

Praca oryginalna

Original paper

Charakterystyka molekularna szczepów *Mycobacterium tuberculosis complex* izolowanych od bydła w woj. mazowieckim w latach 2008-2012

MONIKA KRAJEWSKA-WĘDZINA, MONIKA KOZIŃSKA*, EWA AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ*,
MARCIN WEINER**, KRZYSZTOF SZULOWSKI

Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa

**Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej, ul. Sidorska 95/97, 21-500 Biała Podlaska

Otrzymano 01.03.2017

Zaakceptowano 27.04.2017

Krajewska-Wędzina M., Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Weiner M., Szulowski K.

Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis complex* strains isolated from cattle in Masovian Voivodeship in 2008-2012

Summary

Since 2009, Poland has had a TB-free status, although over the last seven years 12-34 cases of bovine TB have been recorded annually. In 2009-2012 the largest number of cattle infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* were culled in Masovian Voivodeship. Likewise, the largest number of sources of this zoonosis were recorded in that voivodeship. The vicinity of farms where bTB was found indicated that it could have been transmitted between their herds. The aim of this study was to characterise the molecular patterns of bovine bacillus strains isolated from cattle in Masovian Voivodeship and the molecular relationships between them. The material for microbiological examination came from 38 cattle (*Bos taurus*) located in 7 counties of Masovian Voivodeship. These 38 strains of MTBC were further identified as *M. bovis* (24 isolates; 63%) and *M. caprae* (14 isolates; 37%). A two-step genotyping analysis of the 38 MTBC strains identified 24 molecular patterns, closely related phylogenetically, which were assigned to 8 clusters of 2-6 strains. Sources of transmission were identified in 8 out of 13 herds examined in the 7 counties of Masovian Voivodeship. The results of the genotyping analysis excluded the possibility of TB transmission between different herds in Masovian Voivodeship. It was proved, however, that TB had been transmitted between animals bred on one of the farms.

Keywords: bovine tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*

Gruźlica bydła (*bovine tuberculosis*, bTB, BTB) jest powolnie postępującą chorobą zakaźną spowodowaną przez kwasooporne prątki bydłące: *Mycobacterium bovis* oraz *Mycobacterium caprae*, które należą do kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (27). Prątki bydłące mogą być również czynnikiem etiologicznym gruźlicy u innych gatunków zwierząt gospodarskich, zwierząt wolno żyjących i ludzi (13, 20, 22, 24). Gruźlica bydła generuje znaczne obciążenia ekonomiczne i zdrowotne, co uzasadnia rygorystyczne badania epidemiologiczne dotyczące monitorowania i kontroli tej zoonozy. Wdrożenie badań molekularnych do śledzenia transmisji zakażeń zarówno w gospodarstwach, jak i naturalnym środowisku ułatwia projektowanie programów kontroli i zwalczania gruźlicy u bydła w wielu krajach (5).

Gruźlica u bydła jest chorobą zwalczaną z urzędu. Obecnie obowiązek zwalczania tej zoonozy nakłada przede wszystkim „Ustawa o Inspekcji Weterynaryjnej”, mówiąca o obowiązkach lekarzy weterynarii działających w strukturach Inspekcji. Aktem prawnym odnoszącym się bezpośrednio do zwalczania chorób zakaźnych jest „Ustawa o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt”. Najistotniejszym aktem prawodawstwa polskiego jest Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 listopada 2004 r., określające metody zwalczania gruźlicy bydła w Polsce, sposoby postępowania przy podejrzeniu, stwierdzeniu oraz wygaszaniu ogniska gruźlicy bydła. Reasumując, bydło, u którego stwierdza się gruźlicę na podstawie dodatniego wyniku testu tuberkulinowego bądź dodatniego wyniku porównawczego testu

tuberkulinowego, zostaje usunięte ze stada, a następnie poddane ubojowi sanitarnemu. Następnie węzły chłonne wymienione w załączniku nr 1 do Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 listopada 2004 r. oraz chorobowo zmienione narządy przysyłane są do badania mikrobiologicznego do Krajowego Laboratorium Gruźlicy Bydła, które znajduje się w Zakładzie Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego (PIWet – PIB) w Puławach.

Polska od 2009 r. posiada status kraju wolnego od tej zoonozy, mimo tego w przeciągu ostatnich 7 lat każdego roku notowanych było od 12 do 34 ognisk gruźlicy u bydła (2, 15). W latach 2008-2012 w województwie mazowieckim zlikwidowano największą liczbę bydła zakażonego prątkami bydłecy i zanotowano największą liczbę ognisk tej zoonozy (14). Bliskie sąsiedztwo gospodarstw, w których stwierdzono bTB, nasunęło podejrzenia, że mogło dojść do transmisji gruźlicy między tymi stadami. Zgodnie z danymi z piśmiennictwa, wzajemnemu zakażeniu się zwierząt sprzyja handel chorymi sztukami, będącymi bezobjawowymi nosicielami prątków, korzystanie z tych samych pastwisk i brak wiedzy z zakresu chorób zakaźnych u osób trudniących się handlem zwierzętami (3, 6, 26, 29).

Celem pracy było określenie wzorów molekularnych szczepów MTBC izolowanych od bydła w woj. mazowieckim w latach 2008-2012, zbadanie ich pokrewieństwa oraz wskazanie potencjalnych ognisk transmisji.

Materiał i metody

Materiał do badań mikrobiologicznych pochodził od 38 sztuk bydła (*Bos taurus*) z 13 stad zlokalizowanych w 7 powiatach (Żuromin, Maków Mazowiecki, Płońsk, Pułtusk, Sochaczew, Ciechanów i Radom) na terenie Mazowsza. Zwierzęta skierowano na ubój sanitarny z powodu podejrzenia o gruźlicę bydłą, na podstawie dodatniego wyniku śródskórnego testu tuberkulinowego (10). Zgodnie z Rozporządzeniem MRiRW, do badań mikrobiologicznych w kierunku gruźlicy przysłano węzły chłonne: okołogardzielowe, oskrzelowe, śródpiersiowe, nadwymiennie, kąta żuchwy, krezkowe i wnęki wątroby oraz dodatkowo wycinki płuc. Wszystkie materiały tkankowe zostały pobrane *post mortem* oraz opracowane i posiane na pożywki hodowlane (Stonebrinka – S oraz Petragnaniego – P,) zgodnie z Instrukcją laboratoryjnej diagnostyki gruźlicy bydłecy (18).

Posiew na pożywkach. Osad uzyskany z każdej opracowanej próbki posiewano na podłoża stałe: 3 podłoża S, 3 P i inkubowano w temperaturze 37°C (\pm 2°C), przez okres 4-6 tygodni. Wszystkie pożywki do namnażania prątków bydłecy zostały przygotowane przez Pracownię Pożywek PIWet – PIB w Puławach.

Test identyfikacyjny MGIT TBc. Do identyfikacji szczepów wyhodowanych na pożywkach Stonebrinka zastosowano komercyjny test – Identification Test MGIT TBc®. Jest to test immunochromatograficzny służący do wykrywania frakcji białka MPT64 wydzielanej przez komórki prątka MTBC w trakcie hodowli.

Test niacynowy. Do różnicowania pomiędzy gatunkiem *M. tuberculosis* i *M. bovis* zastosowano test niacynowy (BD

BBL Taxo TB Niacin®). Hodowlę prątków zawieszano w sterylnej wodzie destylowanej i umieszczano w probówce wraz z paskiem diagnostycznym BBL Taxo TB Niacin Test Strip®. Wg procedury załączonej przez producenta, dla każdej badanej próbki należało przeprowadzić procedurę testową z paskiem BBL Taxo TB Niacin Test Control®. *M. tuberculosis* wytwarza największe ilości niacyny, dlatego w odróżnieniu od *M. bovis* powoduje żółte zabarwienie pasków.

Izolacja DNA. Bakterie wyhodowane na pożywce S zawieszano w buforze Tris-EDTA, inaktywowano w 85°C przez 20 min, a następnie poddawano lizie z proteinazą K. Otrzymany lizat ekstrahowano roztworem CTAB-NaCl i oczyszczano mieszaniną chloroform-alkohol izoamylowy. Precypitację DNA prowadzono w izopropanolu w temp. –20°C przez 30 min. Następnie preparat wirowano, a otrzymane osad przemywano 70% etanolem, suszono i zawieszano w 20 µl wody. Otrzymane w ten sposób DNA wykorzystano do dalszych analiz.

Identyfikacja szczepów do gatunku MTBC. Identyfikację gatunkową wykonano komercyjnym Testem GenoType MTBC, który wykorzystuje metodę DNA-STRIP. Test bazuje na polimorfizmie genu *gyrB*. Każdy pasek testowy zawiera trzy obszary kontrolne: kontrolę konjugatu (CC, conjugate control), czyli kontrolę wiązania koniugatu oraz prawidłowości działania odczynników; obszar kontroli uniwersalnej (UC, universal control) wykrywający obecność w badanej próbce DNA wszystkich mykobakterii oraz bakterii Gram+ posiadających w genomie dużą zawartość par G+C i obszar kontrolny potwierdzający obecność bakterii z kompleksu *M. tuberculosis*.

Profil genetyczny szczepów. W dalszym etapie badań szczepy poddano analizie genetycznej. Wykorzystano 2 metody genotypowania: spoligotyping oraz MIRU-VNTR.

Metoda spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) wykrywa polimorfizm chromosomalnego regionu DR (Direct Repeat) występującego wyłącznie w genomie prątków *M. tuberculosis* complex (11). W przedstawionych badaniach spoligotyping szczepów przeprowadzono z zastosowaniem komercyjnego zestawu firmy Isogen® (Isogen Bioscience, Holandia).

Uzyskane wzory hybrydazyjny porównywano do wzorów zarejestrowanych w międzynarodowych bazach spoligotypów SpolDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spolddb4.pdf>), SITVIT WEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/) oraz Mycobacterium bovis Spoligotype Database (<http://www.mbovis.org/>). Według nazewnictwa w rejestrach szczepy klasyfikowano do rodzin molekularnych. Szczepy o takich samych spoligotypach zarejestrowanych w bazach grupowano w rodziny – klastery genetyczne. Szczepy, których spoligotypy nie miały swoich odpowiedników w bazach, tworzyły nowe rodziny molekularne lub stanowiły tzw. „szczepy sieroce” (orphans).

Metodę MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repeating Units – Variable Number Tandem Repeat) przeprowadzono w oparciu o analizę wybranych 15 polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych rozproszonych w genomie prątków. DNA każdego szczepu poddawano 15 reakcjom amplifikacji z wykorzystaniem 15 par sekwencji starterowych. Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci 15-cyfrowego kodu (kod MIRU-VNTR), gdzie każda z cyfr obrazowała liczbę powtórzeń kolejnych sekwencji repetytywnych MIRU-VNTR.

Wyniki i omówienie

W wyniku przeprowadzonych badań anatomopatologicznych materiału tkankowego pobranego od 38 sztuk bydła, u 32 zwierząt (84%) w węzłach chłonnych oskrzelowych i śródpiersiowych zaobserwowano gruzelki gruźlicze wielkości od kilku do 10 mm (ryc. 1). Obserwowane zmiany anatomopatologiczne u bydła chorego na gruźlicę ograniczały się do układu oddechowego, gdzie w większości opisanych w literaturze przypadków jest to typowa lokalizacja zmian u bydła (7, 19, 23).

Materiał tkankowy z każdej z badanych próbek pulowano. Z każdej próbki pulowanej pochodzącej od jednego zwierzęcia uzyskano osady do posiewów bakteryjnych. Uzyskano hodowlę 38 szczepów prątków gruźlicy na pożywce stałej S. Do gatunku *M. bovis* i *M. caprae* wstępnie klasyfikowano prątki wykazujące wzrost na pożywce S. Wzrost ten widoczny jest makroskopowo w postaci białych kolonii, lekko wilgotnych i kruchych. Skąpy wzrost prątka bydlęcego w stosunku do wzrostu prątka typu ludzkiego określa się jako dysgoniczny (16). Dodatni wynik testu identyfikacyjnego MGIT TBC zakwalifikował 38 szczepów do kompleksu MTBC. Dodatni wynik testu niacynowego pozwalał wykluczyć *M. tuberculosis*, chociaż ujemny wynik testu niacynowego traktowano jako wstępną identyfikację prątka bydlęcego.

Identyfikacja uzyskanych hodowli szczepów prątków gruźlicy wykonana metodą molekularną Haina wykazała, że szczepy wyizolowane od 38 zwierząt należały do gatunków: *M. bovis* – 24 szczepy (63%) oraz *M. caprae* – 14 szczepów (37%).

Dwuetapowa analiza pokrewieństwa genetycznego 38 szczepów wyhodowanych z materiałów należących do badanych zwierząt obejmowała 2 metody – spoligotyping oraz MIRU-VNTR. Wyniki spoligotypowania przedstawiono w tab. 1. Analizowane szczepy przyporządkowano do 11 spoligotypów, spośród których 4 były zarejestrowane w międzynarodowych bazach. Wg bazy SpolDB4 i SITIVIT WEB były to: BOV 820, BOV 694,

CAP 647 i CAP 979 i ich odpowiedniki w bazie Mbovis.org: SB0856, SB0127, SB0418 i SB2393 (tab. 1).

Wśród 38 szczepów zidentyfikowano 29 wzorów MIRU-VNTR. Dwadzieścia cztery (63%) szczepy prezentowały unikalne wzory, a 14 (37%) rozdzielono pomiędzy 5 klastery liczących od 2 do 4 szczepów

Tab. 1. Typowanie genetyczne metodą spoligotyping

L.p.	Nr ogniska	Nr szczepu	Zapis oktagonalny	Spoligotyp wg bazy SpolDB4 i SITIVIT WEB	Spoligotyp wg bazy Mbovis.org
1.		92/11	67676377777600	BOV 820	SB0856
2.		94/11	67676377777600	BOV 820	SB0856
3.		95/11	67676377777600	BOV 820	SB0856
4.	1	100/11	67676377777600	BOV 820	SB0856
5.		179/11	67676377777600	BOV 820	SB0856
6.		182/11	67676377777600	BOV 820	SB0856
7.		184/11	67676377777600	BOV 820	SB0856
8.		185/11	67676377777600	BOV 820	SB0856
9.		2	3951/08	66634377777600	NZ*
10.		3896/08	676743777075600	NZ*	SB2449**
11.	3	3963/08	676743777075600	NZ*	SB2449**
12.		3973/08	676343737075600	NZ*	SB2451**
13.	4	3953/08	676743776037600	NZ*	SB2452**
14.	5	66/10	200003777347600	NZ*	SB2390**
15.		116/10	200003777347600	NZ*	SB2390**
16.		117/10	200003777347600	NZ*	SB2390**
17.		118/10	200003777347600	NZ*	SB2390**
18.	6	58/09	200003777377600	CAP 647	SB0418
19.		88/09	200003777377600	CAP 647	SB0418
20.	7	132/10	67676377777600	BOV 820	SB0856
21.	8	26/09	67674377777600	BOV 694	SB0127
22.		27/09	67674377777600	BOV 694	SB0127
23.		28/09	67674377777600	BOV 694	SB0127
24.		94/09	67634377777600	NZ*	SB2416**
25.		99/09	67674377777600	BOV 694	SB0127
26.		9	45/12	67676377777600	BOV 820
27.	10	110/09	200003777377600	CAP 647	SB0418
28.		111/09	20000377777600	CAP 979	SB2393
29.		122/09	200003777377600	CAP 647	SB0418
30.		123/09	200003777377600	CAP 647	SB0418
31.		2/10	200003777377600	CAP 647	SB0418
32.		3/10	200003777377600	CAP 647	SB0418
33.		4/10	200003777377600	CAP 647	SB0418
34.		5/10	200003777377600	CAP 647	SB0418
35.	11	3999/08	67674347777600	NZ*	SB2453**
36.	12	12/10	67674377777600	BOV 694	SB0127
37.		21/10	67674377777600	BOV 694	SB0127
38.	13	111/10	67676377777600	BOV 820	SB0856

Objaśnienia: *NZ – wzory niezarejestrowane w bazie SpolDB4 oraz SITIVIT WEB; ** – wzory zarejestrowane w bazie Mbovis.org przez autorów publikacji



Ryc. 1. Wycinek węzła śródpiersiowego bydła z gruzelkami gruźliczymi wielkości do 10 mm

o identycznym profilu MIRU-VNTR. Wyniki podano w tab. 2.

W kolejnym etapie analizy wskazano szczepy, które na podstawie podobieństwa wzorów DNA mogły należeć do wspólnego łańcucha transmisji. Za blisko spokrewnione filogenetycznie uznawano szczepy, które należały do jednego spoligotypu i jednocześnie posiadały identyczne wzory MIRU-VNTR oraz należały do jednego spoligotypu, a ich wzór MIRU-VNTR różnił się najwyżej w 1 z 15 analizowanych *loci*. Zgodnie z algorytmem, wśród 38 analizowanych szczepów zidentyfikowano 24 (63%) szczepy blisko spokrewnione filogenetycznie, rozdzielone między 8 klastery genetycznych skupiających od 2 do 6 szczepów. Pozostałych 14 (37%) szczepów prezentowało indywidualne profile DNA i zostało wykluczonych poza potencjalne ogniska transmisji (A-H) gruźlicy. Wyniki przedstawiono w tab. 3 i 4.

Spośród 13 badanych stad zlokalizowanych w 7 powiatach woj. mazowieckiego, ogniska transmisji zidentyfikowano w 8 stadach. Na podstawie wyników genotypowania wykluczono możliwość transmisji gruźlicy między stadami bydła w woj. mazowieckim, natomiast potwierdzono transmisję gruźlicy pomiędzy zwierzętami w jednym gospodarstwie.

Tab. 2. Typowanie genetyczne szczepów metodą MIRU-VNTR

Klaster molekularny MIRU-VNTR	Nr szczepu	Spoligotyp	Wzór MIRU-VNTR
1 4 szczepy	94/11	BOV 820 SB0856	423432352421134
	95/11		
	100/11		
	185/11		
2 3 szczepy	26/09	BOV 694 SB0127	423632253421232
	27/09		
	28/09		
3 3 szczepy	2/10	CAP 647 SB0418	452752352412323
	3/10		
	4/10		
4 2 szczepy	92/11	BOV 820 SB0856	422432352421134
	182/11		
5 2 szczepy	110/09	CAP 647 SB0127	463652352413323

Analiza molekularna z zastosowaniem metody MIRU-VNTR w bieżącej pracy wskazała również, że gruźlica w stadzie może mieć więcej niż jedno źródło zakażenia, co również wykazali w swoich badaniach Garcia de Viedma i wsp. (9) oraz Navarro i wsp. (21).

Tab. 3. Klaster genetyczny zidentyfikowane na podstawie podobieństwa DNA badanych szczepów

Klaster genetyczny	Nr szczepu	Spoligotyp	Wzór MIRU-VNTR
A 6 szczepów	92/11	67676377777600 BOV 820 SB0856	422432352421134
	94/11	67676377777600 BOV 820 SB0856	423432352421134
	95/11	67676377777600 BOV 820 SB0856	423432352421134
	100/11	67676377777600 BOV 820 SB0856	423432352421134
	182/11	67676377777600 BOV 820 SB0856	422432352421134
	185/11	67676377777600 BOV 820 SB0856	423432352421134
B 4 szczepy	2/10	200003777377600 CAP 647 SB0418	452752352412323
	3/10	200003777377600 CAP 647 SB0418	452752352412323
	4/10	200003777377600 CAP 647 SB0418	452752352412323
	5/10	200003777377600 CAP 647 SB0418	452752352212323
C 3 szczepy	3896/08	676743777075600 NZ SB2449	423631355221315
	3963/08	676743777075600 NZ SB2449	423631355421315
	3973/08	676743777075600 NZ SB2449	423631355421335

Klaster genetyczny	Nr szczepu	Spoligotyp	Wzór MIRU-VNTR
D 3 szczepy	26/09	67674377777600 BOV 694 SB0127	423632253421232
	27/09	67674377777600 BOV 694 SB0127	423632253421232
	28/09	67674377777600 BOV 694 SB0127	423632253421232
E 2 szczepy	116/10	200003777347600 NZ SB2390	352652262413323
	118/10	200003777347600 NZ SB2390	352652162413323
F 2 szczepy	58/09	200003777377600 CAP 647 SB0418	453632352413323
	88/09	200003777377600 CAP 647 SB0418	453632352213323
G 2 szczepy	110/09	200003777377600 CAP 647 SB0418	463652352413323
	122/09	200003777377600 CAP 647 SB0418	463652352413323
H 2 szczepy	12/10	67674377777600 BOV 694 SB0127	423632153421232
	21/10	67674377777600 BOV 694 SB0127	422632153421232

Tab. 4. Potencjalne ogniska transmisji gruźlicy zidentyfikowane w badanej populacji bydła

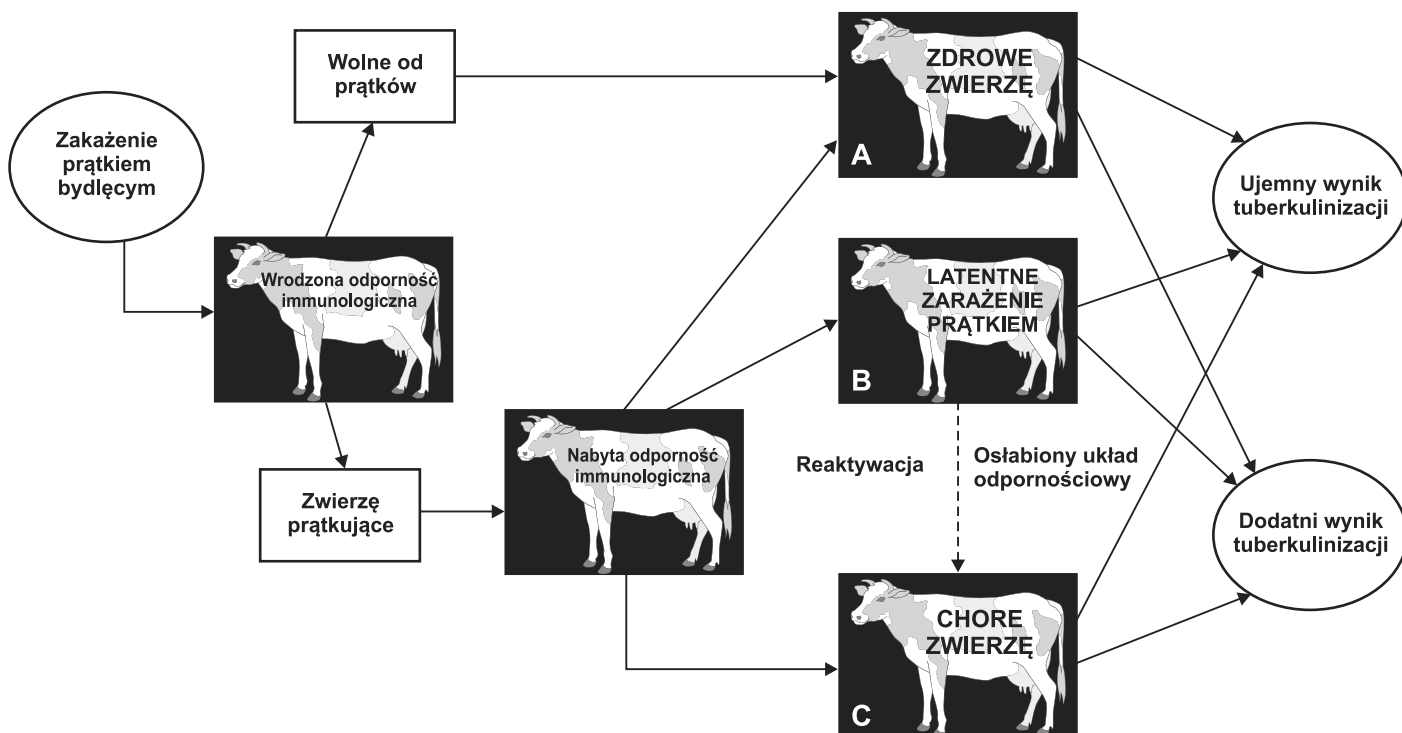
Ognisko	Nr szczepu	Powiat	Gatunek prątków
A	92/11	Żuromin	<i>M. bovis</i>
	94/11		
	95/11		
	100/11		
	182/11		
B	2/10	Pułtusk	<i>M. caprae</i>
	3/10		
	4/10		
	5/10		
C	3896/08	Maków Maz.	<i>M. bovis</i>
	3963/08		
	3973/08		
D	26/09	Płońsk/ Smarzewno	<i>M. bovis</i>
	27/09		
	28/09		
E	116/10	Żuromin	<i>M. caprae</i>
	118/10		
F	58/09	Płońsk	<i>M. caprae</i>
	88/09		
G	110/09	Pułtusk	<i>M. caprae</i>
	122/09		
H	12/10	Ciechanów	<i>M. bovis</i>

Naukowcy zajmujący się diagnostyką molekularną gruźlicy u ludzi również wskazują na różne źródła zakażenia *M. tuberculosis* wśród osób blisko spokrewnionych, chorych na gruźlicę (8, 12, 28). Dochodzenia epidemiologiczne w polskich zakładach penitencjar-

nych wśród więźniów chorych na gruźlicę również nie dowiodły wystąpienia transmisji gruźlicy w obrębie badanej grupy (4).

Większość krajów europejskich i poza Europą posiada własne kolekcje wzorów MIRU-VNTR i na tej podstawie możliwe jest śledzenie transmisji gruźlicy bydłowej nawet na arenie międzynarodowej. Badania 3398 izolatów pochodzących z Nowej Zelandii, zarchiwizowanych w latach 1982-2008 wskazują, że źródłem zakażeń *M. bovis* w tym kraju było bydło sprowadzane bezpośrednio z Wielkiej Brytanii i pośrednio z Australii (25).

Warto podkreślić, że w okresie, z którego pochodziły badane próbki (lata 2008-2012), liczba zwierząt zakażonych, potwierdzonych dodatnim wynikiem badania bakteriologicznego nie przekraczała kilku sztuk w stadzie, a zwykle były to pojedyncze zwierzęta. W ostatnim okresie obserwuje się, że liczby zwierząt zakażonych w przypadku dużych stad sięgają 30-40 osobników, co wcześniej nie miało miejsca (17). Może to mieć związek z wydłużeniem okresu między kolejnymi badaniami testem tuberkulinowym z 3 lat do 5 lat, co nastąpiło (w zgodzie z przepisami UE) od 2009 r. Tym samym stwarza to większe możliwości transmisji choroby w stadzie zanim zostanie zdiagnozowana. Zakażenie u bydła następuje najczęściej drogą aerogenną, kiedy pojedyncze prątki transportowane są na jądrach kropelek w powietrzu wydychanym przez chore zwierzę. Do transmisji choroby dochodzi w czasie kontaktu chorego i zdrowego zwierzęcia (1). Nie bez znaczenia jest stan utrzymania bydła, pielęgnacja, żywienie, warunki lokalowe. Zła opieka nad stadem przyczynia się do zmniejszenia odporności zwierząt, a złe warunki w pomieszczeniu, w którym przebywają zwierzęta, zwłaszcza ciasnota i brak wentylacji powodują znaczne nagromadzenie się prątków, wydalanych przez chore bydło (ryc. 2).



Ryc. 2. Schemat przedstawia najbardziej prawdopodobne skutki wynikające z zakażenia bydła prątkiem bydłowym

Piśmiennictwo

1. Allix C., Walravens K., Saegerman C., Godfroid J., Supply P., Fauville-Dufaux M.: Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44, 1951-1962.
2. Augustynowicz-Kopeć E., Krajewska M., Zabost A., Napiórkowska A., Zwolska Z.: Characterisation of *Mycobacterium bovis* strains isolated from farm and wild animals from Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2011, 55, 381-383.
3. Badhadha D.: Epidemiological investigation of bovine tuberculosis causes of herd breakdowns and persistence in Spain. PhD Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain 2013.
4. Brzezińska S., Zabost A., Kozińska M., Janicka-Sobierajska G., Zwolska Z., Augustynowicz-Kopeć E.: Molekularne dochodzenia epidemiologiczne wśród polskich więźniów chorych na gruźlicę w latach 2004-2008. Badania wstępne. *Pneumol. Alergol. Pol.* 2012, 80, 209-213.
5. Caminiti A., Pelone F., LaTorre G., De Giusti M., Saulle R., Mannocci A., Sala M., Della Marta U., Scaramozzino P.: Control and eradication of tuberculosis in cattle: a systematic review of economic evidence. *Vet. Rec.* 2016, 179, 70-75.
6. Corner L. A.: The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet. Microbiol.* 2006, 112, 303-312.
7. Costello E., Doherty M. L., Monaghan M. L., Quigley F. C., O'Reilly R. F.: A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. J.* 1998, 155, 245-250.
8. Crampin A. C., Glynn J. R., Traore H., Yates M. D., Mwaungulu L., Mwenebabu M., Chagulukula S. D., Floyd S., Drobniowski F., Fine P. E.: Tuberculosis transmission attributable to close contacts and HIV status, Malawi. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 729-735.
9. Garcia de Viedma D., Alonso Rodriguez N., Andres S., Ruiz Serrano M. J., Bouza E.: Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 5660-5664.
10. Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii Nr GIWpr-02010-8/2016 z dnia 8 lutego 2016 r. w sprawie postępowania przy podejrzeniu, prowadzeniu i zwalczaniu oraz przy prowadzeniu badań kontrolnych gruźlicy bydła, Warszawa 2016.
11. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 907-914.
12. Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z., Brzezińska S., Zabost A., Anielak M., Klatt M., Napiórkowska A., Belzowska M., Dąbrowska M., Grzesica R., Kowalska M., Krawiecka D., Maciak L., Piskula B., Sankowska A., Słodowski K., Szymkiewicz W., Żulikowski W.: Badanie transmisji *Mycobacterium tuberculosis* wśród osób blisko spokrewnionych chorych na gruźlicę. *Przegl. Epidemiol.* 2008, 62, 55-62.
13. Kozińska M., Zientek J., Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z., Koziński J.: Transmission of tuberculosis among people living in the border areas of Poland, the Czech Republic, and Slovakia. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2016, 126, 32-40.
14. Krajewska M.: Charakterystyka szczepów *Mycobacterium bovis* izolowanych od zwierząt w Polsce. Praca dokt., PIWet-PIB, Puławy 2015.
15. Krajewska M., Kozińska M., Kubajka M., Weiner M., Augustynowicz-Kopeć E., Belkot Z., Lipiec M., Szulowski K.: Tuberculosis in humans and in animals – current epidemiological data. *Życie Wet.* 2015, 90, 647-651.
16. Lipiec M.: Gruźlica bydła w Polsce. Wydawnictwo PIWet-PIB, Puławy 2008, s. 17.
17. Lipiec M.: Niepokojące zjawiska w zwalczaniu zakażeń *Mycobacterium bovis/caprae* u zwierząt w Polsce. XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Lublin 22-24 września 2016, s. 368.
18. Lipiec M., Pilaszek J.: Instrukcja laboratoryjnej diagnostyki gruźlicy bydłowej. Wydawnictwo PIWet-PIB, Puławy 2007.
19. Menzies F. D., Neill S. D.: Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet. J.* 2000, 160, 92-116.
20. Mwakapuja R. S., Makondo Z. E., Malakalinga J., Moser I., Kazwala R. R., Tanner M.: Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from pastoral livestock at Mikumi-Selous ecosystem in the eastern Tanzania. *Tuberculosis (Edin)* 2013, 93, 668-674.
21. Navarro Y., Romero B., Copano M. F., Buoza E., Dominguez L., de Juan L., Garcia-de-Viedma D.: Multiple sampling and discriminatory fingerprinting reveals clonally complex and compartmentalized infections by *M. bovis* in cattle. *Vet. Microbiol.* 2015, 175, 99-104.
22. Nebreda T., Alvarez-Prida E., Blanc B., Remacha M. A., Samper S., Jiménez M. S.: Peritoneal tuberculosis due to *Mycobacterium caprae*. *IDCases* 2016, 4, 50-52.
23. Neill S. D., Bryson D. B., Pollock J. M.: Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 2001, 81, 79-86.
24. Orłowska B., Augustynowicz-Kopeć E., Krajewska M., Zabost A., Welz M., Kaczor S., Anusz K.: *Mycobacterium caprae* transmission to free-living grey wolves (*Canis lupus*) in the Bieszczady Mountains in Southern Poland. *Eur. J. Wildl. Res.* 2017, 63, 1-5.
25. Price-Carter M., Rooker S., Collins D. M.: Comparison of 45 variable number tandem repeat (VNTR) and two direct repeat (DR) assays to restriction endonuclease analysis for typing isolates of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 2011, 150, 107-114.
26. Probst C., Freuling C., Moser I., Geue L., Köhler H., Conraths F. J., Hotzel H., Liebler-Tenorio E. M., Kramer M.: Bovine tuberculosis: making a case for effective surveillance. *Epidemiol. Infect.* 2011, 139, 105-112.
27. Rodriguez-Campos S., Smith N. H., Boniotti M. B., Aranz A.: Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implication for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 2014, 97, 5-19.
28. Schaaf H. S., Michaelis I. A., Richardson M., Booysen C. N., Gie R. P., Warren R., van Helden P. D., Beyers N.: Adult-to-child transmission of tuberculosis: household or community contact? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2003, 7, 426-431.
29. Vos C. J. de, van der Goot J. A., van Zijderveld F. G., Swanenburg M., Elbers A. R. W.: Risk-based testing of imported animals: A case study for bovine tuberculosis in The Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 2015, 121, 8-20.

Adres autora: dr n. wet. Monika Krajewska-Wędzina, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: monika.krajewska@piwet.pulawy.pl