

Krajewska M.¹, Augustynowicz-Kopec E.²,
Orłowska B.³, Welz M.⁴, Anusz K.³,
Szulowski K.¹, Department of Microbiology,
National Veterinary Research Institute in Pulawy¹,
Department of Microbiology, National Research
Institute for Tuberculosis and Lung Diseases,
Warsaw², Department of Food Hygiene and
Public Health Protection, Faculty of Veterinary
Medicine in Warsaw³, Voivodal Veterinary
Inspectorate, Krosno⁴

This article aims at the presentation of laboratory procedures to differentiate two mycobacterial species responsible for BTB. Also current legislation concerning the control of BTB in Poland is presented. Both, *Mycobacterium caprae* and *M. bovis*, cause similar gross lesions and their location is also similar. The recent development of molecular methods has improved the MTBC clinical isolates identification, both at the species and strain levels (spoligotyping, MIRU-VNTR). The nomenclature of the members of MTBC however, is a little controversial. This paper discusses the possible implications for diagnostics and the legal consequences of naming the new species. According to the current veterinary legislation in Poland, only *M. bovis* and *M. tuberculosis* are regarded as the causative agents of BTB. Changing the Polish legislation seems to be at this moment necessary in connection with the legal and economic importance of tuberculosis in cattle and in other animal species.

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

***Mycobacterium caprae* – prątek bydłęcy.** **Część II. Diagnostyka mikrobiologiczna** **i prawodawstwo weterynaryjne**

**Monika Krajewska¹, Ewa Augustynowicz-Kopec², Blanka Orłowska³, Mirosław Welz⁴,
Krzysztof Anusz³, Krzysztof Szulowski¹**

z Zakładu Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach¹, Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie², Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie³ oraz Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii z/s w Krośnie⁴

Diagnostyka mikrobiologiczna

Pomimo licznych badań dotychczas niewiele wiadomo na temat różnic w chorobotwórczości wywołanej gatunkami prątków wchodzących w skład kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). W przypadku gruźlicy zwierząt wywołanej zarówno przez *M. bovis*, jak i *M. caprae* gatunki te wywołują podobne zmiany patologiczne widoczne w obrazie makroskopowym i podobne umiejscowienie zmian, co prawdopodobnie jest związane z drogą zakażenia u zwierząt. Badania zmian patologicznych gruźlicy wywoływanych przez *M. caprae* u dzików wykazały większą ilość ziarniaków w zaawansowanym stadium choroby oraz większą liczbę wielojądrowych komórek olbrzymich i kwasoopornych prątków niż w przypadku gruźlicy wywołanej przez *M. bovis*. Autorzy sugerują, że *M. caprae* może powodować większą ekspresję prątków (1).

Identyfikacja gatunków prątków gruźlicy należących do MTBC ze względu na

ich podobne cechy biochemiczne jest nie-
możliwa za pomocą rutynowych metod
bakteriologicznych. Dopiero zastosowa-
nie metod molekularnych w diagnostyce
mikrobiologicznej pozwoliła na dokładną
identyfikację MTBC. Początkowo orga-
nizmy należące do kompleksu identyfiko-
wano w oparciu o różnice w genomie, ta-
kie jak m.in. analiza sekwencji 16S rRNA
(2), sekwencja insercyjna IS6110 (3), gen
mpb70 (4). W ciągu ostatnich lat metody
molekularne rozwinęły się, umożliwiając
kompleksową klasyfikację MTBC przy
zastosowaniu metody spoligotypowania lub
MIRU-VNTR (mycobacterial intersper-
sed repetitive units – variable number of
tandem repeats). Zastosowanie tych me-
tod genetycznych w laboratoriach wete-
rynaryjnych pozwoliło rozpoznać gruźlicę
u bydła wywołaną prątkiem ludzkim –
M. tuberculosis (5, 6, 7). Ponadto metody
molekularne umożliwiły wykazanie trans-
misji pomiędzy zwierzętami hodowlany-
mi i wśród dzikich zwierząt. Opisano rów-
nież przypadki gruźlicy odzwierzęcej, co

podkreśla korzyści płynące ze współpracy służb medycznych i weterynaryjnych (6, 8).

Zastosowanie tych nowych metod umożliwiło identyfikację gruźlicy wywołanej przez *M. caprae* oraz opisanie nowych gatunków prątków, takich jak *Mycobacterium mungi* wyizolowany od mangusty czy *Mycobacterium orygis* wyizolowany od kilku gatunków zwierząt krętorogich (9, 10). Metody te wymagają jednak specjalistycznego sprzętu i dużej wiedzy, którymi nie dysponują wszystkie laboratoria zajmujące się diagnostyką mikrobiologiczną gruźlicy.

Mycobacterium caprae w prawodawstwie weterynaryjnym

Wśród kompleksu MTBC *M. bovis* uważany jest za główny czynnik etiologiczny gruźlicy zwierząt, a termin „gruźlica bydła” jest często mylnie używany tylko w odniesieniu do zakażeń wywołanych przez *M. bovis*. Według definicji Podgrupy ds. Gruźlicy Bydła (Task Force Bovine Tuberculosis Subgroup), należącej do Grupy Zadaniowej ds. monitorowania chorób podlegających obowiązkowi zwalczania (11), gruźlica jest „Zakażeniem bydła spowodowanym przez którykolwiek z chorobotwórczych gatunków prątków należących do kompleksu *M. tuberculosis*”. W 2005 r. jako zoonoza została wpisana na listę Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), która weryfikowana jest na bieżąco i wchodzi w życie 1 stycznia każdego roku. W 2009 r. do gatunków będących czynnikiem etiologicznym gruźlicy bydła został dołączony również gatunek *M. caprae* (OIE, 2009; Wydział Komisji Europejskiej – Dyrekcja Generalna ds. Zdrowia i Konsumentów, 2013), chociaż początkowo uważano, że gatunek ten wywołuje tylko gruźlicę u kóz (12, 13).

Epidemiologia gruźlicy u zwierząt wywołanej przez *M. bovis* znana była od dawna (14, 15, 16), natomiast liczba przypadków wywołanych przez *M. caprae* – z powodu braku metod umożliwiających identyfikację tego gatunku w obrębie MTBC była nieznana. Prątki gruźlicy należące do gatunku *M. caprae* wyizolowano z materiału tkankowego bydła oraz innych udomowionych i nieudomowionych gatunków zwierząt na kontynencie europejskim. Badania prowadzone w Hiszpanii w latach 2004–2009 wykazały, że znacząco wzrosła liczba przypadków izolacji *M. caprae* z próbek pochodzących od bydła (17). Wykazano, że większość bydła zakażonego *M. caprae* pochodziła z hodowli niemających żadnego kontaktu z małymi przeżuwaczami, co mogło wskazywać na transmisję patogenu w obrębie lub pomiędzy stadami zwierząt.

Gruźlicę, której czynnikiem etiologicznym u zwierząt jest gatunek *M. caprae*,

rejestruje się w wielu krajach Europy Środkowej urzędowo wolnych od gruźlicy wywołanej przez *M. bovis* (18, 19, 20, 21, 22). W ww. krajach Europy rejestruje się również przypadki gruźlicy u ludzi wywołanej gatunkami *M. bovis* i *M. caprae* (23, 24, 25, 26, 27, 28). Możliwość różnicowania szczepów prątka bydłowego na gatunki *M. bovis* i *M. caprae* powoduje w Europie istotne wątpliwości prawne.

Dyrektywa Rady 64/432/EWG w sprawie problemów zdrowotnych zwierząt wpływających na handel wewnątrzspółnotowy bydłem, ze zmianami wynikającymi z dyrektywy Rady 98/46/EC i artykułu 1 [6] dyrektywy Rady 2000/20/WE, opisuje procedurę klasyfikacji przyznawania urzędowego statusu stada wolnego od gruźlicy (29). W załączniku A znajduje się informacja, że status stada określany jest poprzez „brak zwierząt z reakcją pozytywną na śródskórny test tuberkulinowy” oraz „brak klinicznych objawów gruźlicy”. W przypadku wystąpienia pozytywnych reakcji na test, status stada pozostaje zawieszony. Punkt 3B w załączniku A do dyrektywy Rady 98/46/EW określa, że „Status stada oficjalnie uznawanego za wolne od gruźlicy zostaje cofnięty, jeżeli w trakcie badania laboratoryjnego poprzez wyodrębnienie *M. bovis* potwierdzona zostanie obecność gruźlicy”. Pojawia się jednak pytanie, czy przepisy prawne nie powinny zostać zmienione tak, aby objąć także gatunek *M. caprae*, który, jak wielokrotnie wykazano, jest również czynnikiem etiologicznym gruźlicy u bydła. Państwa członkowskie przyjęły dyrektywę Rady 64/432/EWG wraz z poprawkami, odpowiednio przystosowując swoje prawa krajowe, rozporządzenia i przepisy administracyjne. W kolejnych latach wiele państw stopniowo zmieniało swoje przepisy prawne dostosowujące je do sytuacji epidemiologicznej gruźlicy u bydła na danym terytorium Unii Europejskiej. Jednak do chwili obecnej nie powstały jednolite przepisy prawne i rozporządzenia dokładnie określające, które gatunki prątków w obrębie MTBC uważane są za czynniki wywołujące gruźlicę bydła. W wielu państwach Europy w przepisach prawnych dotyczących gruźlicy u zwierząt nadal nie uwzględnia się gatunku *M. caprae*. Krajami Europy, w których za czynnik wywołujący gruźlicę bydła uznaje się wszystkie gatunki należące do MTBC, należą: Austria, Chorwacja, Holandia, Hiszpania, Irlandia i Portugalia. Inne prawo dotyczące gatunków wywołujących gruźlicę u zwierząt obowiązuje w następujących krajach: Niemcy – za czynniki wywołujące gruźlicę bydła uznaje się *M. bovis* i *M. caprae*, Norwegia, Szwecja – *M. bovis* i *M. tuberculosis*, Francja, Portugalia i Szwajcaria – *M. bovis*, *M. caprae* i *M. tuberculosis*. W Belgii, na Cyprze,

Automat biochemiczny MINDRAY BS-120



Automat hematologiczny 3-diff MINDRAY BC-2800vet



Najnowszy automat hematologiczny 5-diff MINDRAY BC-5000vet



(cytometria przepływową + laser)

STAMAR[®]

Autoryzowany
i wyłączny dystrybutor sprzętów
firmy **mindray**
do laboratorium weterynaryjnego

Tel.: 601 845 055 (Marek)
726 300 777 (Dominika)

w Czechach, Finlandii, we Włoszech, na Łotwie, w Luksemburgu, Norwegii, na Słowacji, w Słowenii, Szwecji i Wielkiej Brytanii *M. caprae* nie jest uznany jako czynnik wywołujący gruźlicę u bydła. Część państw europejskich, takich jak Włochy, Norwegia i Słowenia, przyjęła rozwiązania pozwalające na cofnięcie urzędowego statusu stada wolnego od gruźlicy w przypadku rejestracji gruźlicy u bydła wywołanej przez *M. caprae*. Prawdopodobnie w krajach, w których status stad urzędowo wolnych od gruźlicy (OTF) został osiągnięty wiele lat temu (Łotwa, Luksemburg, Norwegia), albo w których przypadek gruźlicy u bydła wywołany *M. caprae* nigdy nie został wykryty (Irlandia i Wielka Brytania), potrzeba zmiany prawodawstwa nie jest odczuwana jako pilna. Istnieją jednak doniesienia potwierdzające obecność *M. caprae* w państwach OTF, np. w Austrii i Niemczech (30, 31), a „Podręcznik OIE dotyczący zwierząt lądowych” (2009) zawiera wytyczne odnośnie do uwarunkowań diagnostycznych i prawnych *M. caprae*. Stwierdzono w nim, że: „W Europie Środkowej potwierdzono, że *M. caprae* jest częstym czynnikiem powodującym gruźlicę bydła. Uważa się, że choroba wywołana przez *M. caprae* nie różni się znacząco od wywołanej przez *M. bovis*, a w diagnozowaniu można stosować te same testy”. Niedawno wydany przez unijną Dyрекcję Generalną ds. Zdrowia i Konsumentów (SANCO/7059/2013) dokument roboczy dotyczący czynników wywołujących gruźlicę bydła stwierdza, że *M. caprae* jest czynnikiem wywołującym gruźlicę bydła i że „wszystkie przepisy w sposób bezpośredni odnoszące się w dyrektywie 64/432/EWG do *M. bovis* powinny być rozumiane jako stosujące się również do *M. caprae*”. Dostosowanie unijnego prawodawstwa, tak aby *M. caprae* zostało uznane za czynnik etiologiczny gruźlicy u bydła, zajęło dziesięć lat, a w niektórych państwach w Europie stanowi nadal prawną i ekonomiczną szarą strefę.

Podsumowanie

Różnorodność sekwencji w obrębie MTBC przy braku jakichkolwiek znaczących różnic patologicznych wywołujących gruźlicę u zwierząt wydaje się z epidemiologicznego punktu widzenia bez znaczenia. Pomijając nazewnictwo, ich rola jako patogenów stanowiących problem dla zdrowia ludzi i zwierząt pozbawiona jest większych różnic. Wydaje się, że zgodnie z tradycją w pionie weterynaryjnym przeważa koncepcja „gatunku” oparta na preferencji wobec żywiciela, co odzwierciedla potencjalne źródło zakażenia w badaniach epidemiologicznych. Warto podkreślić, że rozważenie konsekwencji, jakie niesie

z sobą desygnowanie nowych gatunków należących do MTBC, takich jak wcześniej wspomniane *M. orygis* i *M. mungi* (9, 10). W prawodawstwie weterynaryjnym jedynie prątek bydłowy (*Mycobacterium bovis*) i prątek ludzki (*Mycobacterium tuberculosis*) występują jako czynniki przyczynowe gruźlicy u bydła w Polsce. Jednak biorąc pod uwagę sytuację epidemiologiczną gruźlicy zwierząt wywołanej przez *M. caprae* w Polsce (32, 33), zmiana prawodawstwa i włączenie gatunku *M. caprae* do czynników etiologicznych wydaje się w tej chwili konieczna i niezbędna jako narzędzie badań epidemiologicznych w Polsce.

Piśmiennictwo

- García-Jiménez W.L., Salguero F.J., Fernández-Llario P., Martínez R., Risco D., Gough J., Ortiz-Peláez A., Hermoso-de-Mendoza J., Gómez L.: Immunopathology of granulomas produced by *Mycobacterium bovis* in naturally infected wild boar. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013, **156**, 54–63.
- Bödinghaus B., Rogall T., Flohr T., Blöcker H., Böttger E.C.: Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 190, **58**, 197–203.
- Hermans P.W., van Soelingen D., Bik E.M., de Haas P.E., Dale J.W., van Embden J.D.: Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun* 1991, **59**, 2695–2705.
- Wilton S., Cousins D.: Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl* 1992, **1**, 269–73.
- Ocepek M., Pate M., Zolnir-Dovc M., Poljak M.: Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J. Clin. Microbiol.* 2005, **43**, 3555–3557.
- Romero B., Rodríguez S., Bezos J., Díaz R., Copano M.F., Merediz I., Minguéz O., Marqués S., Palacios J.J., García de Viedma D., Sáez J.L., Mateos A., Aranz A., Domínguez L., de Juan L.: Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, **17**, 2393–2395.
- Krajewska M., Kozłowska M., Zwolska Z., Lipiec M., Augustynowicz-Kopec E., Szulowski K.: Human as a source of tuberculosis for cattle. First evidence of transmission in Poland. *Vet. Microbiol.* 2012, **159**, 269–271.
- Allix-Béguec C., Fauville-Dufaux M., Stoffels K., Omme-slag D., Walravens K., Saegerman C., Supply P.: Importance of identifying *Mycobacterium bovis* as a causative agent of human tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 2010, **35**, 692–694.
- Alexander K.A., Laver P.N., Michel A.L., Williams M., van Helden P.D., Warren R.M., Gey van Pittius N. C.: Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg. Infect. Dis.* 2010, **16**, 1296–1299.
- van Ingen J., Rahim Z., Mulder A., Boeree M. J., Simeone R., Brosch R., van Soelingen D.: Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, **18**, 653–655.
- Task Force Bovine Tuberculosis Subgroup, Working Document on Eradication of Bovine Tuberculosis in the EU accepted by the Bovine tuberculosis subgroup of the Task Force on monitoring animal disease eradication, 2006. SANCO/10200/2006.
- Aranaz A., Liébana E., Gmóez-Mampaso E., Galán J.C., Cousins D., Ortega J., Blázquez J., Baquero F., Mateos A., Suarez G., Domínguez L.: *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, **49**, 1263–1273.
- Aranaz A., Cousins D., Mateos A., Domínguez L.: Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003, **53**, 1785–1789.
- Dudley M., Willett H.P.: Nicotinamide adenine dinucleotide synthesis by *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965, **119**, 807–812.

- Larsen A.B., Merkal R.S., Kopecky K.E., Boothe A.D.: Hypersensitivity and serologic responses in cattle vaccinated with disrupted *Mycobacterium paratuberculosis* cells and subsequently infected with *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 1969, **30**, 2167–2172.
- Pollock J.M., Neill S.D.: *Mycobacterium bovis* infections and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 2002, **163**, 115–127.
- Rodríguez S., Bezos J., Romer B., de Juan L., Álvarez J., Castellanos E., Moya N., Lozano F., Javed M. T., Sáez-Llorente J.L., Liébana E., Mateos A., Domínguez L., Aranz A.: *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, **17**, 532–535.
- Pavlik I., Dvorska L., Bartos M., Parmova I., Meliciárek I., Jesenska A., Havelkova M., Slosarek M., Putova I., Martin G., Erler W., Kremer K., van Soelingen D.: Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in the Czech Republic and Slovakia in the period 1965–2001 studied by spoligotyping. *Vet. Med. Czech.* 2002, **47**, 181–194.
- Erler W., Martin G., Sachse K., Naumann L., Kahlau D., Beer J., Bartos M., Nagy G., Cvetnic Z., Zolnir-Dovc M., Pavlik I.: Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 2234–2238.
- Proding W.M., Brandstätter A., Naumann L., Pacciarini M., Kubica T., Boschirollo M.L., Aranz A., Nagy G., Cvetnic Z., Ocepek M., Skrypnik A., Erler W., Niemann S., Pavlik I., Moser I.: Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2005, **43**, 4984–4992.
- Pete M., Svára T., Gombac M., Paller T., Zolnir-Dovc M., Emersic I., Proding W.M., Bartos M., Zdobav I., Krt B., Pavlik I., Cvetnic Z., Pogacnik M., Ocepek M.: Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. *J. Vet. Med. Series B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 2006, **53**, 387–392.
- Csivincsik A., Jánosi S., Szabó J., Nagy G., Nemes C., Nagy J., Sugár L., Bogdán T., Tuboly S., Lövey L., Chapman N.G., Hecker K.: Enclosures: a died-end? *Proceedings of the International Symposium Sopron, Hungary* 2008, 62–67.
- Kubica T., Rüscho-Gerdes S., Niemann S.: *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis* – associated tuberculosis cases reported in German between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 3070–3077.
- Blaas S.H., Böhm S., Martin G., Erler W., Gluck T., Lehn N., Naumann L.: Pericarditis as primary manifestation of *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae* infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, **47**, 431–433.
- Rodríguez E., Sánchez L.P., Pérez S., Herrera L., Jiménez M.S., Samper S., Iglesias M.J.: Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004–2007. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2009, **13**, 1536–1541.
- Bayraktar B., Bulut E., Baris A.B., Toksoy B., Dalgic N., Calikkan C., Sevgi D.: Species distribution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a prospective study. *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49**, 3837–3841.
- Lari N., Bimbi L., Rindi L., Tortoli E., Garzelli C.: Genetic diversity of human isolates of *Mycobacterium bovis* assessed by spoligotyping and Variable Number Tandem Repeat genotyping. *Infect. Gen. Evol.* 2011, **11**, 175–180.
- Aimé B., Lequen L., Balageas A., Haddad N., Maugein J.: Infections à *M. bovis* et *M. caprae* en Aquitaine: étude clinico-épidémiologique de 15 cas. *Pathologie Biologie (Paris)* 2012, **60**, 156–159.
- Dyrektywa Rady 64/432/EWG z 26 czerwca 1964 r. w sprawie problemów zdrowotnych zwierząt wpływających na handel wewnątrzspółnotowy bydłem i trzodą chlewną (Dz. Urz. UE L 121 z 29.7.1964, str. 1977).
- Proding W.M., Eigentler A., Allerberger F., Schonbauer M., Glawitschnig W.: Infections of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J. Clin. Microbiol.* 2002, **40**, 2270–2272.
- Erler W., Kahlau D., Martin G., Naumann L., Schimmel D., Weber A.: Zur Epizootiologie der Rindertuberkulose in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochens.* 2003, **116**, 288–292.
- Krajewska M.: *Charakterystyka szczepów Mycobacterium bovis izolowanych od zwierząt w Polsce*. Rozprawa doktorska, PIWet – PIB, Puławy 2015.
- Augustynowicz-Kopec 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. Puławy* 2011, **55**, 381–383.

Dr Monika Krajewska,
e-mail: monika.krajewska@piwet.pulawy.pl