

Diagnostyka laboratoryjna gruźlicy bydłej u zwierząt wolno żyjących z uwzględnieniem żubrów

Monika Krajewska¹, Blanka Orłowska², Krzysztof Anusz³

¹ Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

² Katedra Nauk Klinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

³ Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

Laboratory diagnostics of bovine tuberculosis in wildlife including bison

Abstract: Free-ranging wild animals have been the subject of researches for years. Bovine tuberculosis, Johne's disease (paratuberculosis), yersiniosis, leptospirosis, brucellosis, anthrax, salmonellosis and colibacteriosis are the most common bacterial diseases in wildlife. The causative agent of bovine tuberculosis is *Mycobacterium bovis* – the member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex group (MTC). Polish researchers indicate that bovine tuberculosis in bison used to be and still is evidenced in Poland. Until now tuberculosis has been occurring only in the population of bison from the Bieszczady region. Without thorough epidemiological survey, the source of infection can not be identified. The neighborhood of Ukraine, where the disease remains uncontrolled, can be one of the infection risk factor. Mutual contacts of wildlife and cattle at pastures and meadows, where mycobacteria can survive even for many months, facilitate an interspecies transmission of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium*, wildlife diseases, Bieszczady

Wstęp

Zwierzęta wolno żyjące od wielu lat są przedmiotem badań naukowych (Thoen i in. 1988; Zanella i in. 2008; Kalicki, Krajewska 2011). Najczęściej występującymi chorobami bakteryjnymi u zwierząt wolno żyjących są: gruźlica bydła, choroba Johnego (paratuberkuloza), jersinioza, leptospiroza, brucelloza, pastereloza, wąglik, salmonelloza oraz kolibakterioza (Mackintosh i in. 2002). Czynnikiem etiologicznym gruźlicy bydłej jest prątek bydły (*Mycobacterium bovis*), zaliczany do kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* (MTC). Badania prowadzone przez polskich naukowców wykazały, że gruźlica bydła u żubrów, występowała i nadal występuje w Polsce (Żórawski, Lipiec 1997; Welz i in. 2005; Krajewska, Lipiec 2011). Do tej pory gruźlicę stwierdza się jedynie w populacji żubrów zasiedlających teren Bieszczad (Brewczyński, Welz 2011; Salwa i in. 2011). Bez dokładnych badań epidemiologicznych trudno wskazać

źródło zakażenia. Być może wśród czynników zwiększających ryzyko zakażenia prątkiem jest bliskie sąsiedztwo z Ukrainą, gdzie nadal choroba ta jest bez nadzoru medyczno-weterynaryjnego. Zakażeniu mogą również sprzyjać kontakty zwierząt wolno żyjących z bydłem na wspólnych pastwiskach i łąkach, gdzie prątki mogą przeżywać nawet do kilkunastu miesięcy.

Diagnostyka przyżyciowa

Testem do przyżyciowej diagnostyki gruźlicy jest przede wszystkim śródskórny test tuberkulinowy. Test ten jest międzynarodowym standardem przyżyciowej diagnostyki gruźlicy bydła. Jest wykorzystywany rutynowo w programach zwalczania gruźlicy i polecany przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE).

Wykonanie testu tuberkulinowego polega na śródskórnym podaniu tuberkuliny (białko ze ściany komórkowej prątków). U zakażonego gruźlicą zwierzęcia w miejscu podania tuberkuliny występuje miejscowy obrzęk zapalny. Jest to reakcja nadwrażliwości późnej na tuberkulinę. Odczyt próby wykonywany jest po 72 godzinach od podania tuberkuliny. Ze względu na powszechną obecność w środowisku prątków atypowych, niegruźliczych (NTM – non-tuberculosis mycobacteria) możliwe są dodatnie odczyny nieswoiste u zwierząt zakażonych NTM (wyniki fałszywie dodatnie). Prątkiem należącym do grupy NTM jest często występujący prątek ptasi (*M. avium*). W celu różnicowania zakażenia prątkiem bydłowym od zakażenia prątkiem ptasim stosuje się tuberkulinizację porównawczą. U zwierzęcia zakażonego prątkiem bydłowym występuje silniejsza reakcja na tuberkulinę prątka bydłowego niż na tuberkulinę prątka ptasiego. Test tuberkulinowy może również dawać wyniki fałszywie ujemne (immunosupresja, świeże zakażenie prątkiem, błędy w podaniu tuberkuliny i inne).

Testami uzupełniającymi w diagnostyce gruźlicy mogą być test gamma-interferonowy (Bovigam, Prionics) oraz test ELISA (IDEXX M. bovis Ab Test). Ten ostatni przeznaczony jest do badania bydła i wymaga pobrania od zwierzęcia surowicy. Test gamma-interferonowy jest testem immunoenzymatycznym służącym do wykrywania interferonu γ uwalnianego *in vitro* przez leukocyty krwi po stymulacji tuberkuliną. Jest stosowany do diagnostyki gruźlicy bydła, owiec, kóz, bawołów afrykańskich i innych ssaków z rodziny Bovidae (Kita, Anusz 2009).

Diagnostyka laboratoryjna

Diagnostyka laboratoryjna gruźlicy bydłej wykonywana jest zgodnie z Instrukcją Głównego Lekarza Weterynarii i opiera się na izolowaniu i identyfikacji drobnoustrojów z rodzaju *Mycobacterium*. Materiał do badań mikrobiologicznych stanowią węzły chłonne i chorobowo zmienione narządy, pobrane

post mortem w sposób możliwie jałowy. Badanie laboratoryjne obejmuje następujące etapy: wstępne badanie anatomopatologiczne, bakterioskopię, badanie hodowlane, próbę biologiczną na świnkach morskich oraz dodatkowo w ramach badań naukowych identyfikację genotypową izolatów.

Bakterioskopia opiera się na sporządzeniu z każdej próbki co najmniej dwóch preparatów mazanych lub odciskowych, które następnie barwi się metodą wg Ziehl-Neelsena. Kwasooporne bakterie z rodzaju *Mycobacterium* barwią się na kolor czerwony, podczas gdy inne drobnoustroje i tkanki barwią się na niebiesko. Niestety na podstawie samej bakterioskopii nie można stwierdzić do jakiego typu należą badane prątki.

W dalszym badaniu mikrobiologicznym materiał tkankowy zostaje bardzo dokładnie rozdrobniony i opracowany zgodnie z Instrukcją, w celu uzyskania osadu do posiewów na podłoża hodowlane stałe: Stonebrinka, Petragnaniego, Loewensteina-Jensena oraz do próby biologicznej na świnkach morskich (Tab.1).

Tabela 1. Wrażliwość zwierząt laboratoryjnych na iniekcję różnych typów prątka gruźlicy

	Prątek bydłowy	Prątek ludzki	Prątek ptasi
świnka morska	+	+	-
królik	+	-	+
kurczę	-	-	+

Jak wynika z danych w tabeli 1, świnka morska jest wrażliwa na prątki typu bydłowego (*M. bovis*). Dawka 0,1mg zawiesiny prątków powoduje rozległe zmiany sekcyjne w postaci typowych gruźliczków gruźliczych na wątrobie, śledzionie, krezce oraz węzłach chłonnych a nawet śmierć zwierzęcia przed datą zakończenia doświadczenia. Świnka morska nie jest natomiast wrażliwa na prątek ptasi.

Dodatkowym badaniem diagnostycznym jest nieradiologiczny i w pełni automatyczny system hodowli na podłożu płynnym. Do badania wykorzystuje się ten sam osad, który uzyskuje się do posiewów na podłoża stałe. Do tego celu niezbędne jest wyposażenie laboratorium w Aparat BD BACTEC MGIT 320 (Krajewska, Lipiec, 2012). Dodatkową zaletą tego systemu jest również możliwość oznaczenia wrażliwości na leki przeciwgruźlicze: streptomycynę, izoniazyd, rifampicynę, etambutol (S.I.R.E.) oraz pyrazynamid (PZA). W weterynaryjnym aspekcie wykonanie testu lekowrażliwości nie ma znaczenia klinicznego, a jedynie epidemiologiczne. Diagnostyka laboratoryjna gruźlicy bydłowej trwa około 6 tygodni.

W badaniach naukowych wykorzystuje się również diagnostykę molekularną prątków. Wyizolowane szczepy poddawane są genotypizacji komercyjnym testem GenoType MTBC Hain Lifescience&ae& (Niemcy). Test ten bazuje na polimorfizmie genu kodującego gyrase B. Procedura badania składa się z trzech

etapów: wyodrębnienia ze szczepów materiału genetycznego, amplifikacji przy użyciu primerów wyznakowanych biotyną oraz hybrydyzacji. Dostarczony w zestawie wzorzec umożliwia szybką i prostą interpretację (Safianowska, Walkiewicz, 2007).

Podsumowanie

Przyżyciowa diagnostyka gruźlicy może być obarczona błędem, dlatego podstawę diagnostyki gruźlicy stanowi nadal izolacja prątków z materiału pobranego od zwierzęcia. Ponadto wykonanie przyżyciowego badania w kierunku gruźlicy wymaga bezpośredniego kontaktu ze zwierzęciem (podanie tuberkuliny, pobranie krwi), co w przypadku zwierząt wolno żyjących, takich jak żubry, nierzadko wiąże się z koniecznością farmakologicznej immobilizacji zwierzęcia. Dodatkowo odczyt próby tuberkulinowej wymaga ponownego kontaktu ze zwierzęciem. Stąd w diagnostyce gruźlicy zwierząt wolno żyjących, większość materiału do badań w dalszym ciągu pobierana jest *post mortem*.

Piśmiennictwo

- Brewczyński P., Welz M., 2011. Zagrożenie gruźlicą u żubrów w Bieszczadach. *European Bison Conservation Newsletter*, 4, 63–70.
- Kalicki M., Krajewska M., 2011. The case of tuberculosis in the Defassa Waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus defassa*). *Medycyna Weterynaryjna* 67(7), 499–500.
- Kita J., Anusz K., 2009. Rozpoznawanie gruźlicy u bydła. *Życie Wet.*, 84(6).
- Krajewska M., Lipiec M., Szulowski K., 2011. Bovine tuberculosis in bison (*Bison bonasus caucasicus*) located in Poland. *Post. Nauk Med.*, XXIV(10), 842–845.
- Krajewska M., Lipiec., 2012. Przydatność systemu MGIT w diagnostyce gruźlicy bydłowej. Materiały konferencyjne XIV Zjazdu PTNW Wrocław, p. 517.
- Mackintosh C., Haigh J.C., Griffin F., 2002. Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Rev Sci Tech*, 21(2), 249–63.
- Safianowska A., Walkiewicz R., Nejman-Gryz P., Chazan R., Grubek-Jaworska H., 2009. Przydatność diagnostyczna molekularnego testu GenoType MTBC (HAIN Lifesciences, Niemcy) w identyfikacji prątków gruźlicy. *Pneumonologia i Alergologia*, 77, 517–520.
- Salwa A., Anusz, Welz, M., Wozikowski R., Zaleska M., Kita J., 2011. Analiza sytuacji epizootiologicznej u zwierząt gospodarskich i wolno żyjących w Bieszczadach w związku wystąpieniem gruźlicy bydłowej u żubrów (*Bison bonasus*). *European Bison Conservation Newsletter*, 4, 71–80.
- Thoen C.O., Throlson K.J., Miller L.D., Himes E.M., Morgan R.L., 1988. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in American bison. *Am J Vet Res*, 49(11), 1861–65, 1988.
- Welz M., Anusz K., Salwa A., Zaleska M., Bielecki W., Osinska B., Kaczor S., Kita J.: Gruźlica bydła u żubrów w Bieszczadach. *Medycyna Wet.* 2005(61), 04 s. 441–444
- Zanella G., Durand B., Hars J., Moutou F., Garin – Bastuji B., Duvauchelle A., Fermé M., Karoui C., Boschiroli M.L., 2008. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *J Wildl Dis.*, 44(1), 99–108.
- Żórawski C., Lipiec M., 1997. Przypadek uogólnionej gruźlicy u żubra. *Medycyna Weterynaryjna*, 53, 90–92.