s, natomiast Foddai i wsp. [7] przy znacznie wyższej temp. 68 °C – 10,1 s. Wartości D w temp. 72 °C, obliczone jako średnie dla 4 szczepów *Map*, wynosiły 4,4 ± 1,1 s [7]. Z kolei dla szczepu *Map* wyizolowanego ze źródeł klinicznych wartość D_{71 °C} wynosiła 11,7 s [31], a obliczona dla kilku szczepów przez Pearce'a i wsp. [25] D_{72 °C} – 2,03 s.

Średnia wartość z (zmiana temperatury konieczna do 10-krotnej zmiany wartości D) mleka obliczona przez Foddaiego i wsp. [7] wynosiła 6,9 °C. Podobną wartość (7,11 °C) podają Sung i Collins [31], co potwierdza, że bakterie *Map* są bardziej ciepłooporne niż bakterie *M. bovis*, których średnia wartość z w mleku wynosi 5,0 °C.

Hipotezy ciepłooporności *Map*

Istnieje kilka hipotez dotyczących oporności cieplnej *Map* w mleku, m.in. tworzenie skupisk komórek, adaptacja fizjologiczna prowadząca do nabycia ciepłooporności oraz fizykochemiczne zmiany we wnętrzu komórki [1]. Bakterie *Map* mają naturalną tendencję do tworzenia skupisk dzięki hydrofobowości ich ściany komórkowej. Stwierdzono, że komórki, które przetrwały obróbkę cieplną występowały właśnie w formie niewielkich skupisk [17]. Wykazano także, że po mechanicznym wymieszaniu próbki mleka (umieszczonej w probówce ze szklanymi perełkami) w urządzeniu Vortex, sztucznie zanieczyszczonego *Map*, komórki były 2-krotnie bardziej wrażliwe na pasteryzację w warunkach 63°C/30 min niż w próbce niepoddawanej takiej obróbce

[27]. Z drugiej strony, czas konieczny do przeniknięcia ciepła do wnętrza skupiska komórek wynosi jedynie kilka setnych sekundy [5]. Liczba komórek tworzących skupiska pochodzące z kału nie była duża, ale znacznie większe, wielowarstwowe skupiska *Map* tworzą w zawiesinach wodnych [18], jakie wykorzystuje się do badań nad inaktywacją cieplną drobnoustrojów. Tworzenie skupisk może nie być więc jedyną przyczyną oporności cieplnej tych drobnoustrojów. Gould i wsp. [10] odrzucają hipotezę o adaptacji *Map* do stresu cieplnego. Wykazana przez Hammera i wsp. [17] przeżywalność *Map* w temp. 90 °C wiązałaby się z ponad 1000-krotnym wzrostem ciepłooporności, co jest mało prawdopodobne. Żaden z mechanizmów odpowiedzi na stres cieplny wykazany u innych gatunków bakterii nie powodował tak znacznego wzrostu ich oporności. Inny mechanizm oporności cieplnej *Map* może być związany z obecnością w mleku kuleczek tłuszczowych, w których wnętrzu bakterie znajdują środowisko o zmniejszonej zawartości wody, co zwiększa ich oporność na ciepło [1].

Obserwowana, nieliniowa zależność inaktywacji cieplnej *Map*, zjawisko wcześniej przypisywane tworzeniu skupisk, jest również charakterystyczna dla komórek występujących pojedynczo, a nie w skupiskach. W starszych kulturach *Mycobacterium marinum* i *M. bovis* BCG stwierdzono występowanie przetrwalników, a jednocześnie – podobnych w przebiegu krzywych inaktywacji cieplnej w czasie ogrzewania w temp. 65 °C/15 min, jakie obserwuje się w przypadku *Map* [9]. Hipoteza, że *Map* w warunkach niesprzyjających (np. przy wydłużonej hodowli) mogą tworzyć przetrwalniki, wymaga potwierdzenia dodatkowymi badaniami.

Wpływ innych procesów wstępnej obróbki mleka na ciepłooporność *Map*

Procesy oczyszczania, homogenizacji, normalizacji mleka czy ewentualnej mikrofiltracji mogą wpływać na liczbę *Map* w mleku pasteryzowanym. Dzięki połączeniu wirowania mleka i jego mikrofiltracji usuwa się od 95 do 99,9 % komórek *Map* [12]. Skuteczniejsze pod względem zniszczenia *Map* jest prowadzenie procesu homogenizacji mleka przed pasteryzacją niż po pasteryzacji [23]. Korzystny wpływ homogenizacji mleka (17 MPa) przed obróbką cieplną na zniszczenie *Map* wykazali także Grant i wsp. [11]. Natomiast Rademaker i wsp. [26] nie stwierdzili wpływu homogenizacji mleka na skuteczność pasteryzacji w stosunku do *Map*.

Podsumowanie

Wyniki badań nad cieplną inaktywacją *Map* nie są jednoznaczne. Nadal nie można podać przyczyny występowania tych drobnoustrojów w produktach rynkowych, gdyż nie ma pewności, czy *Map* przeżywają proces pasteryzacji mleka, czy mogą być wynikiem wtórnego zanieczyszczenia produktu. Na podstawie danych empirycznych stworzono matematyczny model opisujący prawdopodobieństwo występowania *Map* w pasteryzowanym mleku rynkowym. Zgodnie z nim dobra praktyka higieny doju

w połączeniu z prawidłowo przeprowadzoną przemysłową pasteryzacją mleka (72 °C/15 s) skutkuje bardzo niskim prawdopodobieństwem obecności żywych komórek *Map* w produkcie. Według innych badań prawdopodobieństwo wykrycia *Map* w próbce 50 ml mleka pasteryzowanego handlowego w krajach rozwiniętych wynosi 0,54 % (przy założeniu liczby *Map* w mleku surowym 10 jtk/ml). Przy założeniu, że prognozy te są prawidłowe i w mleku pasteryzowanym handlowym występuje bardzo mało żywych komórek *Map*, to zgodnie z wiedzą dotyczącą patogenności tych drobnoustrojów nie można określić ich wpływu na zdrowie konsumenta. *Map* izolowano również z tusz mięsnych [24, 33] i chociaż brakuje danych literaturowych na temat występowania tych drobnoustrojów w warzywach i owocach, to biorąc pod uwagę występowanie *Map* w środowisku, należy przyjąć, że produkty mleczne nie są jedyymi nośnikami tych patogenów.

Literatura

- [1] Anonim: Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*MAP*). J. Food Prot., 2010, **73**, 1357-1397.
- [2] 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. App. Environ. Microbiol., 2005, **71**, 1210-1214.
- [3] Cerf O., Griffiths M., Aziza F.: Assessment of the prevalence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in commercially pasteurized milk. Foodborne Pathog. Dis., 2007, **4**, 433-447.
- [4] Chodini 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] Davey K.R.: Equilibrium temperature in a clump of bacteria heated in fluid. Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56**, 566-568.
- [6] Ellingson J.L., Anderson J.L., Koziczkowski 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.
- [7] Foddai A., Elliot C.T., Grant I.R.: Rapid assessment of the viability of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* cells after heat treatment, using an optimized phage amplification assay. Appl. Environ. Microbiol., 2010, **76**, 1777-1782.
- [8] 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.
- [9] Ghosh J., Larsson P., Singh B., Pettersson B., Islam N., Sarkar S., Dasgupta S., Kirsebom L.: Sporulation in mycobacteria. PNAS, 2009, **106**, 10781-10786.
- [10] Gould G., Franken P., Hammer P.M., Shanahan F.: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*MAP*) and the food chain. ILSI Europe Report Series, August 2004.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T.: Effect of high temperature, short time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. Lett. Appl. Microbiol., 1998, **26**, 166-170.
- [15] Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T.: Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72°C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. Lett. Appl. Microbiol., 1999, **28**, 461-465.
- [16] Grant I.R., Hitchings E.I., McCartney A., Ferguson F., Rowe M.T.: Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. Appl. Environ. Microbiol., 2002, **68**, 602-607.
- [17] Hammer P., Kiesner C., Walte H.G., Knappstein K., Teufel P.: Heat resistance of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber., 2002, **54**, 275-303.
- [18] Hammer P., Kiesner C., Walte H.G., Teufel P.: Inactivation of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in whole milk, skim milk and cream in a pilot plant pasteurizer. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber., 2006, **58**, 17-40.
- [19] Ikonopoulous 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.
- [20] Keswani J., Frank J.F.: Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. J. Food Prot., 1998, **61**, 974-978.
- [21] Klijn N., Herrewegh A., de Jong P.: Heat inactivation data for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: implications for interpretation. J. Appl. Microbiol., 2001, **91**, 697-704.
- [22] Lynch D., Jordan K.N., Kelly P.M., Freyne T., Murphy P.M.: Heat sensitivity of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in milk under pilot plant pasteurization conditions. Int. J. Dairy Technol., 2007, **60**, 98-104.
- [23] McDonald W.L., O'Riley K.J., Schroen C.J., Condron R.J.: Heat inactivation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk. Appl. Environ. Microbiol., 2005, **4**, 1785-1789.
- [24] Meadus W.J., Gill C.O., Duff P., Badoni M., Saucier L.: Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* DNA. Int. J. Food Microbiol., 2008, **124**, 291-294.
- [25] Pearce L.E., Truong H.T., Crawford R.A., Yates G.F., Cavaignac S., De Lisle G.W.: Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* added to raw milk. Appl. Environ. Microbiol., 2001, **67**, 3964-3969.
- [26] 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.
- [27] Rowe M.T., Grant I.R., Dundee L., Ball H.J.: Heat resistance of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk. Irish J. Agric. Food Res., 2000, **39**, 203-208.
- [28] Shankar H., Singh S.V., Singh P.K., Singh A.V., Sohal J.S., Greenstein R.J.: Presence, characterization and genotype profiles of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized and milk products in India by culture, PCR and PCR-REA methods. Int. J. Infect. Dis., 2010, **14**, 121-126.
- [29] Stabel J.R., Lambertz A.: Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in milk. J. Food Prot., 2004, **67**, 2719-2726.
- [30] 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.

- [31] Sung N., Collins M.T.: Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**, 999-1005.
- [32] Sztejn J., Wiszniewska-Łaszczyk A., Ruszczyńska A.: Występowanie *Mycobacterium paratuberculosis* w mleku surowym. Med. Weter., 2006, **10(62)**, 1186-1187.
- [33] Wells J.E., Bosilevac J.M., Kalchaganand N., Arthur T.M., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M.: Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes and on hides and carcasses from culled cows and fed cattle at commercial beef processing plants in the United States. J. Food Prot., 2009, **72**, 1457-1462.

THERMAL RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*

S u m m a r y

In the 1990s, first publications appeared where it was indicated that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) was more heat resistant than *M. bovis* and it could survive the HTST pasteurization of milk. Since then, there were many research studies published to confirm the presence of *Map* in dairy products. It was found that live cells of those micro-organisms were present in samples of marketed pasteurized milk and, also, in cheeses. It is not easy to study the thermal resistance of *Map*, because the cultivation of *Map* is an arduous process, and comparing and interpreting the data contained in the reference literature is impeded for reasons attributable to differences among experimental methods applied. The analyses performed with the use of milk heated in tubes, capillary tubes, or in laboratory pasteurizers proved that the pasteurization at a temperature of 63 °C/30 minutes as well as HTST caused the count of *Map* cells to decrease by 4 to 7 logarithmic orders. When the experiments were carried out under the conditions of industrial pasteurization, the results obtained were divergent. There are several hypotheses on the thermal resistance of *Map* in milk, among other things, the formation of clusters of bacteria, physiological adaptation of bacteria that allows them to acquire heat resistance, and physical-chemical changes inside the cells.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, heat processing, pasteurization, HTST ☒