

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Lek. wet. Małgorzata Bruczyńska

**Gruźlica bydłęca i paratuberkuloza
u zwierząt dzikich oraz utrzymywanych
w zakładach odizolowanych – analiza
wybranych przypadków w świetle koncepcji
„Jedno Zdrowie”**

Bovine tuberculosis and paratuberculosis in wild and kept animals in
confined establishments- analysis of selected cases in the light of the
"One Health" concept

Praca doktorska

Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Krzysztofa Anusza

w Katedrze Higieny Żywności

i Ochrony Zdrowia Publicznego

Promotor pomocniczy

Dr hab. Monika Krajewska-Wędzina

Warszawa, 2024

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

21.11.2024

Podpis promotora pracy

Krzysztof Anus

Oświadczenie autora pracy

Świadoma odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. Nr 90 poz. 631 z późn. zm.).

Oświadczam, że przedstawiona praca nie była wcześniej podstawą procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną. Przyjmuję do wiadomości, że praca doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data

21.11.2024

Podpis autora pracy

Chatarowate
Bmumbe



Za okazaną pomoc i ogromną życzliwość pragnę serdecznie podziękować *prof. dr. hab. Krzysztofowi Anuszowi, dr Annie Didkowskiej oraz dr hab. Monice Krajewskiej - Wędzinie.*

Podziękowania składam również współautorom publikacji naukowych: *prof. dr hab. Wandzie Olech - Piaseckiej, prof. dr hab. Ewie Augustynowicz - Kopeć, dr Blance Orłowskiej, dr Katarzynie Filip - Hutch, dr Sylwii Brzezińskiej, dr. Mirosławowi Kalickiemu, dr. Michałowi Rudemu, dr. Andrzejowi Dzikowskiemu, dr. Mirosławowi Welzowi, lek. wet. Michałowi Michalskiemu, lek. wet. Magdalenie Nowak oraz wszystkim pomocnym lekarzom weterynarii z polskich ogrodów zoologicznych za okazaną pomoc przy pobieraniu materiału do badań.*

Moim najbliższym: za ogromne wsparcie, motywację i cierpliwość.



Streszczenie

Gruźlica bydlęca i paratuberkuloza u zwierząt dzikich oraz utrzymywanych w zakładach odizolowanych – analiza wybranych przypadków w świetle koncepcji „Jedno Zdrowie”

Zagadnienia rozpatrywano w wymiarze mikrobiologicznym, molekularnym oraz uwarunkowań prawno-organizacyjnych ochrony zdrowia zwierząt i ludzi. Analiza przypadku gruźlicy bydlęcej (BTB) u mundżaków chińskich (*Muntiacus reevesi*) w prywatnej hodowli typu „minizoo” z możliwym bliskim kontaktem zwierząt z odwiedzającymi – z węzłów chłonnych dwóch osobników wyizolowano *M. bovis* (klasyfikacja na podstawie testu Genotype MTBC opartego na polimorfizmie genu *gyrB*), wskazuje na potrzebę precyzyjnego określenia obowiązków prawnych właścicieli takich zakładów w zakresie ochrony zdrowia publicznego, z uwzględnieniem obowiązku posiadania dokumentacji pochodzenia zwierząt, wyników ich badań w kierunku chorób zakaźnych i inwazyjnych, jak również odnoszącej się do środków ochrony indywidualnej, z podziałem na przeznaczone dla pracowników oraz odwiedzających. Powyższe obowiązki prawne powinny być określone zgodnie z wymaganiami Prawa o Zdrowiu Zwierząt (AHL -Animal Health Law).

Zwalczanie BTB u żubrów nie było wystarczająco jasno uregulowane prawnie przed wprowadzeniem AHL w 2021 r. (przypadki BTB w Ośrodku Hodowli Żubrów w Smardzewicach – Kampinoski Park Narodowy i wśród żubrów wolno żyjących w Nadleśnictwie Borki oraz w Puszczy Boreckiej). Według obecnego stanu prawnego Powiatowy Lekarz Weterynarii posiada kompetencje w zakresie zapobiegania i zwalczania BTB u żubrów, co ułatwi zarówno efektywne realizowanie strategii ochrony i reintrodukcji gatunku, jak i z uwzględnieniem koncepcji „Jedno Zdrowie - One Health” zapobieganie przenoszeniu choroby na inne gatunki wolno żyjące oraz zwierzęta gospodarskie produkujące żywność. U 11 gatunków zwierząt roślinożernych w polskich ogrodach zoologicznych stwierdzono bezobjawowe zakażenia *Mycobacterium avium* susp. *paratuberculosis* (dodatknie wyniki posiewów bakteriologicznych próbek kału, Real time PCR; identyfikacja gatunkowa na podstawie testu Geno Type *Mycobacterium* CM opartego na technologii DNA-Strip) Patogen ten jest potencjalnie groźny również dla odwiedzających. Należy uwzględnić paratuberkulozę w monitoringu serologicznym chorób zakaźnych i inwazyjnych w ogrodach zoologicznych.

Słowa kluczowe: gruźlica bydlęca, paratuberkuloza, zwierzęta dzikie i utrzymywane, hodowla typu „minizoo”, ogród zoologiczny, zakłady odizolowane, Prawo o Zdrowiu Zwierząt (AHL), koncepcja „One Health”

Abstract

Bovine tuberculosis and paratuberculosis in wild and kept animals in confined establishments- analysis of selected cases in the light of the "One Health" concept

Topics were considered in the microbiological, molecular dimensions and in the appearance of legal and organizational conditions for the protection of animal and human health. Analysis of a case of bovine tuberculosis (BTB) in Reeves's muntjacs (*Muntiacus reevesi*) in a "minizoo"-private animal collection with the possible contact between animals and visitors - *M. bovis* was isolated from the lymph nodes of two animals (classification based on the Genotype MTBC test of the *gyrB* gene polymorphism coefficient) points to the need to precisely define the legal obligations of the owners of such establishments in the field of public health protection, including the obligation to have documentation of the origin of animals, the results of their tests for infectious and invasive diseases, as well as in relation to personal protective equipment, divided into for employees and visitors. The legal obligation must be defined in accordance with the requirements of the Animal Health Law (AHL).

Combating BTB in European bison was not clear enough to be legal before the introduction of AHL in 2021 (cases of BTB in the Bison Breeding Center in Smardzewice - Kampinoski National Park and among free-living bison in the Borki Forest Inspectorate and in the Borecka Forest). According to the current legal status, the County Veterinary Officer is competent to prevent and combat BTB in European bison, which will facilitate both the effective implementation of the strategy for the protection and reintroduction of the species, and, taking into account the concept of "One Health", preventing the transmission of the disease to other free-living species and food producing animals.

Asymptomatic *Mycobacterium avium* susp. paratuberculosis infections were found in 11 species of herbivorous animals in Polish zoological gardens (positive results of bacteriological cultures of fecal samples, Real time PCR; species identification based on the Geno Type Mycobacterium CM test based on DNA-Strip technology). This pathogen is potentially dangerous also for visitors. This indicates the need to include paratuberculosis in the serological monitoring of infectious and invasive diseases in zoos.

Key words: bovine tuberculosis (BTB), paratuberculosis, wild and kept animals, "mini zoo"-private animal collection, zoo, confined establishments, Animal Health Law, "One Health" concept

Wykaz skrótów

AHL	–	Animal Health Law – Prawo o Zdrowiu Zwierząt
BTB	–	Bovine tuberculosis – Gruźlica bydłęca
EAZA	–	European Association of Zoos and Aquaria – Europejskie Stowarzyszenie Ogrodów Zoologicznych i Akwariów
HEYM	–	Herrold's Egg Yolk Media - Podłoże z żółtkiem Herroldsa
HPC	–	3-Hydroxy-2-phenylcinchoninic acid - Kwas 3-hydroksy-2-fenylocynchoninowy
IBD	–	Identical by Descent - identyczne przez pochodzenie
MAC	–	<i>Mycobacterium avium complex</i>
MAH	–	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MAP	–	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MTBC	–	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> - grupa prątków z rodziny <i>Mycobacteriaceae</i>
OHŻ	–	Ośrodek Hodowli Żubrów
OTF	–	Officially TB Free – Oficjalnie Wolny od Gruźlicy
PIWet	–	PIB Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy
PLW	–	Powiatowy Lekarz Weterynarii
TB	–	Tuberculosis – Gruźlica
UE	–	Unia Europejska
WHO	–	World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia
WOAH	–	World Organisation for Animal Health - Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt

Spis treści

Streszczenie	7
Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	13
1. Wstęp	15
2. Cele pracy.....	21
3. Materiały i metody	23
3.1 Gruźlica bydlęca u mundżaków chińskich (<i>Muntiacus reevesi</i>) w prywatnej hodowli zwierząt w Polsce – zarządzanie i konsekwencje prawne	23
3.2 Problemy w stosowaniu prawa w zwalczaniu gruźlicy bydlęcej u żubrów (<i>Bison bonasus</i>) — zagrożenie dla efektywnej strategii reintrodukcji	24
3.3 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> u bezobjawowych zwierząt roślinożernych w ogrodach zoologicznych w Polsce	24
4. Wyniki.....	27
4.1 Gruźlica bydlęca u mundżaków chińskich (<i>Muntiacus reevesi</i>) w prywatnej hodowli zwierząt w Polsce – zarządzanie i konsekwencje prawne	27
4.2 Problemy w stosowaniu prawa w zwalczaniu gruźlicy bydlęcej u żubrów (<i>Bison bonasus</i>) — zagrożenie dla efektywnej strategii reintrodukcji	27
4.2.1 Przypadek gruźlicy bydlęcej w Ośrodku Hodowli Żubrów w Smardzewicach (Kampinoski Park Narodowy)	27
4.2.2 Przypadek gruźlicy bydlęcej związany z przeniesieniem żubrów z Ośrodka Hodowli w Smardzewicach do zagrody pokazowej w Nadleśnictwie Borki.....	28
4.2.3 Przypadek gruźlicy bydlęcej w stadzie wolno żyjących żubrów w Puszczy Boreckiej	28
4.2.4 Analiza stanu prawnego	29
4.3 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> u bezobjawowych zwierząt roślinożernych w ogrodach zoologicznych w Polsce	31

5. Dyskusja	33
6. Wnioski	43
7. Bibliografia	45
7.1. Literatura	45
7.2. Wykaz aktów prawnych i dokumentów urzędowych	57
8. Załączniki	61
8.1 Publikacje	61
8.2 Oświadczenia współautorów	91

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1. Bruczyńska M, Didkowska A, Michalski M, Brzezińska S, Augustynowicz-Kopeć E, Anusz K. 2022. Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland– management and legal implications. *Ann Agric Environ Med.*, 29, 365. DOI: [/doi.org/10.26444/aaem/150007](https://doi.org/10.26444/aaem/150007)

(IF₂₀₂₂ = 0,982; MEiN₂₀₂₂ = 100 pkt.)

2. Bruczyńska M., Didkowska A., Dzikowski A., Rudy M., Orłowska B., Welz M., Krajewska-Wędzina M., Olech W., Anusz K. 2022. Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) - A Threat to an Effective Reintroduction Strategy. *Diversity*, 14, 710. DOI: [/doi.org/10.3390/d14090710](https://doi.org/10.3390/d14090710)

(IF₂₀₂₂ = 3,032; MEiN₂₀₂₂ = 70 pkt.)

3. Bruczyńska M., Didkowska A., Brzezińska S., Nowak M., Filip-Hutsch K., Kalicki M., Augustynowicz-Kopeć E., Anusz K. 2023. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in Poland. *Animals*, 13, 1022. DOI: [/doi.org/10.3390/ani13061022](https://doi.org/10.3390/ani13061022)

(IF₂₀₂₃ = 3,231; MEiN₂₀₂₂ = 100 pkt.)

Suma punktów ME i N – 270

Suma IF – 7,244

1. Wstęp

Niniejsza praca stanowi analizę: przypadków gruźlicy bydłowej u mundżaków chińskich w prywatnej hodowli typu „minizoo”, przypadków bezobjawowych zakażeń *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (czynniki etiologiczne paratuberkulozy) u zwierząt nieudomowionych w ogrodach zoologicznych oraz przypadków gruźlicy bydłowej u żubrów żyjących na wolności lub w zagrodach, z uwzględnieniem uwarunkowań prawnych ochrony zdrowia publicznego.

Gruźlica jest chorobą zakaźną ludzi i zwierząt, wywoływaną przez jedenaście gatunków kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex - MTBC) (Rodriguez-Campos i in., 2014, Parsons i in., 2013). Należące do kompleksu *Mycobacterium bovis* i *Mycobacterium caprae* są czynnikami etiologicznymi gruźlicy zwierząt (ang. animal tuberculosis) (Krajewska i in., 2017, Augustynowicz-Kopeć i in., 2011). W Polsce BTB jest najczęściej wykrywana u bydła (Lipiec i in., 2019). Odnotowano również przypadki u świń (Lipiec i in., 2019) oraz u licznych gatunków zwierząt nieudomowionych. W Bieszczadach BTB została potwierdzona mikrobiologicznie u żubrów (*Bison bonasus*), dzików (*Sus scrofa*) oraz wilków (*Canis lupus*) (Krajewska i in., 2014, Orłowska i in., 2017, Radulski i in., 2019, Didkowska i in., 2021a). Przypadki BTB stwierdzano również w polskich ogrodach zoologicznych (Krajewska i in., 2015, Krajewska-Wędzina i in., 2018).

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) klasyfikuje BTB jako bezpośrednią chorobę odzwierzęcą. To znaczy, że czynnik zakaźny przenoszony jest z zakażonego zwierzęcia na człowieka, bez żywiciela pośredniego (Thoen i in., 2006, Lipiec i in., 2019).

W trosce o zdrowie publiczne należy minimalizować ryzyko zakażenia w miejscach, w których utrzymywane są zwierzęta – w ogrodach zoologicznych czy w hodowlach typu „minizoo”, między innymi poprzez regularne badania i zakup zwierząt o znanym statusie epizootycznym.

Ze względu na dużą liczbę odwiedzających ogrody zoologiczne, BTB może stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Główną drogą przenoszenia BTB między zwierzętami jest droga oddechowa (Montali i in., 2001, Pavlik i in., 2002, Lawerin i in., 2005, Kosińska i in. 2011, Zlot i in., 2016, Gong i in., 2017). W ogrodach zoologicznych potwierdzono przypadki przeniesienia

BTB zwierzę-człowiek, co sugeruje przenoszenie również drogą aerogenną (Sanou i in., 2014, Malama i in., 2014, Olea-Popelka i in., 2017, Akkerman i in., 2020).

Status państwa oficjalnie wolnego od gruźlicy bydła (OTF – Officially TB Free), otrzymuje państwo, w którym odsetek zakażonych stad bydła nie przekracza 0,1% rocznie i co najmniej 99,9% stad jest oficjalnie wolne od gruźlicy każdego roku przez sześć lat. Polska uzyskała status kraju OTF na mocy Decyzji Komisji nr 2009/342/WE z dnia 23 kwietnia 2009 roku [1-wykaz aktów prawnych i dokumentów urzędowych]. Uzyskanie tego statusu umożliwiło zmianę systemu nadzoru z 1/3 do 1/5 stad bydła w okręgu rocznie. Obecnie wszystkie stada bydła w okręgu są poddawane badaniom co pięć lat, przy czym badania obejmują zwierzęta w wieku powyżej 42 dni. Badanie urzędowe przeprowadza się za pomocą porównawczej śródskórnej próby tuberkulinowej w okolicy szyi. W ciągu ostatnich dziesięciu lat odnotowano w Polsce 372 ogniska gruźlicy u bydła.

Aktualny stan prawny w Polsce nie implikuje konieczności przeprowadzania badań monitoringowych w kierunku BTB u zwierząt dzikich ani utrzymywanych przez człowieka za wyjątkiem gatunków *Bison ssp.*, *Bos ssp.*, *Bubalus ssp* [2].

W tym kontekście poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego stanowią hodowle typu „minizoo”, niepodlegające szczegółowym, specyficznym uregulowaniom prawnym.

Należy podkreślić, że działalność ogrodów zoologicznych podlega zatwierdzeniu przez Powiatowego Lekarza Weterynarii (PLW), podczas gdy dla prywatnych hodowli zwierząt typu „minizoo” nie ma określonych szczegółowych zasad rejestracji.

Sytuacja ta stanowi lukę prawną – tym bardziej, że pochodzenie i status epizootyczny zwierząt utrzymywanych w prywatnych hodowlach często pozostają nieznane, a ich przemieszczanie często było wielokrotne i nie podlegało żadnym ograniczeniom ani przepisom zapobiegającym rozprzestrzenianiu się chorób zakaźnych.

Zwierzęta w hodowlach typu „minizoo” są wykorzystywane jako atrakcja turystyczna i często mają bezpośredni kontakt z ludźmi, co zagraża przenoszeniem odzwierzęcych chorób zakaźnych, między innymi gruźlicy – tak jak w analizowanym w niniejszej pracy przypadku gruźlicy bydlęcej u mundżaków. Gruźlica bydlęca u zwierząt w ogrodach zoologicznych, w hodowlach typu „minizoo” ma niezwykle wysoki potencjał zakaźny (Müller i in., 2013, Stephens i in., 2013).

Nie jest to jednak jedyne zagrożenie związane z zakażeniami prątkami. Do kwasoopornych prątków rodzaju *Mycobacterium* należy również *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), który jest czynnikiem etiologicznym paratuberkulozy (choroba Johnego) - przewlekłego, ziarniniakowego zakażenia przewodu pokarmowego, najczęściej występującego u przeżuwaczy. Inne ssaki są również podatne na zakażenia MAP (Roller i in., 2020a, Pigoli i in., 2020). W ogrodach zoologicznych paratuberkuloza została potwierdzona wśród *Bovidae* (Dukes i in., 1992, Naylor i in., 2018, Hernández-Reyes i in., 2022), *Cervidae* (Girling i in., 2011) *Giraffidae* (Stevenson i in., 2009, Vansnick i in., 2005), *Camelidae* (Jorge i in., 2008, Münster i in., 2013a), *Rhinocerotidae* (Collins i in., 1993, Bryant i in., 2012) i *Rodentia* (Roller i in., 2020a, Roller i in., 2020b). Jednym z celów niniejszej pracy było potwierdzenie bezobjawowych zakażeń MAP u zwierząt roślinożernych w ogrodach zoologicznych w Polsce.

W ogrodach zoologicznych wiele zwierząt może być nierozpoznanym rezerwuarem MAP. Sieją MAP w sposób przerywany lub przewlekły (Münster i in., 2013b, Corn i in., 2005). Przenoszenie patogenu odbywa się głównie drogą fekalno-oralną, chociaż opisane zostały również drogi wertykalna, pseudo-wertykalna i weneryczna (Larsen i in., 1981, Sweeney i in., 1992, Whittington i in., 2009). Zwykle objawy kliniczne rozwijają się u zwierząt po długim okresie inkubacji.

Należy podkreślić, że siewstwo MAP w kale może występować na kilka miesięcy przed wystąpieniem objawów klinicznych. Postępująca utrata masy ciała, osłabienie kondycji i biegunka to główne objawy klinicznej postaci paratuberkulozy (Barrero-Dominguez i in., 2019).

Problematyka zakażeń MAP jako zagrożenia dla zdrowia publicznego pozostaje nie w pełni wyjaśniona i sporna (Waddell i in., 2015, Agrawal i in., 2021, Moghadam i in., 2022), niemniej jednak odwiedzający ogrody zoologiczne i opiekunowie zwierząt powinni przestrzegać środków ostrożności. Jest to tym bardziej istotne, że paratuberkuloza może mieć ciężki przebieg, w zależności od gatunku i osobnika (Roller i in., 2020b).

Monitorowanie paratuberkulozy jest szczególnie ważne w ogrodach zoologicznych, które utrzymują zwierzęta bardzo cennych i zagrożonych gatunków.

Zakażenia MAP potwierdzono w Polsce u zwierząt gospodarskich (Szteyn i in., 2020, Kaczmarkowska i in., 2022). Dotychczas nie prowadzono w Polsce badań występowania tego patogenu w polskich ogrodach zoologicznych.

Łącznie w Polsce zarejestrowanych jest 25 ogrodów zoologicznych w 13 regionach kraju. Spośród nich 11 to członkowie Europejskiego Stowarzyszenia Ogrodów Zoologicznych i Akwariów (EAZA), wraz z najważniejszymi ogrodami zoologicznymi z całej Europy. W ogrodach zoologicznych mogą być trzymane i hodowane wyłącznie zwierzęta urodzone i wychowane poza środowiskiem naturalnym, które w inny sposób nie mają szans na przeżycie. Zwierzęta mogą być również utrzymywane, jeżeli wymaga tego ochrona populacji lub gatunku lub osiągnięcie celów naukowych. W takich przypadkach, zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/429 z dnia 9 marca 2016 r. w sprawie przenośnych chorób zwierząt oraz zmieniające i uchylające niektóre akty w dziedzinie zdrowia zwierząt „Prawo o zdrowiu zwierząt”, AHL [2], tak zwierzęta, jak i miejsce ich utrzymywania podlegają nadzorowi właściwego organu – PLW.

Jak wspomniano, BTB opisano również u dzikich i utrzymywanych przez człowieka osobników nieudomowionych gatunków zwierząt, m.in. w 2018 r. u żubrów utrzymywanych w zagrodach (Didkowska i in., 2021b). W tym kontekście zwalczanie i zapobieganie gruźlicy bydłej jest kwestią troski o zdrowie publiczne oraz ważnym elementem działań na rzecz ochrony gatunków, np. żubra.

W Polsce normy prawne dotyczące zwierząt wolno żyjących są złożone, niejasne lub niepełne. System prawny obfituje w przepisy różnego rodzaju i różnej mocy, które są powiązane złożonymi relacjami systemowymi, normatywnymi i interpretacyjnymi. W obliczu niejasności prawnych ustalenie jasnych procedur, które mogą być stosowane przez organy, może być bardzo trudne. Konsekwencją jest przekazywanie odpowiedzialności lub niepodejmowanie odpowiednich działań w odpowiedzi na określone sytuacje kryzysowe.

Odnosząc się do analizowanych w niniejszej pracy problemów stosowania prawa w zwalczaniu gruźlicy bydłej u żubrów, różne wykładnie jednego przepisu zagrażają skutecznej strategii reintrodukcji - tworzeniu większych metapopulacji i utrzymywaniu małych, izolowanych stad rezerwuarowych (ośrodków hodowli) na wypadek wystąpienia choroby zakaźnej (Perzanowski i in., 2019).

W wielu wolno żyjących stadach żubrów występuje duże zagęszczenie zwierząt, szczególnie w okresie dokarmiania zimowego. W tej sytuacji wzrasta ryzyko epidemiczne szczególnie jeśli stada są połączone w większe metapopulacje (Perzanowski i in., 2019).

Należy podkreślić, że każde z podjętych w pracy zagadnień rozpatrywane jest zarówno w wymiarze mikrobiologicznym oraz molekularnym, jak i niezwykle istotnym wymiarze uwarunkowań prawno-organizacyjnych ochrony zdrowia zwierząt i ludzi według koncepcji „One Health – Jedno Zdrowie”, będącej jedną z podstaw ochrony zdrowia publicznego.

Koncepcja ta stanowi podstawę, uzasadnienie i naczelną regułę interpretacyjną „Prawa o zdrowiu zwierząt” (AHL) [2]. Jest to europejski akt prawny, który obowiązuje bezpośrednio w porządkach prawnych państw członkowskich Unii Europejskiej, w tym w Polsce. Niemniej jednak, krajowe przepisy prawne dotyczące ochrony zdrowia zwierząt i ochrony zdrowia publicznego pozostały niezmienione. W sposób zasadniczy zmieniła się jednak ich interpretacja – a zatem zmieniła się także treść norm prawnych.

Normy prawne mogą zostać zrekonstruowane dopiero po uwzględnieniu przepisów AHL i przepisów prawa polskiego, przy jednoczesnym prymacie interpretacyjnym dla prawa europejskiego. Przepisy polskie muszą być rozumiane i wykładane w świetle AHL oraz stosowane w zgodzie z AHL. Poprawna interpretacja i zastosowanie tych reguł nakłada na organy weterynaryjne, takie jak PLW, znaczną odpowiedzialnością. Zakłada też posiadanie przez nie znacznych kompetencji prawnych.

Choć AHL nie doprowadziło do ujednolicenia prawa na obszarze całej UE, to powołało do istnienia spójne mechanizmy działania i stworzyło jednolite podstawy do stosowania szczegółowych przepisów lokalnych. Dzięki AHL wszystkie państwa członkowskie UE posiadają wspólną podstawę aksjologiczną i wspólną regułę interpretacyjną przepisów z zakresu ochrony zdrowia zwierząt i ludzi – „One Health – Jedno Zdrowie”.

AHL stanowi ogólnoeuropejski mechanizm ochrony zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego i w sposób istotny wpływa na ochronę między innymi żubrów dzikich oraz utrzymywanych przez człowieka – we wszystkich aspektach i rodzajach tej ochrony.

2. Cele pracy

1. Ocena procedur podejmowanych przez właścicieli oraz lekarzy weterynarii z uwzględnieniem uwarunkowań prawnych ochrony zdrowia publicznego w odniesieniu do analizy przypadku gruźlicy bydlęcej u mundżaków chińskich (*Muntiacus reevesi*) w prywatnej hodowli typu „minizoo”.
2. Analiza, interpretacja i ocena norm prawnych dotyczących zwalczania gruźlicy bydlęcej (BTB) u żubrów w Polsce na podstawie wybranych przypadków, pozostająca w związku ze strategią reintrodukcji gatunku.
3. Potwierdzenie występowania przypadków bezobjawowych zakażeń *Mycobacterium avium* susp. *paratuberculosis* (MAP) u zwierząt roślinożernych w polskich ogrodach zoologicznych w kontekście potencjalnego zagrożenia zdrowia publicznego.

3. Materiały i metody

3.1 Gruzlica bydlęca u mundżaków chińskich (*Muntiacus reevesi*) w prywatnej hodowli zwierząt w Polsce – zarządzanie i konsekwencje prawne

Dwa mundżaki chińskie (*Muntiacus reevesi*), samiec i samica w wieku czterech lat, wykazywały podobne objawy kliniczne w różnych odstępach czasu. W lutym 2021 roku, lekarz weterynarii został wezwany do przypadku mundżaka utrzymywanego w prywatnej hodowli, wykazującego objawy ogólnego osłabienia, braku apetytu i apatii. W badaniu klinicznym stwierdzony został znaczny stopień duszności wdechowo-wydechowej. Zdecydowano się na immobilizację zwierzęcia w celu ułatwienia badania klinicznego oraz podania antybiotyków i leków przeciwzapalnych. Zwierzę padło podczas chwytania.

Po kilku tygodniach właściciel zgłosił podobne objawy kliniczne u drugiego mundżaka (ogólne osłabienie, brak apetytu, apatia). Po przeprowadzeniu badania klinicznego, lekarz weterynarii dokonał eutanazji zwierzęcia.

Sekcję zwłok obu osobników przeprowadzono zgodnie z załącznikiem nr 3 do Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 4 lipca 2017 r. w sprawie sposobu prowadzenia dokumentacji związanej ze zwalczaniem chorób zakaźnych zwierząt [3]. Podczas sekcji zwłok pobrano fragmenty płuc w przypadku pierwszego mundżaka, a w przypadku drugiego: węzły chłonne piersiowe, podżuchwowe, kregkowe oraz fragmenty płuc.

Materiał poddano standardowej hodowli prątków (Krajewska-Wędzina i in., 2020). Każdą tkankę badano w trzech powtórzeniach. W skrócie, po homogenizacji w 5% kwasie szczawiowym (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), osad przepłukiwano roztworem soli fizjologicznej (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA). Po odwirowaniu osad umieszczano na pożywkach Lowenstein i Stonebrink (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Zastosowano trzy podłoża Lowenstein i Stonebrink dla każdego rodzaju tkanki w celu zwiększenia czułości testu. Pożywki inkubowano w temperaturze 37°C przez 6 tygodni i sprawdzano co siedem dni. DNA wyizolowano stosując zestaw do izolacji Genolyse (Hain Lifescience, Niemcy). Szczepy zidentyfikowano za pomocą testu GenoType®MTBC (Hain Lifescience, Niemcy). Oba badania przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta (Krajewska-Wędzina i in., 2020).

Badane zwierzęta zostały sprowadzone w 2017 r. do Polski północnej, jednak ich dokładne pochodzenie pozostaje nieznane. Z informacji uzyskanych od właściciela wynika, że pochodziły z okolic Krakowa. Zwierzęta przybyły do ośrodka bez wcześniejszego badania przesiewowego w kierunku chorób zakaźnych.

Opisywana prywatna hodowla zwierząt jest częścią obiektu agroturystycznego o powierzchni 6 ha. W obiekcie przebywały również kangury (*Wallabia*), zebry (*Equus quagga*), wielbłądy (*Camelus dromader*), owce (*Ovis aries*), kozy (*Capra hircus*), lamy (*Lama guanicoe*), guanako (*Lama guanicoe*), alpaki (*Vicugna pacos*), osły domowe (*Equus asinus*), daniela (*Dama dama*), antylopy nilgawskie (*Boselaphus tragocamelus*), antylopy Sitatunga (*Tragelaphus speki*), mara patagońska (*Dolichotis patagonum*), pawie (*Pavo cristatus*), emu (*Dromaius novaehollandiae*), reka (*Rhea americana*) oraz egzotyczne gatunki drobiu. Zwierzęta nie miały bezpośredniego kontaktu z kundakami.

3.2 Problemy w stosowaniu prawa w zwalczaniu gruźlicy bydłej w u żubrów (*Bison bonasus*) — zagrożenie dla efektywnej strategii reintrodukcji

Badaniom, analizie i interpretacji prawniczej poddano akty normatywne z zakresu zarówno prawa europejskiego i polskiego [1-15]. Zastosowane zostały następujące metody badawcze analizy i interpretacji tekstów prawnych: językowa, systemowa, teleologiczna, funkcjonalna, proeuropejska.

Zbadano także wybrane akty stosowania prawa w konkretnych stanach faktyczno-prawnych, pozwalające na ocenę kazuistycznych przypadków zwalczania gruźlicy u żubrów [16-42]. W badaniach zastosowano metodę analizy przypadków pod kątem prawnym i epizootycznym. Przyjęto stan prawny na dzień 1 lutego 2022 r., a w odniesieniu do przypadków z lat wcześniejszych – właściwy im stan prawny.

3.3 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* u bezobjawowych zwierząt roślinożernych w ogrodach zoologicznych w Polsce

Próbki pobrano z siedmiu polskich ogrodów zoologicznych oznakowanych kodami od „A” do „G” w liczbie $n = 126$. Próbki pobrano również z niekomercyjnego ośrodka hodowlanego „H” ($n = 5$). Wszystkie badane zwierzęta, 11 gatunków, nie miały objawów choroby. Gatunki inne niż roślinożerne zostały wykluczone z badania. Zwierzęta wykazujące oznaki biegunki i wycieńczenia zostały również wykluczone z badania, ponieważ jego celem było monitorowanie klinicznie zdrowych zwierząt.

Do badania tego nie była wymagana zgoda Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach. Próbkę pobrano od 50 różnych gatunków zwierząt. Wiek zwierząt wahał się od 5 miesięcy do 22 lat (średnio 8 lat). Materiał pobrano od 48 samic i 47 samców (dla 36 próbek nie można było określić płci). Materiał (131 próbek kału) pobierano dwoma sposobami: próbki indywidualne ($n = 89$) oraz próbki pobierane z zagród ($n = 42$).

Próbki zostały opracowane zgodnie z Podręcznikiem „Terrestrial Manual” Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (WOAH) 2021 (<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/manual-manual-online-access/>, dostęp 15 grudnia 2021 r.). W skrócie, 1 g kału dodawano do wody destylowanej i wstrząsano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie 5 ml płynu z nad osadu przenoszono do próbówki zawierającej 20 ml 0,95% kwasu 3-hydroksy-2-fenylocynonowego (3-Hydroxy-2-phenylcinchoninic acid HPC). Po kilkukrotnym odwróceniu próbówkę pozostawiano na 18 godzin w temperaturze pokojowej. Osad był przenoszony na podłoża z i bez mykobaktyny Herrold's Egg Yolk Media (HEYM, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Pożywki inkubowano w temperaturze 37°C przez osiem miesięcy i sprawdzano obecność kolonii co siedem dni. DNA z kolonii wyizolowano przy użyciu zestawu do izolacji Genolyse (Hain Lifescience,). Szczepy zostały sklasyfikowane jako gatunki prątków innych niż gruźlicze przy użyciu testu GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience) opartego na technologii DNA-Strip. W skrócie, DNA ekstrahowano, a następnie poddawano multipleksowej amplifikacji z biotynylowanymi starterami. Następnie przeprowadzano odwrotną hybrydyzację. MAP wykrywano metodą PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu zestawu VetMax *M. paratuberculosis* 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Celem testu jest sekwencja insercyjna IS900, część sekwencji insercyjnych z rodziny IS1110. Powtórzono to od 14 do 18 razy w genomie MAP. Wszystkie testy przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producentów.

4. Wyniki

4.1 Gruźlica bydlęca u mundżaków chińskich (*Muntiacus reevesi*) w prywatnej hodowli zwierząt w Polsce – zarządzanie i konsekwencje prawne

Przeprowadzone badania anatomopatologiczne wykazały rozległe gruźlicze zmiany u obu osobników mundżaka chińskiego. Ziarniniaki z martwicą guzową i zmianami mineralizacyjnymi stwierdzono w płucach oraz w wątrobie, węzłach chłonnych, a także na powierzchni otrzewnej. Zmiany miały wielkość małych szaro-białych guzków wielkości od 3 do 5 mm.

Wyniki hodowli z materiału pobranego pośmiertnie były dodatnie, a na podstawie testu GenoType MTBC (opartego na polimorfizmie genu *gyrB*) wyizolowane szczepy sklasyfikowano jako *M. bovis*.

4.2 Problemy w stosowaniu prawa w zwalczaniu gruźlicy bydlęcej u żubrów (*Bison bonasus*) — zagrożenie dla efektywnej strategii reintrodukcji

W pracy zbadano trzy wybrane przypadki zakażenia BTB odnotowane u żubrów przed 21 kwietnia 2021 r. tj. przed wejściem w życie AHL [2]. Przypadki te podkreślają prawne i praktyczne problemy związane ze zwalczaniem BTB u gatunków chronionych.

4.2.1 Przypadek gruźlicy bydlęcej w Ośrodku Hodowli Żubrów w Smardzewicach (Kampinoski Park Narodowy)

Przeprowadzona analiza aktów normatywnych w ówczesnie obowiązującym stanie prawnym [4-10, 14, 15] oraz zbadanie dokumentów urzędowych wytworzonych przez właściwe organy w toku ich postępowań w przedmiotowej sprawie [16], pozwoliły na stwierdzenie, że:

W 2013 r. u 3 żubrów utrzymywanych w OHŻ w Smardzewicach stwierdzono typowe dla BTB pośmiertne zmiany anatomopatologiczne oraz obecność *M. caprae* potwierdzoną badaniami bakteriologicznymi. We wrześniu 2014 r., podczas kontrolnych badań przyżyciowych w kierunku gruźlicy, u dwóch osobników stwierdzono dodatni wynik zarówno śródskórnej próby tuberkulinowej, jak i testu Bovigam® (Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland). Wykazano, że w Polsce, jeśli zwierzęta znajdują się na terenie parku narodowego, należy uzyskać zgodę Ministerstwa Środowiska, a obecnie Ministerstwa

Klimatu i Środowiska, jeżeli jednak zlokalizowane są na innych terenach, zgodę musi wyrazić Generalny Dyrektor Ochrony Środowiska [6].

4.2.2 Przypadek gruźlicy bydlęcej związany z przeniesieniem żubrów z Ośrodka Hodowli w Smardzewicach do zagrody pokazowej w Nadleśnictwie Borki

Przeprowadzona analiza aktów normatywnych w ówczesnie obowiązującym stanie prawnym [4-10, 14-15] oraz zbadanie dokumentów urzędowych wytworzonych przez właściwe organy w toku ich postępowań w przedmiotowej sprawie [17-26], pozwoliły na stwierdzenie, że:

W 2013 r. u żubra przeniesionego z OHŻ w Smardzewicach do zagrody kwarantannowej w Wolisku na terenie Nadleśnictwa Borki (powiat Giżycko) nie wykazano oznak BTB w badaniu sekcyjnym, jednak próbki tkanek pobrano i przesłano do Państwowego Instytutu Badawczego Weterynarii w Puławach. Badaniem bakteriologicznym potwierdzono zakażenie u jednego żubra – wyizolowano *M. bovis*. [20, 21].

4.2.3 Przypadek gruźlicy bydlęcej w stadzie wolno żyjących żubrów w Puszczy Boreckiej

Przeprowadzona analiza aktów normatywnych w ówczesnie obowiązującym stanie prawnym [4-10, 14, 15] oraz zbadanie dokumentów urzędowych wytworzonych przez właściwe organy w toku ich postępowań w przedmiotowej sprawie [27-42], pozwoliły na stwierdzenie, że:

W 2016 r. w czasie okresowej kontroli stada wolno żyjących żubrów w Puszczy Boreckiej (powiat Giżycko) 2 osobniki wybrane do odstrzału redukcyjnego [31, 34]. Jednym z wyselekcjonowanych zwierząt był apatyczny byk ze zmianami chorobowymi w okolicy napletka (*posthitis*) [31, 32], który przybywał do miejsc żerowania jako ostatni. Innym z wyselekcjonowanych żubrów była osowiała i apatyczna krowa. Miała wyraźne problemy przy pobieraniu pokarmu, sylwetkę wychudzoną ze śladami zaniku mięśni [34, 35]. W czasie eliminacji [31, 32, 34, 35] pobrano próbki do badań laboratoryjnych w kierunku gruźlicy [38, 40].

W materiale tkankowym pozyskanym podczas eliminacji żubra - byka potwierdzono mikrobiologicznie obecność *M. bovis* [38], zaś w przypadku krowy uzyskano wynik ujemny

[40]. Konsekwencją zaistniałej sytuacji było zalecenie przez PLW w Giżycku wprowadzenia monitoringu gruźlicy zwierząt łownych gatunków bytujących na terenie Puszczy Boreckiej.

4.2.4 Analiza stanu prawnego

Przeprowadzona została analiza przepisów prawnych obowiązujących w przedmiotowych przypadkach – w porównaniu do aktualnego stanu prawnego. Badania te pozwoliły na stwierdzenie, że:

Przed wejściem w życie „Prawa o zdrowiu zwierząt” (AHL) [2] w dniu 21 kwietnia 2021 r., obowiązujące w Polsce przepisy w badanym zakresie obejmowały: ustawę o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt [4], rozporządzenie w sprawie zwalczania gruźlicy bydła [5] oraz ustawę o ochronie przyrody [6].

Przepisy dotyczące BTB [5] stanowiły uszczegółowienie ogólnych przepisów ustawy o ochronie zdrowia zwierząt i zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt [4].

Ten stan prawny dodatkowo komplikowało istnienie licznych norm w postaci różnych ustaw dotyczących ochrony przyrody i ochrony gatunkowej zwierząt - ustawa o ochronie przyrody [6] i rozporządzenie wykonawcze do niej [7] ochrony zdrowia zwierząt [4], obowiązków organów inspekcji weterynaryjnej [8], wykonywania zawodu lekarza weterynarii [9], a także ogólnych przepisów prawa dotyczących postępowania administracyjnego [10].

W analizowanych przypadkach szczególnie problematyczne było stosowanie obowiązującego prawa w odniesieniu do żubra jako chronionego gatunku dzikiego zwierzęcia.

Należy jednak zauważyć, że ochrona przyrody, w tym gatunków prawnie chronionych, jest formą ochrony odrębną od ochrony zwierząt i ochrony zdrowia zwierząt. Niemniej jednak, niesłuszne byłoby założenie, że należy je rozumieć oddzielnie. Jest to szczególnie uzasadnione w kontekście chorób podlegających urzędowej kontroli.

Konieczny był wieloaspektowy i teleologicznie ukierunkowany sposób podejścia do problemu interpretacji przepisów. Było to bardzo trudne zadanie dla każdego właściwego organu (PLW). Wobec braku ogólnokrajowego programu przyjętego przez Głównego Lekarza Weterynarii, właściwe organy rozpatrujące badane przypadki przyjęły taką formę interpretacji, zgodnie z którą dopuszczano jedynie zwalczanie choroby u zwierząt gospodarskich, a nie u żubrów. Według organów, z przeprowadzonej analizy przypadku

wynika, że przed kwietniem 2021 r. skuteczne zastosowanie środków prawnych byłoby możliwe jedynie po ustanowieniu przez Głównego Lekarza Weterynarii programu zwalczania gruźlicy u żubrów, określającego działania, jakie należało podjąć w celu zwalczania choroby.

Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi wydał rozporządzenie w sprawie zwalczania gruźlicy bydła [5], jednak jego treść dotycząca kontroli administracyjnej była niespójna. Pomimo tego, że w samej nazwie rozporządzenia mowa jest o „gruźlicy bydła”, a nie o „gruźlicy bydlęcej”, władze zrozumiały, że jej treść odnosi się wyłącznie do bydła udomowionego. Taka interpretacja, oparta na prostym rozumieniu językowym, ale bez uwzględnienia spójności prawa czy wartości teleologicznych, takich jak ochrona zdrowia publicznego, objawiała się w niestosowaniu norm prawnych do żubrów.

Proponowana jest inna droga interpretacyjna, mianowicie przyjmując, że „gruźlica bydła” to nazwa choroby, która podlegała (i podlega) obowiązkowemu zwalczaniu, wszelkie środki administracyjne mające na celu zagwarantowanie zwalczania tej choroby mogły dotyczyć również żubrów. Przepisy ustawy o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt, a także rozporządzenia w sprawie sposobów zwalczania gruźlicy zawierały informację o kompetencjach i uprawnieniach PLW w omawianym zakresie [4, 5]. Zasady te można było zastosować w przypadkach BTB u żubrów w sposób analogiczny jak w przypadku gruźlicy krów, *mutatis mutandis*, uwzględniając różnice w zakresie ochrony żubrów. Od 2021 r. zakażenie MTBC podlega obowiązkowej kontroli we wszystkich państwach członkowskich UE a każde państwo jest zobowiązane do przyjęcia obowiązkowych programów zwalczania, dopóki nie zostanie uznane za strefę wolną od choroby [2]. *Bison spp.*, w tym *B. bonasus*, jest również wymieniony jako podatny na zakażenie MTBC.

Jeżeli właściwy PLW podejrzewa lub oficjalnie potwierdza ognisko choroby, musi zastosować środki zwalczania określone w AHL odpowiednie dla dotkniętego obszaru [2, 11, 12]. W związku z tym PLW musi przestrzegać procedur prawa UE we wszystkich obiektach, w których wykryto gruźlicę, takich jak ogrody zoologiczne lub ośrodki hodowlane, w których żubry są trzymane pod kontrolą człowieka oraz u dzikich zwierząt, takich jak wolno żyjące żubry (np. w Bieszczadach).

Zgodnie z AHL ochrona gatunku zwierząt, jakim jest żubr, polega na wprowadzeniu przez właściwy organ zmodyfikowanych środków zwalczania choroby. Konieczność

zwalczania BTB oraz stosowane środki, metody i techniki jej zwalczania nie mogą stwarzać zagrożenia dla populacji żubrów. Z drugiej strony żadna przyjęta modyfikacja nie może utrudniać procedur przeprowadzanych w celu wyeliminowania choroby. Należy zauważyć, że istniejące prawo krajowe nie zostało derogowane, a jedynie uzupełnione i zmodyfikowane przez prawo unijne.

4.3 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* u bezobjawowych zwierząt roślinożernych w ogrodach zoologicznych w Polsce

Dodatknie wyniki stwierdzono w siedmiu próbkach. Niechromogenne, małe, okrągłe, kremowe kolonie rozwinęły się w ciągu czterech do sześciu miesięcy na podłożu HEYM z mykobaktyną. Analiza genetyczna potwierdziła *M. avium* w pięciu wyizolowanych szczepach. W jednym stwierdzono *M. fortuitum*. Jeden szczep nie był charakterystyczny dla gatunku *Mycobacterium*. RT-PCR był dodatni w przypadku dziewięciu zwierząt z czterech ogrodów zoologicznych. Szczegółowe dane dotyczące zwierząt przedstawiono w Tabelach nr 1 i 2.

Tabela 1. Zwierzęta z dodatnimi wynikami hodowli w kierunku *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Materiał stanowiły próbki kału.

Kod próbki	Gatunek	Wiek [lata]	Płeć	Kod Zoo	Analiza genetyczna
Z24	Bongo leśne <i>Tragelaphus eurycerus</i>	5	F	B	<i>Mycobacterium avium</i>
Z25	Bongo leśne <i>Tragelaphus eurycerus</i>	3	M	B	<i>Mycobacterium avium</i>
Z26	Bongo leśne <i>Tragelaphus eurycerus</i>	1	F	B	<i>Mycobacterium avium</i>
Z27	Bongo leśne <i>Tragelaphus eurycerus</i>	1	M	B	<i>Mycobacterium avium</i>
Z45	Kanczyl jawański <i>Tragulus javanicus</i>	5	M	G	<i>Mycobacterium avium</i>
Z106	Jeleń szlachetny (<i>Cervus elaphus</i>)	15	F	C	nie jest charakterystyczny dla żadnego gatunku <i>Mycobacterium</i>
Z194	Owca domowa (<i>Ovis aries</i>)	11	F	A	<i>Mycobacterium fortuitum</i>

Tabela 2. Zwierzęta dodatnie w RT-PCR w kierunku *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Materiał stanowiły próbki kału.

Kod próbki	Gatunek	Wiek [lata]	Płeć	Kod Zoo
Z17	Pudu południowe (<i>Pudu puda</i>)	2	F	B
Z24	Bongo leśne (<i>Tragelaphus eurycerus</i>)	5	F	B
Z25	Bongo leśne (<i>Tragelaphus eurycerus</i>)	3	M	B
Z46	Guanako (<i>Lama guanicoe</i>)	11	M	G
Z88	Żubr europejski (<i>Bison bonasus</i>)	próbka pulowana		D
Z113	Żyrafa (<i>Giraffa camelopardalis</i>)	11	M	A
Z164	Wielbłąd dwugarbny (<i>Camelus bactrianus</i>)	5	M	A
Z168	Alpaka (<i>Vicugna pacos</i>)	5	F	A
Z192	Koza domowa (<i>Capra hircus</i>)	6	F	A

5. Dyskusja

Występowanie BTB u zwierząt w ogrodach zoologicznych oraz w hodowlach typu „minizoo” to poważne zagrożenie zdrowia publicznego. Zwierzęta mogą być źródłem zakażenia dla odwiedzających, a przede wszystkim dla personelu obsługującego. Wymiana zwierząt między hodowlami bez uprzedniego wykonania badań w kierunku gruźlicy bydlęcej, tak jak w zbadanym przypadku choroby u mundżaków chińskich, może również umożliwiać łatwe przenoszenie prątków.

Nie ulega wątpliwości transgraniczny czy też nieznający granic państwowych, charakter problemów związanych z przenoszeniem BTB (Bielecki i in., 2014, Krajewska-Wędzina i in., 2020).

Istnieje wyraźna potrzeba zaostrzenia przepisów, szczególnie w zakresie obowiązku badań w kierunku BTB, co pozwoliłoby na unikanie sytuacji jak w zbadanych przypadkach.

Nie w pełni uregulowany jest status prawny hodowli typu „minizoo”. Brakuje procedur dotyczących ich rejestracji i generalnych zasad monitorowania chorób zakaźnych. Nie wszystkie zwierzęta przebywające na terenie „minizoo” podlegają obowiązkowej kontroli podczas przemieszczania. Ich obrót i transport nie podlegają tym samym przepisom jakie obowiązują dla ogrodów zoologicznych. Konsekwencją jest błędne diagnozowanie wielu przypadków BTB lub ich nie wykrywanie.

W Polsce odnotowano jeden przypadek leczenia BTB u samca żyrafy siatkowatej (*Giraffa camelopardalis*) w Śląskim Ogrodzie Zoologicznym (Krajewska-Wędzina i in., 2018). W prezentowanym przypadku BTB u mundżaków chińskich leczenie nie było brane pod uwagę. Terapia taka jest bardzo kontrowersyjna ze względu na ryzyko dla innych zwierząt i ludzi narażonych na kontakt z leczonym zwierzęciem.

AHL [2] zawiera przepisy dotyczące wszystkich zwierząt na terytoriach państw należących do Unii Europejskiej, w tym i Polski, niezależnie od tego, czy są one przeznaczone do produkcji hodowlanej, żyją w ogrodach zoologicznych czy są wykorzystywane w cyrkach. Polska, jak i inne kraje członkowskie Unii Europejskiej, była zobowiązana do wdrożenia AHL do 21 kwietnia 2021 r. Nie stwierdzono w tej mierze działań legislacyjnych przeprowadzonych na forum krajowym w wystarczającym zakresie ani w sposób należyty.

Wzmocnienie kontroli urzędowej BTB również w prywatnych hodowlach typu „minizoo” winno być brane pod uwagę przy interpretacji i stosowaniu przepisów AHL i aktów krajowych. Obecnie rozwiązaniem prawodawczym jest Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2018/1882 z dnia 3 grudnia 2018 roku w sprawie stosowania zasad zapobiegania chorobom i ich zwalczania. Rozporządzenie to zawiera kategorie chorób umieszczonych w wykazie i ustala wykaz gatunków stanowiących znaczne ryzyko dla rozprzestrzeniania zakażenia. Jego treść zmieniła kategoryzację i metody zwalczania gruźlicy [13].

Tabela 3. Kategoryzacja zakażenia kompleksem *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*) w zależności od gatunku

MTBC	Kategoria	Gatunek zwierzęcia
Zakażenie kompleksem <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i> , <i>M. tuberculosis</i>)	B+D+E	<i>Bison ssp.</i> , <i>Bos ssp.</i> , <i>Bubalus ssp.</i>
	D+E	Parzystokopytne inne niż <i>Bison ssp.</i> , <i>Bos ssp.</i> , <i>Bubalus ssp.</i>
	E	Ssaki (lądowe)

AHL klasyfikuje zakażenia MTBC jako choroby kategorii B, czyli jako niebezpieczne choroby bakteryjne tylko w przypadku gatunków takich jak: *Bison*, *Bos* i *Bubalus*. Schemat podziału obrazuje tabela 3. W związku z tym zakażenia te podlegają obowiązkowi kontroli we wszystkich państwach członkowskich, a każde państwo członkowskie powinno przyjąć obowiązkowe programy zwalczania, jeśli nie jest terytorium wolnym od choroby.

Mundzaki chińskie zaklasyfikowane są do tzw. innych przeżuwaczy. Zgodnie z rozporządzeniem 2018/1882 gruźlica u przeżuwaczy innych niż *Bison*, *Bos* i *Bubalus* została zaliczona do grup D i E, co oznacza, że należy zapobiegać rozprzestrzenianiu się choroby i powiadamiać o jej wystąpieniu, ale zwierzęta nie są objęte żadnym programem zwalczania [13].

AHL wprowadza bardziej uniwersalny, ale bardzo ogólny, podział wszystkich zwierząt na zwierzęta utrzymywane, czyli zwierzęta utrzymywane przez ludzi, w tym w prywatnej hodowli zwierząt, oraz zwierzęta dzikie, czyli takie, które nie są trzymane w niewoli. Wymienione przepisy nowego aktu prawnego mogą mieć szczególną wartość

w identyfikacji przypadków BTB oraz generalnie w przypadku chorób zakaźnych w prywatnych hodowlach zwierząt, w tym typu „minizoo”.

Art. 108 AHL nakłada na państwa członkowskie odpowiedzialność za ustanowienie systemu identyfikacji i rejestracji utrzymywanych zwierząt lądowych. Ponadto, art. 117 wymaga przestrzegania przepisów dotyczących indywidualnej lub grupowej identyfikacji, dokumentacji określonej dla identyfikacji i śledzenia zwierząt, stosownie do potrzeb danego gatunku. Z kolei art. 124 stanowi, że „podmioty wprowadzają odpowiednie środki zapobiegawcze w celu zapewnienia, aby przemieszczanie utrzymywanych zwierząt lądowych nie zagrażało statusowi zdrowotnemu w miejscu przeznaczenia”, a „operatorzy przemieszczają utrzymywane zwierzęta lądowe ze swoich zakładów i przyjmują je wyłącznie wtedy, gdy dane zwierzęta pochodzą z zakładów zarejestrowanych lub zatwierdzonych oraz spełniają wymagania w zakresie identyfikacji i rejestracji” [2].

Należy zauważyć, że kierownictwo hodowli prywatnej typu „minizoo”, w której wystąpił przypadek gruźlicy bydłej u mundżaków chińskich, postępowało odpowiedzialnie w odniesieniu do odzwierzęcego charakteru gruźlicy: wszystkie zwierzęta i pracownicy zostali przebadani, kojce zdezynfekowane, a właściciel w pełni współpracował z terenowym lekarzem weterynarii i ośrodkiem badawczym. Dobrą praktyką byłoby zobowiązanie odwiedzających do mycia i dezynfekcji rąk przy wejściu i wyjściu.

Przenoszenie gruźlicy ze zwierzęcia na człowieka i z człowieka na zwierzę (Olea-Popelka i in., 2017), w tym wśród zwierząt w ogrodach zoologicznych (Stephens i in., 2013), zostało szeroko opisane. Takie przenoszenie jest szczególnie niebezpieczne w „minizoo”, gdzie goście mogą wejść w bliski kontakt ze zwierzętami, pogłaskać je i nakarmić (Gong i in., 2017, Qadri i in., 2021).

Należy podkreślić, że mundżak chiński jest gatunkiem inwazyjnym w niektórych krajach o wysokim rozpowszechnieniu BTB (Delahay i in., 2007). Potwierdzenie BTB u kolejnych dwóch osobników oznacza, że gatunek ten powinien być dokładnie monitorowany pod kątem gruźlicy zarówno w ogrodach zoologicznych, jak i hodowlach typu „minizoo”.

Istotnym problemem są zagrożenia związane z handlem dzikimi zwierzętami trzymanymi w niewoli zarówno jako zwierzęta ozdobne, jak i hodowlane. Wwiezione do Europy lub przemieszczane bez ustalonych zasad kontroli mogą być źródłem różnych patogenów, które są niebezpieczne zarówno dla innych zwierząt, jak i dla ludzi. Do tej pory

nie istniały przepisy dotyczące monitorowania chorób zakaźnych i inwazyjnych u zwierząt wolno żyjących czy nieudomowionych utrzymywanych w niewoli. Patogeny pochodzące od dzikich zwierząt stanowią bezpośrednie zagrożenie dla osób odwiedzających prywatne hodowle.

Ustawodawstwo w dziedzinie zdrowia publicznego ma solidne podstawy naukowe zarówno na szczeblu unijnym, krajowym, jak i lokalnym. Istnieje jednak pilna potrzeba ustanowienia klarownych i niebudzących wątpliwości przepisów dotyczących monitorowania chorób zakaźnych i inwazyjnych występujących u zwierząt trzymanyh w obiektach dostępnych dla ludzi oraz uregulowania zasad przemieszczania i obiegu utrzymywanych dzikich zwierząt w UE.

Zmiany zachodzące w prawie unijnym dają szansę na wypracowanie krajowych programów zwalczania chorób zakaźnych, w tym gruźlicy oraz innych chorób będących następstwem zakażeń prątkami, między innymi niedocenianej z punktu widzenia zagrożenia zdrowia publicznego paratuberkulozy, będącej następstwem zakażenia MAP.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że bezobjawowe zakażenia MAP występują u zwierząt roślinożernych w polskich ogrodach zoologicznych. Tym niemniej, szczególnie u przeżuwaczy następstwem zakażenia może być stan zapalny przewodu pokarmowego (Roller i in., 2020b).

Zwierzęta zakażone bezobjawowo mogą być rezerwuarami MAP, a tym samym odgrywać rolę w przenoszeniu paratuberkulozy. Biorąc to pod uwagę, bardzo ważne jest odpowiednie sprawowanie nadzoru epidemiologicznego nad ogrodami zoologicznymi.

W ogrodach zoologicznych trudno jest pobrać próbki surowicy od dużej liczby zwierząt w celu monitorowania chorób metodami serologicznymi. Stosuje się więc nieinwazyjne sposoby pobierania materiału do badań. Materiałem do badań ukierunkowanych na wykrywanie zakażeń MAP jest wydalony kał zwierząt. Złotym standardem badania diagnostycznego w przypadku prątków jest posiew mikrobiologiczny. Chociaż czułość tej metody różni się w zależności od rodzaju próbki i zastosowanego podłoża, to jednak jest w 100% specyficzna (Whittington, 2020).

W niniejszych badaniach potwierdzono obecność *M. avium* u dwóch antylop bongo leśnego pochodzących z Zoo o kodzie „B”. Badania molekularne wykazały, że wyizolowany szczep to MAP. Jest to pierwszy potwierdzony przypadek zakażenia MAP u tego

gatunku. Wcześniej od pięciu wycieńczonych antylop bongo trzymanyh w niewoli wyizolowano inny prątek z kompleksu *Mycobacterium avium* (MAC) - *M. avium* spp. *hominissuis* (MAH) (Moravkova i in., 2013). MAH został również potwierdzony u antylopy sitatunga przebywającej w jednym z polskich ogrodów zoologicznych (Radulski i in., 2022).

Metodą RT-PCR potwierdzono zakażenie MAP u siedmiu innych gatunków: pudu (Salgado i in., 2015), guanako (Salgado i in., 2009, Corti i in., 2022) żubr (Girling i in., 2011) żyrafa (Stevenson i in., 2009) wielbłąd dwugarbny (Zavgorodniy i in., 2015) alpaka (Salgado i in., 2009, Fecteau i in., 2009) i koza domowa (Khol i in., 2006). W niniejszym badaniu więcej próbek pozytywnych potwierdzono za pomocą RT-PCR niż za pomocą posiewu mikrobiologicznego - dziewięć próbek potwierdzono molekularnie, ale tylko dwie w hodowli (Tabela 1 i 2). Jest to wynik podobny do odnotowanego w badaniach na wielbłądowatych (Salem, i in., 2019), w przeciwieństwie do wyników badań przeprowadzonymi w zoo w Meksyku (Hernández-Reyes i in., 2022). Różna czułość zastosowanych metod diagnostycznych może wynikać z przerywanego siewstwa lub małej liczby bakterii w próbce kału. Wiarygodne wykrywanie MAP u określonych osobników wymaga powtarzanego, regularnego pobierania próbek. Niniejsze badania miały na celu ocenę ogólnej sytuacji epidemiologicznej w polskich ogrodach zoologicznych i w związku z tym próbki pobrano tylko raz. Należy również podkreślić, że izolacja na podłożach mikrobiologicznych niektórych typów szczepów MAP jest bardzo trudna i mogły nie zostać wykryte (Juste i in., 1991). W trzech z pięciu próbek, z których wyizolowano szczepy *M. avium*, metodą RT-PCR nie potwierdzono ich przynależności do MAP. Konieczne są dalsze badania, aby potwierdzić, który podgatunek został wyizolowany. W związku z przypadkami gruźlicy u zwierząt w polskich ogrodach zoologicznych (Krajewska-Wędzina i in., 2018, Bruczyńska i in., 2022) należy zauważyć, że zwierzęta MAP-dodatnie mogą komplikować rozpoznanie tej choroby ze względu na reakcje krzyżowe (Osterstock i in., 2007, Raffo i in., 2020, Didkowska i in., 2021c). Wobec izolowania MAP od zwierząt nie wykazujących objawów klinicznych, ogrody zoologiczne powinny przeprowadzać badania kału od zwierząt wykazujących objawy mogące sugerować paratuberkulozę. Należy zauważyć, że objawy choroby mogą być różnorodne zarówno u przeżuwaczy, jak również u innych gatunków (Carta i in., 2013). Najczęstszym objawem klinicznym jest biegunka, prowadząca do wyniszczenia i stopniowego wychudzenia, bez wpływu na pobieranie paszy (Harris i in., 2001).

Wielokrotnie bezobjawowy charakter zakażenia sprawia (Carta i in., 2013), że kluczowym narzędziem zwalczania paratuberkulozy w ogrodach zoologicznych jest sekcja zwłok, chociaż nie u wszystkich gatunków rozwijają się poważne zmiany anatomopatologiczne (Manning i in., 2001). U małych przeżuwaczy, jeleni i wielbłądowatych potwierdzono wystąpienie zwapniałych zmian, przypominających zmiany gruźlicze (Stehman, 1996). W badaniu histopatologicznym paratuberkuloza objawia się histiocytarnym zapaleniem ziarniniakowym, pogrubieniem błony śluzowej oraz zanikiem kosmków i gruczołów jelitowych (Clarke, 1997). Kluczową kwestią dla właścicieli ogrodów zoologicznych jest podjęcie kroków prawnych w przypadku stwierdzenia paratuberkulozy w ogrodzie zoologicznym.

Od 21 kwietnia 2021 r., w związku z wejściem w życie AHL [2], uznaje się paratuberkulozę za chorobę kategorii E, wskazując, że wymaga nadzoru w UE z zastosowaniem zasad powiadamiania, raportowania i nadzoru.

Chociaż zoonotyczny potencjał MAP pozostaje niepewny (Waddell i in., 2015), niezbędne jest monitorowanie tej choroby w celu ochrony zdrowia publicznego. Jest to szczególnie ważne w ogrodach zoologicznych, które często mają wydzielone obszary, w których dzieci mogą głaskać zwierzęta i gdzie obserwuje się zachowania sprzyjające zakażeniom drogą doustną lub poprzez kał (Anderson i in., 2012).

Na podstawie rozmieszczenia badanych ogrodów zoologicznych zakłada się, że lokalizacja nie odgrywa istotnej roli w prawdopodobieństwie zakażenia. Skuteczne zwalczanie zakażeń MAP u zwierząt w ogrodach zoologicznych wymaga działań zapobiegawczych, z których najważniejszym jest wprowadzenie ścisłych zasad bioasekuracji. Ponadto osobniki o nieznanym statusie MAP należy zbadać przed wprowadzeniem do ogrodu zoologicznego. Niezbędne jest wdrożenie kompleksowych programów monitorowania zmian anatomopatologicznych i chorób (Marinkovich i in., 2016).

Dokonana analiza przypadków wykazała niezwykle istotną rolę uwarunkowań prawnych ochrony zdrowia zwierząt. W tym kontekście należy zauważyć, że ochrona przyrody, w tym ochrona gatunkowa zwierząt, realizowana przy tworzeniu prawa i stosowaniu jego przepisów, nie jest odrębna od ochrony zwierząt czy zdrowia zwierząt i nigdy nie powinna być tak postrzegana. Ma to podstawowe znaczenie w analizowaniu

problemów w stosowaniu prawa w zwalczaniu BTB u żubrów, które mogą zagrozić efektywnej strategii reintrodukcji tego gatunku.

Normy prawne obowiązujące w Polsce przed 2021 r. były niejednoznaczne, a ich wzajemne relacje niejasne. Interpretacja jednolitej, spójnej i poprawnej normy z tekstu ustaw była bardzo skomplikowana. Szczególnie problematyczne było stosowanie prawa stanowionego w odniesieniu do żubra jako chronionego gatunku dzikiego zwierzęcia.

Rozważając przeszkody prawne w zwalczaniu BTB u żubrów, należy podkreślić, że założycielami obecnej populacji żubrów jest zaledwie 12 zwierząt, które przeżyły w niewoli po wyginięciu gatunku na wolności na początku XX wieku. Silny efekt założyciela spowodował dramatyczną utratę różnorodności genetycznej. Na przykład, średni współczynnik chowu wsobnego oszacowany na podstawie zapisów rodowodowych wynosił 0,50 u osobników z linii nizinnej i około 0,30 u osobników nizinno-kaukaskich. Na poziomie genomu osobniki należące do populacji, która niedawno doświadczyła silnego wąskiego gardła, mają większe prawdopodobieństwo posiadania alleli identycznego pochodzenia (IBD), to znaczy odziedziczonych dwukrotnie po wspólnym przodku; mogą to być szkodliwe warianty, przyczyniające się do depresji wsobnej i zagrażające procesowi zdrowienia ze względu na niską odporność (Druet i in., 2020).

We wszystkich zbadanych przypadkach BTB u żubrów właściwe organy przyjęły formę wykładni prawnej, zgodnie z którą wolno im było zwalczać chorobę tylko u zwierząt gospodarskich, ale nie u żubrów.

Niniejsza analiza wskazuje, że problem nie dotyczył samej konstrukcji lub stosowania przepisów prawa, ale raczej ich błędnej interpretacji lub niewystarczającego stosowania.

Analizowane w niniejszym opracowaniu przypadki charakteryzowały się obfitością przepisów prawnych, co utrudniało zrozumienie jednej normy prawnej i postępowanie zgodnie z nią. Co więcej, niektóre przepisy zdawały się wykluczać, a wiele norm prawnych można było zrekonstruować jedynie przy użyciu zaawansowanych, złożonych metod wykładni funkcjonalno-celowej, wymagających specjalistycznej wiedzy prawniczej.

W przypadkach zbadanych w niniejszej pracy ten zagmatwany stan prawny skutkował niewłaściwą interpretacją przepisów prawa, a w konsekwencji ich niewłaściwym stosowaniem.

Jak wykazano powyżej, niejednoznaczność norm prawnych i przyjętej wykładni lub ich brak przed 2021 r. pozostawiły wiele istotnych problemów nieuregulowanych. Można wskazać na brak spójnych rozwiązań systemowych, którego skutkiem było, że groźną chorobę odzwierzęcą pozostawiono bez należytego nadzoru administracyjnego.

Alternatywna ścieżka interpretacyjna, opisana w niniejszym opracowaniu, jest przykładem tego, jak postępować z wybuchem epidemii w przypadku niepewności prawnej. Do przedstawionego powyżej wniosku można dojść poprzez interpretację funkcjonalno-teleologiczną, a także systemową, uwzględniającą cały porządek prawny. Niezbędne jest całościowe spojrzenie na problem i koncentracja na jego realnym, a nie fragmentarycznym rozwiązaniu.

Potrzebę ochrony zdrowia publicznego, zdrowie różnych gatunków zwierząt, w tym zagrożonych wyginięciem, należy uznać za wartość nadrzędną.

Po wejściu w życie przepisów AHL, zmieniło się prawo dotyczące zwalczania chorób zakaźnych, obecnie oparte na nadrzędnej regule „One Health – Jedno Zdrowie”. AHL nie tylko stanowi nową jakość w zakresie zwalczania chorób zakaźnych zwierząt, ale także tworzy nowe obowiązki prawne i wzmacnia istniejące.

Uzyskane wyniki wskazują na obowiązki i kompetencje organów inspekcji weterynaryjnej, wynikające z prawa unijnego i polskiego prawa krajowego. Przeprowadzona analiza prawna dowodzi, że PLW otrzymał niekwestionowaną kompetencję do działania we wszystkich zbadanych przypadkach BTB u żubrów i w związku z tym powinien teraz postępować zgodnie z AHL przy zwalczaniu tej choroby.

Stawia to pod znakiem zapytania, czy wspomniane przypadki kryzysowe (które miały miejsce przed 2021 rokiem, to znaczy w czasie obowiązywania wcześniejszych przepisów) były właściwie zarządzane. Nie jest jasne, czy podjęte środki zwalczania choroby były wystarczające, czy też ich zakres był zbyt wąski. Aby stwierdzić, czy organ weterynaryjny jako organ administracji państwowej podjął adekwatne, skuteczne i prawidłowe pod względem prawnym działania, konieczne jest zbadanie sytuacji w szerszym kontekście. Taka analiza wymaga również prawidłowej interpretacji ówczesnych przepisów prawnych, które były skomplikowane i niejasne oraz mogły być błędnie interpretowane przez właściwe organy. Nie usprawiedliwia to jednak stosowania epizootycznie nieadekwatnych metod zwalczania BTB u żubrów.

Mimo, że żubr jest gatunkiem ściśle chronionym [6, 7, 14], wykrycie epizootii BTB wymaga wyeliminowania całego stada. Oprócz zapewnienia ochrony zdrowia publicznego takie środki służą również ochronie gatunku jako całości. Stwierdzenie to jest zgodne z okolicznościami uzasadniającymi odstępstwo od zakazu zabijania żubrów, określonymi w katalogu art. 56 ust. 4 ustawy o ochronie przyrody [6]. Takimi okolicznościami są brak alternatywnych rozwiązań, brak zagrożenia dla kondycji dzikiej populacji żubrów, zgoda z najlepszym interesem chronionych gatunków oraz z interesem zdrowia publicznego.

Powyższe okoliczności zostały w wystarczającym stopniu uwzględnione w przypadku BTB, które wystąpiło w Nadleśnictwie Borki w 2016 roku, co skutkowało szybką likwidacją ogniska chorobowego. Wydana w tej sprawie decyzja Generalnego Dyrektora Ochrony Środowiska była typowym przykładem derogacji [6]. Pozostawienie zakażonych zwierząt, zamiast ich odstrzeliwania, stwarza ryzyko przeniesienia choroby na ludzi, a także na wolno żyjące żubry i inne dzikie lub udomowione zwierzęta.

Przypadek BTB wykryty w OHŻ Smardzewice w 2013 roku (Krajewska i in., 2016) jest przykładem niewłaściwego stosowania norm prawnych: decyzja o zwalczaniu choroby i eliminowaniu zwierząt w sposób stopniowy, zamiast eliminacji całego stada w ramach jednej operacji, okazała się porażką.

Należy podkreślić, że AHL [2, 12] wyraźnie wskazuje, że zwierzęta z podejrzeniem zakażenia mogą wymagać odstrzelenia razem z tymi, u których zakażenie zostało potwierdzone. W przypadku, o którym mowa powyżej, PLW powinien był rozważyć szeroki wachlarz innych dostępnych instrumentów zwalczania choroby oprócz radykalnego wyeliminowania ogniska choroby, to znaczy zabicia wszystkich zwierząt reprezentujących gatunki podatne, aby zapewnić bezpieczeństwo epidemiologiczne [4]. Przy wyborze takich instrumentów priorytetem powinny być te, które najlepiej ograniczają lub eliminują ryzyko dla zdrowia publicznego oraz rozprzestrzenianie się zakażenia wśród zwierząt gospodarskich i innych podatnych dzikich zwierząt. Rodzaj stosowanych środków zwalczania BTB oraz ich zakres są dość ogólnie wymienione w przepisach UE, a konkretny sposób ich zastosowania zależy od decyzji PLW prowadzącego postępowanie [2, 4, 11, 12]. W omawianych przepisach użyto nieokreślonych sformułowań, które dają PLW swobodę stosowania pewnych środków, które w każdym konkretnym przypadku są uważane za właściwe w zależności od okoliczności. Środki, o których mowa zarówno w prawodawstwie unijnym, jak i krajowym, podlegają obecnie kryterium proporcjonalności,

zgodnie z którym muszą być odpowiednie i proporcjonalne do ryzyka stwarzanego przez BTB w danym przypadku [2, 11]

Wadą rozwiązań przyjętych w sprawie stada ze Smardzewic był wydłużony czas między wykryciem zakażenia, a podjęciem działań, czyli opóźnione działanie. Aktualnie, aby potwierdzić obecność choroby w jej najwcześniejszych stadiach, AHL wymaga, by wszystkie podejrzane zwierzęta przeszły badanie kliniczne i laboratoryjne. Stanowi to podstawowy element dochodzenia epidemiologicznego w przypadku BTB u żubrów. Jednak we wszystkich badanych przypadkach okazało się, że plan działania był nieprawidłowy, a zakażenie BTB potwierdzono zbyt późno.

Należy podkreślić, że zwalczanie chorób zakaźnych u zwierząt to coś więcej niż tylko wykrywanie i zgłaszanie zakażeń, zapobieganie i kontrola ich rozprzestrzeniania się oraz ich ostateczne zwalczanie. Powinno ono również obejmować działania i środki zapobiegawcze. W opisanych przypadkach wątpliwe jest, aby ta potrzeba została zaspokojona: do smardzewickiego stada dołączono samicę żubra z ogrodu zoologicznego, w którym wcześniej potwierdzono BTB u zwierząt. Samica przed przemieszczeniem nie została przebadana w kierunku BTB. Jest bardzo prawdopodobne, że ta krowa mogła być źródłem zakażenia dla smardzewickiego stada (Krajewska i in., 2016). Zasadne jest zatem stwierdzenie, że niezadowalający stan przepisów prawnych dotyczących przemieszczania dzikich zwierząt był kluczowym czynnikiem rozprzestrzeniania się BTB. Zostało to zmienione przez samych hodowców, którzy wdrożyli zasadę jako dobrą praktykę i wszystkie zwierzęta przekazywane w kraju są sprawdzane. Dlatego bardzo ważne jest stwierdzenie, że nowe przepisy europejskie dotyczą dzikich zwierząt w zakresie bezpieczeństwa epidemicznego, nadzoru i bioasekuracji [2, 12].

Przypadek ogniska w Puszczy Boreckiej w 2016 r. pokazuje, jak ważny jest nadzór weterynaryjny i monitorowanie BTB u zwierząt nieudomowionych. Przypadek ten wykryto podczas corocznej oceny i przeglądu stada żubrów w Puszczy Boreckiej, przeprowadzanego zgodnie z zapisami „Strategii ochrony żubra *Bison bonasus* w Polsce” [15]. Analiza potwierdza, że taki monitoring jest zgodny z niezbędnym nadzorem określonym przez AHL.

Podstawowe zasady zwalczania chorób zakaźnych nie zostały jednak odpowiednio wdrożone w przypadku BTB u żubrów w OHŻ Smardzewice w 2013 roku. Wynikało to z wielu czynników, w tym błędnej interpretacji odpowiednich przepisów prawnych, które same w sobie były niejasne, ponadto właściwe organy lub podmioty odpowiedzialne nie

miały dostępu do narzędzi, środków finansowych i środków przymusu niezbędnych do zapobiegania zakażeniu i rozprzestrzenianiu się choroby.

6. Wnioski

1. Analiza przypadku gruźlicy bydlęcej (BTB) u mundżaków chińskich (*Muntiacus reevesi*) w prywatnej hodowli typu „minizoo” z możliwym bliskim kontaktem zwierząt z odwiedzającymi, wskazuje na potrzebę precyzyjnego określenia obowiązków prawnych właścicieli takich przedsiębiorstw w zakresie ochrony zdrowia publicznego, z uwzględnieniem wymagań odnośnie obowiązku posiadania dokumentacji informującej o pochodzeniu zwierząt, wynikach ich badań w kierunku chorób zakaźnych i inwazyjnych, w tym przede wszystkim o potencjale zoonotycznym, jak również o środkach ochrony indywidualnej z podziałem na przeznaczone dla pracowników oraz odwiedzających. Powyższe obowiązki prawne powinny być określone zgodnie z wymaganiami AHL opartego na koncepcji „One Health – Jedno Zdrowie”.
2. Zwalczanie gruźlicy bydlęcej u żubrów nie było wystarczająco jasno uregulowane prawnie przed wprowadzeniem AHL w 2021 r. Według obecnego stanu prawnego Powiatowy Lekarz Weterynarii posiada kompetencje w zakresie zapobiegania i zwalczania BTB u żubrów, co ułatwi zarówno efektywne realizowanie strategii ochrony i reintrodukcji gatunku, jak i z uwzględnieniem koncepcji „One Health – Jedno Zdrowie” zapobieganie przenoszeniu choroby na inne gatunki wolno żyjące oraz zwierzęta gospodarskie produkujące żywność.
3. U zwierząt roślinożernych w polskich ogrodach zoologicznych występują potwierdzone wynikami posiewów bakteriologicznych bezobjawowe zakażenia *Mycobacterium avium* susp. *paratuberculosis*, patogenem potencjalnie groźnym również dla odwiedzających. Wskazuje to na potrzebę uwzględnienia paratuberkulozy w monitoringu serologicznym chorób zakaźnych i inwazyjnych w ogrodach zoologicznych, szczególnie u zwierząt wykazujących objawy kliniczne typowe dla tej choroby. Zapobieganie chorobom, zgodnie z wymaganiami AHL w przypadku wymiany i handlu zwierzętami powinno obejmować między innymi działania zapobiegające przeniesieniu paratuberkulozy.

7. Bibliografia

7.1 Literatura

1. Agrawal G., Aitken J., Hamblin H., Collins M., Borody T. J., 2021. Putting Crohn's on the MAP: Five Common Questions on the Contribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* to the Pathophysiology of Crohn's Disease. Dig. Dis. Sci., 66, 348.
2. Akkerman O. W., van der Werf T. S., Rietkerk F., Eger T., van Soolingen D., van der Loo K., van der Zanden A. G. M., 2020. Retraction Note: Infection of great apes and a zoo keeper with the same *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype. Med Microbiol Immunol., 209, 705.
3. Anderson M. E., Weese, J. S., 2012. Video observation of hand hygiene practices at a petting zoo and the impact of hand hygiene interventions. Epidemiol. Infect., 140, 182.
4. Augustynowicz - Kopeć E., Krajewska M., Zabost A., Napiórkowska A., Zwolska, Z., 2011. Characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from farm and wild animals from Poland. Bull Vet Inst Puławy, 55, 381.
5. Barrero-Dominguez B., Luque I., Huerta B., Gomez-Laguna J., Galán-Relaño Á., Gómez-Gascón L., Sánchez M., Astorga R. J., 2019. Paratuberculosis in dairy goat flocks from Southern Spain: Risk factors associated with seroprevalence. Vet. Rec., 185, 600.
6. Bielecki W., Amarowicz J., Hławiczka M., Kaczor S., Krzysiak M., Kuberka K., Lizoń R., Matuszewska M., Olszewski B., Osińska B., Rzewuska M., Strzałkowski S., 2014. Monitorowanie stanu zdrowia populacji żubrów jako element ochrony gatunkowej. European Bison Conservation Newsletter, 7, 43.
7. Bruczyńska M., Didkowska A., Michalski M., Brzezińska S., Augustynowicz-Kopeć E., Anusz K., 2022. Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland—Management and legal implications. Ann. Agric. Environ. Med., 29, 365.
8. Bryant B., Blyde D., Eamens G., Whittington R., 2012. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from the feces of a Southern black

- rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) with diarrhea and weight loss. J. Zoo Wildl. Med., 43, 391.
9. Carta T., Alvarez J., Perez de la Lastra J. M., Gortazar C., 2013. Wildlife and paratuberculosis: A review. Res. Vet. Sci., 94, 191.
 10. Clarke C. J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J. Comp Pathol., 116, 217.
 11. Collins M. T., Oosterhuis J. E., 1993. Diagnosis and control of paratuberculosis in exotic hoofed stock. Proc. Am. Assoc. Zoo Vet., 386.
 12. Corn J. L., Manning E. J., Sreevatsan S., Fischer J. R., 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. Appl. Environ. Microbiol., 71, 6963.
 13. Corti P., Collado B., Salgado M., Moraga C. A. Radic-Schilling S., Tejeda C., Ruiz-Aravena M., 2022. Dynamic of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in a domestic-wildlife interface: Domestic sheep and guanaco as reservoir community. Transbound. Emerg. Dis., 69, e161.
 14. Delahay R. J., Smith G. C., Barlow A. M., Walker N., Harris A., Clifton-Hadley R. S., Cheeseman C. L., 2007. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. Vet J., 173, 287.
 15. Didkowska A., Krajewska-Wędzina M., Orłowska B., Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Anusz K., 2021b. Molecular Characterization of *Mycobacterium spp.* Isolated from Cattle and Wildlife in Poland. In: Molecular Epidemiology Study of Mycobacterium Tuberculosis Complex, IntechOpen, London, UK.
 16. Didkowska A., Krajewska-Wędzina M., Bielecki W., Brzezińska S., Augustynowicz-Kopeć E., Olech, W., Anusz K., Sridhara A. A., Johnathan-Lee A., Elahi R., Miller M. A., Ray Waters W., Lyashchenko K. P., 2021a. Antibody responses in European bison (*Bison bonasus*) naturally infected with *Mycobacterium caprae*. Vet. Microbiol., 253, 108952.

17. Didkowska A., Krajewska-Wędzina M., Klich D., Prolejko K., Orłowska B., Anusz K., 2021c. The Risk of False-Positive Serological Results for Paratuberculosis in *Mycobacterium bovis* - Infected Cattle. *Pathogens.*, 10, 1054.
18. Druet T., Oleński K., Flori L., Bertrand A. R., Olech W., Tokarska M., Kamiński S., Gautier M., 2020. Genomic Footprints of Recovery in the European bison. *J. Hered.*, 111, 194.
19. Dukes T. W., Glover G. J., Brooks B. W., Duncan J. R., Swendrowski M., 1992. Paratuberculosis in saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep. *J. Wildl. Dis.*, 28, 161.
20. Fecteau M. E., Ross, J., Tennent-Brown B. S., Habecker P. L., Sreevatsan S., Sweeney R. W., Whitlock R. H., 2009. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* high shedding in an adult female alpaca, and its implications for the rest of the herd. *J. Vet. Intern. Med.*, 6, 1311.
21. Girling S., Pizzi R., Harley J., Richardson D., Philbey A., 2011. Diagnosis and management of an outbreak of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a wildlife park in Scotland. In Proceedings of the International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals/Annual Conference of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Lisbon, Portugal, 1–4 June 2011.
22. Gong W., Yang Y., Luo Y., Li N., Bai X., Liu Y., Zhang J., Chen M., Zhang C., Wu X., 2017. An alert of *Mycobacterium tuberculosis* infection of rhesus macaques in a wild zoo in China. *Exp Anim.*, 66, 357.
23. Harris N. B., Barletta R. G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 489.
24. Hernández - Reyes A. L., Chávez - Gris G., Maldonado - Castro E., Alcaraz - Sosa L. E., Díaz - Negrete M. T., 2022. First identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild ruminants in a zoo in Mexico. *Vet. World.*, 15, 655.
25. Jorge M. C., Traversa M. J., Schettino D. M., Giordano A., Etchechoury I., Sanz H., Romero C., Grand, H., Paolicchi F., Romano M.I., 2008. *Lama glama* con

- signología y lesiones compatibles con paratuberculosis causadas por *Mycobacterium avium* subespecie *avium*. InVet , 10, 59.
26. Juste R. A., Marco J. C., Saez de Ocariz C., Aduriz J. J., 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. Vet. Microbiol., 28, 385.
 27. Kaczmarkowska A., Didkowska, A., Brzezińska S., Klich D., Kwiecień E., Dolka I., Kociuba P., Rzewuska M., Augustynowicz - Kopec E., Anusz K., 2022. Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*? PLoS ONE, 17, e0269912.
 28. Khol J. L., Stein B., Dreier S., Baumgartner W., 2006. Paratuberculosis (Johne's disease) in small ruminants in Austria. Slov. Vet. Res., 43, 129.
 29. Kozińska M., Zwolska Z., Augustynowicz - Kopec E. 2011. Transmission of drug-resistant TB among family members. Post N Med., 10, 824.
 30. Krajewska M., Weiner M., Augustynowicz - Kopec E., 2017. Animal tuberculosis as a potential danger to men. Health Problems of Civilization., 11, 10.
 31. Krajewska M., Załuski M., Zabost A., Orłowska B., Augustynowicz-Kopec E., Anusz K., Lipiec M., Weiner M., Szulowski K., 2015a. Tuberculosis in Antelopes in a Zoo in Poland - Problem of Public Health. Pol J Microbiol., 64, 395.
 32. Krajewska M., Lipiec M., Zabost A., Augustynowicz - Kopec E., Szulowski, K. 2014. Bovine tuberculosis in a wild boar (*Sus scrofa*) in Poland. J. Wildl. Dis., 50, 1001.
 33. Krajewska M., Orłowska B., Anusz K., Welz M., Bielecki W., Wojciechowska M., Lipiec M., Szulowski K., 2016. Gruźlica bydłęca w hodowli żubrów w Smardzewicach. Życie Wet. 91, 50.
 34. Krajewska - Wędzina M., Didkowska A., Sridhara A. A., Elahi R., Johnathan-Lee A., Radulski Ł., Lipiec M., Anusz K., Lyashchenko K. P., Miller M. A., Waters W. R. 2020. Transboundary tuberculosis: Importation of alpacas infected with *Mycobacterium bovis* from the United Kingdom to Poland and potential for serodiagnostic assays in detecting tuberculin skin test false-negative animals. Transbound Emerg Dis., 67, 1306.

35. Krajewska - Wędzina M., Augustynowicz - Kopeć E., Weiner M., Szulowski K. 2018. Treatment for active tuberculosis in giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in a Zoo and potential consequences for public health - Case report. *Ann Agric Environ Med.*, 25, 593.
36. Larsen A. B., Stalheim O. H., Hughes D. E., Appell L. H., Richards W. D., Himes E. M., 1981. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 179, 169.
37. Lewerin S. S., Olsson S. L., Eld K., Röken B., Ghebremichael S., Koivula T., Källenius G., Bölske G. 2005. Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* infection among captive Asian elephants in a Swedish zoo. *Vet Rec.*, 156, 171.
38. Lipiec M., Radulski Ł., Szulowski K., 2019. A case of bovine tuberculosis in pigs in Poland-a country free from the disease. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 26, 29.
39. Malama S., Johansen T. B., Muma J. B., Munyeme M., Mbulo G., Muwonge A., Djønne B., Godfroid J., 2014. Characterization of *Mycobacterium bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. *Vet Med Int.*, 187842.
40. Manning E. J., Collins M. T., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, 20, 133.
41. Marinkovich M., Wallace C., Morris P. J., Rideout B., Pye G. W., 2016. Lessons from a retrospective analysis of a 5-yr period of preshipment testing at San Diego Zoo: A risk-based approach to preshipment testing may benefit animal welfare. *J. Zoo Wildl. Med.*, 47, 297.
42. Moghadam M., Ghaemi, E. A., Akbari, H., Razavi Nikoo H., Zamani S., 2022. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Hashimoto's thyroiditis: Is MAP the trigger? *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 12, 972929.
43. Montali R. J., Mikota S. K., Cheng L. I. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev Sci Tech.*, 20, 291.
44. Moravkova M., Mrlik V., Parmova I., Kriz P., Pavlik I., 2013. High incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infection in a zoo population of bongo antelopes (*Tragelaphus eurycerus*). *J. Vet. Diagn. Investig.*, 25, 531–534.

45. Müller B., Dürr S., Alonso S., Hattendorf J., Laise C. J., Parsons S. D., van Helden P. D., Zinsstag J., 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis.*, 19, 899.
46. Münster P., Völkel I., Wemheuer W., Schwarz D., Döring S., Czerny C. P., 2013a. A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS 900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Transbound. Emerg. Dis.*, 60, 175.
47. Münster P., Völkel I., von Buchholz A., Czerny C. P., 2013b. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by IS 900-based PCR assays from an alpaca (*Vicugna pacos*) kept in a German zoological garden. *J. Zoo Wildl. Med.*, 44, 176.
48. Naylor A. D., Richardson D., Sellar M., Harley J., Philbey A. W., Girling S. J., 2018. Clinical signs, antemortem diagnostics, and pathological findings associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Mishmi takin (*Budorcas taxicolor taxicolor*). *J. Zoo Wildl. Med.*, 49, 412.
49. Olea - Popelka F., Muwonge A., Perera A., Dean A. S., Mumford E., Erlacher-Vindel E., Forcella S., Silk B. J., Ditiu L., El Idrissi A., Raviglione M., Cosivi O., LoBue P., Fujiwara P. I., 2017. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* - a call for action. *Lancet Infect Dis.*, 17, e21.
50. Orłowska B., Augustynowicz - Kopeć E., Krajewska M., Zabost A., Welz M., Kaczor S., Anusz K., 2017. *Mycobacterium caprae* transmission to free-living grey wolves (*Canis lupus*) in the Bieszczady mountains in southern Poland. *Eur. J. Wildl. Res.*, 63, 21.
51. Osterstock J. B., Fosgate G. T., Norby B., Manning E. J., Collins M. T., Roussel A. J., 2007. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 230, 896.
52. Parsons S. D., Drewe J. A., Gey van Pittius N. C., Warren R. M., van Helden P. D., 2013. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis.*, 19, 2004.

53. Pavlik I., Machackova M., Yayo Ayele W., Lamka J., Parmova I., Melicharek I. Hanzlikova M., Körmeny B., Nagy G., Cvetnic Z., Ocepek M., Lipiec M., 2002. Incidence of bovine tuberculosis in wild and domestic animals other than cattle in six Central European countries during 1990-1999. *Vet Med-Czech.*, 5, 122.
54. Perzanowski K., Bleyhl B., Olech W., Kuemmerle T., 2019. Connectivity or isolation? Identifying reintroduction sites for multiple conservation objectives for wisents in Poland. *Anim. Conserv.*, 23, 212.
55. Pigoli C., Garbarino C., Ricchi M., Bonacina E., Gibelli L., Grieco V., Scaltriti E. Roccabianca, P., Sironi, G., Russo S., Pongolini S., Arrigoni N., 2020. Paratuberculosis in Captive Scimitar - Horned Oryxes (*Oryx dammah*). *Animals.*, 10, 1949.
56. Quadri N. S., Brihn A., Shah J. A., Kirsch J. D., 2021. Bovine Tuberculosis: A Reemerging Zoonotic Infection. *J Agromedicine.*, 26, 334.
57. Radulski Ł., Kalicki M., Krajewska - Wędzina M., Lipiec M., Szulowski K., 2022. Pulmonary mycobacteriosis of sitatunga antelope caused by *M. avium* ssp. *hominissuis*. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 29, 220.
58. Radulski Ł., Lipiec M., Krajewska - Wędzina M., 2019. Gruźlica bydłęca u zwierząt dzikich oraz wolno żyjących – badania laboratoryjne 2008–2018. *Życie Wet.*, 94, 51.
59. Raffo E., Steuer P., Tomckowiack C., Tejeda C., Collado B., Salgado M., 2020. More insights about the interfering effect of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection on *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) detection in dairy cattle. *Trop Anim. Health Prod.*, 52, 1479.
60. Rodriguez - Campos S., Smith N. H., Boniotti M. B., Aranaz A., 2014. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis complex* organisms: implication for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.*, 97, S5.
61. Roller M., Hansen S., Böhlken-Fascher S., Knauf-Witzens, T., Czerny C. P., Goethe R., Abd El Wahed A., 2020a. Molecular and Serological Footprints of *Mycobacterium avium* Subspecies Infections in Zoo Animals. *Vet. Sci.*, 7, 117.
62. Roller M., Hansen S., Knauf-Witzens T., Oelemann W., Czerny C. P., Abd El Wahed A., Goethe R., 2020b. *Mycobacterium avium* Subspecies

- paratuberculosis* Infection in Zoo Animals: A Review of Susceptibility and Disease Process. Front. Vet. Sci., 7, 572724
63. Salem M. A., El-Deeb W. M., Zaghawa A. A., Housawi F. M., Alluwaimi A. M., 2019. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Arabian dromedary, camels (*Camelus dromedarius*). Vet. World., 12, 218.
 64. Salgado M., Aleuy O.A., Sevilla I.A., Troncoso E., 2015. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a cattle/pudu interface. Arq. Bras. Med. Veterinária Zootec., 67, 1205.
 65. Salgado M., Herthnek D., Bölske G., Leiva S., Kruze J., 2009. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from wild guanacos (*Lama guanicoe*) on Tierra del Fuego Island. J. Wildl. Dis., 45, 295.
 66. Sanou A., Tarnagda Z., Kanyala E., Zingué D., Nouctara M., Ganamé Z., Combary A., Hien H., Dembele M., Kabore A., Meda N., Van de Perre P., Neveu D., Bañuls A.L., Godreuil S., 2014. *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates. PLoS Negl Trop Dis., 8, e3142.
 67. Stehman S. M. 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer and South American camelids. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract., 12, 441.
 68. Stephens N., Vogelnest L., Lowbridge C., Christensen A., Marks G. B., Sintchenko V., McAnulty J., 2013. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from an Asian elephant (*Elephas maximus*) to a chimpanzee (*Pan troglodytes*) and humans in an Australian zoo. Epidemiol Infect., 141, 1488.
 69. Stevenson K., Alvarez J., Bakker D., Biet F., De Juan L., Denham S., Dimareli Z., Dohmann K., Gerlach G. F., Heron I., Kopečna M., May L., Pavlik I., Sharp J. M., Thibault V. C., Willemsen P., Zadoks R. N., Greig A., 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. BMC Microbiol. 9, 212.
 70. Sweeney R. W., Whitlock, R. H., Rosenberger A. E., 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. Am. J. Vet. Res., 53, 477.

71. Szteyn J., Liedtke K., Wiszniewska-Łaszczych A., Wysok B., Wojtacka J., 2020. Isolation and molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from faeces of dairy cows. *Pol. J. Vet. Sci.*, 23, 415.
72. Thoen C., Lobue P., de Kantor I., 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol.*, 112, 339.
73. Vansnick E., Vercammen F., Bauwens L., D'Haese E., Nelis H., Geysen D., 2005. A survey for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the royal zoological society of Antwerp. *Vet. J.*, 170, 249.
74. Waddell L. A., Rajic A., Stärk K. D. C., McEwen S. A. 2015. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: A systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol. Infect.*, 143, 3135.
75. Whittington R., 2020. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*; Behr M. A., Stevenson K., Kapur V., Eds., CABI International: Wallingford, UK., 266.
76. Whittington R. J. Windsor, P. A., 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.*, 179, 60.
77. Zavgorodniy A. I., Pozmogova S. A., Girka M. A., Goncharova N. V., 2015. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from zoo animals. *J. Vet. Med. Biotech. Bios.*, 1, 17.
78. Zlot A., Vines J., Nystrom L., Lane L., Behm H., Denny J., Finnegan M., Hostetler, T., Matthews G., Storms T., DeBess E., 2016. Diagnosis of Tuberculosis in Three Zoo Elephants and a Human Contact - Oregon 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, 64, 1398.

7.2 Wykaz aktów prawnych i dokumentów urzędowych

1. Decyzja Komisji 2009/342/WE z dnia 23 kwietnia 2009 r. zmieniająca decyzję 2003/467/WE w odniesieniu do uznania niektórych regionów administracyjnych Włoch za oficjalnie wolne od gruźlicy bydła, brucelozы bydła i enzoootycznej białaczki bydła, uznania niektórych regionów administracyjnych Polski za oficjalnie wolne od enzoootycznej białaczki bydła oraz uznania Polski i Słowenii za państwa członkowskie oficjalnie wolne od gruźlicy bydła (notyfikowana jako dokument nr C(2009) 2972 EC OJ L 104/51 z 24 kwietnia 2009. pp. 51–56).
2. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/429 z dnia 9 marca 2016 r. w sprawie przenośnych chorób zwierząt oraz zmieniające i uchylające niektóre akty w dziedzinie zdrowia zwierząt („Prawo o zdrowiu zwierząt”) (EU OJ L 084 z 31 marca 2016. p. 1).
3. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 4 lipca 2017 r. w sprawie sposobu prowadzenia dokumentacji związanej ze zwalczaniem chorób zakaźnych zwierząt (Dz.U. z 2017 r. poz. 1388).
4. Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt, (tj.; Dz. U. z 2020 r. poz. 1421, z 2022 r. poz. 1570).
5. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 listopada 2004 r. w sprawie zwalczania gruźlicy bydła, (Dz.U. 2004 Nr 258, poz. 2585).
6. Ustawa z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody, (tj.; Dz. U. z 2022 r. poz. 916, 1726, 2185, 2375).
7. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 16 grudnia 2016 r. w sprawie ochrony gatunkowej zwierząt, (Dz. U. z 2016 r. Nr 2016, poz. 2183).
8. Ustawa z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej, (tj Dz. U. z 2021 r. poz. 306, z 2022 r. poz. 974, 1570)
9. Ustawa z dnia 21 grudnia 1990 r. o zawodzie lekarza weterynarii oraz izbach lekarsko-weterynaryjnych, (tj.; Dz. U. z 2023 r. poz. 154)

10. Ustawa z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego, (tj.; Dz. U. z 2022 r. poz. 2000, 2185)
11. Rozporządzenie delegowane Komisji (UE) 2020/687 z dnia 17 grudnia 2019 r. uzupełniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/429 w odniesieniu do przepisów dotyczących zapobiegania niektórym chorobom umieszczonym w wykazie i ich zwalczania, (Dz.U. UE L 174 z 3 czerwca 2020 r. s. 64–139).
12. Rozporządzenie delegowane Komisji (UE) 2020/689 z dnia 17 grudnia 2019 r. uzupełniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/429 w odniesieniu do zasad nadzoru, programów zwalczania i statusu obszaru wolnego od choroby dla niektórych chorób umieszczonych w wykazie i nowo pojawiających się chorób, (Dz.U. UE L 174 z 3 czerwca 2020 r.; s. 211–340).
13. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2018/1882 z dnia 3 grudnia 2018 r. w sprawie stosowania niektórych przepisów dotyczących zapobiegania chorobom oraz ich zwalczania do kategorii chorób umieszczonych w wykazie oraz ustanawiające wykaz gatunków i grup gatunków, z którymi wiąże się znaczne ryzyko rozprzestrzeniania się chorób umieszczonych w tym wykazie, (EU OJ L 308 z 4 grudnia 2018. pp. 21–29).
14. Dyrektywa Rady 92/43/EEG z dnia 21 maja 1992 r. w sprawie ochrony siedlisk przyrodniczych oraz dzikiej fauny i flory, (EEG Dz.U. L 206 z 22.07.1992, s. 7–50).
15. Strategia ochrony żubra (*Bison bonasus*) w Polsce, 2007 r.
16. Decyzja Ministra Środowiska nr. DLP-III-4102-121/111622/14/ZK z dnia 24 marca 2014 r.
17. Wniosek Nadleśnictwa Borki z dnia 5 kwietnia 2013 roku ZŁ-7554-13/13
18. Decyzja Generalnego Dyrektora Ochrony Środowiska Nr. DOP-OZ.6401.06.8.2013.bp z dnia 7 sierpnia 2013 roku
19. Protokół sekcji eliminowanych osobników z dnia 17 września 2013 roku

20. Sprawozdanie z badań PIW-PIB w Puławach nr P/13/13582 z dnia 22 października 2013 roku
21. Sprawozdanie z badań PIW-PIB w Puławach nr P/13/13498 z dnia 22 października 2013 roku
22. Protokół z komisyjnej oceny i przeglądu stada żubrów w Puszczy Boreckiej przeprowadzonej w dniach 24-25 października 2013 roku
23. Opinia PLW w Giżycku z dnia 25 października 2013 roku
24. Wniosek Nadleśnictwa Borki nr ZŁ-7554-25/13 z dnia 28 października 2013 roku
25. Decyzja Generalnego Dyrektora Ochrony Środowiska Nr. DOP-OZ.6401.06.22.2013.bp z dnia 12 grudnia 2013 roku
26. Sprawozdania z dokonanej sekcji zwłok żubrów przeprowadzonej w dniach 16–17 stycznia 2014 roku w Wolisku
27. Pismo ZO.7211.17.2015 Regionalnego Dyrektora Lasów Państwowych w Białymstoku z dnia 26 lutego 2015 roku
28. Protokół z komisyjnej oceny i przeglądu stada żubrów w Puszczy Boreckiej przeprowadzonej w dniach 13 marca 2015 roku
29. Wniosek Nadleśnictwa Borki nr ZŁ-7211.10.2015 z dnia 30 marca 2015 roku
30. Decyzja Generalnego Dyrektora Ochrony Środowiska z dnia 19 października 2015 roku nr DZP-WG.6401.06.6.2015.km.5
31. Protokół nr 8-15/16 z wykonanej eliminacji żubra z dnia 17 lutego 2016 roku
32. Protokół nr 8-15/16 z dnia 17 lutego 2016 roku z wykonanej sekcji zwłok zwierzęcia
33. Decyzja Generalnego Dyrektora Ochrony Środowiska Nr. DZP-WG.6401.06.8.2016.JRO z dnia 29 lutego 2016 rok.
34. Protokół nr 10-15/16 z wykonanej eliminacji żubra z dnia 3 marca 2016 roku
35. Protokół 10-15/16 z dnia 3 marca 2016 roku z wykonanej sekcji zwłok zwierzęcia

36. Sprawozdanie komisji ds. likwidacji żubrów z wolnej hodowli w Puszczy Boreckiej z dnia 29 marca 2016 roku
37. Protokół eliminacji żubrów wolno żyjących w Puszczy Boreckiej z dnia 29 marca 2016 roku
38. Sprawozdanie z badania PIW-PIB w Puławach nr P/16/06394 z dnia 6 kwietnia 2016 roku
39. Pismo Powiatowego Lekarza Weterynarii w Giżycku nr PIWz.510.5.2016 z dnia 13 kwietnia 2016 roku
40. Sprawozdanie z badania PIW-PIB w Puławach nr P/16/08326 z dnia 28 kwietnia 2016 roku
41. Sprawozdanie z badania PIW-PIB w Puławach nr P/16/10783 z dnia 24 maja 2016 roku
42. Pismo ZO.7211.35.2016 z dnia 14 czerwca 2016 roku Regionalnego Dyrektora Lasów Państwowych w Białymstoku

8. Załączniki

8.1 Publikacje



Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland – management and legal implications

Małgorzata Bruczyńska^{1,2,A-D,F}, Anna Didkowska^{1,C-D,F}, Michał Michalski^{3,B,F},
Sylwia Brzezińska^{4,C,F}, Ewa Augustynowicz-Kopeć^{4,A,C,E-F}, Krzysztof Anusz^{1,A,C-F}

¹ Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Warsaw, Poland

² District Veterinary Inspectorate in Piaseczno, Warsaw, Poland

³ Veterinary Office Michał Michalski, Gdynia, Poland

⁴ Department of Microbiology, National Tuberculosis and Lung Diseases Research Institute, Warsaw, Poland

A – Research concept and design, B – Collection and/or assembly of data, C – Data analysis and interpretation,

D – Writing the article, E – Critical revision of the article, F – Final approval of the article

Bruczyńska M, Didkowska A, Michalski M, Brzezińska S, Augustynowicz-Kopeć E, Anusz K. Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in private animal collection in Poland – management and legal implications. *Ann Agric Environ Med*.

Abstract

Introduction and Objective. Bovine tuberculosis (BTB) remains an emerging problem in animals, and particular care is required in zoos to protect the health of the public visitors (zoonosis) and the unique animals kept in them, which may be endangered species. In larger zoos, the problem is controlled to a greater extent than in private animal collections. Such places pose a significant risk as visitors make direct contact with animals. The article presents the management, diagnostics of a case of BTB in a 'private animal collection', and discusses the legal implications.

Materials and method. Briefly, a post-mortem examination was performed in two Reeves's muntjacs (*Muntiacus reevesi*) in the private animal collection in Poland. Due to the suspicion of BTB, microbiological examination on Lowenstein-Jensen and Stonebrink media and subsequent genotyping was performed.

Results. Post-mortem examination revealed BTB-like lesions. Tests showed that the animals were infected with *Mycobacterium bovis*.

Conclusions. Taking into account the lack of obligation to monitor infectious zoonotic diseases, the often unknown origin of animals and, frequently, very close contact between people and animals in private animal collections, there is a need to clarify the legal obligations of owners of these private animal collections in Poland to ensure public health protection. The findings of this investigation demonstrate that due to the lack of precise epidemiological data for BTB, it is difficult to define the epidemiological status of private animal collections, and further management depends on the owner's cooperation with veterinarians.

Key words

bovine tuberculosis, zoological garden, *Mycobacterium bovis*, animal health law (AHL), *Muntiacus reevesi*

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Tuberculosis is an infectious disease in humans and animals caused by eleven species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) [1, 2]. Of these, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* are known to be etiological agents of bovine tuberculosis (BTB), found in animals [3]. The most common etiological factor of tuberculosis in humans is *Mycobacterium tuberculosis* [4]; however, BTB has also been noted in humans and has been described recently in Poland [5]. The World Health Organization (WHO) classifies BTB as a direct zoonotic disease: an infectious factor, transmitted from an infected vertebrate (animal) to humans, the latter being a sensitive species, without intermediate hosts [6].

Therefore, to ensure public health and animal welfare, animals kept together in places such as zoos should be subjected to regular testing to minimize the risk of disease, as well as those intended for purchase.

BTB is also one of the infectious diseases occurring among zoo-kept animals [7, 8, 9]. With a large number of zoo visitors, BTB may pose a threat to public health. The main route of transmission of BTB between animals is through the respiratory tract [10]. Indeed, cases of animal-human BTB transmission have been confirmed in zoos, which suggests an airborne transmission [11]. In humans, the most common route of BTB infection is via the consumption of unpasteurized milk; however, increasing attention is being paid to animal-human air-borne transmission, as supported by recent literature reports [12, 13, 14].

Since Poland's accession to the European Union (EU), the measures taken to combat BTB have been based on international law. According to Council Directive 64/432 / EEC, a country is officially tuberculosis free (OTF) if the

Address for correspondence: Małgorzata Bruczyńska, Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Warsaw, Poland
E-mail: gosia639@wp.pl

Received: 05.01.2022; accepted: 12.05.2022; first published:

percentage of infected cattle herds does not exceed 0.1% per year, and at least 99.9% herds are officially bovine tuberculosis free each year for six consecutive years. Poland was granted the status of an OTF country following Commission Decision No. 2009/342 / EC of 23 April 2009. Obtaining this status made it possible to reduce the surveillance scheme from 1/3 to 1/5 of cattle herds in a district annually, i.e. all cattle herds in the district are now subjected to testing every five years, with animals over 42 days of age being subject to testing. The official test is carried out by comparative intradermal tuberculin test in the neck area.

BTB is still being recorded in both livestock and wildlife in Poland, with 372 outbreaks recorded in cattle in the past 10 years. In addition, BTB has also been described in free-living and captive wildlife species, most recently in 2018 in captive European bison [15]. Currently, there is no law implemented that would mandate testing for BTB in free-living and captive wild animals in Poland.

BTB has also been previously described in zoos in Poland [16, 17]. However, the present study instead concerns animals kept on a private estate, officially known as a *private animal collection*. Such collections are not currently subject to specific rules in Polish legislation.

This difference between large zoos and private animal collections is a legal distinction: large zoos were under District Veterinary Supervision while private animal collections were not required to be registered. This is a huge legislative gap, as the origin and the epizootic status of animals kept in private animal collections often remains unknown, and their movement is often not subject to any restrictions or rules preventing the spread of infectious diseases. Most importantly, as animals kept in private animal collections are used as tourist attractions, and are often in direct contact with humans, including children, and can pose a threat of zoonotic transfer. Therefore, the present research examines a case of BTB in a private animal collection, describing the procedures undertaken by the owners and attending veterinarians, and attempts to highlight the legal aspects of the case.

MATERIALS AND METHOD

Animals and samples. The two Reeves's muntjacs (*Muntiacus reevesi*) described in this case study (one male and one female, both aged 4 years) presented similar clinical signs at different time intervals. In February 2021, a veterinarian was summoned to the muntjac deer with signs of general weakness, lack of appetite, and apathy. During the clinical examination, a significant degree of inhalation-expiratory dyspnea was found. It was decided to chemically immobilize the deer for a physical examination, and then to facilitate treatment and administer antibiotics and anti-inflammatory drugs. Unfortunately, the animal died during capture for the examination.

A few weeks later, the owner reported similar clinical signs in a second Reeves's muntjac in the herd. The veterinarian decided to euthanize the animal after the clinical examination, and a *post mortem* examination was carried out. For premedication of the animal, xylazine (1 mg/kg, Sedazin, Biowet Puławy, Puławy, Poland) and ketamine (5.75 mg/kg, Ketamine, Biowet Puławy, Puławy, Poland) were administered intramuscularly, Pentobarbital sodium

(133.3 mg/kg) and pentobarbital (26.7 mg/kg) were used intravenously for euthanasia (Morbital, Biowet Puławy, Puławy, Poland)

Post-mortem examination. The autopsy was conducted according to Annex 3 to the Ordinance of the Minister of Agriculture and Rural Development of 4 July 2017 on the method of keeping documentation related to combating infectious animal diseases [18]. During the *post mortem* examination, fragments of lungs were collected from the first muntjac, and varied material from the second (thoracic, submandibular, mesenteric lymph nodes and fragments of lungs).

Culture and molecular examination. The material was subjected to standard mycobacterial culture as described previously [19]. Each tissue was examined as three replicates. Briefly, after homogenization in 5% oxalic acid (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), the sediment was flushed in saline solution (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA). After centrifugation, the sediment was placed on Lowenstein and Stonebrink media (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Three Lowenstein and Stonebrink media were used in this study for each type of tissue to increase the sensitivity of the test. The media were incubated at 37 °C for 12 weeks and checked every 7 days. The DNA was isolated using a Genolyse isolation kit (Hain Lifescience, Germany). Strains were identified with a GenoType®MTBC assay (Hain Lifescience, Germany). Both tests were performed in accordance with the manufacturer's instructions [19].

RESULTS

Herd history. The research was carried out in a private animal collection located in northern Poland. The animals were introduced in 2017 as an exchange; however, their exact origin remains unknown. According to the information obtained from the owner, the animals originated from the vicinity of Kraków, southern Poland. The animals arrived at the facility without any previous disease screening. The described private animal collection is part of an agritourism facility with an area of 6 ha. On the day that the second Reeves's muntjac was euthanized, the facility also housed kangaroos (*Wallabia*), zebras (*Equus quagga*), camels (*Camelus dromader*), sheep (*Ovis aries*), goats (*Capra hircus*), llamas (*Lama guanicoe*), guanacos (*Lama guanicoe*), alpacas (*Vicugna pacos*), domestic donkeys (*Equus asinus*), fallow deer (*Dama dama*), Nilgau antelopes (*Boselaphus tragocamelus*), Sitatunga antelope (*Tragelaphus speki*), Patagonian mara (*Dolichotis patagonum*), peacocks (*Pavo cristatus*), emu (*Dromaius novaehollandiae*), Rhea (*Rhea americana*), and an exotic species of chicken. The animals had no direct contact with muntjacs.

Pathology. *Post-mortem* examination revealed extensive tuberculous gross lesions in both muntjac deer (Fig. 1, 2). Granulomas with caseous necrosis and mineralization lesions were found in the liver (Fig. 1, animal No 1, male) lungs (Fig. 2, animal No 2, female), lymph nodes as well as on the serosal surface of the peritoneum. The lesions resembled small gray-white nodules, ranging from 3–5 mm in size. No histopathological examinations were performed.

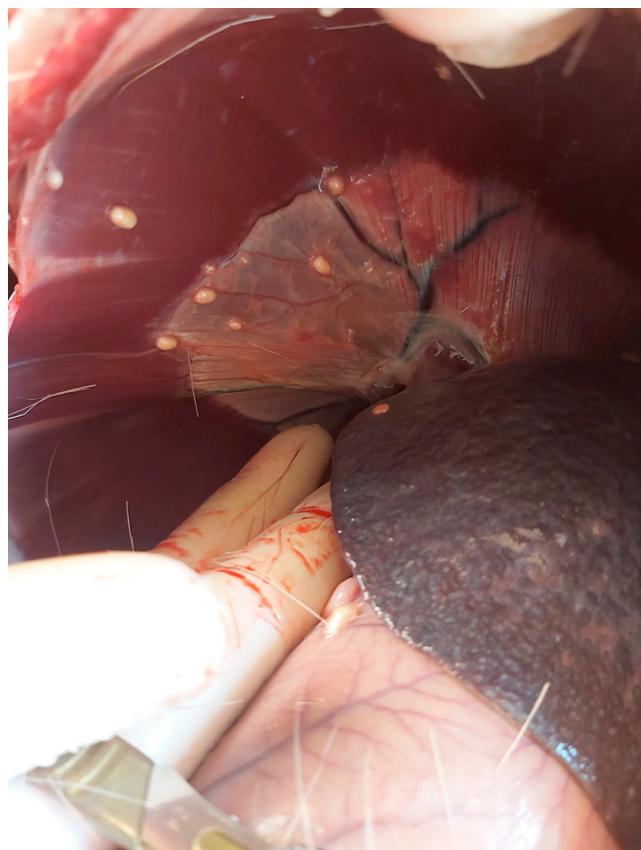


Figure 1. Anima No 1, male. Granulomatous lesions in internal organs. The figure shows the liver, correct consistency and color. Granulomatous lesions from 3–5 mm in size

Bacteriology and molecular identification. The material collected *post-mortem* was positive for culture. On both types of media, growth was visible in the 4th week of incubation. Based on the GenoType MTBC (based on the polymorphism of the *gyrB* gene) test, the isolated strains were classified as *Mycobacterium bovis*.

DISCUSSION

The occurrence of BTB in zoo animals should be treated as a public health problem in the area where it occurs. This is particularly important in countries where there is little public health awareness of the disease, as animals can be the source of infection for zoo visitors, and present a threat to zoo staff in first line. In addition, in the absence of animal testing and the exchange of animals between private animal facilities, may also allow easy transmission of mycobacteria. The transboundary nature of BTB was well illustrated by a case of a group of alpacas shipped from the United Kingdom (UK) to Poland. Although *ante mortem* tuberculin skin testing found them to be free from tuberculosis, some had been infected with *M. bovis* prior to transfer, which resulted in transmission of the disease to animals on Polish farms [19]. Another example was the transport of 2 European bison (*Bison bonasus*) to another European bison breeding herd in the country; the bison had not received any BTB testing, and it was later found that one animal was TB-positive [20]. There is clearly a strong need for stricter legislation to avoid such situations, as illustrated by the case described herein, where the epizootic investigation was able to establish the source of the muntjac deer infection.

Due to the legal status of private animal collection-type facilities, they often lack procedures regarding their registration, and they are generally not subject to monitoring for infectious disease. The animals are not subject to compulsory inspection during movement, and their circulation and transport is not governed by the same rules as for zoos. Therefore, it is likely that many cases of BTB infection have been misdiagnosed or have remained undetected. Interestingly, due to the fact that BTB is not monitored *ex officio* in animals other than cattle, the sick animals may not have received pharmacological therapy. In Poland, a single case of BTB treatment has been reported in a male reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in the Silesian Zoological Garden [16]. However, the use of such treatment is very controversial due to the risk to other animals



Figure 2. Animal No 2, female. Granulomatous lesions in internal organs. The figure shows the lungs with bloodshot, correct consistency. Granulomatous lesions from 3–5 mm in size.

and humans posed by interacting with the treated animal; such treatment was not even considered in the presented case.

Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and the Council of 9 March 2016 on transmissible animal diseases, amending and repealing certain acts in the field of animal health, also known as the 'Animal Health Law' (AHL), was passed on 21 April 2021 [21]. The regulation includes rules for all animals on the territory of the Republic of Poland, as in the territories of all other countries belonging to the European Union, whether they are kept for production breeding, live in zoos, or are used in circuses.

Poland is required to implement the AHL by 21 April 2022, and it is hoped that this will result in better official control of BTB in centres like the one described in the presented study. Currently, the only legislative option is Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1882 of 3 December 2018 on the application of disease prevention and control rules; this regulation provides categories of listed diseases and establishes a list of species and groups posing a considerable risk for their spread. Its content changed the rules of categorization and methods of combating tuberculosis [22]. The AHL classifies MTBC infections as category B diseases, i.e. as dangerous bacterial diseases, only for *Bison*, *Bos* and *Bubalus*. As such, these infections are subject to mandatory control in all Member States, and each Member State should adopt compulsory eradication programs.

The Reeves's muntjac is classified under *other ruminants*. According to Regulation (EU) 2018/1882, tuberculosis in such ruminants, i.e. other than *Bison*, *Bos* and *Bubalus*, belongs to groups D and E, which means that while it is necessary to prevent the spread of the disease and notify its occurrence, the animals are not subject to any eradication programme [22]. The AHL introduces a more universal, but very general, division of all animals into *kept animals*, i.e. animals kept by humans, including those in the private animal collection, and *wild animals*, i.e. those that are not kept in captivity.

Currently, insufficient information is kept on sick zoo or private farm animals and unreported cases, and hence, any conclusive epizootic investigation is difficult with less chance of identifying the source of TB infection. Three articles within the new legislation given above may be of particular value in identifying cases of BTB from private animal collections and for regulating the procedure in the case of infectious diseases. Art. 108 of Regulation 2016/429 imposes on Member States a 'responsibility for establishing a system for the identification and registration of kept terrestrial animals'. In addition, Art. 117 requires operators to comply with regulations regarding individual or group identification and documentation for the identification and tracking of animals, as appropriate for the species concerned; this is needed to keep terrestrial animals other than bovine, ovine, caprine, porcine and equine species [21]. Art. 124 specifies that 'Operators shall take appropriate preventive measures to ensure that the movement of kept terrestrial animals does not jeopardise the health status at the place of destination', and that 'operators shall only move kept terrestrial animals from their establishments and receive such animals if the animals in question fulfil the following condition' of originating from establishments registered or approved by the competent authority or which have been granted a derogation from registration requirements, and fulfill the requirements for the identification and registration of the animals [21].

It should be noted that the management of the studied

private animal collection took a very responsible approach in addressing the zoonotic nature of tuberculosis: all animals and workers were tested, the pens disinfected, and the owners cooperated fully with the field veterinarian and research centre. It would seem to be good practice to oblige visitors to wash and disinfect their hands on entry and exit. Animal-to-human and human-to-animal transmission of tuberculosis [12] and other mycobacteriosis [23] has been extensively described, including among animals in zoos [24]; such transmission is particularly suited to the special nature of the private animal collection, where guests can come into close contact with animals, and can pet and feed them [25, 26].

It should be emphasized that the muntjac is an invasive species in some countries with a high prevalence of BTB, and hence has often been found to be positive during local wide screenings [27]. Therefore, its confirmation in another 2 individuals means that this species should be carefully monitored for tuberculosis in zoos.

In recent years, much attention has been paid to the risks associated with the trade in captive wild animals and their presence on farms, either as ornamental or farm animals. When brought into Europe or moved without established control rules, animals can be a source of various pathogens that are dangerous to both other animals and humans. So far, there has been no legislation on the monitoring of infectious and invasive diseases in free-living or kept animals. Pathogens from wild animals pose a direct threat to people visiting private animal collections. Legislation in the field of public health has a solid scientific basis at both the national and local levels. However, there is a pressing need for rules regarding the monitoring of infectious and invasive diseases occurring in animals kept in facilities accessible to humans, and to regulate the rules of movement and circulation of kept wild animals in the EU. The great changes taking place in EU law allow a chance to develop national programmes for controlling infectious diseases, including tuberculosis.

CONCLUSIONS

Taking into account the lack of obligation to monitor infectious zoonotic diseases, the often unknown origin of animals, and the frequent close contacts between guests and animals in private animal collection centres, there is a need to clarify the legal obligations of the owners of these collections with regard to public health protection. As the presented study shows, due to the lack of precise epidemiological data it is difficult to define the epidemiological status of the private animal collection in which BTB appeared, and further management depends on the owner's cooperation with veterinarians. Generally speaking, however, the key roles in prevention are played by Personal Protective Equipment and the awareness of pet owners.

REFERENCES

1. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, et al. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implication for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*. 2014;97:5–S19. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.009>.
2. Parsons, SD, Drewe JA, Gey van Pittius NC, et al. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(12):2004–7. <https://doi.org/10.3201/eid1912.130268>.

3. Krajewska M, Weiner M, Augustynowicz-Kopeć E. Animal tuberculosis as a potential danger to men. *Health Problems of Civilization*. 2017;11(1):10–14.
4. Krajewska M, Kozińska M, Zwolska Z, et al. Human as a source of tuberculosis for cattle. First evidence of transmission in Poland. *Vet Microbiol*. 2012;159:269–271.
5. Kozińska M, Krajewska-Wędzina M, Augustynowicz-Kopeć E. *Mycobacterium caprae* – the first case of the human infection in Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2020;27(1):151–153. <https://doi.org/10.26444/aaem/108442>.
6. Thoen C, Lobue P, de Kantor I, et al. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol*. 2006;25:112(2–4):339–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.047>.
7. Gong W, Yang Y, Luo Y, et al. An alert of *Mycobacterium tuberculosis* infection of rhesus macaques in a wild zoo in China. *Exp Anim*. 2017;66(4):357–365. <https://doi.org/10.1538/expanim.16-0095>
8. Zlot, A, Vines J, Nystrom L, et al. Diagnosis of Tuberculosis in Three Zoo Elephants and a Human Contact – Oregon 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;64(52): 1398–402. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6452a2>.
9. Montali RJ, Mikota SK, Cheng LI. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev Sci Tech*. 2001;20(1):291–303. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1268>.
10. Kozińska M, Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E. Transmission of drug-resistant TB among family members. *Post N Med*. 2011;10: 824–830.
11. Akkerman OW, van der Werf TS, Rietkerk F, et al. Retraction Note: Infection of great apes and a zoo keeper with the same *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(6):705. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00689-9>.
12. Olea-Popelka F, Muwonge A, Perera A, et al. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(1):e21–e25. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6).
13. Sanou A, Tarnagda Z, Kanyala E, et al. *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):e3142. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003142>.
14. Malama S, Johansen TB, Muma JB, et al. Characterization of *Mycobacterium bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. *Vet Med Int*. 2014;2014:187842. <https://doi.org/10.1155/2014/187842>.
15. Didkowska A, Krajewska-Wędzina M, Orłowska B, et al. Molecular Characterization of *Mycobacterium* spp. Isolated from Cattle and Wildlife in Poland, 2021, <https://doi.org/10.5772/intechopen.96695> In: *Molecular Epidemiology Study of Mycobacterium Tuberculosis Complex*, IntechOpen, London, UK.
16. Krajewska M, Załuski M, Zabost A, et al. Tuberculosis in Antelopes in a Zoo in Poland--Problem of Public Health. *Pol J Microbiol*. 2015;64(4):395–7. <https://doi.org/10.5604/17331331.1185242>.
17. Krajewska-Wędzina M, Augustynowicz-Kopeć E, Weiner, et al. Treatment for active tuberculosis in giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in a Zoo and potential consequences for public health – Case report. *Ann Agric Environ Med*. 2018;25(4):593–595. <https://doi.org/10.26444/aaem/75685>.
18. Ordinance of the Minister of Agriculture and Rural Development of July 4, 2017 on the method of keeping documentation related to combating infectious animal diseases (NS. Of Laws of 2017, item 1388) [in Polish]
19. Krajewska-Wędzina M, Didkowska A, Sridhara AA, et al. Transboundary tuberculosis: Importation of alpacas infected with *Mycobacterium bovis* from the United Kingdom to Poland and potential for serodiagnostic assays in detecting tuberculin skin test false-negative animals. *Transbound Emerg Dis*. 2020;67(3):1306–1314. <https://doi.org/10.1111/tbed.13471>.
20. Bielecki W, Amarowicz J, Hławiczka M, et al. Monitoring the health of the European bison population as an element of species protection. *European Bison Conservation Newsletter*, 2014;7:43–50.[in Polish]
21. Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of March 9, 2016 on transmissible animal diseases and amending and repealing certain acts in the field of animal health ("Animal Health Law") *Journal of Laws of the European Union L No. 84*, p. 1, as amended. Accessed October 27, 2021. ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/429/oj>.
22. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1882 of 3 December 2018 on the application of certain disease prevention and control rules to categories of listed diseases and establishing a list of species and groups of species posing a considerable risk for the spread of those listed diseases. *Journal of Laws of the European Union L No. 308*, p. 21, as amended. Accessed November 27, 2021. ELI: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2018/1882/oj.
23. Macedo R, Isidro J, Gomes MC, et al. Animal-to-human transmission of *Mycobacterium pinnipedii*. *Eur Respir J*. 2020;56(6):2000371. doi: 10.1183/13993003.00371-2020.
24. Stephens N, Vogelnest L, Lowbridge C, et al. J. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from an Asian elephant (*Elephas maximus*) to a chimpanzee (*Pan troglodytes*) and humans in an Australian zoo. *Epidemiol Infect*. 2013;141(7):1488–97. <https://doi.org/10.1017/S095026881300068X>.
25. Quadri NS, Brihn A, Shah JA, et al. Bovine Tuberculosis: A Re-emerging Zoonotic Infection. *J Agromedicine*. 2021;26(3):334–339. doi: 10.1080/1059924X.2020.1771497.
26. Gong W, Yang Y, Luo Y, et al. An alert of *Mycobacterium tuberculosis* infection of rhesus macaques in a wild zoo in China. *Exp Anim*. 2017;66(4):357–365. doi: 10.1538/expanim.16-0095.
27. Delahay RJ, Smith GC, Barlow AM, et al. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Vet J*. 2007;173(2):287–301. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.11.011>.

Article

Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*)—A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

Małgorzata Bruczyńska ^{1,2,*} , Anna Didkowska ¹ , Andrzej Dzikowski ¹, Michał Rudy ³ , Blanka Orłowska ¹, Mirosław Welz ⁴, Monika Krajewska-Wędzina ⁵, Wanda Olech ⁶  and Krzysztof Anusz ¹

¹ Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland

² County Veterinary Inspectorate, Orężna 9, 05-501 Piaseczno, Poland

³ Institute of Law, SWPS University of Social Sciences and Humanities, Chodakowska 19/31, 03-815 Warsaw, Poland

⁴ Provincial Veterinary Inspectorate, Piotra Ściegiennego 6a, 38-400 Krosno, Poland

⁵ Department of Microbiology, National Veterinary Research Institute, Aleja Partyzantów 57, 24-100 Puławy, Poland

⁶ Department of Animal Genetics and Conservation, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland

* Correspondence: gosia639@wp.pl



Citation: Bruczyńska, M.; Didkowska, A.; Dzikowski, A.; Rudy, M.; Orłowska, B.; Welz, M.; Krajewska-Wędzina, M.; Olech, W.; Anusz, K. Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*)—A Threat to an Effective Reintroduction Strategy. *Diversity* **2022**, *14*, 710. <https://doi.org/10.3390/d14090710>

Academic Editor: Luc Legal

Received: 14 July 2022

Accepted: 18 August 2022

Published: 27 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In Poland, bovine tuberculosis (BTB) is most often detected in cattle, although some cases have also been reported in pigs and in other non-domestic species. BTB is believed to be mainly present in the Bieszczady region, in the south-eastern part of the country. The present study analyses the practical applications of the law regarding the eradication of tuberculosis among European bison in Poland, as well as the influence of legal rules in species conservation effects. Its aim is to present and evaluate the effectiveness of legal provisions in selected cases of BTB detected in European bison. The analysis highlights key “critical points” in the management of cases of BTB in European bison, which resulted from the problematic interpretation and application of the existing legal provisions. Findings indicate that before the Animal Health Law, the eradication of BTB in European bison in Poland was not regulated clearly enough by the applicable laws in force prior to 2021. This posed a threat to an effective reintroduction strategy for bison based on creating larger metapopulations and maintaining small, isolated reservoir herds (breeding centers) for fallback in the case of infectious disease. It should be emphasized that in the current legal system, there is no doubt that a District Veterinary Officer has the competence to prevent and control tuberculosis in European bison.

Keywords: European bison; animal health law (AHL); bovine tuberculosis; EU law; veterinary administration

1. Introduction

In Poland, bovine tuberculosis (BTB) is most often detected in cattle [1], although some cases have also been reported in pigs [2] and in other non-domestic species. BTB is believed to be mainly present in the Bieszczady region, in the south-eastern part of the country, where it has been confirmed microbiologically in wild boars (*Sus scrofa*), European bison (*Bison bonasus*) and gray wolves (*Canis lupus*) [3–5].

Until recently, only bovine (*Mycobacterium bovis*) and human (*M. tuberculosis*) Mycobacteria were legally considered etiological factors of BTB in Poland before 21 April 2021. In addition, in 2009, *M. caprae* was added to the list of etiological factors in some European Union member states [6]. According to EU Regulation 2021/620 [7], the territory of Poland is officially recognized as being free from infection with Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC), that is, according to the current law, Mycobacteria of the genera *M. bovis*, *M.*

caprae and *M. tuberculosis* [7–11]. Free status applies only to livestock: the occurrence of tuberculosis in wild animals does not affect this status.

Tuberculosis is a very serious disease for wild species, livestock and pets. It is also a matter of concern for public health (zoonosis) and an important feature for species conservation efforts, such as those concerning the European bison in Poland.

In Poland, the legal framework regarding free-living animals is complex: many of the relationships between its regulations and legal provisions tend to be obscure or incomplete. The legal system has an abundance of laws and legal provisions, bound by complex and sometimes contradictory relationships between them. In the face of such potential legal ambiguity, it can be very hard to establish clear procedures that can be followed by authorities, resulting in transfers of responsibility or failures to act appropriately in response to specific crisis situations, particularly when it is possible for one law to have different interpretations. This posed a threat to an effective reintroduction strategy based on creating larger metapopulations and maintaining small, isolated reservoir herds (breeding centers) for fallback in the case of infectious disease.

As bison demonstrate weak resistance to infection, a particular threat is posed by disease outbreaks. For instance, the whole bison herd from Pszczyna (Poland) died out due to the foot and mouth disease outbreak in 1953/1954, about one third of bison from the German breeding center Hardehausen were lost due to blue-tongue disease in 2007 and a bovine tuberculosis outbreak in the Bieszczady Mountains in 2012/2013 resulted in the elimination of the entire herd. Many free-living herds today occur at high densities with winter feeding; as such they are at high risk of epidemics if herds are connected into larger metapopulations. It is therefore important to establish reservoir herds free of any infections (i.e., bovine tuberculosis) that can serve to restock larger herds in such cases; such efforts should proceed in parallel with those intended to link and expand extant herds [12]. However, these activities can be disrupted by legal obstacles.

The present study analyses the practical applications of the law regarding the eradication of tuberculosis among European bison in Poland, as well as the influence of legislation on species conservation. Its aim is to present and evaluate the effectiveness of legal provisions in selected cases of BTB detected in European bison.

2. Materials and Methods

Intervention studies involving animals or humans, and other studies that require ethical approval, must list the authority that provided approval and the corresponding ethical approval code. The presented paper examines statutes from both Polish [13–20] and European legislation [7–11,21–23]. The legal texts themselves were subjected to linguistic, systemic, teleological, functional and pro-European legal interpretation and analysis.

The study also examines selected factual and legal cases performed to reconstruct and evaluate the actions taken to eradicate BTB in European bison in Poland [24–42]. The case studies were performed of actual state with the aim of exemplifying certain legal and epizootic aspects of BTB monitoring and control.

The study adopts the legal status as appropriate for the reported cases. The case studies were compared with the current (since 21 April 2021) legal state, with the aim of exemplifying certain relations between legal and epizootic aspects of BTB monitoring and control, together with the consequences of decisions made to ensure *B. bonasus* species conservation.

3. Results

3.1. The Historical Background and Geographical Distribution of BTB in European bison in Poland

The highest frequencies of BTB cases among non-domesticated animals in Poland were detected in the European bison population in the Bieszczady region. A total of 45 confirmed cases of BTB were noted in the Bieszczady region in the years 1996–2013 [3]. Two such cases were detected in 1997 [4], and in the period 1997–2001, 13 of the 18 bison eliminated in the Brzegi Dolne herd were posthumously found to be infected with BTB. In 2009, after

detecting BTB in a single animal in the Górny San herd in the same region, the whole herd of 24 animals was eliminated. *M. bovis* infection was posthumously detected in 23 of them [14]. BTB was later detected in other species of free-living animals in the region, including wild boar [2]. Molecular analysis found the *M. caprae* strains isolated from the local population of wild boar to be identical to those from the European bison of the Górny San herd [4].

In 2016, *M. bovis* infection was microbiologically confirmed in two free-living European bison in Borecka Forest, Giżycko district, north-eastern Poland [43]. Continued monitoring showed no more new cases in that region [44].

BTB has also been reported among European bison kept in captive breeding centers and in zoological gardens. In the years 2009–2010, BTB was reported in animals kept in the Silesian Zoological Garden in Chorzów [45,46], and the highest infection rates have been confirmed in the European Bison Breeding Center in Smardzewice (Figure 1) [3,47].



Figure 1. The location of bison herds.

3.2. Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison—Description of Cases Regarding the Legal Act on Infectious Diseases in Animals

The study presents three selected cases of BTB infection, recorded in European bison before 21 April 2021 [11]. These cases highlight the juridical and practical problems associated with the eradication of BTB in protected species.

3.2.1. A Case of BTB Infection in the European bison Breeding Center, Smardzewice (Kampinoski National Park)

The first reported fatal case of BTB in the reservoir herd in Smardzewice was observed in 2013 [47], in a six-year-old bull born in the Smardzewice breeding center. The most probable source of infection was the mother: she had been brought to the Silesian Zoological Garden in Chorzów in 1998 [45,46], and then moved to Smardzewice in 2005, where she calved two years later. The cow was not tested for any infectious diseases when she was transferred from the zoo to the breeding center.

Following the death of the bull in Smardzewice, other animals were tested. Any BTB-positive European bison were isolated from the herd, and permission was obtained from the Minister of the Environment to eliminate six animals [27]. Among these six, three animals demonstrated BTB-typical anatomical and pathological post-mortem lesions, and the presence of *M. caprae* was confirmed in laboratory testing. The material from the other three animals was free of acid-fast Mycobacteria. In September 2014, during follow-up ante-mortem tuberculosis testing, two individuals were found to be positive to both the

intradermal tuberculin test and gamma interferon test, two to the tuberculin test alone and two to the interferon gamma test alone. The Director of the Kampinoski National Park applied for permission from the Minister of the Environment to shoot all individuals (16 animals) kept in the European Bison Breeding Center in Smardzewice at that time; however, permission was only given to shoot the six which had demonstrated a positive response to the in vivo diagnostic tests. Their elimination took place on 21 January 2015. The rest of the herd was culled in December 2018 [47].

In Poland, if the animals are located in the area of the National Park, permission must be obtained from the Ministry of Environment and, currently, the Ministry of Climate and Environment; however, if they are located in other areas, consent must be granted by the General Director of Environmental Protection

3.2.2. A Case of Tuberculosis Associated with the Transfer of European bison from the Breeding Center in Smardzewice to the Quarantine Enclosure in the Borki Forest District

In 2013, two animals from the European Bison Breeding Center in Smardzewice were transferred to the quarantine enclosure Wolisko in the Borki Forest District (Giżycko district). After 30 days of quarantine, the animals were joined with other four animals in the enclosure in Wolisko (Giżycko district). No disease symptoms were revealed in clinical examination. After gaining information about the occurrence of BTB in the breeding center in Smardzewice, the Chief of Borki Forest District applied to the General Director for Environmental Protection for permission to eliminate the two transferred animals. With the permission of the General Director for Environmental Protection [24], two animals were eliminated. The post-mortem examination performed immediately after the shooting, however, revealed no anatomical or pathological changes that could indicate tuberculosis. Tissue samples were collected and sent to the National Veterinary Research Institute in Puławy. The resulting microbiological analysis found one European bison to be negative but indicated the presence of *M. bovis* in the other. As the latter had been in contact with other animals in enclosure during the last three months, all other animals could also have been infected. Under the circumstances, it was necessary to establish a method to eliminate the risk of the disease spreading outside the enclosure and to protect the free-roaming basic herd. The Regional Director of the State Forest in Białystok appointed a commission to develop a procedure for handling the other animals kept in the Wolisko enclosure.

Considering the substantial risk of infection to the animals in enclosure and free-roaming herds in the Borecka Forest, the decision was made to eradicate the BTB outbreak by eliminating the whole herd kept in the enclosure. The District Veterinary Officer (DVO) in Giżycko issued an opinion sanctioning the elimination of European bison as the only way to eradicate the BTB outbreak. The Chief of Borki Forest District applied to the General Director for Environmental Protection for permission to eliminate the remaining animals in the enclosure because all of them had been in direct contact with the infected animal and could be potentially infected with BTB [47]. After a thorough examination of the subject matter, the General Director for Environmental Protection gave permission to proceed with the aim of protecting the free-roaming European bison. Therefore, a decision was issued permitting four European bison from Wolisko to be shot [25]. A post-mortem examination was performed on all the animals [29]. Tissue samples were collected and were tested for the presence of *M. bovis*, as recommended by the commission; no sign of acid-fast Mycobacteria was found [36]. Based on the recommendations of the commission and of the Giżycko DVO, the facility where the animals had been kept was disinfected [36].

3.2.3. A Case of Tuberculosis in a Herd of Free-Roaming European bison in the Borecka Forest

In 2016, a cyclical review (a periodic herd inspection of the condition of a given population of bison present in a given area performed by a group of specialists) detected the presence of BTB in free-living European bison in the Borecka Forest (Giżycko district). The Regional Director of the State Forest in Białystok appointed a commission to evaluate the regulation of the local European bison population. The commission recommended

the elimination of 12 animals [15,37]. Under the circumstances, the Borki Forest District contacted the General Director for Environmental Protection, requesting administrative permission to shoot 12 animals [42]. Such permission was given in the case of six animals.

The herd of European bison was officially inspected by the commission, to select the animals to be shot [37]. One of the selected animals was an apathetic bull which would arrive last to the feeding spots and on which visible lesions were present in the foreskin region (*Posthitis*) [31,33]. An apathetic cow with noticeable feeding problems and a thin body showing muscle atrophy was also selected [32].

Documentation was prepared for the elimination [31–33] and samples were collected for laboratory BTB testing [38,39]. The presence of *M. bovis* was confirmed microbiologically in tissue material obtained from the dead bull [38]—but not from the cow [39].

The Giżycko DVO subsequently introduced BTB monitoring of the game species living in the Borecka Forest. The procedure included collecting tissue samples from hunted animals and testing them for the presence of *M. bovis*, as well as training hunters in recognizing the symptoms and pathological anatomical lesions, which were potentially indicative of BTB in game species [28].

In addition, in accordance with the issued permission [26], another four animals were shot for diagnostic purposes [30,35]. The collected samples were found to be BTB negative [40].

3.3. Legal Analysis

Before the Animal Health Law (AHL) [11] came into force on 21 April 2021, the existing relevant legislation in Poland comprised the Act on Animal Health Protection and Control of Infectious Diseases in Animals [18], the Regulation concerning the control of bovine tuberculosis [13] and the Nature Protection Act [20]. The norms concerning BTB [13] existed as a more detailed version of the general provisions of the Act on Animal Health Protection and Control of Infectious Diseases in Animals [18].

This legal status was further complicated by the existence of numerous norms in the form of various statutory acts concerning protection of nature and protection of animal species (Nature Protection Act [46] and its executive regulation [37]), protection of animals, responsibilities of veterinary inspection authorities, performance of the veterinary profession, as well as general legal provisions regarding administrative procedures.

Typically, a legal norm can only be reconstructed after the application of a number of provisions originating from a wide range of legal references. In analyzed cases, especially problematic was the application of the current law to the European bison as a protected wild animal species. It should be noted, however, that the protection of nature, including legally protected species, is a separate form of protection to the humanitarian protection of animals and the protection of animal health, including that afforded to officially controlled diseases. Nevertheless, it would not be correct to assume that it must be understood separately; this is especially true in the context of officially controlled diseases. A multifaceted and teleologically-focused manner of approaching the problem was inherent.

The authors realize that this was a very difficult task for every competent authority (e.g., DVO). Moreover, in the absence of a national program adopted by the Chief Veterinary Officer, the competent authorities considering the examined cases adopted the form of interpretation, according to which they were only permitted to control the disease in farm animals, but not in European bison.

The authorities assumed that the conducted case analysis revealed, before April 2021, effective application of legal measures would have been possible only if the Chief Veterinary Officer had established a program for eradicating tuberculosis in European bison, specifying measures that should have been taken to control the disease. This program was needed to compensate for the inability of the DVOs (as the competent authorities for a particular territory, having relevant legal obligations and competences) to apply measures indicated in Article 44 of the Act on Animal Health Protection and Control of Infectious Diseases in Animals. These could not be applied unless they were also specified

in the executive regulation issued under Article 61 Section 1 by the Minister of Agriculture. Although the Minister issued a regulation concerning the control of bovine tuberculosis on 23 November 2004 [13], its content regarding administrative control is inconsistent. Despite the fact that the name of the regulation itself mentions “bovine tuberculosis” and not “tuberculosis in bovine species”, the authorities comprehended its content implies as applying to domesticated cattle only. This interpretation, based on simple linguistic understanding, but not taking into account the coherence of the law or teleological values, such as the protection of public health, effected in non-application of the legal norms to European bison.

In the authors’ opinion, another interpretational path was possible. Assuming that “bovine tuberculosis” is the name of a disease which was (and is) subject to compulsory control, any administrative measures intended to guarantee disease control could have been also applied to European bison.

Provisions of the Act on Animal Health Protection and the Control of Infectious Diseases in Animals, and of the Regulation concerning the methods of eradication of tuberculosis, included information on the competence and powers of the DVO in the discussed scope [36,44]. These rules could have been applied in BTB cases in European bison in an analogous manner as for the tuberculosis of cows, *mutatis mutandis*, by considering the differences regarding the protection of the European bison.

Since 2021 [11], MTBC infection has been subject to compulsory control in all EU member states, and each state is required to adopt compulsory eradication programs, until it is not recognized as a disease-free zone. Bison spp., including *B. bonasus*, is also listed as being susceptible to mycobacterial tuberculosis infection. If the competent DVO suspects or officially confirms an outbreak of disease, it must use the control measures set out in the AHL appropriate to the affected area [11,21,22].

Hence, the DVO must follow the procedures of EU law in any establishment in which tuberculosis has been found, such as zoos or breeding centers in which European bison are kept under human control, and in wild animals such as free-living European bison (e.g., in the Bieszczady Mountains); indeed, the AHL is part of EU law. The DVO should select appropriate control measures to facilitate the epidemiological investigation, and to perform eradication, prevention, surveillance and disease control in relation to the appropriate population of wild animals or their habitats [11,21,22]. The competent veterinary authority is also required to consider investigating wild animals from additional animal populations believed to share epidemiological links with any (kept and wild) animals, as indicated by epidemiological investigation. The competent authority is required to order proportionate risk mitigation measures to prevent re-infection of the establishment, and these should consider any relevant risk factors revealed by epidemiological investigation. These measures must at least account for the persistence of the MTBC in the environment or in wild animals, and any biosecurity measures that have been adapted to the specificities of the facility.

Pursuant to the AHL, the protection of an animal species such as the European bison implies the introduction of modified measures for the eradication of disease by a competent authority. The necessity to eradicate BTB, and the measures, methods and techniques used for its eradication, must not pose any risk to the European bison population. On the other hand, no adopted modification may obstruct the procedures carried out to eradicate the disease [35].

It should be noted that the existing national law was not derogated, but only supplemented and modified by the EU law.

4. Discussion

It should be noted that the protection of nature, including animal species protection, implemented in creation of laws and application of their provisions, is not separate to the protection of animals or animal health, and should never be perceived as such.

The legal norms in force in Poland before 2021 were ambiguous and their mutual relations were confusing. Interpreting a uniform, coherent and purposefully correct norm from the text of statutory acts was very complicated. Especially problematic was the application of the statutory law to European bison as a protected species of wild animal. This was the very reason for the response to critical situations in all examined cases. When considering legal obstacles to the eradication of bovine tuberculosis in European bison, it needs to be highlighted that the European bison was successfully recovered from only 12 founder animals that had survived in captivity following its extinction in the wild at the beginning of the 20th century. The strong founder effect caused a dramatic loss of a genetic diversity. For instance, an average inbreeding coefficient estimated from pedigree records was 0.50 in Lowland line individuals and about 0.30 in Lowland-Caucasian individuals. At the genome level, individuals belonging to a population that has recently experienced a strong bottleneck have a greater probability of carrying identical-by-descent (IBD) alleles, i.e., those inherited twice from a common ancestor; these can include deleterious variants that may contribute to inbreeding depression and threaten the recovery process due to low anti-infective immunity [48].

The authors found that in all examined cases, the competent authorities adopted a form of legal interpretation, according to which they were only permitted to control the disease in farm animals, but not in European bison. It should be noted that, in the opinion of the authorities that considered the examined cases, the regulations of that time only allowed for the eradication of the disease in farm animals. All the factual and administrative reactions, no matter if they were correct or questionable, were a corollary of this form of interpretation and resulted from the adopted legal optics.

Present analysis indicates that the problem was not related to the construction or use of legal provisions as such, but rather to their misinterpretation or insufficient application. The cases analyzed in this study were characterized by an abundance of legal norms with unclear legal status, making it hard to understand a single legal norm and act in line with it. Furthermore, some provisions seemed to exclude each other, and many of the legal norms could only have been reconstructed using advanced, complex methods of functional and teleological interpretation, requiring specialist legal knowledge. In the cases discussed in the present study, this confusing legal status resulted in the misconstrued legal provisions, and their eventual misapplication. This was compounded by the fact that the authority in question had insufficient forces and measures to react.

As it was revealed above, the ambiguity of legal standards and the adopted interpretation, or their absence, before 2021, left many crucial problems unregulated. Lack of coherent system solutions can be indicated. A dangerous zoonosis was left without proper administrative supervision.

According to the authors, it was (and is) necessary to approach the discussed problem in a multifaceted and functional manner, and to have broad horizons of thought. The alternative interpretational path, as described in the present study, is an example of how to deal with the epidemic outbreak in case of legal incertitude.

The conclusion presented above can be reached through functional and teleological, as well as systemic interpretation, considering the whole legal order. It assumes a holistic view of the problem and is focused on its real, rather than fragmentary, solution. Regulation [36] was applicable to European bison analogously. After all, the European bison has a similar biology to domestic cattle, and both species demonstrate similar BTB development. The authors are aware that adoption of such an interpretation of the regulations by the administration authority required both courage and extensive knowledge. It could also raise justified, yet not unsolvable, concerns about DVO's competence in this area. Still—a pressing need to protect public health, health of different animal species, including those endangered, should be seen as superior values.

The provisions of the AHL have since come into force, and the law concerning the eradication of infectious diseases has changed. The AHL is directly in force and is applied in the legal system of every member state.

It should be noted that Polish law should be interpreted from a pro-European perspective. The AHL was introduced to unify and simplify the application of legal procedures throughout the EU and make it more flexible. Its rules comprise a number of requirements intended to prevent animal diseases which can be transmitted to other animals or humans and allow their eradication. They are based on the principal meta-rule of “one health”.

Not only does the AHL constitute a new quality regarding the eradication of tuberculosis, but it also creates new legal responsibilities and reinforces existing ones. Our present findings indicate the responsibilities, and the competence of the national veterinary inspection authorities, currently stemming from the EU law and Polish national law.

Conducted analysis and legal interpretation proves that the DVO was granted by the AHL the unquestionable competence to act in all investigated cases of tuberculosis in European bison and should therefore now act in line with the AHL when combating bovine tuberculosis.

This calls into question whether the aforementioned crisis cases (that took place before 2021, i.e., while earlier provisions were in force) were properly managed. It is unclear whether the measures taken to combat the disease were sufficient, or whether their scope was too narrow.

To determine whether the veterinary authority took adequate, effective and legally correct actions as a state administration body, it is necessary to examine the situation within a broader context. Such analysis also requires the correct interpretation of the legal provisions of the time, which were complicated and confusing, and could have been misconstrued by the competent authorities. Nevertheless, this does not justify the use of epizootically inadequate methods of eradication of BTB in European bison.

Although the European bison is a strictly protected species, the discovery of an epizootic such as BTB requires the whole herd to be eliminated [14,20,23]. In addition to ensuring public health, such measures also serve to protect the species as a whole.

This statement is in line with the circumstances justifying a derogation from the prohibition of killing the European bison, as given in the catalog of Article 56 Section 4 of the Nature Protection Act [20]. Such circumstances include lack of alternative solutions, no risk of harm to the condition of the wild European bison population, agreement with the best interest of such protected species, and accordance with the interest of public health.

The above circumstances were sufficiently considered in the case of BTB which occurred in the Borki Forest District in 2016, resulting in the swift eradication of the disease focus. The decision of the General Director for Environmental Protection issued in the matter was a standard instance of the abovementioned derogation [20]. More specifically, the elimination of the individual referred to in the permission to shoot was not detrimental to preserving the free-roaming population of European bison in an appropriate condition: the elimination of five animals out of a population of 110 European bison living in the Borecka Forest could not bring any major harm to that population.

Allowing the infected animals to stay within the range, instead of shooting them, poses a risk of disease transmission to humans, as well as free-roaming European bison, and other wild or domesticated animals.

The case of BTB detected in the EBBC Smardzewice in 2013 [47] is an example of the incorrect application of legal norms: the decision to control the disease and eliminate the animals in a stepwise fashion, rather than eliminating the whole herd as a single operation, proved to be a failure. It should be emphasized that Regulation 2020/689 [22] clearly indicates that animals with a suspected infection may have to be shot, together with those with proven infection.

In the case referred above, the DVO should have considered a wide array of other available instruments for disease eradication in addition to the radical elimination of the disease focus, i.e., killing all animals representing the susceptible species, to ensure epizootic security [18]. When choosing such instruments, those that best limit or eliminate the risks to public health, and the spread of infection to livestock and other susceptible wild animals, should be prioritized.

The type of measures used for eradication of BTB and their scope are listed rather generally in the EU regulations, and the specific method of their application is subject to the decision of the DVO conducting the procedure [11,18,21,22]. The discussed provisions use some indeterminate expressions, which give the DVO the liberty of using certain measures that are deemed to be proper in each specific case, based on the circumstances. The measures referred to in both the EU and national legislation are currently subject to the proportionality criterion that it must be adequate and proportional to the risk posed by tuberculosis in a given case [35].

A key disadvantage of the solutions adopted in the Smardzewice case was the extended length of time between detecting the infection and taking measures, i.e., delayed action. Currently, to confirm the presence of disease in its earliest stages, the AHL requires any suspect animals to undergo clinical examination and laboratory testing; this forms the basic component of epizootic investigation in the case of BTB in European bison. However, in all the cases examined herein, it became evident that the plan of action was incorrect and BTB infection was confirmed too late.

It should be stressed that there is more to the control of infectious diseases in animals than just the detection and reporting of infections, the prevention and control of their spread, and their eventual eradication; it should also include preventive actions and measures. In the described cases, it is doubtful that this need was satisfied: the Smardzewice herd was joined by one animal from a zoological garden where tuberculosis in animals had been detected previously, and that particular animal was not tested for *Mycobacteria*. It appears that this cow may have been the source of infection for that herd [47]. It is therefore reasonable to construe that the unsatisfactory state of the legal provisions regarding the transfer of wild animals was a key factor in the spread of BTB. It was changed by breeders themselves who implemented rule as a good practice and all transferred animals within the country are checked. It is hence of great importance to conclude that the new European provisions concern wild animals in terms of epizootic and epidemic safety, supervision and biosecurity [11,22].

The case of the 2016 Borecka Forest outbreak underlines the importance of veterinary supervision and monitoring tuberculosis in non-domesticated animals. This case was detected during the annual evaluation and review of the European bison herd in the Borecka Forest, performed in accordance with the provisions of the “Strategy for the protection of *Bison bonasus* in Poland” [15]. The current study confirms that such monitoring is in line with necessary supervision, as specified by the AHL.

The essential rules for controlling infectious diseases were not, however, properly implemented in the case of the 2013 Smardzewice case. This was due to a number of factors, including the misinterpretation of the relevant legal provisions, which themselves were unclear; in addition, the tools, financial means and coercive measures needed to prevent infection and the spread of disease were not available to the competent authorities or responsible entities.

5. Conclusions

The analysis highlights key “critical points” in the management of cases of BTB in European bison, which resulted from the problematic interpretation and application of the existing legal provisions. Our present findings indicate that before the AHL, the eradication of BTB in European bison in Poland was not regulated clearly enough by the applicable laws in force before the year 2021. It should be emphasized that in the current legal system, there is no doubt that a DVO has the competence to prevent and control tuberculosis in European bison. Thus, the introduction of AHL has helped to clear legal obstacles to the eradication of bovine tuberculosis in European bison. This is extremely important also in the context of threats of other infectious diseases. However, it is important to note that European bison herds remain at high risk of disease, as demonstrated by a number of previous incidents, due to their low genetic diversity, which makes herds vulnerable to pandemics.

On the other hand, the provisions of the new European law are not very clear either. They raise numerous doubts with regard to legal dogmatic, as well as veterinary, epizootiological or administrative issues. Furthermore, the EU law does not diminish nor derogate the provisions of the national law, but rather modifies their application. The reconstruction of a single legal norm requires the use and interpretation of a wider array of provisions, originating in a variety of European and national statutory acts. There is no doubt that this affects the legibility of the norms, and that it complicates their use by veterinary administration authorities. The application of the AHL in the eradication of BTB in the European bison clearly requires further investigation.

Current analysis of the relevant legal provisions and case studies indicates that ignoring scientific data can result in serious errors in the formation and application of legal norms. Only a thorough knowledge of the relevant legal provisions, and their correct and thoughtful interpretation, enables their effective application in controlling the spread of BTB in European bison, and in other species.

The presented cases clearly point out that proper usage of legal rules is a crucial factor in effectiveness of species conservation.

Usefulness of legal provisions as such is dependent on many factors. Proper and in-depth interpretation of statutory acts has been demonstrated as the most important of them, even more important than the wording itself. Legal effectiveness in the discussed BTB cases was low due to many circumstances. Currently, as the law has changed, its effectiveness is postulated to increase.

The present study demonstrates that proper veterinary control is only feasible when simple and effective statutes exist, which can be implemented easily and without delay. It is essential that tuberculosis is monitored effectively and eliminated. The eradication of diseases in wildlife, including BTB in European bison, minimizes the risk of transmission to free-living animals and livestock, as well as to humans.

Author Contributions: Conceptualization, M.B., M.R., A.D. (Andrzej Dzikowski), W.O. and K.A.; methodology, A.D. (Anna Didkowska), A.D. (Andrzej Dzikowski) and M.K.-W.; formal analysis, M.B., M.R. and A.D. (Andrzej Dzikowski); writing—original draft preparation, A.D. (Andrzej Dzikowski), M.B. and A.D. (Anna Didkowska); writing—review and editing A.D. (Andrzej Dzikowski), A.D. (Anna Didkowska), W.O., B.O. and K.A., supervision, K.A., A.D. (Andrzej Dzikowski), W.O. and M.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Complex Project of European Bison Conservation by State Forests, which is financed by the Forest Fund (Poland), grant number OR.271.3.10.2017.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available in the Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Poland.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lipiec, M.; Radulski, Ł.; Szulowski, K. A case of bovine tuberculosis in pigs in Poland—a country free from the disease. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2019**, *26*, 29–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Krajewska, M.; Lipiec, M.; Zabost, A.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Szulowski, K. Bovine tuberculosis in a wild boar (*Sus scrofa*) in Poland. *J. Wildl. Dis.* **2014**, *50*, 1001–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Didkowska, A.; Krajewska-Wędzina, M.; Bielecki, W.; Brzezińska, S.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Olech, W.; Anusz, K.; Sridhara, A.A.; Johnathan-Lee, A.; Elahi, R.; et al. Antibody responses in European bison (*Bison bonasus*) naturally infected with *Mycobacterium caprae*. *Vet. Microbiol.* **2021**, *253*, 108952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. 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*, 21. [[CrossRef](#)]
5. Radulski, Ł.; Lipiec, M.; Krajewska-Wędzina, M. Bovine tuberculosis in wild and free-living animals—laboratory studies 2008–2018. *Życie Wet.* **2019**, *94*, 51–53.

6. Aranaz, A.; Cousins, D.; Mateos, A.; Domínguez, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, Pt 6, 1785–1789. [CrossRef] [PubMed]
7. Directorate-General for Health and Food Safety; European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/620 of 15 April 2021 Laying down Rules for the Application of Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council as Regards the Approval of the Disease-Free and Non-Vaccination Status of Certain Member States or Zones or Compartments Thereof as Regards Certain Listed Diseases and the Approval of Eradication Programmes for Those Listed Diseases. EU OJ L 131/78 of 16 April 2021. pp. 78–119. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2021/620/oj (accessed on 16 April 2021).
8. Directorate-General for Health and Food Safety; European Commission. Commission Decision 2009/342/EC of 23 April 2009 amending Decision 2003/467/EC as Regards the Declaration that Certain Administrative Regions of Italy are Officially Free of Bovine Tuberculosis, Bovine Brucellosis and Enzootic-Bovine-Leukosis, That Certain Administrative Regions of Poland are Officially Free of Enzootic-Bovine-Leukosis and That Poland and Slovenia are Officially Free of Bovine Tuberculosis. EC OJ L 104/51 of 24 April 2009. pp. 51–56. Available online: [http://data.europa.eu/eli/dec/2009/342\(1\)/oj](http://data.europa.eu/eli/dec/2009/342(1)/oj) (accessed on 24 April 2021).
9. European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1882 of 3 December 2018 on the Application of Certain Disease Prevention and Control Rules to Categories of Listed Diseases and Establishing a List of Species and Groups of Species Posing a Considerable Risk for the Spread of Those Listed Diseases. EU OJ L 308 of 4 December 2018. pp. 21–29. Available online: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2018/1882/oj (accessed on 21 April 2021).
10. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the Monitoring of Zoonoses and Zoonotic Agents, Amending Council Decision 90/424/EEC and Repealing Council Directive 92/117/EEC. EC OJ L 325 of 12 December 2003. pp. 31–40. Available online: <http://data.europa.eu/eli/dir/2003/99/2013-07-01> (accessed on 21 April 2021).
11. The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on Transmissible Animal Diseases and Amending and Repealing Certain Acts in the Area of Animal Health ('Animal Health Law'). EU OJ L 084 of 31 March 2016. p. 1. Available online: <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/429/oj> (accessed on 21 April 2021).
12. Perzanowski, K.; Bleyhl, B.; Olech, W.; Kuemmerle, T. Connectivity or isolation? Identifying reintroduction sites for multiple conservation objectives for wisents in Poland. *Anim. Conserv.* **2019**, *23*, 212–221. [CrossRef]
13. Regulation of the Minister of Agriculture and Rural Development of 23 November 2004 on Combating Cattle Tuberculosis, Journal of Laws 2004 No. of 2004, No. 258, Item 2585. Available online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20042582585> (accessed on 21 April 2021). (In Polish)
14. Regulation of the Minister of the Environment of 16 December 2016 on the Protection of Animal Species, Journal of Laws of 2016, No. of 2016, Item 2183. Available online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20160002183> (accessed on 21 April 2021). (In Polish)
15. Strategy for the Protection of the European Bison (*Bison bonasus*) in Poland, 2007.
16. The Act of June 14, 1960 Code of Administrative Procedure, i.e.; Journal of Laws of of 2021, Item 735, 1491, 2052. Available online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=wdu19600300168> (accessed on 21 April 2021). (In Polish)
17. The Act of December 21, 1990 on the Profession of a Veterinarian and Medical and Veterinary Chambers, i.e.; Journal of Laws of of 2019, Item 1140. Available online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU19910080027> (accessed on 21 April 2021). (In Polish)
18. The Act of March 11, 2004 on the Protection of Animal Health and Combating Infectious Animal Diseases, i.e.; Journal of Laws of of 2020, Item 1421. Available online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20200001421> (accessed on 21 April 2021). (In Polish)
19. The Act of January 29, 2004 on the Veterinary Inspection, i.e.; Journal of Laws of of 2021, Item 306. Available online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20210000306> (accessed on 21 April 2021). (In Polish)
20. The Act of April 16, 2004 on Nature Protection, i.e.; Journal of Laws of 2021, Item 1098, 1718, of 2022, Item 84. Available online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=wdu20040920880> (accessed on 21 April 2021). (In Polish)
21. European Union. Commission Delegated Regulation (EU) 2020/687 of 17 December 2019 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and the Council, as Regards Rules for the Prevention and Control of Certain Listed Diseases, EU OJ L 174 of 3 June 2020. pp. 64–139. Available online: http://data.europa.eu/eli/reg_del/2020/687/oj (accessed on 21 April 2021).
22. European Union. Commission Delegated Regulation (EU) 2020/689 of 17 December 2019 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council as Regards Rules for Surveillance, Eradication Programmes, and Disease-Free Status for Certain Listed and Emerging Diseases, EU OJ L 174 of 3 June 2020; pp. In 211–340.. Available online: http://data.europa.eu/eli/reg_del/2020/689/oj (accessed on 21 April 2021).
23. European Union. Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the Conservation of Natural Habitats and of Wild Fauna and Flora, EEC OJ L 206 of 22 July 1992. pp. 7–50. Available online: <http://data.europa.eu/eli/dir/1992/43/oj> (accessed on 21 April 2021).
24. Decision of the General Director for Environmental Protection no. DOP-OZ.6401.06.8.2013.bp of August 7, 2013.
25. Decision of the General Director for Environmental Protection no. DOP-OZ.6401.06.22.2013.bp of December 12, 2013.

26. Decision of the General Director for Environmental Protection no. DZP-WG.6401.06.8.2016.JRO of February 29, 2016.
27. Decision of the Minister of the Environment no. DLP-III-4102-121/111622/14/ZK of March 24, 2014.
28. Letter of the District Veterinarian in Giżycko no. PIWz.510.5.2016 of April 13, 2016 to the Borki Forest Inspectorate.
29. Reports of the post-mortem examinations of European bison, performed on 16–17 January 2013 in Wolisko.
30. Report of the commission for the elimination of bison from free breeding in the Borki Primeval Forest of March 29, 2016.
31. Report No. 8-15/16 from the qualifying round of February 17, 2016.
32. Report No. 10-15/16 from the qualifying round of March 3, 2016.
33. Report on the dissection of the animal No. 8-15/16 performed by a veterinarian on February 17, 2016.
34. Report of the post-mortem examination of an animal, performed by a veterinarian, No. 8-15/16, of 17 February 2016.
35. Report of the post-mortem examination of an animal, performed by a veterinarian, No. 10-15/16, of 3 March 2016.
36. Report of the post-mortem examination of free-living European bison in the Borecka Forest, of 29 March 2016.
37. Commission report of the evaluation and review of the European bison herd in the Borecka Forest on 24–25 October 2013.
38. Research report of PIW-PIB in Puławy No. P/16/06394 of April 6, 2016.
39. Research report of PIW-PIB in Puławy No. P/16/08326 of April 28, 2016.
40. Research report of PIW-PIB in Puławy No. P/16/10783 of May 24, 2016.
41. Request of the Forest Inspectorate of the Borki Forest District No. ZŁ-7554-25/13 of October 28, 2013 to the General Director of Environmental Protection.
42. Request of the Forest Inspectorate of the Borki Forest District No. ZŁ-7211.10.2015 of March 30, 2015 to the General Director of Environmental Protection.
43. Didkowska, A.; Krajewska-Wędzina, M.; Orłowska, B.; Krzysiak, M.; Żygowska, M.; Wiśniewski, J.; Bielecki, W.; Olech, W.; Anusz, K. Further epidemiological investigation of tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*). *Eur. Bison Conserv. News* **2018**, *11*, 43–48.
44. Didkowska, A.; Orłowska, B.; Witkowski, L.; Olbrych, K.; Brzezińska, S.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Krajewska-Wędzina, K.; Bereznowski, A.; Bielecki, W.; Krzysiak, M.; et al. Biopsy and Tracheobronchial Aspirates as Additional Tools for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Living European Bison (*Bison bonasus*). *Animals* **2020**, *10*, 2017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. 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. Puławy*. **2011**, *55*, 381–383.
46. Krajewska, M.; Załuski, M.; Zabost, A.; Orłowska, B.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Anusz, K.; Lipiec, M.; Weiner, M.; Szulowski, K. Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in antelopes in a zoo in Poland. *Pol. J. Microbiol.* **2015**, *64*, 405–407.
47. Krajewska, M.; Orłowska, B.; Anusz, K.; Welz, M.; Bielecki, W.; Wojciechowska, M.; Lipiec, M.; Szulowski, K. Bovine tuberculosis in the bison breeding in Smardzewice. *Życie Wet.* **2016**, *91*, 50–53.
48. Druet, T.; Oleński, K.; Flori, L.; Bertrand, A.R.; Olech, W.; Tokarska, M.; Kaminski, S.; Gautier, M. Genomic Footprints of Recovery in the European Bison. *J. Hered.* **2020**, *111*, 194–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Mycobacterium avium Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in Poland

Małgorzata Bruczyńska ^{1,2,*}, Anna Didkowska ¹, Sylwia Brzezińska ³, Magdalena Nowak ¹, Katarzyna Filip-Hutsch ¹, Mirosław Kalicki ⁴, Ewa Augustynowicz-Kopeć ³ and Krzysztof Anusz ¹

¹ Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Nowoursynowska 166, 02-787 Warsaw, Poland

² County Veterinary Inspectorate, Orezna 9, 05-501 Piaseczno, Poland

³ Department of Microbiology, National Tuberculosis and Lung Disease Research Institute, 01-138 Warsaw, Poland

⁴ Zoological Garden of Gdańsk, Karwieńska 3, 80-328 Gdańsk, Poland

* Correspondence: gosia639@wp.pl; Tel.: +48-604209339

Simple Summary: Paratuberculosis is a bacterial infection occurring globally in ruminants. Although it has a known impact on animal health and welfare, diagnosis is complicated by high animal densities, the chronic nature of the disease, the variable course of infection, and the immune response. The aim of the current study was to confirm whether *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* (MAP) infections occur in zoo animals in Poland. Faeces samples ($n = 131$) were collected for analysis from different species of animals from eight zoos in Poland. Our study provides the first confirmation of MAP in bongo antelope and confirms that MAP is present in Polish zoological gardens and requires monitoring, which can be easier now due to new legislation.

Abstract: Mycobacterial infections are significant issues in zoo animals, influencing animal welfare, conservation efforts, and the zoonotic potential of pathogens. Although tuberculosis is recognised to be highly dangerous, paratuberculosis can also lead to animal losses and is potentially dangerous for humans. The aim of the current study was to confirm whether *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) infections are currently present in zoos in Poland. Faeces samples ($n = 131$) were collected from different animal species from eight zoos in Poland. The faeces were decontaminated and inoculated into Herrold's Egg Yolk Media. The species was determined using commercial DNA testing. The IS900 was checked using RT-PCR. The culture was positive in seven samples: five with *M. avium*, one with *Mycobacterium fortuitum*, and one without any identified *Mycobacterium* species. RT-PCR confirmed MAP genetic material in nine animals. Our findings represent the first confirmation of MAP in bongo (*Tragelaphus eurycerus*), indicating that it is present in Polish zoological gardens. Fortunately, the disease can be monitored more easily due to recent legislation (the Animal Health Law).

Keywords: animals; bongo; herbivore; IS900; *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*; one-health; paratuberculosis; zoo

Citation: Bruczyńska, M.; Didkowska, A.; Brzezińska, S.; Nowak, M.; Filip-Hutsch, K.; Kalicki, M.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Anusz, K. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in Poland. *Animals* **2023**, *13*, 1022.

<https://doi.org/10.3390/ani13061022>

Academic Editor: Søren Nielsen

Received: 20 February 2023

Revised: 6 March 2023

Accepted: 09 March 2023

Published: 10 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mycobacterial infections in zoo animals have a significant impact on animal welfare and conservation efforts, and have worrying zoonotic potential [1]. Of these diseases, the most dangerous is believed to be tuberculosis (TB); however, significant animal losses can be caused by paratuberculosis. Paratuberculosis is a chronic granulomatous infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), an acid-fast bacterium characterised by long environmental persistence.

The most commonly affected species are ruminants; however, other mammals are also susceptible [2,3]. In zoos, paratuberculosis has been confirmed among *Bovidae* [4–6], *Cervidae* [7], *Giraffidae* [8,9], *Camelidae* [10,11], *Rhinocerotidae* [12,13], and *Rodentia* [1,2].

In zoos, many animals can be unrecognised reservoirs of MAP; these can have major epidemiological significance by shedding MAP intermittently or chronically [14,15]. Transmission is mostly through the faecal-oral route, although vertical, pseudo-vertical and venereal transmission have been also described [16–18]. Animals usually develop clinical signs after a long incubation period. However, it is important to note that MAP can be shed in faeces several months before clinical signs occur. Progressive weight loss, exercise intolerance, and diarrhoea are the main clinical signs observed in clinical paratuberculosis [19].

Although it remains unclear whether MAP is a potential public health threat [20–22], visitors to petting zoos and zookeepers should observe safety precautions.

As paratuberculosis can follow a severe course, depending on species and individuals, [1] there is a need to monitor it. This is particularly important in zoos, which are often home to very valuable and endangered species. Although MAP has been confirmed in Poland in livestock [23,24], no studies have yet examined its occurrence in Polish zoos.

In total, 25 zoological gardens are registered in Poland, in 13 regions of the country. Of these, the 11 best examples are members of the European Association of Zoos and Aquariums (EAZA), together with the most important zoos from all over Europe. Only animals born and raised outside the natural environment, and which have no chance of survival otherwise, may be kept and bred in zoos; however, they may also be kept if it is required to protect the population or species, or to achieve scientific goals. In such cases, in accordance with the Animal Health Law (AHL), the animals are subject to the supervision of the competent authority. The aim of the current study was to confirm whether MAP infections occur in zoo animals in Poland.

2. Materials and Methods

2.1. Material

Faeces were collected from seven Polish zoological gardens: Zoo “A” ($n = 61$), Zoo “B” ($n = 24$), Zoo “C” ($n = 6$), Zoo “D” ($n = 9$), Zoo “E” ($n = 16$), Zoo “F” ($n = 1$), and Zoo “G” ($n = 9$). Samples were also taken from a non-commercial breeding centre “H” ($n = 5$) (Table 1). All tested animals have no symptoms of disease. Non-herbivore species were excluded from the study. Animals showing signs of diarrhoea and emaciation were excluded from the study, because the purpose of the study was to monitor clinically healthy animals. Ethical approval was not required for this study as the samples were collected without any harm to the animals.

Table 1. Characteristics of the zoos in which material was collected (A–H).

Code	Area in Hectares	Characteristics of the Place	Number of Visitors per year 2022	Number of Kept Species/Animals
A	over 100	away from the urban agglomeration, in a forested area	500,000–1 mln	156/771
B	30,3	isolated from the agglomeration, in an island area	below 50,000	227/1553
C	16	forest park, by walking trails	500,000–1 mln	260/1400
D	33	near the urban agglomeration, by a river and walking trails	over 1 mln	1132/10,000

E	40	near the urban agglomeration	500,000–1 mln	500/12,000
F	13,81	near the city centre	below 500,000	312/3547
G	16	near park areas	over 1 mln	554/3350
H	4	in a forest, private property, agritourism farm	20,000	29/211

The samples were collected from the following animal species: addax antelope (*Addax nasomaculatus*) ($n = 1$), alpaca (*Vicugna pacos*) ($n = 10$), Ankole-Watusi (*Bos taurus*) ($n = 2$), anoa (*Bubalus depressicornis*) ($n = 2$), waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus*) ($n = 1$), Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) ($n = 6$), Baringo giraffe (*Giraffa camelopardalis rothschildi*) ($n = 3$), capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) ($n = 1$), Chinese bharal, (*Pseudois nayaur szechuanensis*) ($n = 1$), Chinese goral (*Naemorhedus caudatus arnouxi*) ($n = 1$), common eland (*Tragelaphus oryx*) ($n = 9$), Djallonké sheep (*Ovis aries*) ($n = 1$), domestic goat (*Capra hircus*) ($n = 9$), domestic yak (*Bos grunniens*) ($n = 1$), dromedary (*Camelus dromedarius*) ($n = 6$), eastern bongo (*Tragelaphus eurycerus isaaci*) ($n = 11$), European bison (*Bison bonasus*) ($n = 3$), European mouflon (*Ovis aries musimon*) ($n = 2$), fallow deer (*Dama dama*) ($n = 2$), giraffe (*Giraffa camelopardalis*) ($n = 3$), guanaco (*Lama guanicoe*) ($n = 2$), Java mouse-deer (*Tragulus javanicus*) ($n = 1$), llama (*Lama glama*) ($n = 3$), lowland nyala (*Nyala angasii*) ($n = 1$), maned arui (*Ammotragus lervia*) ($n = 3$), Mesopotamian fallow deer (*Dama mesopotamica*) ($n = 1$), Mishmi takin (*Budorcas taxicolor taxicolor*) ($n = 1$), Nile lechwe (*Kobus megaceros*) ($n = 1$), okapi (*Okapia johnstoni*) ($n = 2$), Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) ($n = 1$), Polish heath sheep (*Ovis orientalis f. aries "Wrzosówka"*) ($n = 2$), prairie bison (*Bison bison*) ($n = 1$), pygmy hippopotamus (*Cheoropsis liberiensis*) ($n = 5$), red cow (*Bos taurus*) ($n = 1$), red deer (*Cervus elaphus*) ($n = 1$), Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) ($n = 2$), reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*) ($n = 3$), sable antelope (*Hippotragus Niger*) ($n = 2$), scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) ($n = 1$), Shetland pony (*Equus caballus Shetland*) ($n = 7$), Siberian ibex (*Capra sibirica*) ($n = 2$), sika deer (*Cervus nippon dybowskii*) ($n = 2$), sitatunga (*Tragelaphus spekii gratus*) ($n = 2$), South American tapir (*Tapirus terrestris*) ($n = 2$), southern pudu (*Pudu puda*) ($n = 1$), Thorold's deer (*Cervus albirostris*) ($n = 1$), vicugna (*Vicugna vicugna*) ($n = 1$), Visayan spotted deer (*Rusa alfredi*) ($n = 2$), white-bearded wildebeest (*Connochaetes taurinus albojubatus*) ($n = 1$), and wild goat (*Capra aegagrus*) ($n = 1$). The age of the animals ranged from 5 months to 22 years (average eight years). The material was collected from 48 females and 47 males (for 36 samples, sex could not be determined). The material (131 faecal samples) was collected in two ways: individual samples ($n = 89$) and pulled samples from pens ($n = 42$).

2.2. Culture

The samples were processed by suspension, decontamination, and culture, according to the World Organisation to Animal Health (WOAH) Terrestrial Manual 2021 (<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>, accessed on 15 December 2021). Briefly, 1g of faeces was transferred to the distilled water and shaken for 30 min at room temperature (RT). The uppermost 5 mL of the faeces suspension was then transferred to a tube containing 20 mL 0.95% 3-Hydroxy-2-phenylcinchoninic acid (HPC). After being inverted several times, the tube was left to stand for 18 h at RT. The undistributed sediment was then inoculated into Herrold's Egg Yolk Media (HEYM, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US), with and without mycobactin. The media were incubated at 37°C for eight months and checked for colonies every seven days.

2.3. Genetic Analysis

DNA from colonies was isolated using the Genolyse isolation kit (Hain Lifescience, Nehren, Germany).

The strains were classified as non-tuberculosis mycobacteria species using the Geno-Type Mycobacterium CM test (Hain Lifescience) based on the DNA-Strip technology. Briefly, the DNA was extracted and then subjected to multiplex amplification with biotinylated primers. Following this, reverse hybridisation was conducted.

MAP was detected by real-time PCR using the VetMax *M. paratuberculosis* 2.0 Kit (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). The test targets the insertion sequence IS900, part of the IS1110 family of insertion sequences. It was repeated between 14 and 18 times in MAP genome.

All tests were performed according to the manufacturers' manuals.

3. Results

3.1. Culture

Positive results were observed in seven samples. Nonchromogenic, small, round, cream-coloured colonies of fastidious cells developed in four to six months on HEYM media with mycobactin (Figure 1).



Figure 1. Colonies grown on Herrold's media with mycobactin.

3.2. Genetic Analysis

The genetic analysis confirmed *M. avium* in five isolated strains and *M. fortuitum* in another. One strain was found not to be characteristic of any Mycobacterium species (Table 2). RT-PCR was positive in the case of nine animals from four zoos. Detailed data of animals are presented in Table 3.

Table 2. Animals with positive mycobacteria culture results.

ID	Animal Species	Age [years]	Sex	Zoo	Genetic Analysis
Z24	Bongo <i>Tragelaphus eurycerus</i>	5	F	B	<i>Mycobacterium avium</i>
Z25	Bongo <i>Tragelaphus eurycerus</i>	3	M	B	<i>Mycobacterium avium</i>
Z26	Bongo <i>Tragelaphus eurycerus</i>	1	F	B	<i>Mycobacterium avium</i>
Z27	Bongo <i>Tragelaphus eurycerus</i>	1	M	B	<i>Mycobacterium avium</i>

Z45	The Java mouse-deer <i>Tragulius javanicus</i>	5	M	G	<i>Mycobacterium avium</i>
Z106	Red deer <i>Cervus elaphus</i>	15	F	C	None of the <i>Mycobacteria</i> species
Z194	Sheep <i>Ovis aries</i>	11	F	A	<i>Mycobacterium fortuitum</i>

Table 3. Animals positive for IS900 in RT-PCR.

ID	Animal Species	Age [years]	Sex	Zoo
Z17	Southern pudu (<i>Pudu puda</i>)	2	F	B
Z24	Bongo (<i>Tragelaphus eurycerus</i>)	5	F	B
Z25	Bongo (<i>Tragelaphus eurycerus</i>)	3	M	B
Z46	Guanaco (<i>Lama guanicoe</i>)	11	M	G
Z88	European bison (<i>Bison bonasus</i>)	Pulled sample		D
Z113	Giraffe (<i>Giraffa camelopardalis</i>)	11	M	A
Z164	Bactrian camel (<i>Camelus bactrianus</i>)	5	M	A
Z168	Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	5	F	A
Z192	Domestic goat (<i>Capra hircus</i>)	6	F	A

4. Discussion

Our findings indicate that MAP infections are present in asymptomatic herbivores in Polish zoological gardens. Although not all infected animals develop clinical disease, inflammatory gastrointestinal disease can occur, especially in ruminants [2]. In addition, as asymptomatic infected animals may also be reservoirs of MAP, and hence play a role in its transmission, it is important to confirm the epidemiological status of zoos.

Although infectious diseases are usually monitored using serological methods, in zoos it is difficult to collect sera samples for a large number of animals, so non-invasive materials such as faeces are used. The gold standard diagnostic test in the case of mycobacteria is microbiological culture. While the sensitivity of the test varies according to the type of sample and medium used, it is nevertheless characterised by 100% specificity [25]. In the present study, culture confirmed the presence of *M. avium* in two bongo antelopes originating from Zoo B (Tables 1–3), and MAP was confirmed molecularly. While this appears to be the first confirmed case of MAP infection in this species, another bacterium from the *Mycobacterium avium* complex (MAC) has previously been diagnosed in bongo; *M. avium* spp. *hominissuis* (Mah) was confirmed in five captive bongo antelopes suffering from emaciation [26]. Mah was also confirmed in another sitatunga antelope in a Polish zoo [27].

RT-PCR also achieved positive results in the case of seven other species (Table 3). All seven species have previously been confirmed to harbour MAP: pudu [28], guanaco [29,30], European bison [7], giraffe [8], Bactrian camel [31], alpaca [29,32], and domestic goat [33].

In the present study, more positive samples were confirmed by RT-PCR than by culture; nine samples were confirmed molecularly but only two in culture (Tables 2 and 3). This is a similar result as noted in research on camelids [34]; however, it contrasts with a recent study from a zoo in Mexico [6]. The different sensitivity observed between our diagnostic methods may be due to intermittent excretion or low numbers of bacteria in the faecal sample. Reliable detection of MAP in specific individuals requires repeated, regular sampling. However, as the present study is intended as an epidemiological assessment of the general situation in Polish zoos, samples were only collected once. In addition, some strain types are difficult to cultivate and may have not been detected in culture [35]. In

three out of five *M. avium*-positive samples, MAP was not detected by RT-PCR (Tables 1 and 2). Further tests will be needed to confirm which subspecies has been isolated.

As tuberculosis has previously been confirmed in Polish zoos [36,37], it should be noted that MAP-positive animals can complicate the diagnosis of tuberculosis, due to cross-reactions [38–40].

As even asymptomatic animals were found to yield positive results, all zoos should conduct tests in animals showing symptoms that may suggest paratuberculosis. It is important to note that symptoms can vary between ruminants as well as in other species [41]; however, the most common clinical symptom is diarrhoea, leading to wasting and gradual emaciation, while the feed uptake is not affected [42]. As clinical signs of the disease are often inapparent [41], a key tool for controlling paratuberculosis in zoos is necropsy, although gross pathology does not develop in all species [43]. Furthermore, caseation and calcification of lesions have been confirmed in small ruminants, deer, and camelids, which can be mistaken for tuberculosis [44]. In histological examination, paratuberculosis manifests with histiocytic granulomatous inflammation, mucosal thickening, and atrophy of intestinal villi and glands [45].

A key consideration for zoo owners concerns legal action in the case of paratuberculosis being confirmed in a zoo. Since April 21, 2021, within the territory of the Republic of Poland, as in the territories of all other countries belonging to the European Union, Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on transmissible animal diseases and amending and repealing certain acts in the field of animal health (Journal of Laws of the European Union L No. 84, p. 1, as amended) also known as the Animal Health Law (AHL), has been in force. In some areas, the AHL has introduced changes in the field of animal health protection, one of which is the division of infectious animal diseases into five categories (A, B, C, D, E). The AHL regards paratuberculosis as a category E disease, indicating that it requires surveillance in the EU, and that notification, reporting, and surveillance rules apply. The AHL introduces a more universal, but very general, division of all animals into *kept animals*, i.e., those that are kept by humans, and *wild animals*, i.e., those that are not. Zoo animals, being under human control, are regarded as kept animals. Unfortunately, insufficient information exists concerning sick animals in zoos or on private farms to conduct a full epizootic investigation and thus identify the source of paratuberculosis infection [46].

Although the zoonotic potential of MAP remains uncertain [20], it is important to monitor this disease to ensure public health. This is particularly important in zoos, which often have separate areas where children can pet the animals, and where behaviours conducive to faecal–oral infections can often be observed [47].

Based on the distribution of the tested zoological gardens (Table 1), location does not seem to play an important role in the chance of infection. Effective control of MAP infections in zoo animals requires preventive measures, the most important of which is the introduction of strict hygiene measures. In addition, individuals with unknown MAP status should be tested before being introduced to the zoo, and comprehensive pathology and disease monitoring programmes should be adopted [48]. Additionally, as wildlife faeces are known to play an important role as a source of infection for livestock, effective zoo-wide pest control programmes are important [49].

5. Conclusions

This study confirms MAP in zoo animals in Poland, and is the first to identify MAP in bongo antelope. Out of 131 samples of asymptomatic animals, genetic analysis confirmed *M. avium* in five isolated strains and *M. fortuitum* in one. Our findings confirm that MAP infections are present in asymptomatic animals in Polish zoological gardens, and that there is a growing need for effective control programmes. All animals with symptoms that may suggest paratuberculosis should be tested for the disease, especially because it is a potential threat to zoo visitors. It is also particularly important that, in line with the requirements of the AHL, disease prevention measures should be included for the

exchange or trade in animals. Our study is therefore significant not only because of animal health monitoring, but also for public health protection. It also sets out further possible directions for research in zoos, which should include examinations of animals showing clinical signs typical of paratuberculosis and an attempt to carry out serological monitoring.

Author Contributions: Conceptualization, M.B., A.D., and K.A.; methodology, A.D., K.F.-H., S.B., and E.A.-K.; formal analysis, M.B. and A.D.; investigation, M.B., M.N., and A.D.; resources, M.B. and M.K.; writing—original draft preparation, M.B. and A.D.; writing—review and editing A.D. and K.A., supervision, K.A. and E.A.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement:

Acknowledgments: The authors would like to thank to veterinarians who care for animals in zoos for their help with collecting material.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Roller, M.; Hansen, S.; Knauf-Witzens, T.; Oelemann, W.; Czerny, C.P.; Abd El Wahed, A.; Goethe, R. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Infection in Zoo Animals: A Review of Susceptibility and Disease Process. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 572724. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.572724>.
2. Roller, M.; Hansen, S.; Böhlken-Fascher, S.; Knauf-Witzens, T.; Czerny, C.P.; Goethe, R.; Abd El Wahed, A. Molecular and Serological Footprints of *Mycobacterium avium* Subspecies Infections in Zoo Animals. *Vet. Sci.* **2020**, *7*, 117. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030117>.
3. Pigoli, C.; Garbarino, C.; Ricchi, M.; Bonacina, E.; Gibelli, L.; Grieco, V.; Scaltriti, E.; Roccabianca, P.; Sironi, G.; Russo, S.; Pongolini, S.; Arrigoni, N. Paratuberculosis in Captive Scimitar-Horned Oryxes (*Oryx dammah*). *Animals* **2020**, *10*, 1949. <https://doi.org/10.3390/ani10111949>.
4. Dukes, T.W.; Glover, G.J.; Brooks, B.W.; Duncan, J.R.; Swendrowski, M. Paratuberculosis in saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep. *J. Wildl. Dis.* **1992**, *28*, 161–170. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-28.2.161>.
5. Naylor, A.D.; Richardson, D.; Sellar, M.; Harley, J.; Philbey, A.W.; Girling, S.J. Clinical signs, antemortem diagnostics, and pathological findings associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Mishmi takin (*Budorcas taxicolor taxicolor*). *J. Zoo Wildl. Med.* **2018**, *49*, 412–419. <https://doi.org/10.1638/2017-0215.1>.
6. Hernández-Reyes, A.L.; Chávez-Gris, G.; Maldonado-Castro, E.; Alcaraz-Sosa, L.E.; Díaz-Negrete, M.T. First identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild ruminants in a zoo in Mexico. *Vet. World* **2022**, *15*, 655–661. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.655-661>.
7. Girling, S.; Pizzi, R.; Harley, J.; Richardson, D.; Philbey, A. Diagnosis and management of an outbreak of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a wildlife park in Scotland. International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals/Annual Conference of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Lisbon, Portugal, 1–4 June **2011**.
8. Stevenson, K.; Alvarez, J.; Bakker, D.; Biet, F.; De Juan, L.; Denham, S.; Dimareli, Z.; Dohmann, K.; Gerlach, G.F.; Heron, I.; et al. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 212. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-212>.
9. Vansnick, E.; Vercammen, F.; Bauwens, L.; D’Haese, E.; Nelis, H.; Geysen, D. A survey for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the royal zoological society of Antwerp. *Vet. J.* **2005**, *170*, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.07.006>.
10. Jorge, M.C.; Traversa, M.J.; Schettino, D.M.; Giordano, A.; Etchehoury, I.; Sanz, H.; Romero, C.; Grand, H.; Paolicchi, F.; Romano, M.I. *Lama glama* con signología y lesiones compatibles con paratuberculosis causadas por *Mycobacterium avium* subespecie *avium*. *In Vet* **2008**, *10*, 59–64.
11. Münster, P.; Völkel, I.; von Buchholz, A.; Czerny, C.P. Detection, of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by is 900-based PCR assays from an alpaca (*Vicugna pacos*) kept in a German zoological garden. *J. Zoo Wildl. Med.* **2013**, *44*, 176–180. <https://doi.org/10.1638/1042-7260-44.1.176>.
12. Collins, M.T.; Oosterhuis, J.E. (Eds.). Diagnosis and control of paratuberculosis in exotic hoofed stock. *Proc. Am. Assoc. Zoo Vet.* **1993**, *1993*, 386–387.

13. Bryant, B.; Blyde, D.; Eamens, G.; Whittington, R. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from the feces of a Southern black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) with diarrhea and weight loss. *J. Zoo Wildl. Med.* **2012**, *43*, 391–393. <https://doi.org/10.1638/2010-0161.1>.
14. Münster, P.; Völkel, I.; Wemheuer, W.; Schwarz, D.; Döring, S.; Czerny, C.P. A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS 900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Transbound. Emerg. Dis.* **2013**, *60*, 175–187. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01336.x>.
15. Corn, J.L.; Manning, E.J.; Sreevatsan, S.; Fischer, J.R. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 6963–6967. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6963-6967.2005>.
16. Sweeney, R.W.; Whitlock, R.H.; Rosenberger, A.E. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.* **1992**, *53*, 477–480.
17. Whittington, R.J.; Windsor, P.A. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.* **2009**, *179*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>.
18. Larsen, A.B.; Stalheim, O.H.; Hughes, D.E.; Appell, L.H.; Richards, W.D.; Himes, E.M. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1981**, *179*, 169–171.
19. Barrero-Dominguez, B.; Luque, I.; Huerta, B.; Gomez-Laguna, J.; Galán-Relaño, Á.; Gómez-Gascón, L.; Sánchez, M.; Astorga, R.J. Paratuberculosis in dairy goat flocks from Southern Spain: Risk factors associated with seroprevalence. *Vet. Rec.* **2019**, *185*, 600. <https://doi.org/10.1136/vetrec-2019-105465>.
20. Waddell, L.A.; Rajic, A.; Stärk, K.D.C.; McEwen, S.A. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: A systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol. Infect.* **2015**, *143*, 3135–3157. <https://doi.org/10.1017/S095026881500076X>.
21. Agrawal, G.; Aitken, J.; Hamblin, H.; Collins, M.; Borody, T.J. Putting Crohn's on the MAP: Five Common Questions on the Contribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* to the Pathophysiology of Crohn's Disease. *Dig. Dis. Sci.* **2021**, *66*, 348–358. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06653-0>.
22. Moghadam, M.; Ghaemi, E.A.; Akbari, H.; Razavi Nikoo, H.; Zamani, S. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Hashimoto's thyroiditis: Is MAP the trigger? *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 972929. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.972929>.
23. Sztejn, J.; Liedtke, K.; Wiszniewska-Łaszczyk, A.; Wysok, B.; Wojtacka, J. Isolation and molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from faeces of dairy cows. *Pol. J. Vet. Sci.* **2020**, *23*, 415–422. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2020.134686>.
24. Kaczmarkowska, A.; Didkowska, A.; Brzezińska, S.; Klich, D.; Kwiecień, E.; Dolka, I.; Kociuba, P.; Rzewuska, M.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Anusz, K. Could the type and severity of gross lesions in pig lymph nodes play a role in the detection of *Mycobacterium avium*? *PLoS ONE*. **2022**, *17*, e0269912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269912>.
25. Whittington, R. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*; Behr, M.A., Stevenson, K., Kapur, V., Eds.; CABI International: Wallingford, UK, 2020; pp. 266–304.
26. Moravkova, M.; Mrlik, V.; Parmova, I.; Kriz, P.; Pavlik, I. High incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infection in a zoo population of bongo antelopes (*Tragelaphus eurycerus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **2013**, *25*, 531–534. <https://doi.org/10.1177/1040638713490689>.
27. Radulski, Ł.; Kalicki, M.; Krajewska-Wędzina, M.; Lipiec, M.; Szulowski, K. Pulmonary mycobacteriosis of sitatunga antelope caused by *M. avium* ssp. *hominissuis*. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2022**, *29*, 220–223. <https://doi.org/10.26444/aaem/145158>.
28. Salgado, M.; Aleuy, O.A.; Sevilla, I.A.; Troncoso, E. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a cattle/pudu interface. *Arq. Bras. De Med. Veterinária E Zootec.* **2015**, *67*, 1205–1209. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7530>.
29. Salgado, M.; Herthnek, D.; Bölske, G.; Leiva, S.; Kruze, J. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from wild guanacos (*Lama guanicoe*) on Tierra del Fuego Island. *J. Wildl. Dis.* **2009**, *45*, 295–301. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.295>.
30. Corti, P.; Collado, B.; Salgado, M.; Moraga, C.A.; Radic-Schilling, S.; Tejeda, C.; Ruiz-Aravena, M. Dynamic of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in a domestic-wildlife interface: Domestic sheep and guanaco as reservoir community. *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, e161–e174. <https://doi.org/10.1111/tbed.14277>.
31. Zavgorodnyi, A.I.; Pozmogova, S.A.; Girka, M.A.; Goncharova, N.V. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from zoo animals. *J. Vet. Med. Biotech. Bios.* **2015**, *1*, 17–19.
32. Fecteau, M.E.; Ross, J.; Tennent-Brown, B.S.; Habecker, P.L.; Sreevatsan, S.; Sweeney, R.W.; Whitlock, R.H. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* high shedding in an adult female alpaca, and its implications for the rest of the herd. *J. Vet. Intern. Med.* **2009**, *6*, 1311–1314. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0401.x>.
33. Khol, J.L.; Stein, B.; Dreier, S.; Baumgartner, W. Paratuberculosis (Johne's disease) in small ruminants in Austria. *Slov. Vet. Res.* **2006**, *43*, 129–130.
34. Salem, M.A.; El-Deeb, W.M.; Zaghawa, A.A.; Housawi, F.M.; Alluwaimi, A.M. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Arabian dromedary, camels (*Camelus dromedarius*). *Vet. World* **2019**, *12*, 218–223.

35. Juste, R.A.; Marco, J.C.; Saez de Ocariz, C.; Aduriz, J.J. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **1991**, *28*, 385–390. <https://doi.org/10.1016/0378-113590073-O>.
36. Bruczyńska, M.; Didkowska, A.; Michalski, M.; Brzezińska, S.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Anusz, K. Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland—management and legal implications. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2022**, *29*, 365. <https://doi.org/10.26444/aaem/150007>.
37. Krajewska-Wędzina, M.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Weiner, M.; Szulowski, K. Treatment for active tuberculosis in giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in a Zoo and potential consequences for public health—Case report. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2018**, *25*, 593–595. <https://doi.org/10.26444/aaem/75685>.
38. Didkowska, A.; Krajewska-Wędzina, M.; Klich, D.; Prolejko, K.; Orłowska, B.; Anusz, K. The Risk of False-Positive Serological Results for Paratuberculosis in *Mycobacterium bovis*-Infected Cattle. *Pathogens* **2021**, *10*, 1054. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081054>.
39. Raffo, E.; Steuer, P.; Tomckowiack, C.; Tejeda, C.; Collado, B.; Salgado, M. More insights about the interfering effect of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection on *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) detection in dairy cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* **2020**, *52*, 1479–1485. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02151-2>.
40. Osterstock, J.B.; Fosgate, G.T.; Norby, B.; Manning, E.J.; Collins, M.T.; Roussel, A.J. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2007**, *230*, 896–901. <https://doi.org/10.2460/javma.230.6.896>.
41. Carta, T.; Alvarez, J.; Perez de la Lastra, J.M.; Gortazar, C. Wildlife and paratuberculosis: A review. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *94*, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.002>.
42. Harris, N.B.; Barletta, R.G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 489–512. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.489-512.2001>.
43. Manning, E.J.; Collins, M.T. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* **2001**, *20*, 133–150. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1275>.
44. Stehman, S.M. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **1996**, *12*, 441–455. <https://doi.org/10.1016/S0749-072030416-3>.
45. Clarke, C.J. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp Pathol.* **1997**, *116*, 217–261. <https://doi.org/10.1016/S0021-997580001-1>.
46. More, S.; Bøtner, A.; Butterworth, A.; Calistri, P.; Depner, K.; Edwards, S.; Garin-Bastuji, B.; Good, M.; Schmidt, C.G.; Michel, V.; et al. Ocena wykazu i kategoryzacji chorób zwierząt w ramach ustawy o zdrowiu zwierząt (rozporządzenie (UE) nr 2016/429): Paratuberculosis. *EFSA J.* **2017**, *15*, 4960. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4960>.
47. Anderson, M.E.; Weese, J.S. Video observation of hand hygiene practices at a petting zoo and the impact of hand hygiene interventions. *Epidemiol. Infect.* **2012**, *140*, 182–190. <https://doi.org/10.1017/S095026881100029X>.
48. Marinkovich, M.; Wallace, C.; Morris, P.J.; Rideout, B.; Pye, G.W. Lessons from a retrospective analysis of a 5-yr period of preshipment testing at San Diego Zoo: A risk-based approach to preshipment testing may benefit animal welfare. *J. Zoo Wildl. Med.* **2016**, *47*, 297–300. <https://doi.org/10.1638/2015-0069.1>.
49. Daniels, M.J.; Hutchings, M.R.; Greig, A. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol. Infect.* **2003**, *130*, 561–568. <https://doi.org/10.1017/S0950268803008483>.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

8.2 Oświadczenia współautorów

Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland– management and legal implications.

Warszawa, 02.05.2023 r.

Lek. wet. Małgorzata Bruczyńska

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Michał Michalski, Sylwia Brzezińska, Ewa Augustynowicz - Kopeć, Krzysztof Anusz: Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland– management and legal implications.

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, współudziale w zebraniu materiału, badaniach mikrobiologicznych, opracowaniu wyników i pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 60%

Podpis



Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Anna Didkowska

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, **Anna Didkowska**, Michał Michalski, Sylwia Brzezińska, Ewa Augustynowicz - Kopeć, Krzysztof Anusz: Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland— management and legal implications.

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, współudziale w pobraniu materiału, badaniach mikrobiologicznych, opracowaniu wyników i pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 10 %

Podpis

Anna
Didkowska

Elektronicznie
podpisany przez Anna
Didkowska
Data: 2023.06.05
23:13:09 +02'00'

Warszawa, 02.05.2023 r.

Lek. wet. Michał Michalski

Gabinet Weterynaryjny Michał Michalski

ul. Rdestowa 6/2

81-577 Gdynia

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, **Michał Michalski**, Sylwia Brzezińska, Ewa Augustynowicz - Kopeć, Krzysztof Anusz: Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland– management and legal implications.

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w zebraniu materiału i pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 7 %


Podpis
Michał Michalski
LEKARZ WETERYNARII
SPECJALISTA CHOROBYZ WIEZĄT
NIEUDOLNOŚĆ WIEZĄT
tel. 512 500 117


Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Sylwia Brzezińska
Zakład Mikrobiologii
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
ul. Płocka 26
01-138 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Michał Michalski, **Sylwia Brzezińska**, Ewa Augustynowicz - Kopeć, Krzysztof Anusz: Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland– management and legal implications.

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w badaniach molekularnych i opracowaniu wyników.

Mój wkład procentowy szacuję na 7 %

Podpis 

Warszawa, 02.05.2023 r.

Prof. dr hab. Ewa Augustynowicz – Kopeć
Zakład Mikrobiologii
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
ul. Płocka 26
01-138 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Michał Michalski, Sylwia Brzezińska, **Ewa Augustynowicz - Kopeć**, Krzysztof Anusz: Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland– management and legal implications.

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w badaniach molekularnych i opracowaniu wyników.

Mój wkład procentowy szacuję na 7 %

Podpis

Prof. dr hab. n. med.
Ewa Augustynowicz-Kopeć

KIEROWNICA
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc

Warszawa, 02.05.2023 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Anusz

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

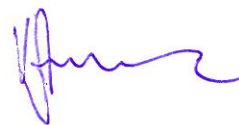
Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Michał Michalski, Sylwia Brzezińska, Ewa Augustynowicz - Kopeć, **Krzysztof Anusz**: Bovine tuberculosis in a Reeves's muntjac (*Muntiacus reevesi*) in a private animal collection in Poland– management and legal implications.

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu pracy, nadzorowaniu prawidłowości prowadzonego badania oraz współudziale w pisaniu i korekcie artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 9 %

Podpis



Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*)
- A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

Warszawa, 02.05.2023 r.

Lek. wet. Małgorzata Bruczyńska
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Andrzej Dzikowski, Michał Rudy, Blanka Orłowska, Mirosław Welz, Monika Krajewska-Wędzina, Wanda Olech, Krzysztof Anusz:
Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) - A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, współudziale w zebraniu materiału i jego analizie, opracowaniu wyników i pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 50%

Podpis



Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Anna Didkowska

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, **Anna Didkowska**, Andrzej Dzikowski, Michał Rudy, Blanka Orłowska, Mirosław Welz, Monika Krajewska-Wędzina, Wanda Olech, Krzysztof Anusz:
Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) - A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania oraz w pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 6 %

Podpis

Anna

Didkowska

Elektronicznie podpisany
przez Anna Didkowska

Data: 2023.06.05

23:15:22 +02'00'

Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Andrzej Dzikowski

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

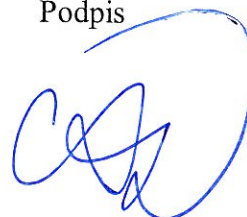
Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, **Andrzej Dzikowski**, Michał Rudy, Blanka Orłowska, Mirosław Welz, Monika Krajewska-Wędzina, Wanda Olech, Krzysztof Anusz:
Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) - A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, zebraniu materiału oraz w pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 7 %

Podpis



Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Michał Rudy
Instytut Prawa SWPS
Uniwersytet Humanistycznospoleczny,
ul. Chodakowska 19/31,
03-815 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Andrzej Dzikowski, **Michał Rudy**, Blanka Orłowska, Mirosław Welz, Monika Krajewska-Wędzina, Wanda Olech, Krzysztof Anusz:
Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) - A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, zebraniu materiału oraz w pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 7 %

Podpis



Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Blanka Orłowska
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Andrzej Dzikowski, Michał Rudy, **Blanka Orłowska**, Mirosław Welz, Monika Krajewska-Wędzina, Wanda Olech, Krzysztof Anusz: Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) - A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania oraz w pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 6 %

Podpis



Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Mirosław Welz
Wojewódzki Inspektor Weterynarii
ul. Piotra Sciegieńskiego 6a
38-400 Krosno

OŚWIADCZENIE

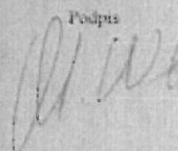
Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Braczyńska, Anna Dufkowska, Andrzej Dzikowski, Michał Rudy, Blanka Orłowska, **Mirosław Welz**, Monika Krajewska-Wedzina, Wanda Olech, Krzysztof Anusz
Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) - A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, zebraniu materiału oraz w pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 5 %

Podpis



Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr hab. Monika Krajewska - Wędzina
Zakład Mikrobiologii
Państwowy Instytut Weterynaryjny
Aleja Partyzantów 57
24-100 Puławy

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Andrzej Dzikowski, Michał Rudy, Blanka Orłowska, Mirosław Welz, **Monika Krajewska-Wędzina**, Wanda Olech, Krzysztof Anusz:
Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) - A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w pisaniu i korekcie artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 6 %

Monika Krajewska - Wędzina

Podpis

Warszawa, 02.05.2023 r.

Prof. dr hab. Wanda Olech

Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8,
02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Andrzej Dzikowski, Michał Rudy, Blanka Orłowska, Mirosław Welz, Monika Krajewska-Wędzina, **Wanda Olech**, Krzysztof Anusz:
Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) - A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w pisaniu i korekcie artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 6 %



Podpis

Warszawa, 02.05.2023 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Anusz

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Andrzej Dzikowski, Michał Rudy, Blanka Orłowska, Mirosław Welz, Monika Krajewska-Wędzina, Wanda Olech, **Krzysztof Anusz**:
Legal Obstacles in the Eradication of Bovine Tuberculosis in European bison (*Bison bonasus*) -A Threat to an Effective Reintroduction Strategy

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, nadzorowaniu prawidłowości prowadzonego badania oraz współudziale w pisaniu i korekcie artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 7 %

Podpis



Mycobacterium avium Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in Poland

Warszawa, 02.05.2023 r.

Lek. wet. Małgorzata Bruczyńska
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Magdalena Nowak, Katarzyna Filip-Hutsch, Mirosław Kalicki, Ewa Augustynowicz - Kopec, Krzysztof Anusz: *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in Poland.

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, współudziale w zebraniu materiału, badaniach mikrobiologicznych, opracowaniu wyników i pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 50%

Podpis



Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Anna Didkowska

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, **Anna Didkowska**, Sylwia Brzezińska, Magdalena Nowak, Katarzyna Filip - Hutsch, Mirosław Kalicki, Ewa Augustynowicz - Kopeć, Krzysztof Anusz: *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in Poland.

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, współudziale w pobraniu materiału, badaniach mikrobiologicznych, opracowaniu wyników i pisaniu artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 9 %

Podpis

Anna
Didkowska

Elektronicznie
podpisany przez Anna
Didkowska
Data: 2023.06.05
23:16:09 +02'00'

Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Sylwia Brzezińska
Zakład Mikrobiologii
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
ul. Płocka 26
01-138 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, **Sylwia Brzezińska**, Magdalena Nowak,
Katarzyna Filip - Hutsch, Mirosław Kalicki, Ewa Augustynowicz - Kopeć, Krzysztof Anusz:
Mycobacterium avium Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in
Poland.

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w badaniach molekularnych
i opracowaniu wyników.

Mój wkład procentowy szacuję na 7 %

Podpis



Warszawa, 02.05.2023 r.

Lek. wet. Magdalena Nowak

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, **Magdalena Nowak**,
Katarzyna Filip - Hutsch, Mirosław Kalicki, Ewa Augustynowicz - Kopeć, Krzysztof Anusz:
Mycobacterium avium Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in
Poland.

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w badaniach mikrobiologicznych

Mój wkład procentowy szacuję na 7 %

Podpis

Nowak Magdalena

Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Katarzyna Filip-Hutsch
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Magdalena Nowak,
Katarzyna Filip - Hutsch, Mirosław Kalicki, Ewa Augustynowicz - Kopeć, Krzysztof
Anusz: *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo
Herbivores in Poland.

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w badaniach mikrobiologicznych

Mój wkład procentowy szacuję na 7 %

Katarzyna Filip-Hutsch
Podpis

Warszawa, 02.05.2023 r.

Dr Mirosław Kalicki
Gdański Ogród Zoologiczny
ul. Karwieńska 3
80-328 Gdańsk

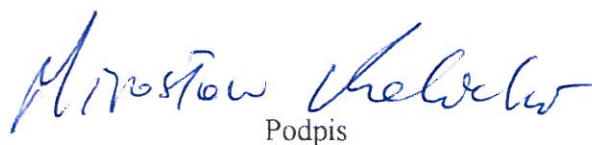
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Magdalena Nowak,
Katarzyna Filip - Hutsch, **Mirosław Kalicki**, Ewa Augustynowicz - Kopeć, Krzysztof
Anusz: *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo
Herbivores in Poland.

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w zebraniu materiału.

Mój wkład procentowy szacuję na 6 %


Podpis

Warszawa, 02.05.2023 r.

Prof. dr hab. Ewa Augustynowicz - Kopec

Zakład Mikrobiologii

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc

ul. Płocka 26

01-138 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Magdalena Nowak, Katarzyna Filip - Hutsch, Mirosław Kalicki, **Ewa Augustynowicz - Kopec**, Krzysztof Anusz: *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in Poland.

mój wkład w jej powstanie polegał na współudziale w badaniach molekularnych i opracowaniu wyników

Mój wkład procentowy szacuję na 6 %

Podpis

Prof. dr hab. n. med.
Ewa Augustynowicz-Kopec

KIEROWNIK
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc

Warszawa, 02.05.2023 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Anusz

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy

Małgorzata Bruczyńska, Anna Didkowska, Sylwia Brzezińska, Magdalena Nowak, Katarzyna Filip - Hutsch, Mirosław Kalicki, Ewa Augustynowicz - Kopeć, **Krzysztof Anusz**: *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Asymptomatic Zoo Herbivores in Poland.

mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji i planu badania, nadzorowaniu prawidłowości prowadzonego badania oraz współudziale w pisaniu i korekcie artykułu.

Mój wkład procentowy szacuję na 8 %

Podpis



Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW

.....*CEBMMG*.....

(podpis autora pracy)

