

Slutrapport för projekt ”Utveckling och prövning av tester för detektion av *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* i mjölk”

SLF projnr: 0430034

Göran Bölske & David Herthnek, SVA, Uppsala

Referensgrupp: Anders Christiansson, Jonas Carlsson, Sven-Ove Olsson och Ann Lindberg från Svensk Mjölk. Jan Åke Robertsson, Andrea Holmström och Ulrika Rockström från Svenska Djurhälsovården, samt Susanna Sternberg Lewerin från SVA.

Bakgrund

Paratuberkulos är en kronisk tarmsjukdom hos nötkreatur och andra idisslare, som orsakas av bakterien *Mycobacterium paratuberculosis*, eller mera korrekt *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* (MAP). Sjukdomen har ett långdraget, smygande förlopp och djuren kan vara infekterade i många år innan de visar några symtom. Symtomen hos nötkreatur är avmagring och diarré. Sjukdomen ger ekonomiska förluster p.g.a. produktionsminskning, utslaktningen av infekterade djur, höga kostnader för tester och kontrollprogram.

Paratuberkulos är vanlig runt om i världen. Sverige är ett av de få länder som är fria (eller har mycket låg förekomst). Paratuberkulos betraktas i Sverige som en epizooti, vilket innebär att staten måste vidta åtgärder för att förhindra smittspridning och försöka utrota smittämnet.

Det tar oftast flera år innan man ser några symtom vid paratuberkulos. Inkubationstiden är 6 månader – mer än 10 år. Sjukdomsprocessen startar i bakre delen av tunntarmen och dess lymfknotor. Utskiljningen av bakterier i träcken kommer sent och är först oregelbunden och det tar alltså oftast flera år innan man kan påvisa bakterien i träckprover. När djuret väl visar symtom är bakterie-utskiljningen i regel riklig. Det säkraste sättet att avgöra om ett symtomfritt djur är infekterat med MAP är att vid slakt eller obduktion undersöka prover från tarmslemhinna och tarmlymfknotor från bakre delen av tunntarmen med odling.

På senare år har man visat att MAP ibland också kan finnas i blod, mjölk och sperma och därför kan dessa provmaterial också vara av intresse för screening och diagnostik. I det här projektet planerade vi att utveckla agens-diagnostiken på mjölk för att kunna screena svenska mjölkbesättningar genom att testa tankmjölken.

Crohns sjukdom. Det har länge också hävdats att MAP kan orsaka till Crohns sjukdom, ett kroniskt tarmlidande på människa. Detta är dock mycket kontroversiellt. Medan en del forskare anser sambandet så starkt att det visar att MAP orsakar Crohns sjukdom, förespråkar de flesta bara att det finns ett visst samband mellan sjukdomen och mikroorganismen och att orsakssammanhanget är oklart. Det föreslagna sambandet mellan MAP och Crohns sjukdom kan också bero på att MAP är en opportunistisk samexisterande kolonisationsorganism. Emellertid är det faktum att man har påvisat MAP i mjölken från infekterade kor anledning att bevaka frågan om eventuell zoonos-status för MAP.

Den viktigaste smittkällan för människa anses vara mjölk och mjölkprodukter, eftersom bakterien kan påvisas i mjölken och överleva pasteuriseringen. MAP har påvisats i pasteuriserad konsumtionsmjölk i bl. a. England, Nordirland och USA. Frågan om förekomsten av MAP i konsumtionsmjölk och kopplingen till Crohns sjukdom har tidvis uppmärksamats i massmedia i Storbritannien och USA.

Projektets syfte var att förbättra och effektivisera metodiken att påvisa *M. avium* ssp. *paratuberculosis* i mjölkprover och att validera och dokumentera tekniken för att ge trovärdighet åt testresultaten. Ett mål var också att tillämpa PCR-testning på tankmjölk i Sverige för screening av svenska besättningar och svensk mjölk.

Material och metoder

PCR-metoder. En realtids-PCR (MP-systemet), som utnyttjar IS900-genen hos MAP, är redan tidigare införd i rutindiagnostiken (Herthnek et al. 2006).

Tre alternativa realtidsPCR-system har utvecklats för att användas för konfirmering vid positivt utslag med rutinPCR-metoden (MP). Två av de alternativa systemen (DH1 och DH2) utnyttjar andra delar av IS900-genen, medan det tredje (DH3) utnyttjar F57-genen, som också anses vara specifik för MAP, och därmed är DH3 ett helt oberoende system (Herthnek & Bölske 2006).

I samtliga tillämpningar används rutinmässigt realtids-PCR MP och vid positiv test används i första hand DH3 för att konfirmera, men för prover med små mängder MAP kan DH1 eller DH2 behöva användas eftersom DH3 har lägre känslighet. (Orsaken är att F57 finns i endast en kopia, medan IS900 finns i ca 18 kopior hos MAP.)

Extraktionsmetoder för mjölk. Förbehandlingsprotokollen innefattar lysering med bead-beating och därefter följer rening och extraktion av DNA.

Under första året utgick vi från en **modifierad metod efter Corti** och Stephan 2002. Metoden bygger på centrifugering och fenol-extraktion i flera steg (Bull et al. 2003). Metoden användes i en screening av tankmjölksprover från Schweiz (Corti & Stephan 2002). Vi modifierade metoden med bättre lysering och ytterligare ett extraktionssteg, eftersom reningen visade sig vara otillräcklig. I de ursprungliga metodbeskrivningarna används en nästads PCR (dubbel PCR) för den slutliga analysen. Nästads PCR har hög känslighet, men har ökad risk för falskt positiva resultat, och därför använde vi istället vår egen realtids-PCR MP för den slutliga analysen.

Under andra året utvecklades en **förbättrad metod för extraktion**, som i korthet innefattar centrifugering vid 10°C och avskiljning av både gräddlock och bottenpellet. Inkubering av dessa vid 37°C och efter centrifugering, fränkilja och kasta eventuell upplöst kaseinfraction. Efter upplösning av gräddfasen med lysisbuffert och proteinas K poolades den med bottenpelleten och behandlades med beadbeating för att öppna cellväggen och frigöra DNA. DNA-extraktion utfördes sedan automatiskt i en BioRobot EZ1 workstation. (Herthnek et al. 200x)

Den analytiska sensitiviteten bestämdes med hjälp av spikades mjölkprover. Till MAP-fri mjölk tillsattes en räknad kultur av MAP. Mängdbestämningen skedde genom räkning av bakterierna i Bürkerkammare med mikroskop.

Mjölksprover från paratuberkulosbesättningar erhöles från Sören Saxmose Nielsen, KVL, Köpenhamn och kom från besättningar som ingick i ett projekt med Erik Rattenborg, Dansk Kvaeg.

Första året erhöles tankmjölksprov och 65 individuella mjölkprover från en besättning, som testades med modifierad Cortis metod.

Under andra året utvecklades en **förbättrad metod för extraktion**, som i korthet innefattade centrifugering vid 10°C och avskiljning av gräddlock och bottenpellet. Inkubering av dessa vid 37°C och därefter vid centrifugering fränkilja och kasta eventuell upplöst

kaseinfraktion. Efter upplösning av grädden med lysisbuffert och proteinas K poolades den med bottenpelleten. (Herthnek et al. 200x)

Tankmjölkprover från paratuberkulosfria besättningar erhöles via Svenska Djurhälsovården från besättningar inom Paratuberkuloskontrollen med mjölkkor. Ett fåtal av dessa har mjölkkor, varför vi endast fick in 8 tankmjölksprover från dem.

Resultat

PCR-system för konfirmering

De tidigare utvecklade PCR-systemen för konfirmering av PCR-positivt prov har prövats praktiskt vid tillämpning på träckprover och vävnadsprover. De alternativa PCR-systemen visade god tillförlitlighet och kunde bekräfta positivt testresultat med direkt-PCR på organ eller träckprov (Herthnek & Bölske 2006). De konfirmerande systemen har nu också prövats på positiva mjölkprover, som varit svårare att konfirmera pga de låga halterna MAP i dessa prover (Herthnek et al. 200x).

Mjolk-PCR

Den **modifierade PCR-metoden efter Corti**, som använts för tankmjölkprover i Schweiz, prövades först. Förbehandlingsmetoden kunde, efter modifieringen, tillfredsställande avlägsna PCR-hämmande substanser från mjölken. Metoden prövades på mjölkprover från en dansk besättning med paratuberkulos. MAP påvisades då i mjölken från 2 av 14 kor som hade haft positiv träckodling. Mjölken från övriga 51 kor i besättningen var negativ. En mycket svag PCR-reaktion påvisades i prov från besättningens tankmjölk.

Den **egenutvecklade extraktionsmetoden** utvärderades mot spikade mjölkprover och bestämdes ha en **sensitivitet** på 100 bakterier/ml för prover om 10 ml, men MAP kunde även detekteras i tre av fyra prover som spikats med 10 organismer/ml. Här ska man observera att 100 mikroskopi-räknade MAP/ml kan motsvara mindre än 5 CFU/ml. (Herthnek et al. 2006).

När extraktionsmetoden med efterföljande realtids-PCR **prövades på 143 tankmjölksprover från 56 besättningar**, blev 19 prover från 17 besättningar (30%) PCR-positiva i det primära MP real-tids PCR-systemet. Resultatet vid odling av miljöprover, som var positivt från 38 besättningar (68%), användes som referens. Av de 89 tankmjölkproverna från dessa odlingspositiva besättningar var 18 prover (20%) mjölkPCR-positiva. På besättningsnivå var 16 (42%) av de 38 odlingspositiva gårdarna positiva med mjölk-PCR.

Vid den kvantitativa mätningen med PCR visade det sig att halten av MAP i mjölken sällan översteg 100 bakterier/ml, vilket också är i närheten av metodens detektionsgräns. Detta stämmer också väl med det faktum att positiva PCR-reaktioner ofta var svåra att konfirmera och i vissa fall kunde inte konfirmering ske pga brist på prov-material för att testa ytterligare replikat. Andelen odlingspositiva prover bland de mellan 6 – 18 miljöprover, som odlades per besättning, var positivt korrelerad till andelen PCR-positiva tankmjölksprover och också till i vilken grad de positiva mjölkproverna kunde konfirmeras. I gruppen där mer än hälften av miljöproverna var positiva var 54% positiva med mjölk-PCR. Från gårdar där alla miljöproverna var positiva var 67% av mjölkproverna PCR-positiva.

Tankmjölksproverna från de svenska besättningarna var alla negativa med PCR.

Diskussion

Cortis förbehandlingsmetod är omständig och arbetskrävande. Vår modifiering av metoden för att bättre eliminera PCR-hämning från provet gjorde metoden än mer arbetskrävande. För övrigt var metoden inte särskilt robust och det skulle behövas en hel del utvecklingsarbete innan metoden kan fungera bra. Ett bättre alternativ var att gå över till en helt annan förbehandlings-metod, helst robotiserad metod.

Eftersom endast mjölkproverna från en gård var tillräckligt färska för att kunna analyseras med den metod som användes är materialet för litet för att dra några slutsatser. Undersökningen gav därför inte någon klarhet i hur mycket paratuberkulosbakterier det kan finnas i mjölken från infekterade kor. Inte heller kan man dra några säkra slutsatser om den använda PCR-metodens diagnostiska sensitivitet, alltså hur känslig den är i praktiken. Det är dock troligt att PCR-testning av tankmjölk inte är en så känslig metod som antydde av den schweiziska screeningen där 19,7 % av tankmjölkproverna blev positiva. Att det var en betydande del falskt positiva resultat bekräftades också vid den schweiziska gruppens presentation på Paratuberkulosmötet i Köpenhamn i augusti 2005 (Tasara & Stephan 2005). Sammanfattningsvis kan man säga att det inte var meningsfullt att testa svenska tankmjölkprover med Cortis förbehandlingsmetod. En bättre metod måste först provas och valideras.

PCR-metoder för konfirmering. Den rutinmässigt använda PCR-metoden (MP-systemet), som påvisar en del av IS900-genen hos paratuberkulosbakterien är inte fullständigt specifik, utan kan i enstaka fall reagera med liknande gener hos närbesläktade bakterier (Englund et al. 2002). Man måste därför alltid konfirmera en positiv PCR för paratuberkulos. Om man utför PCR-testen direkt på provet måste man konfirmera med en annan lika känslig detektionsmetod. Det kan vara en annan oberoende PCR, som t ex är riktad mot en annan gen hos bakterien. Vi har tagit fram en sådan konfirmerande PCR, som utnyttjar en annan specifik gen (F57) hos paratuberkulosbakterien. Den är dock inte lika känslig som MP-systemet, vilket är förklarligt med tanke på att IS900-genen förekommer i ca 18 kopior hos bakterien, men F57-genen endast i 1 kopia. Vi har därför utvecklat två alternativa realtids-PCR mot andra delar av IS900-genen. Dessa alternativ har lika hög känslighet som MP-systemet. I praktisk användning av realtids-PCR F57 för konfirmering har vi dock kunnat kompensera för detta genom att vid behov testa flera replikat av provet. På så sätt har vi i de flesta fall lyckats konfirmera även svagt positiva prov med PCR F57.

Vi har därmed tillgång till säkra konfirmerande metoder även när vi använder realtids-PCR direkt på provmaterialet för att påvisa *M paratuberculosis*, vilket är mycket viktigt i Sverige där ett påvisat nytt fall av paratuberkulos får mycket allvarliga konsekvenser. Beskrivning och validering av våra konfirmerande PCR har nu publicerats (Herthnek & Bölske 2006).

Utveckling av extraktionsmetoden för mjölk.

Den egenutvecklade extraktionsmetoden visades ha en detektionsgräns under 100 bakterier/ml när man testade mjölk som tillsatts känd mängd bakterier. För en del tidigare rapporterade PCR-metoder för mjölk har man visat lägre detektionsgränser vid mätning på spikad mjölk. Bakterieräkningen i den tillsatta kulturen sker dock vanligen i de flesta rapporter genom koloniräkning efter odling och anges då som CFU (colony forming units). Det är ett sätt att räkna bakterier som för MAP underskattar mängden bakterier mellan 10 och 1000 gånger. När det är mer bakterier i provet än vad man uppmätt, leder det till att den prövade metodens känslighet överskattas, för MAP med mellan 10 till 1000 gånger. Vi har räknat bakterierna med mikroskop i en räknekammare och anser därför våra uppmätta värden bör vara mera korrekta än de som räknats med CFU.

I den egenutvecklade extraktionsmetoden sker en första rening med centrifugering och både bottenpelleten och gräddlocket samlas upp för vidare behandling. Detta ökar metodens känslighet eftersom den fettrika cellväggen hos MAP gör att en del av bakterierna finns i gräddfasen. Liksom i alla våra förbehandlingsmetoder för PCR på MAP utförs sedan en effektiv mekanisk behandling med bead-beating för att få ut allt DNA från de mycket motståndskraftiga paratuberkulosbakterierna. Den egentliga DNA-extraktionen utförs sedan med en lab-robot.

Ett av projektets syften var att undersöka om PCR tester på tankmjölk skulle kunna vara en enkel och bra metod för screening av MAP i mjölkbesättningar. I samarbete med det danska projektet hade vi möjlighet att jämföra PCR-test av tankmjölk med en annan metod för besättnings-screening, nämligen odling av miljöprover. Med reservation för att antalet prover från varje besättning inte var matchade kan man ändå konstatera att det var stor skillnad i känslighet mellan metoderna. Med miljöprovodling påvisades MAP i 68% av de 56 besättningarna medan mjölk-PCR blev positiv i 30% av besättningarna.

För att kunna detektera MAP i tankmjölken krävs att bakterien utskiljs i mjölken eller genom kontamination tillförs i tillräcklig mängd för att komma upp till detektionsgränsen, även efter utspädning med MAP-fri mjölk från andra kor. Uppenbarligen var, i de flesta av de undersökta paratuberkulosbesättningarna, koncentrationen av MAP i tankmjölken för låg för att säkert påvisas, och när proven blev positiva var koncentrationen vanligen lägre än 100 MAP/ml. Därför är den diagnostiska känsligheten i det här fallet låg, även om den analytiska känsligheten är hög. Det kan finnas besättningar i andra länder med andra kliniska förhållanden och andra skötselrutiner där en större andel av korna i en besättning utskiljer MAP i mjölken och/eller kontaminerar mjölken mer pga sämre rengöring av juver och spenar, resulterande i högre koncentrationer av MAP i tankmjölken. Man kan dock inte utgå ifrån att så är fallet. Det är därför inte troligt att PCR-testning av tankmjölk kan vara en tillförlitlig metod för att screena besättningar avseende förekomst av MAP. Det gäller i hög grad även för Sverige, där eventuella paratuberkulosbesättningar kan förväntas ha få smittade djur och låg utskiljning av MAP.

Däremot kan mjölk-PCR vara användbar för att kontrollera MAP i mjölk avsedd för konsumtion. När mjölkproverna testas parallellt med spikad mjölk med kända halter av MAP kan man utnyttja Realtids-PCRs möjlighet att mäta kvantitativt och tillsammans med data om överlevnaden av MAP efter pasteurisering har man möjlighet att bedöma risken för viabla MAP i konsumtionsmjölken. I en översikt av pasteuriseringsstudier (Rademaker et al. 2007) framgår att man har uppnått mellan 4 och 7 log reduktion med pasteuriseringen. Utan att spekulera om den möjliga risken för konsumenten med överlevande MAP, kan man dra slutsatsen att i tankmjölk från besättningar med sjukdomsläge och hygieniska förhållanden som i de i Danmark testade, skulle det vara mycket osannolikt med överlevande MAP efter pasteuriseringen.

Övrig resultatförmedling till näringen

- Bölske informerar om mjölkPCR-projektet och metodutvecklingen för representanter för Svensk Mjök, Svenska Djurhälsovården och Dansk Kvaeg vid planeringsmöte i Köpenhamn 2005-01-27.
- Bölske och Herthnek informerar om mjölkPCR-projektet och de första resultaten av testerna på dansk mjök 2006-11-17.
- Bölske och Herthnek informerar Svensk Mjök och Svenska Djurhälsovården om de första resultaten på danska mjökproverna med den schweiziska metoden vid möte 2006-02-21.
- Information till Svensk Mjök och Svenska Djurhälsovården om resultat av utförda tester på dansk mjök på ett möte 2007-05-24.
- Information till Svensk Mjök, Svenska Djurhälsovården och Jordbruksverket om mjölkPCR-metoden och slutresultatet av utvärderingen på danska mjökprover vid möten 2007-09-05 och 2007-11-07.
- Särskild resultatförmedling via Jonas Carlsson i referensgruppen till Svensk Mjök och däri ingående föreningar.

- För övrigt har vi hållit kontakt och informerat referensgruppens medlemmar om resultat via e-mail och telefon.

Egna publikationer från projektet

1. Herthnek D & Bölske G (2006) New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC Microbiol.* **6**:87.
2. Herthnek D, Saxmose Nielsen S & Bölske G (2007) Real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in milk and comparison to culture of environmental samples for herd testing. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, Tsukuba, 2007. Abstract and poster.
3. Herthnek D (2006) Detection and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in clinical samples. Ph. Lic. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
4. Herthnek D, Saxmose Nielsen S, Lindberg A & Bölske G (200x) A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J. Microbiol. Methods* (Accepted for publication)

Referenser

- Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2003) Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2915-2923.
- 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 Microbiol.*, **2**, 1-7.
- Englund S, Bölske G & Johansson K-E (2002) An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **209**, 267-271.
- Herthnek D, Englund S, Willemsen P & Bölske G (2006) Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.*, **100**:1095-1102.
- Rademaker JL, Vissers MM, Te Giffel MC (2007) Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4185-4190.
- Tasara T. & Stephan R. (2005) A light cyclor based real-time PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in food samples. 8th International Colloquium *M. paratuberculosis*, Copenhagen, August 2005. Abstracts p. 121.