

FIL/IDF - ref. S. I. 9405

Značaj patogenih mikroorganizama u sirovom mlijeku

R. N. S i n h a, National Dairy Research Institute, Karnal, Haryal, Haryana 132001, India

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

1. Uvod

Robert K o c h (1) je 1882. izolirao *Mycobacterium tuberculosis* što je najvažniji doprinos proučavanju tuberkuloze - vrlo stare bolesti. Uzročnik ove bolesti je gotovo sigurno nanio više patnje i umiranja od bilo koje infekcije bakterijama. Ova se vrsta bakterije smatra patogenom ne samo za ljude već i za mnoge druge životinjske vrste obično vezane uz ljude. Životinje proizvođači mlijeka prve su privukle pozornost u tom pogledu. Ipak tek je poslije 16 godina Theobald S m i t h (2) ukazao na jasnu razliku mikroorganizama uzročnika tuberkuloze životinja proizvođača mlijeka sada poznatih kao *Mycobacterium bovis*. Kasnije su povezana još dva srodnija mikroorganizma *M. africanum* i *M. microti*. *M. africanum* je u Africi izoliran iz ljudi (3) i smatra se da stoji između *M. tuberculosis* i *M. bovis*, dok *M. microti* uzrokuje infekcije glodavaca (4). Sve četiri vrste - *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* i *M. microti* rastu polagano, stvaraju zbijenu nakupinu i označavaju se kao kompleks *M. tuberculosis* (5). 1966. i 1967. predlagao je T s u k a m u r a (6,7) da *M. tuberculosis* i *M. bovis* valja svesti na dvije podvrste jedne vrste, *M. tuberculosis*. Usprkos različitim sličnostima, *M. tuberculosis* i *M. bovis* njihove se zoonoze razlikuju. Opis *M. tuberculosis*, značajnog patogenog mikroorganizma, navodi se u nastavku.

2. Karakteristike

2.1. Morfologija

Navodi se pregled bioloških karakteristika *M. tuberculosis* po kojima se razlikuje od ostalih srodnih mikroorganizama.

Kao što proizlazi iz imena, *M. tuberculosis* napada malu kvržicu u bolesnom tkivu. Mikroorganizam je tanak, ravan ili oblikovan poput biča, dostižući veličinu od 0,3-0,6 x 1-4 µm. Pojavljuje se pojedinačno, u parovima,

često tupast ili kao mali svežnjevi paralelnih štapića. Mokroorganizam nije pokretan, ne stvara spore, ali je znatno otporan prema sušenju. U starim kulturama mogu stanice izrasti u dugačka vlakna, te se granati i bojiti nepravilno, često poprimajući vezane ili oblike poput kuglica. Lako se boji kiselom bojom ili kiselom u alkoholu kako su pokazali Ziehl-Neelsen ili fluorokromni postupak.

2.2. Kultura

M. tuberculosis je aerobni mikroorganizam. Kad se štapići drže u vrlo aerobnim uvjetima, oni se mogu prestati brzo razvijati naglim prelazom u anaerobiozu (8). Ipak, kad mogu rasti i naseliti se zahvaljujući kisiku koji su sami stvorili, oni postaju tolerantni prema nestašici kisika. Rast stimulira inkubacija u zraku kome je dodano 5-10% CO₂. *M. tuberculosis* optimalno raste pri 37-38°C, ali i unutar raspona 30-41°C.

Potrebna je posebna pažnja za uzgoj mikroorganizma u supstratima, jer obični supstrati ne podržavaju njihov rast tijekom početnog izoliranja. Za primarni se rast može koristiti serum krv ili bolje supstrat koji sadrži čitavo jaje ili žumanjak. U podkulturi za rast se mogu koristiti obični supstrati (agar, tekući supstrat ili krumpir) uz dodavanje 5-6% glicerola. Rast je polagan - 10 do 14 dana kao najranije i najkasnije od 6 do 8 tjedana poslije prvotnog inkubiranja. Trajanje generacije in vitro u optimalnim je uvjetima 14-15 sati. Rast nastoji napredovati poput serpentine u skupinama paralelno orijentiranih štapića. Kolonije su hrapave, grube s čvorastom ili naboranom površinom i nepravilnim, tankim rubom. Kolonije mogu postati pigmentirane (od bijelog do blijedo žućkasto ili čak žutog), ali i mikroorganizmi ne ispoljavaju niti fotokromogene niti "skotokromogene" karakteristike. Kolonije na albuminskom agaru s oleinskom kiselinom su ravne, grube, prugaste, suhe i obično bez pigmenta. U tekućim supstratima, koji ne sadrže sredstvo za dispergiranje, stvara se kožica, koja vremenom postaje debela i naborana. U supstratu Dubos albumin Tween, rast je difuzan, obaranje neometano, ali brzo dispergirano.

Kolonije *M. tuberculosis* su obično grube, ali u posljednje jednu do dvije dekade, naročito poslije uvođenja rifampina kao kemoterapeutskog agensa, kolonije sojeva *M. tuberculosis* postaju manje (5). T s u k a m u r a et al. (5) su nedavno izolirali sojeve *M. tuberculosis* koje su se razlikovale od onih izoliranih prije 20 godina.

2.3. Biokemija

Biokemijske reakcije se normalno ne koriste za identifikaciju *M. tuberculosis* (9), ali o njima se zna da posjeduju različite biokemijske aktivnosti po kojima se mogu razlikovati kao što su to pokazala ranija istraživanja (10-16). Informacije o biokemijskim aktivnostima *M. tuberculosis* i srodne vrste tabelarno su prikazane u novijem izdanju Bergey-evog "Manual of Systematic Bacteriology (17)". Sojevi *M. tuberculosis* mogu proizvoditi različite enzime, ureazu, pirazinamidazu, kiselu fosfatazu, esterazu, nikotinamidazu i peroksidazu. Mikroorganizam može reducirati nitrat, hidroliziranjem Tweena 80 tijekom 10 dana i izazvati redukciju telurita za 9 dana. Odolijeva inhibiciji hidrazida izazvanoj tiofenat-2-karboksilne kiseline (1 µg/ml), ali se ne može oduprijeti oleinskoj kiselini (250 µg), pikrinskoj kiselini (2 mg), p-nitrobenzoičnoj kiselini (500 µg). HCl-hidroksilaminu (125 mg), modrom toluidinu (300 µg), etam-butolu (5 µg), p-amino salicikličkoj kiselini (1 µg) ili izoniazidu (1 µg) u 1 ml supstrata za rast. Biokemijske aktivnosti mogu pomoći u otkrivanju *M. tuberculosis*. Na primjer, sve mikrobakterije koje ne izazivaju tuberkulozu mogu rasti na p-nitrobenzoičnoj (PNB) kiselini Ogowa supstrata s jajetom i niacin su negativne. S druge strane, niti jedan od 88 sojeva *M. tuberculosis* nije mogao rasti u supstratu, a 82% *M. tuberculosis* su poslije 4 tjedna bili niacin-pozitivni, dostigavši 96% krajem šestog tjedna (5). Nadalje, jednu ili obe od dvije klase "M" i "T" katalaza proizvode divlji sojevi (18) iako se T klasa enzima može izgubiti u na izoniazid otpornim mutantima (17).

2.4. Serologija

Aglutiniranje i precipitacija su dvije korištene metode. Metoda aglutiniranja temelji na jednom ili više površinskih antigena (peptidoglikolipidi). Reakcije sero-aglutiniranja čitave stanice temelje na peptidoglikolipidskim antigenima površine, obično sojevima koji se razlikuju na intraspecifičnoj razini (19,20).

Komplementarni pokus fiksiranja pozitivan je u znatnoj proporciji utvrđenih slučajeva, ali je obično negativan u ranim ili sumnjivim slučajevima (89). Middlebrook i Dubos (21) su opisali test aglutiniranja krvi koji ovisi o učinku aglutiniranja seruma pacijenta u ovčjim ili skupini 0 humanih crvenih stanica krvi, senzitiviranih antigenim ekstraktom bacila tuberkuloze ili starim trgovačkim tuberkulinom (OT). Stanice se tada izmiješaju s različitim razrijeđenjima seruma pacijenta iz kojih nije

adsorpcijom uklonjeno niti jedno heterofilno antitijelo. Testu se posvetilo dosta pažnje, ali je njegova praktična vrijednost u dijagnozi kliničke tuberkuloze nepouzdana jer mu nedostaje specifičnost i osjetljivost (22).

Metode imunološke precipitacije (imunodifuzija i imunoelektroforeza) većinom su doprinijele klasifikaciji na razini vrste. Najveća je važnost imunodifuzije (ID) te imunoelektroforeze (IE) u samoj klasifikaciji rutinskoj analizi. Analize ID i IE tipa filtrata cijele kulture i ekstrakta stanice su bile korisne za određivanje vrsta unutar roda (23-25) kao što su kvantitativna uspoređivanja preosjetljivih reakcija kože ili pokusnih kunića preosjetljivih na neprerađene filtrate homolognih ili heterolognih mikrobakterija (26). Sero-precipitacijska proučavanja katalaze mikobakterija koristile su se u utvrđivanju imunoloških razdvajanja među vrstama, kao indirektnoj mjeri evolutivnog razdvajanja (18). Na 6oj konferenciji o sistematizaciji roda *Mycobacterium* koju je organizirala Međunarodna radna skupina o taksonomiji *Mycobacteria* (27), naglašena je važnost povećane suradnje na području sero-klasifikacije utemeljene na ID i IE.

Pojavili su se neki novi nalazi (28-32) koji se tiču antigena bjelančevina *M. tuberculosis*. Sastav bjelančevina mikrobakterija u razmjerno grubim pripravcima pročišćenih derivata bjelančevina (PPD) utvrđen u novije vrijeme. Korištenjem modernih oruđa molekularne biologije i tehnologije proučavali su P a t e r r o y et al. (32) bjelančevine *M. tuberculosis* i identificirali više od 20 bjelančevina *M. tuberculosis* pomoću seruma 400 pacijenata koji su bolovali od tuberkuloze kako bi odredili koje bi bjelančevine mogle biti važne za osiguranje od infekcije s *M. tuberculosis*.

2.5. Osjetljivost prema antibiotiku

M. tuberculosis je relativno otporan prema većini iz širokog spektra antibiotika, uz značajne iznimke prema nekoliko poput streptomicina i rifampina. Taj mikroorganizam može također podnijeti vankomicin, cikloserin, kapreomicin, karamicin i neomicin. Navodi se lista MIC doza za neke antibiotike:

<u>Antibiotik</u>	<u>MIC/ml</u>
Streptomicin	0,5-2,5 µg
Rafampin	0,5-1 µg u tekućem i 7H 10 supstratu 5 µg u Loewenstein Jensen supstratu
Cikloserin	10-20 µg
Kapremicin	5-20 µg

3. Izoliranje i identifikacija

Dokazivanje bacila tuberkuloze se u uzorcima mlijeka općenito postiže pomoću četiri navedene metode.

- (1) Mikroskopsko istraživanje
- (2) Metoda uzgoja
- (3) Metoda inokuliranja životinje
- (4) Novije tehnologije

Prednost je mikroskopskog istraživanja neposredno dobivanje rezultata, ali je vjerojatno samo onda uspješno ako je prisutno mnogo bacila, na pr. 105/ml ili više. Mnogo su osjetljivije metode uzgoja i inokuliranja pokusnih kunića i svako otkrivanje samo 10 štapića/ml, ali zbog polaganog rasta mikroorganizma, rezultati tih metoda su dostupni tek poslije više tjedana. Ipak, izoliranje iz kulture je potrebno kad se traži posebna identifikacija ili provjeravanje osjetljivosti prema lijekovima.

3.1. Mikroskopsko istraživanje

Da bi se dokazali bacili tuberkuloze, koriste se boje otporne prema kiselom. Postoje dva tipa takvog bojenja: one što koriste kao osnovne boje fuksina Ziehl-Nielsen - toplo bojenje kiselom bojom (33-35) i K i n y o u n - hladno brzo bojenje kiselim (34, 36, 37) i one što koriste fluorescentne boje poput auramina. Korištenje osnovnih fuksin boja kao Z i e l - N e e l s e n je uobičajeno, ali sad se uočavaju kretanja prema većem korištenju fluorescentnog brzog bojenja kiselim, jer se tako obojeni razmazi mogu brže proučavati, a čini se da su rezultati osjetljiviji od postignutih osnovnim fuksin postupcima. Fluorohramom obojeni razmazi se obično promatraju od 250X do 450X, dok se razmazi obojeni fuksinom proučavaju od 800X do 1000X. Sama razlika u povećanju osigurava očitu uštedu vremena za radnika uz mikroskop. Osim toga, oko laganije uočava žuti štapić koji fluorescira u tamnoj (K-permanganat) ili tamno crvenoj (akridin narandasta) podlozi, nego crven štapić obojen crvenim fuksinom u sredini metilen modre boje.

Za mikroskopsko istraživanje moguće je direktno pripremanje razmaza, ali je primjećeno da 10^5 štapića/ml vrste može osigurati tehničaru 50% mogućnosti da otkrije čak jedan od dva štapića u čitavom razmazu (38). Štapići humanog tipa se mogu naći u mlijeku kad je kontaminirano posebno pljuvačkom, ako mužač ili mljekar boluju od tuberkuloze. Zato što mlijeko obično sadrži samo malo bacila tuberkuloze, oni se koncentriraju centrifugiranjem C o l l e e et al. (39) su preporučivali centrifugiranja 100

ml (ili 50 ml u dva dijela) mlijeka, temeljito promiješanog i raspoređenog pod uvjetima dovoljnim da se istalože bacili tuberkuloze, na primjer, za 30 minuta pri 1500 okretaja. Poslije odvajanja supernatantnog sloja načini se tanak sloj od kapi sedimenta. Taj se razmaz oboji Ziehl Neelsen metodom.

Drugom se metodom stavi uzorak mlijeka u hladnjak tijekom 24h. Mast se izdvoji na površinu s većinom stranih tvari, kao čestica nečistoća, gnoja, leukocita ili čestica tkiva. U tim će se slojevima većinom naći bacili tuberkuloze. Ovi se dijelovi analiziraju bilo odvojeno ili poslije miješanja. Bacili tuberkuloze se prepoznaju zbog otpornosti prema kiselini u obojenim slojevima sedimenta mlijeka. Oni se ne moraju naći, ako ih je malo i ako se nađu valja biti oprezan pri identifikaciji. Postoje mnogi saprofiti otporni prema kiselini koji se mogu naći u mlijeku, a ne razlikuju se lako, s morfološkog gledišta, od bacila tuberkuloze. Često se u vrhnju mogu pojaviti artefakti, koji se zamijene bacilima otpornim prema kiselini. Nakupljanje masnih tvari oko bakterija koje nisu otporne ili drugih malih predmeta također mogu spriječiti nestajanje boje tako da oni kasnije mogu biti slični bakterijama otpornim prema kiselini. Kako bi se izbjegli ti učinci, oplahne se fiksirani tanak sloj otapalom za mast poput etera ili kiselina prije postupka bojenja. Osim pripremanja uzorka, lažni mogu biti posljedica ne pridržavanja normi mikroskopiranja (39).

3.2. Metoda uzgoja

Digestija i dekontaminacija uzoraka mlijeka preduslovi su metode uzgoja patogenog *Mycobacteriuma*.

3.2.1. Digestija i dekontaminiranje

Uzorci mlijeka sadrže mnogo vrsta mikroorganizama. Zbog toga je važno osloboditi uzorak prije inokuliranja supstrata za uzgoj što je moguće više kontaminenata. Opisane su mnoge metode dekontaminiranja digestijom. Njihov uspjeh ovisi o većoj otpornosti bacila prema vrlo alkalnim ili kiselim otopinama. Svi postupci digestije i dekontaminiranja su toksični za mycobacteriae kao i za kontaminente, pa pretjerana digestija može završiti kao znatno smanjenje broja preživjelih mikobakterija. Treba upamtiti da se koristi najblaža moguća metoda digestije i još održi obim kontaminiranja ispod 5%. Da bi se osiguralo obnavljanje maksimalnog broja mikobakterija valja temeljito slijediti pojedinosti postupka digestije. Uspjeh tih postupaka ovisi o relativno većoj otpornosti mikobakterija prema jakim alkaličnim ili kiselim

otopinama za digestiju, trajanju kontakta s agensom, temperaturi izgradnje primjerka za centrifugiranja i efikasnosti centrifuge u taloženju mikobakterija (38).

Lista mješavina digestije i dekontaminacije što se koriste za izoliranje *M. tuberculosis* je prilično dugačka (40-42). Za mlijeko je prihvaćena modificirana metoda Petroff. Metoda uključuje miješanje uzorka s jednakim volumenom 4%-tnog Na-hidroksida i 30 minuta držanja u inkubatoru pri 37°C, te mućkanje svakih 5 minuta. Na kraju inkubacije smjesa se centrifugira 30 minuta (3000 okretaja/minuta), a supernatantna tekućina odlije. Talog se neutralizira 8%-tnom solnom kiselinom koja se dodaje kapaljkom. Reakcija smjese se provjerava dodavanjem kapi fenol crvene otopine u epruvetu, a krajna je točka dostignuta kad indikator požuti. Poslije mikroskopskog pregleda taloga, inokulira se supstrat. Primjetilo se također da izbor kemikalije za dekontaminaciju ovisi o supstratu za uzgoj i vrsti mikobakterija.

Alternativno se uzorci mogu uzgajati u supstratima koji sadrže smjesu antibakterijskih i antifungalnih agenasa koji ometaju rast praktički svih mikroorganizama koj nisu mikobakterije. Od tih se najčešće koristi "koktel Mitschinson" koji sadrži karbenicilin, trimetoprim, polimiksin B i amfotericin (43,44).

3.2.2. Supstrati za uzgoj

Obični supstrati za uzgoj ne moraju biti prikladni za izoliranje *M. tuberculosis*, jer se čini da su njihove prehrambene potrebe kompleksne. Misslebrook i Dubos (45) razvrstali različite supstrate dostupne za uzgoj mikobakterija u tri skupine. Jednostavni sintetski supstrati (na primjer Long-ov sintetski supstrat) koji sadrži mineralne tvari, jednostavne izvore dušika poput amonijaka i glutamata ili asparagina nisu korisni za uzgoj pojedine stanice ili malih inokuluma zbog toksičnosti lipida i masnih kiselina prema tim mikroorganizmima. Supstrati s kompleksnim organskim tvarima kao animalni serum, žumanjak jajeta, ekstrakt škroba ili krumpira (na primjer Lowenstein-Jensen, Petragnani-jevi i Dorset supstrati s jajima) korisni su u uzgoju pojedine stanice ili malih inokula. Taj tip supstrata se koristi za dijagnozu i diferenciranje. Iako se smatra da je dug lanac masnih kiselina toksičan u sintetskim supstratima, koristi se sposobnost (kapacitet) povezivanja serum albumina na masnu kiselinu da se izazove treći tip supstrata (Dubos supstrata albumina oleinske kiseline), koji osim

masne kiseline (oleinske kiseline) i serum albumina sadrži i jednostavne hranjive tvari.

U standardnim metodama koje predlaže "Njemačka komisija za istraživanje mlijeka i mliječnih proizvoda" (46), preporuča se *Petrargnanijev* supstrat za izoliranje bacila tuberkuloze.

Jensen (47) je kratko ocrtao metode izoliranja koristeći L-J supstrat, koji sadrži jaje, glicerol, asparagin, mineralne soli i malahit zelenu boju. Boja ometa razvoj bakterija kontaminirana u primarnoj kulturi te osigurava zelenu podlogu u kojoj su mikobakterije jasnije vidljive. Prema mišljenju *Marksa* (48), ovaj supstrat zadovoljava najviše, ali naglašava važnost kvalitete sastojaka upotrebljenih za supstrat. *Aleksandro* (49) je preporučio *Stonebrinkov* supstrat za uzgajanje *M. tuberculosis* iz mlijeka za rutinskih analiza.

Kad se radi o tekućim supstratima, čini se da su onaj *Dubosa* i *Kirchanaera* bolji od čvrstih supstrata (5). Međutim serum albumin mora biti osnovni sastojak supstrata za početni rast malih inokuluma (51). Preporučalo se dodavanje žumanjka jajeta da bi supstrat postao čvrst za prvi uzgoj (52). Čvrsti supstrat *Dubosa* bolji je za uzorke kojima se dodalo 4% Na-hidroksida i 10% trinatrium fosfata (53). Neki tekući supstrati sadrže sredstva za emulgiranje kao što je Tween 80 ili polioksietilen stearat (POES). Oni vode disperziji rasta kroz čitav supstrat te potiču rast bakterija (54).

3.2.3. Inkubacija

Kubica i *Good* (38) smatraju da na izabranim supstratima valja kulture inkubirati pri 35-37°C i proučavati ih svakog tjedna 6-8 tjedana prije no što ih se može nazvati negativnim. Ploče valja uvijek pregledati i utvrditi da li sadrže mikrokolonije pa ih tek onda baciti. Ako je kultura izrasla, laboratorij treba biti osposobljen da odredi da li je mikroorganizam *M. tuberculosis*. Čim se opazi rast, treba pripremiti razmaz i dokazati da je otporan na kiselo.

3.2.4. Obim rasta

Mikobakterije se grubo mogu svrstati među mikroorganizme koji rastu brzo (pojave se za 7 dana ili ranije). Prilikom prvog izoliranja razlike ne moraju biti jasne. Na primjer, neki mikroorganizmi brzog rasta mogu se najranije pojaviti za 3 ili više tjedana. Za dokaz obima rasta valja pripremiti

podkulturu s dovoljno razrijeđenim inokulumom da bi se razvile izolirane kolonije.

3.2.5 Morfologija kolonija

Mikroskopsko proučavanje agar ploča manjeg povećanja omogućuje promatranje morfologije kolonija, koja je često karakteristika pojedine vrste, na pr. grube zmiјasto izvučene veze *M. tuberculosis* (55, 56). Ako se vide dva različita tipa kolonija treba ukloniti mogućnost postojanja miješane kulture prije izvođenja bilo kakvih drugih testiranja.

3.2.6 Pigment

Proizvodnja pigmenta pomaže diferenciranju mnogih mikobakterija (55, 56). Pigmentiranje je prilično stabilno i na njega obično ne utječu uvjeti uzgoja zbog čega je vrijedno za identifikaciju. Skotokromogeni oblik pigmenta je svijetao i taman. Fotokromogeni mikroorganizmi proizvode pigment samo u prikladnim uvjetima poslije lakog izlagnja. Kulture moraju biti mlade dobro aerirane, a kolonije diskretne. Prilikom tjednog proučavanja kultura valja one, za koje se čini da nisu pigmentirane, izložiti s jasnom ili fluorescentnom svjetlu 1 sat, vratiti u inkubator otpuštene kapice i pregledati drugi dan da bi se utvrdile karakteristike žutog pigmenta fotokromogenosti. Bacili otporni prema kiselom rastu za manje od tjedna, što se smatra brzim rastom. Ako se radi o polaganom rastu ne-kromogene kulture, iza njega slijedi dokazivanje za određivanje *M. tuberculosis*.

Prije konačne identifikacije *M. tuberculosis* valja biti oprezan. Obično se pretpostavlja da se mikobakterija polagana rasta, nepigmentirana, niacin pozitivna može nazivati *M. tuberculosis*. Iako je to većinom točno, postoje i iznimke zbog čega se preporučaju pokusi potpomaganja kako bi podržali primjećivanje pozitivne niacin reakcije. Ovi pokusi su redukcija nitrata i proizvodnja katalaze pri pH7/68°C. Ipak, valja razlikovati neke niacin pozitivne mikobakterije, poput *M. simiae*, *M. chelone* i neke sojeve *M. bovis* (uključujući BCG) od *M. tuberculosis* (57). Postoje i druge mikobakterije, koje mogu biti niacin pozitivne. Zbog toga su mogući neispravni pozitivni rezultati u kontaminiranim kulturama. Obzirom na niacin pokus, nastati mogu i lažne negativne reakcije s *M. tuberculosis* što se izbjegava postupkom koji su predložili Kubica et al. (57).

Izolirana se kultura može kontrolirati obzirom na različite karakteristike uzgoja kako je opisano ranije.

3.3. Pokus cijepjenja životinje

Morsko prase se vrlo lako zarazi uzročnikom tuberkuloze sisavaca i zbog toga prvenstveno koristi za otkrivanje *M. tuberculosis* u mlijeku. Selekcionirano morsko prase ne smije biti laganijeod 350 g, jer malo može podleći utjecaju stranih mikroorganizama koji se mogu naći u mlijeku. Kako bi se izbjegla svaka sumnja o infekciji morskog praseta uzročnikom tuberkuloze, životinju valja intradermalno testirati tuberkulinom.

Morsko se prase cijepi intradermalno sa do 5 ml, ovisno o kvaliteti i starosti mlijeka. Ako je staro i mikroorganizmima vrlo onečišćeno mlijeko može brže izazvati smrt od peritonitisa od mlijeka bolje kvalitete, te se predlaže primjena manjih količina tog mlijeka za izazivanje infekcije. S istim uzorkom valja cijepiti najmanje dvije životinje. Poslije ugibanja životinja, što je to prije moguće, valja oprezno provesti autopsije kako bi se vidjele kazeinske mase u većoj količini peritoneuma i karakteristična oštećenja u jetri, slezeni i plućima. Kad nije jasna priroda oštećenja, valja inokulirati drugu morskuprasad, stavljanjem inokuluma u čvrste mišiće prije no u abdominalnoj šupljini. Tada se infekcija snimi kroz limfatične i organe utrobe. Obično tuberkulozne ozlijede utvrđuju iskusni radnici čak i kad se ne radi o mikroorganizmima otpornim prema kiselini. U sumnjivim slučajevima bacil valja kultivirati u prikladnom supstratu. Zaražene životinje obično pokazuju uznapredovalu bolest s oštećenjima na mnogim unutarnjim organima. Kad se radi s grijanim mlijekom, naći će se samo lokalna infekcija. Takve se životinje pretražuju pažljivo i ako se zaključi da se ne radi o tuberkuloznim oštećenjima, savjetuje se bilo cijepjenje drugih životinja ili uzgajanje bacila. Oštećenja slična onima tuberkuloze mogu se proizvesti u pokusnim životinjama cijepljenjem bilo kojim mikroorganizmom otpornim prema kiselini, ali da bi se proizvelo taj učinak u komparativno znatnom broju valja uvesti mikroorganizme otporne prema kiselini, a mlijeko vjerojatno rijetko, ako uopće, kad je zastupljenost mikroorganizama takva. Kad se sumnja da masna tvar sadrži prema kiselini otporne saprofite, poput vrhnja kao sastojka ubrizganog materijala, povećana je njihova sposobnost stvaranja oštećenja. Da bi se otkrio ovaj tip pseudotuberkuloze, potrebno je materijalom iz rana inficirati drugu morskuprasad. Ako je rana tipa pseudotuberkuloze, životinje se neće zaraziti. I saprofitski se prema kiselini otporni mikroorganizmi također mogu razlikovati njihovim laganim i brzim rastom na supstratima za uzgoj na kojima ne raste uzročnik tuberkuloze.

3.4. Novije tehnologije

Uvedene su mnoge nove, a opozvane su mnoge ranije uvedene tehnologije. Primjena mnogih od tih tehnologija još je u prvim počecima, ali još je potrebno učiniti vrlo mnogo toga kako bi se dramatično izmijenilo identificiranje mikobakterija uključivši *M. tuberculosis*. O tim se tehnikama piše u nastavku.

3.4.1 Radiometrička tehnologija

Rast *M. tuberculosis* i drugih mikobakterija spornog rasta može se utvrditi unutar par dana, korištenjem sustava BACTEC koji upotrebljava supstrat označen s 14C. Budući da uvođenje BACTEC metode osigurava brži obim rasta (prosjeck 9 dana), specifičnu identifikaciju *M. tuberculosis* (5 dana) i brzu mogućnost testiranja (6 dana). Pojednostavljeni radiometrijske tehnike su opisali L a s z l o et al. (58) i Roberts et al. (59).

3.4.2 Genetske sonde

Korištenje tehnologije genetskih sonda nuđa silna obećanja identificiranja mikroorganizama na razini varijeteta - familije, roda, vrste ili podvrste. Najčešća tehnologija sonde je jednostruko rentgenski označena DNA sonda, koja se sada može nabaviti u trgovini. Sonda specifična za genus *Mycobacterium*, ili kompleks *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum* i *M. microti*) koji se mogu koristiti za identificiranje oba roda *Mycobacterium* i *M. tuberculosis* direktno u ispljuvku upravo se proučavaju i ukazuju na to da bi mogla biti korisna. Takav se pristup vjerojatno može razviti i za mlijeko. Identifikacija sondom se provede unutar 2-8 sati, ovisno o broju testiranih uzoraka. Revolucionarna je mogućnost precizne identifikacije *M. tuberculosis* direktno u uzorcima unutar nekoliko sati.

3.4.3 Imunopokus s mikobakterijskim antigenima

Antigeni su otkriveni u tekućim kulturama mikobakterija samo nešto poslije pozitivnog uočavanja radiometrijskog rasta. Korišteni su i enzim vezan u pokusu s imunosorbentom (ELISA) i radioimuno pokus (RIA). Iako su još u pokusnoj fazi, čini se da ovi pokusi daju mogućnost brze identifikacije specifičnih vrsta. Monoklonalna se antitijela mogu koristiti za prijenos specifičnosti za pojedinačne kondenzirane preglede tih pokusa. Imunopokusi točkica-mrlja mogu prepoznati specifične katalaze vrsta.

3.4.4 Serološka dijagnoza tuberkuloze

Mnogi su istraživački laboratoriji pokazali da se ELISA mjerenja IgG antitijela mikobakterijskih antigena mogu koristiti za serološku identifikaciju mikroorganizma. Druge serodijagnostičke tehnike, uključivo RIA inhibiranje monoklonalnih antitijela i lateks aglutiniranje nisu intenzivnije proučavane, ali čini se da obećavaju.

3.4.5 Tipiziranje mikobakteriofaga

Aktivnije korištenje starog oruđa, tipiziranja faga bilo je korisno u otkrivanju laboratorijskog unakrsnog kontaminiranja, istraživanju epidemija tuberkuloze i otkrivanju da li su slučajevi ponavljanja zazvani ponovnom infekcijom ili reaktiviranjem. Ako je pomoć tipiziranja faga moguća za definiranje različitih faga skupina *M. tuberculosis* uključujući tipove A, B i C (60).

3.4.6 Tekuća kromatografija odličnog izvodenja

Drugo je vrijedno oruđe bilo korištenje HPLC za otkrivanje specifičnih vrsta kiselina plijesni, koje proizvode rodovi što sadrže te jedinstvene masne kiseline. Kad se koristi u primarnim izolatima kultura, ova tehnika omogućuje da se identificira vrstu unutar 6-18 sati a ne za 2-6 tjedana obično potrebnih za biokemijsko diferenciranje.

4. Mehanizam kontaminiranja

Tuberkuloza je bolest koja se širi bilo pomoću agenasa koji se primarno pojavljuju na domaćim životinjama lučenjem mlijeka ili pojavom agenasa koji dospjevaju u mlijeko poslije lučenja a infekciju izazovu ljudi ili životinje. U tom kontekstu valja smatrati širenje *M. tuberculosis* bilo kroz bolesno (inficirano) vime ili kontaminiranjem poslije lučenja.

4.1. Zaraženo vime

Konzumiranje sirovog mlijeka je najvažniji put prenosa uzročnika tuberkuloze. G u h a i S a r k a r (61) u pregledu studija tuberkuloze u 224 stada u Kalkuti izvještavaju o posmrtnim istraživanjima u kojima je 4,8% životinja imalo tuberkulozna oštećenja granulomnog tipa u vimenu i dokazan je *M. tuberculosis* s ozlijedama. Uzročnici humane tuberkuloze čini se uvjetuju

kratkotrajne infekcije u stadu (47, 62). U takvim slučajevima stado može izlučivati uzročnika u mlijeku iz prividno zdravog vimena (63,65). Bilo je malo izvještaja o kravama bez simptoma koje su izlučivale virulentan *M. tuberculosis* u mlijeku poslije inokuliranja (66) i prirodne infekcije (67). Nasuprot ovome, relativnu otpornost stada prema humanom tipu bakterije ilustrirao je Schlie sser (65) koji navodi da je poslije intravenozne injekcije takvog bacila u dvije krave, kontinuirana kontrola mlijeka u razdoblju 3 mjeseca mikroskopskom pretragom i inokuliranjem morske prasadi nije otkrila nikakvih uzročnika tuberkuloze. Ipak, u stadu je došlo do pokusne tuberkuloze intravenoznim injiciranjem *M. tuberculosis* što je završilo nizom sindroma perakutne tuberkuloze pluća do progresivne opće tuberkuloze (68). Pojava *M. tuberculosis* u mlijeku čak i ako nema infekcije vimena ne može se isključiti. U jednom je slučaju mlijeko tuberkulin pozitivnih krava sadržavalo čak 110 sojeva uzročnika tuberkuloze humanog tipa (69). Appu s w a m y et al. (70) izvijestili su o prisutnosti *M. tuberculosis* iz tuberkulin pozitivnih muzara. Ovo je možda posljedica činjenice da *M. tuberculosis* rijetko izaziva otvorenu bolest stada, ali dodir s inficiranim radnicima na farmi može dovesti konverziji tuberkulina (67). Ipak, raniji naponi M a l l i c k et al. (71) da izoliraju bacile tuberkuloze iz 101 uzorka sirovog mlijeka pomuzenog iz muzara koje su reagirale na tuberkulin nije bilo uspješno.

4.2. Kontaminacija poslije lučenja

Za *M. tuberculosis* kontaminacija mlijeka poslije lučenja je od najveće važnosti. *M. tuberculosis* može direktno dospjeti u mlijeko od muzača i drugih radnika koji barataju oko mlijeka te može dospjeti do potrošača kao i drugi patogeni iz mlijeka, Ulaz *M. tuberculosis* u mlijeko fekalnim tvarima je također jedna od mogućnosti (72). Mikroorganizam se ne razmnaža u mlijeku. Drugi izvor *M. tuberculosis* je kontaminiranje preko inficiranog osoblja naročito onih koji pate od otvorene tuberkuloze pluća. Uzročnik infekcije se prenosi u kapljici nastaloj na zraku koju su proizveli plućni bolesnici koji kašlju, kišu, govore ili pjevaju. Do njih može doći i manipuliranjem s ranama ili tvarima sekrecije u blizini. Jezgra kapi je malena (1-5 μm) koji promaja u svakom zatvorenom prostoru može održavati u zraku za dugih vremenskih razdoblja. Kad se jednom oslobode domaćina one se dispergiraju u prostoriji, Riley et al. (73) su pokazali da je u prosjeku područje s tuberkuloznim bolesnicima sadržalo jednu infektivnu česticu na svakih

15000-20000 stopa³ zraka. Pacijenti s tuberkulozom grla dispergirali su infekcioznu česticu na svakih 200 stopa³ zraka.

Priroda infekciozne čestice također je bila predmetom nesuglasica. *Cornet* (74) je smatrao da je glavni izvor infekcije prašina, ili to nastaje iz suhe pljuvačke ili odjeća kontaminirana kapljicama izbačenim prilikom kašljanja. *Flugge* (75) s druge strane smatra da su bacili bili rasprostranjeni u obliku vlažnih kapljica koje izbacuju tuberkulozni pacijenti prilikom govora, kašljanja i kihanja. *Wells* (76) je zabilježio da tekući sastav malih kapljica brzo ishlapi, ostavljajući suha "središta kapljica" koja su bila dovoljno malena da ostanu u zraku suspendirana tijekom znatnog razdoblja.

Kolesnik (77) doveo je u korelaciju prisutnost *M. tuberculosis* u mlijeku s prevladavanjem tog mikroorganizma među zaposlenima na farmi.

5. Pojavljivanje

5.1. Zbirno mlijeko

Pojava mikobakterija u mlijeku svraća pozornost javnog zdravstva te planera i administratora zdravlja životinja. *Eissa et al.* (78) je analizirao 45 uzoraka kravljeg mlijeka i 42 uzorka bivoljeg u Egiptu te izolirao samo 2 soja *M. tuberculosis* iz svakog tipa mlijeka. *Nassal* (79) je izvijestio da je u 40 svježe inficiranih stada 4,7% uzoraka mlijeka pomuzenog od takvih muzara sadržalo *M. tuberculosis* humanog tipa. *Donchenco* (80) je 1972. analizirao 248 sastavljenih uzoraka mlijeka i izolirao *M. tuberculosis* samo iz 0,6-1,7% takvih uzoraka. Pojava *M. tuberculosis* je sigurno umanjena zahvaljujući unapređenjem stočarske prakse. Prije 1960-tih u sirovom se mlijeku *M. tuberculosis* uvijek pojavljivao u većem broju (81-83). Primjećeno je da u prosjeku 7% farmi dostavlja mlijeko koje sadrži *M. tuberculosis*. *Kolesnik* (77) je pokazao da je pojava *M. tuberculosis* na farmama za koje se pretpostavljalo da su čiste bila začuđujuće visoka (9,7%). Tijekom analize 356 uzoraka mlijeka s tržišta i mljekara u USSR, *Saulita* (84) je pokazao da su samo 4 uzorka sadržala *M. tuberculosis*.

Izveštaj iz Varšave, Poljska (85) ukazao je da je od 348 uzoraka mlijeka s tržišta 38,5% sadržalo uzročnik tuberkuloze humanog tipa. *Schlieser* i *Unertl* (86) izolirali su 84 soja *M. tuberculosis* iz 572 uzorka sirovog mlijeka uzetih iz kanti, zbirnog mlijeka iz spremnika i kartonskih kutija. U posljednje vrijeme pojava je *M. tuberculosis* u sirovom mlijeku relativno

manja. Appuswamy et al. (70) su 1980. analizirali 308 uzoraka sirovog mlijeka s organiziranih farmi i mlijaka s tržišta i otkrili 3 soja *M. tuberculosis*.

5.2. Mliječni proizvodi

Pojava *M. tuberculosis* u sirovom mlijeku je dobro utvrđena, a nekoliko pregleda dovelo je otkrivanju njegova prisustva u mliječnim proizvodima.

G u i n d i et al. (87) izvijestili da niti jedan od 300 uzoraka mliječnih proizvoda nije sadržao *M. tuberculosis*. Ali 1959. K a t r a n d z h i e v (88) primijetio je da su od 105 uzoraka maslaca tri sadržala *M. tuberculosis*. Prema D a v i s-u (89) *M. tuberculosis* se nalazi u sirovoj smjesi za sladoled od svježih ili nedovoljno zagrijavanih sastojaka mliječnih proizvoda i preživjet će u smrznutom i tvrdom sladoledu osim ako je smjesa učinkovito pasterizirana. Osim toga, najbolji sladoled, onaj od vrhnja, punomasnog mlijeka tid. najvjerojatnije je tip koji će udomiti patogene. Od svih mliječnih proizvoda siru je posvećeno najviše pažnje obzirom na prisutnost *M. tuberculosis*. Ako antibiotici koje u siru proizvode neki mikroorganizmi zrenja ili plijesni (90, 91) ne igraju ulogu, može se očekivati dugotrajno preživljavanje *M. tuberculosis*. Na taj mikroorganizam, zbog otpornosti, vjerojatno manje utječe pH sira.

H a m m e r i B a b e l (92) navode pregled izvještaja o preživljavanju *M. tuberculosis* u nizu vrsta sira te su zaključili da je tip sira bio činilac koji je utjecao na preživljavanje. Sir kontaminiran s *M. tuberculosis* bio je izazivač infekcije poslije 180 dana (Camembert), 220 dana (Cheddar) i 305 dana (Tilsit). H a h n (93) također je izvijestio da je životna sposobnost *M. tuberculosis* znatno varirala u različitim sirevima. Virulentni su mikroorganizmi bili prisutni u Camembert-u i edamcu poslije dva i više mjeseci. U siru ementalcu opao je broj bacila tuberkuloze poslije grijanja gruš pri 55°C. H a h n (93) je analizirao šest ementalaca pripremljenih iz umjetno inficiranog mlijeka, jedan od njih je izazvao tuberkulozu 8 morske prasadi inficirane poslije 3 mjeseca zrenja. I o t o v i T o d o r o v (94) su otkrili virulentne uzročnike tuberkuloze u bugarskom bijelom siru od umjetno inficiranog mlijeka poslije 120 dana skladištenja. M e y e r et al. (90) izvještavaju da su zamijetili opadanje broja uzročnika tuberkuloze tijekom prva 4 tjedna zrenja ementalca i grijera i brzi rast bakterija propionske kiseline koje su proizvodile aktivnu bakterijsku tvar protiv uzročnika tuberkuloze. Proizvodnja plavog sira od mlijeka inficiranog umjetno s *M. tuberculosis* u količini 10^4 /ml otkrilo je opadanje broja mikroorganizama tijekom zrenja,

naročito tijekom prvog i drugog tjedna, ali bio je još prisutan poslije 3-4 mjeseca.

Pregled Obigera et al. (95) konstatira da francuske vrste mekog sira nisu ukazale na prisustvo *M. tuberculosis* i potvrđeno je da njemački potrošači nisu bili u opasnosti od zaraze tuberkulozom francuskim mekim sirom.

6. Patogenost za čovjeka i simptomi

Tuberkuloza se javlja u svim starosnim skupinama ljudi. Teško je naznačiti koliko mlijeko i životinje proizvođači mlijeka doprinose morbidnosti i smrtnosti ljudi, ali uzročnik tuberkuloze koga ima i u mlijeku može izazvati oboljenje gotovo svakog organa. Kao rezultat primarne tuberkuloze obična su mjesta infekcije tonzile, limfni čvorovi, bubrezi, reproduktivni organi te skeletni i gastrointestinalni sustavi. Oštećenje izazvano u organu primarno je središte pa se o njemu, zajedno s infekcijom područnih limfnih čvorova, izvještava kao o "primarnom kompleksu". U nekim je slučajevima, naročito u infekciji tonzila, primarni fokus vrlo malen, a jedino su vidljivi prošireni limfni čvorovi. Limfni čvor se češće pojavljuje kod djece nego kod odraslih i veći je. Neovisno o načinu prenošenja, češće se javlja infekcija pluća, a postoji sklonost da se tuberkulozne bolesti svrstava kao plućne i izvan pluća.

6.1. Plućna tuberkuloza

Bolest je uvijek kronična. Obično nema simptoma ili se rentgenske promjene vežu s prvim naseljavanjem uzročnika tuberkuloze u pluća čovjeka. Tako inficirane osobe se obično ne otkriju osim ako ih ne otkriju programi testiranja kože tuberkulinom.

Približno 5-10% primarno zaraženih osoba razvije kliničku tuberkulozu unutar 2 godine. Razdoblje inkubacije vrlo varira i može se protegnuti od nekoliko tjedana do više mjeseci. Simptomi ovise o napadnutom organu, a domaćin reagira na infekciju. Kad se pojave crvene kvržice na koži, znak je da je do infekcije došlo nedavno. Dodatnih 5-10% primarno zaraženih osoba oboli jednom kasnije u životu. Nastup bolesti je obično podmukao, a patogeni procesi mogu napredovati u veće dijelove jednog ili oba pluća prije no što simptomi postanu dovoljno oštri da navedu bolesnika da potraži liječnika. Najranije pritužbe su slabost, gubitak težine i kašalj. Može se pojaviti i groznica, iako prikrivena, a na nju valja sumnjati kad se javi noćno znojenje. Ako se javlja pljuvačka, ona može biti zelena, žuta ili krvava. Obilno pljuvanje krvi ili manje količine gotovo čiste krvi također se mogu vidjeti u pljuvački.

Bol u grudima ili bol porebrice mogu se pojaviti čak i kad nema infuzije porebrice. Depresija, bol u trbušnoj šupljini, gubljenje težine, kao i glavobolja pojavljuju se u različitim kombinacijama i mogu biti toliko znatne da ih ni kliničar neće smatrati primarnim poremećajem pluća. Anemija žena može biti dovoljno signifikantna da izazove prekid menstruacije. Poteškoća disanja, izazvane oštećenjem funkcije pluća primjećena je kod pacijenata s plućnom tuberkulozom i povezana je s razaranjem parenhima pluća izazvanog bilo procesom nekroze bilo plućnom groznicom, emfizemom ili bronhitisom, koji se često otkrivaju.

U rijetkim slučajevima pacijent boluje od tuberkulozne upale pluća s višim groznicama, slabosti, teškim disanjem i krajnom toksičnosti. Često se primjećuje izostajanje disanja. Taj oblik bolesti rezultat je širenja uzročnika tuberkuloze bronhija iz sirastog područja u kome je došlo do pretvaranja u tekuće stanje. Poteškoća s larinksom, velikih bronhijama i mukoznim membranama širokih puteva za zrak gotovo uvijek je povezana s ekstenzivnim plućnim poteškoćama i stvaranjem praznina. Do plućnog izlivanja može doći bilo kada u toku bolesti. Ako do toga dođe neposredno poslije početne infekcije radiografskim pregledom grudi ne mora se otkriti teškoća pluća. Bacili u pljuvački mogu izazvati tuberkulozne čireve u grlu, ustima, gastrointestinalnom traktu i na čmaru.

6.2. Tuberkuloza izvan pluća

Kožni tuberkulin test može biti negativan. Groznica nepoznatog porijekla može biti tuberkuloza izvan pluća i govori se da se javlja u 10% bolesnika. Može se opaziti i niz hematoloških anomalija.

Bolesnici se genitalno-urinarnom tuberkulozom obično mokre češće, teško, krvavo ili bolno, ali niz tih pacijenata nema simptoma vezanih uz mokraćni trakt.

Tuberkulozni peritonitis obično izaziva manje od 5% svih slučajeva perikarditisa i ne pokazuje znakove ili simptome po kojima bi se razlikovala od ostalih akutnih i kroničnih perikarditisa. Teško disanje, otečeni zglobovi, kašalj i bol u grudima obično su razlog žalbe.

Rani simptomi bolesnika od tuberkuloznog meningitisa su glavobolja, mentalne promjene i groznica.

Milijarna tuberkuloza kakva je bila primijećena u razvijenim zemljama češće se javlja kod odraslih nego kod djece, ali obratan je slučaj u zemljama

u razvoju. Ona je vrlo dobro poznat uzročnik zamršene groznice. Drugi simptomi nisu specifični i uključuju gubitak težine, noćno znojenje, glavobolju i bol u abdomenu.

Tuberkuloza ljudi je vrlo varijabilna u kliničkim očitovanjima, ali ipak postoji osnovni slijed događaja kako o tome referira *Wallgren* (96) kao o "rasporedu sati tuberkuloze".

7. Epidemiologija

Tri indikatora korištena u utvrđivanju i ocijeni epidemiološkog statusa tuberkuloze u različitim fazama njegova razvoja su omjer smrti, obim okolnosti tuberkuloze te pojava i uzimanje maha bolesti u posljednje vrijeme.

Tuberkuloza se još uvijek stavlja u red glavnih uzročnika smrti među zaraznim i parazitarnim bolestima. Podaci koje je prikupio *Lowell* (97) ukazali su da je tijekom 1971.-1972. tuberkuloza bila četvrti vodeći uzrok smrti u zemljama područja jugo-istočne Azije, dok je u Europi bila na 13-om mjestu. Svjetski omjeri smrtnosti tuberkuloze djece mlađe od 5 godina dostizala je od 0,1 na 100.000 populacije u Kanadi, Nizozemskoj i Mađarskoj do izvanredno visokog omjera od 17,2 u Filipinima i 18,5 u Peru gdje je zabilježen najviši omjer. Uz malo iznimaka bio je odnos smrti dva ili više puta veći za muškarce nego za žene. Ova bolest uzrokom je bar 3 milijuna smrti svake godine. Od 20 milijuna slučajeva tuberkuloze u svijetu godišnje se pojavi jedan milijun novih slučajeva svake godine. Najveći omjer pojave tuberkuloze u svijetu i dalje se navodi za zemlje Azije i otoka u Pacifiku. Omjeri su za te predjele dostigli nevjerojatno visoke razine od 300-500 na 100.000 populacije (*Macuo* 523,7, *Burma* 450,0, *Filipini* 337,4, *Republika Koreja* 313,1, *Istočni Tima* 312,7). U nizu afričkih zemalja omjeri su također vrlo visoki (*Swaziland*, *Lesotho*, 163,5, *Combros* 174,2). Najniži omjeri pojave tuberkuloze zabilježeni su za zemlje u kojima se uspješno primjenjuju mjere kontrole bolesti niz godina (*Australija* 11,6, *Danska* 13,6, *Nizozemska* 18,7, *Kanada* 18,3). Ovi se podaci odnose većinom na godinu 1971. Godina 1980. izvještava se o 27.669 slučajeva tuberkuloze u SAD, a omjer je bio 12,6 na 100.000 populacije. Daljnje opadanje slučajeva tuberkuloze primijećeno je 1990. i navodi se broj oko 13.604. Prema izvještaju *CDCMMWR* (98) procjena pojave i omjer smrtnosti svih oblika tuberkuloze u zemljama u razvoju bio je:

Geografska lokacija	Procjenjen omjer na 100.000 populacije	Smrt
Afrika ispod Sahare	229	104
Istočna i Južna Azija	174	58
Sjeverna Afrika i Zapadna Azija	120	37
Južna Amerika	120	42
Centralna Amerika i Karibi	120	57
Ukupno	171	61

Geografski su predjeli s najviše obima infekcije istočni rub Azije, indijski podkontinent, jugo-istočni dijelovi Afrike, jugo-istočna Europa.

Prije uvođenja učinkovitih lijekova, godišnji obim pomora od tuberkuloze bio je dobar indikator pojave bolesti, ali poslije uvođenja kemoterapije pažnja je skrenula otkrivanju slučajeva aktivne tuberkuloze analizom pljuvačke i radiografijom mase. U skladu s tim sad se epidemiološke studije temelje obično na određivanju "godišnjeg obima infekcije" ili "godišnjeg rizika infekcije". Pregledi testiranja tuberkulinom u Stuttgartu navode da je rizik infekcije oko 0,3 na 1.000 djece.

Ako ne postoji specifičan program kontrole tuberkuloze na pojavu bolesti mogu utjecati mnogi faktori uključujući gustoću populacije, obim pretrpanosti i opći životni standard te brigu o zdravlju.

Pojava tuberkuloze osoba koje su tuberkulin pozitivne, odnosno, koje su prethodno bile u kontaktu s *M. tuberculosis* je veći među onima izloženim izvorima infekcije nego među onima koji to nisu bili, što ukazuje da je moguća ponovna infekcija (99). Osim toga, sojevi otporni prema lijeku se nekada izoliraju iz neliječenih bolesnika koji su prvu infekciju zadobili prije unosa antituberkuloznih agenasa (100) i bakterija različitih tipova faga koje se izoliraju tijekom uzastopnih napada tuberkuloze na istog pacijenta (101).

Neke epidemiološke studije ukazuju da su mnogi slučajevi poslije primarne tuberkuloze izazvani endogenim reaktiviranjem (102). Canetti (103) ističe da je u zemljama s malo tuberkuloze većina slučajeva kasnije tuberkuloze vjerojatno endogenog porijekla (104). U takvim se područjima većina infekcija desi djeci, a slučajevi odraslih su gotovo svi uzrokovani kasnijim infekcijama. Kad bolest prevladava u takvim područjima ona se ubrzo reducira antituberkuloznom kampanjom te pojava tuberkuloze odraslih začudo opada (105).

Osobe koje potiskuju imunost izložene su riziku oboljenja od tuberkuloze. Oni uključuju primaoce transplantata, oboljele od maligne bolesti i, u novije vrijeme, one sa sindromom stečenog nedostatka imuniteta (AIDS) (106,107).

Manje tuberkuloze u zajednici vjerojatno je rezultat umanjene svijesti o bolesti. U jednom britanskom pregledu (108) smatra se da je nedovoljna medicinska pažnja doprinjela u 149 od 263 slučaja smrti od tuberkuloze. Propust dijagnoziranja tuberkuloze još uvijek vodi nepotrebnim umiranjima.

8. Terapija

Liječenje tuberkuloznih pacijenata kemoterapijom i povećanje zaštite domaćina su važne linije pristupa koje valja izvoditi pod medicinskim nadzorom.

8.1. Kemoterapija

Uvođenjem kemoterapije postale su infekcije s *M. tuberculosis* izlječive, a mogle su se i predusresti. Tvrdi da se redovna kemoterapija standardnim lijekovima pod strogim nadzorom liječnika može biti 100% uspješna za pacijente s osjetljivim bacilom tuberkuloze prema upotrebljenom lijeku.

Lijekovi koji se upotrebljavaju protiv tuberkuloze su rifampin, izoniazid, pirazinamid, streptomycin, etambutol i tiacetazon. Drugi, koji se koriste rjeđe uključuju etionamid, cikloserin, kapreomicin, kanamicin, viomicin i paraminsku salicilnu kiselinu (PAS).

8.2. Povećane obrane domaćina

Kako tuberkuloza prevladava među ljudima podvrgnutim prevelikim naporima te nedovoljno ishranjenim, dobar je prehrabeni program najbolji pristup povećanju otpornosti tih ljudi. Dopuna ishrane multivitaminima se obično primjenjuje za takve bolesnike. Ipak, uloga nekih fermentiranih mlijeka s inhibitornim utjecajem na *M. tuberculosis* bila je povodom mnogim radnicima da savjetuju konzumiranje tih proizvoda (109-115). Jedno je proučavanje označilo da je antituberkulozni faktor izoliran iz sirutke u prirodi lipofilan (111). Većina proučavanja antituberkuloznog faktora koncentrirana je na acidofilno mlijeko, sirutku, mliječnu kiselinu i kumis. U usporedbi između acidofilus sirutke i mliječne kiseline je prvo bilo učinkovito. Također se primijetilo da morska prasid hranjena acidofilnim mlijekom 10-12 dana prije intramuskularne injekcije *M. tuberculosis* oboljela od opće, ali manje oštre tuberkuloze od kontrolnih životinja koje nisu hranili acidofilnim mlijekom.

U proučavanjima antibiotskog djelovanja *Lactobacillus acidophilus* na *M. tuberculosis* Tomić - Karović et al. (112) su zaključili da acidofilna

sirutka in vitro djeluje jače baktericidno od acidofilnog mlijeka. I acidofilna sirutka i acidofilno mlijeko in vivo djeluju inhibicijski na *M. tuberculosis*. Čini se da je baktericidna snaga ovisna o soju mikobakterija. Primjetilo se u prisustvu jogurta ugibaju humani i bovini tipovi unutar 8 sati dok sojevi tipa peradi nisu stradali.

Među tipovima fermentiranih mlijeka antituberkulozno je svojstvo smješteno oko kumisa. Tvrđilo se da tip kvasca, naime, *Candida*, što se koristi za vrenje mogao bi biti važniji u usporedbi s tipom mlijeka za komis (110). Goldstein et al. (114) proučavali su utjecaj kumisa u ishrani na metabolizam vitamina i aktivnosti serum transaminaze bolesnika s plućnom tuberkulozom. Zaključili su da kumis (bilo od kravljeg ili bivoljeg mlijeka) kao terapija ispravlja nenormalnosti vitamina koje se javljaju u tuberkuloznim pacijentima. Kumis od kravljeg mlijeka čak u razrijeđenju 1:320 kočio je rast *M. tuberculosis*. Shamling et al. (116) naglašavaju da kumis dobro toleriran, signifikantno poboljšava zdravlje bolesnika i umanjuje popratne učinke izazvane aktivnošću bakterija. Preporučavalo se da se koristi kao jedno od sredstava u ranim fazama kompleksnog liječenja pacijenata oboljelih od plućne tuberkuloze. Kumis od kozjeg mlijeka pripremljen cijepljenjem *Lactobacillus acidophilus* i *Saccharomyces fragilis* povećali su težinu tijela četiri pacijenta oboljela od plućne tuberkuloze (117). U tom proučavanju je davanje kumisa poboljšalo obim sedimentacije eritrocita te broj R.B.C. i W.B.C. u krvi.

9. Kontrola i sprečavanje

Iako mikroorganizam raste polagano, uvjetuje tvrdoglavu infekciju. Zbog toga je trebalo prihvatiti sprečavanje i kontrolu ove bolesti svojstvenim nadzorom i svladavanjem mikroorganizma. Ipak, ishod ovisi o socijalno-ekonomskim činiocima.

9.1. Opća higijena

Tuberkuloza se najviše pojavljuje u siromašnijim urbanim sredinama koje su pretrpane, gdje je smještaj u kućama loš, a prehrana loša. Ali čak i u tim sredinama infekcije su češće u obiteljima u kojima je zaražen jedan odrastao. Ipak, javnost valja podučiti da je rano raspoznavanje tuberkuloze pluća (kašalj koji ne prestaje, pljuvanje, nekad pljuvanje krvi, groznica i znojenje) ima prednosti i za bolesnika i za njegovu obitelj. Izbjegavanje

otvorenog kašljanja ili pljuvanja sada je postalo dobra praksa. Dobri higijenski standardi, osvjetljenje i zračenje moraju se uzeti u obzir.

Za usvajanje higijenskih mjera prema mljekarskim pretpostavkama valja promatrati prijenos *M. tuberculosis* kapljicama iz zraka. Zbog toga su tehnike kojima se umanjuje broj kapljica u sobnom zraku učinkovite u sprečavanju prenosa tuberkuloze zrakom. Provjetravanje svježim zrakom naročito je važno, a poželjno je 6 ili više izmjena zraka u satu. Mehaničko prozračivanje i ultravioletno osvjetljavanje su metode kontroliranja zraka (118,119). Broj živih štapića tuberkuloze u zraku moguće je tako smanjiti u gornjem dijelu sobe.

Učinkovita antituberkulozna kemoterapija smanjuje broj oslobođenih bacila u zraku smanjivanjem broja mikroorganizama u pljuvački i učestalosti kašljanja. Pokrivanjem usta i nosa papirnom maramicom prilikom kašljanja ili kihanja ili još učinkovitije maskom, dobra je praksa za smanjivanje broja mikroorganizama koji bi se mogli rasprostirati kapljicama dospjelim u zrak. Kad se koriste maske, one se moraju proizvesti tako da filtriraju kapljice i oblikovane tako da temeljito prijanjaju uz nos i usta.

Slučajevi pronalaza tuberkulinskim testiranjem mogu stvarati temelj mjera sprečavanja i koristiti u prekidanju lanca prenošenja tuberkuloze. *M a n t o u x* ili *H e a f* pokus korištenjem derivata pročišćene bjelančevine (PPD) izvodi se pomoću tih autoriteta. Testiranje tuberkulinom pokazalo se vrlo korisnim u pregledu pojavljivanja u populaciji ljudi, naročito među djecom prije masovnog cijepljenja BCG. *H o r n e* (120) je savjetovao masovnu i selektivnu radiografiju za otkrivanje subliničkih T.B. slučajeva. Selektivne skupine su bile karakterizirane kao skupina s velikim prinosom, opasna skupina i posebna skupina. Prva skupina uključuje opće medicinske i veterinarske praktičare, koji dolaze u dodir sa slučajevima infekcije, stanovnikom kuća za smještaj, zatvorenicima i imigrantima. Opasna skupina uključuje liječnike, medicinske sestre, zdravstvene pomoćnike, osoblje mikrobiološkog i patološkog laboratorija, mrtvozornike, javne transportne radnike, osobe u službi proizvodnje, prerade, skladištenja i distribucije mlijeka do osoblja koje barata hranom. Rentgenski pregledi specijalnih skupina poput populacije lokalizirane epidemije i odrasli preko 45 godina starosti u zajednicama s visokom zastupljenosti bolesti također su zastupljeni (120).

Bolesnici s otvorenom tuberkulozom trebaju se njegovati u standardnim uvjetima izolacije dok pljuvačka ne postane negativna za bacile otporne prema kiselinu. Tek poslije toga bolesniku se može dopustiti kućno liječenje kemoterapijom.

9.2. Dezinfekcija

Bilo je pokušaja razaranja *M. tuberculosis* fizičkim i kemijskim sredstvima. Svjetlost razara kulture tijekom 2 sata. Tuberkulozni proizvodi sušeni u odjeći i izloženi dobrom danjem svjetlu 30 sati ne mogu zaraziti morsku prasad. Ultravioletne zrake brzo ubijaju mikroorganizam. Sušenje u obično osvijetljenoj sobi je fatalno za oko 40 dana. Mikroorganizam je vrlo otporan prema kemijskim dezinficijensima i izdržava izlaganje 5%-tnom fenolu nekoliko sati. Vodikov superoksid se smatrao letalnim (121). Mikobakterije je dobro sterilizirao klor, kloramin, Na-sol dikloroisotiocianove kiseline u znatnim dozama (122).

9.3. Hlađenje mlijeka

M. tuberculosis ne izumire u mlijeku držanom pri niskim temperaturama tijekom duljih razdoblja (123). Istovremeno mlijeko ne sadrži sastojke koji bi pogodovali rastu *M. tuberculosis* i mnogim mikroorganizmima koji djeluju jedni na druge i pojavljuju se u mlijeku te mogu vrlo brzo prerasti ostale. Vrlo dugo trajanje generacije *M. tuberculosis* je dobro poznato. Zato što mikroorganizam ostaje živ u mlijeku on se nalazi živ u mliječnim proizvodima poput sira i maslaca proizvedenim od njega. U tim proizvodima *M. tuberculosis* može ostati živ nekoliko tjedana.

9.4. Zagrijavanje mlijeka

U doba pripremanja standarda pasterizacije *M. tuberculosis* se smatrao najotpornijim patogenim mikroorganizmom koji je vjerojatno prisutan. Zato je postupak zagrijavanja (kombinacija trajanje-temperatura) potreban za uništenje bacila tuberkuloze prvi određeni faktor pri postavljanju standarda pasterizacije. Napor koje su poduzeli North i Park (124) u propisivanju postupka zagrijavanja za razaranja *M. tuberculosis* bilo signifikantno. Na temelju svojih proučavanja, zaključili su da je minimalna potrebna temperatura 142°F/30 minuta dozvoljavala dovoljno sigurnosti u odnosu na razaranja *M. tuberculosis*.

Za HTST pasterizaciju koja se sad općenito koristi, u razvoju odgovarajućih mehanizama koji mogu osigurati prikladan postupak za svaku česticu mlijeka izazvalo je nesklonost dijela službenika u kontroli mlijeka prihvaćanju metode. To je nešto otklonilo rano prihvatanje.

Efikasnost razaranja *M. tuberculosis* pasterizacijom kombiniranjem trajanja-temperature provjeravano je bilo uzgojnom ili biološkom metodom

(125-127). Općenita je suglasnost proizašla iz činjenice da pasterizacija bilo LTLT i HTST, ako je propisno provedena, razara *M. tuberculosis* (127). Pasterizacija mlijeka LTLT postupkom smatrala se nešto učinkovitijom od HTST (128).

Razaranje *M. tuberculosis* u vodi ili mlijeku smatra se identičnim prema izvještajima (129). *M. tuberculosis* H 37 RV kada je grijan u sterilnom mlijeku u epruveti pri 62,8°C 30 minuta ili pri 71,7°C tijekom 15 sekundi nije preživio (130). Čini se da je sustav mlijeka važan za razaranje *M. tuberculosis*. Donchenko et al. (131) preporučuju za mlijeko deve nešto intenzivnije zagrijavanje (85°C/30 min ili vrenje mlijeka tijekom 5 minuta) za uništavanje *M. tuberculosis*. Povećanjem koncentracije vrhnja (do 45%) u mlijeku završilo je preživljavanjem *M. tuberculosis* H 37 RV (132). Filtriranje mlijeka za pasterizaciju smatralo se važnim korakom u uklanjanju *M. tuberculosis*. Nefiltrirano mlijeko uvjetovalo je 100%-tnu infekciju morskog praseta, nakon što je zagrijavano 2-20 sekundi pri 70°C. P a v l a s (133) je ranije smatrao da je u prirodno kontaminiranom mlijeku koje nije bilo organoleptički bez primjedbe i koje je sadržalo pahuljice, bacil tuberkuloze bio otporan prema zagrijavanju 60 sekundi pri 85°C. Zbog toga su uklanjanje grubih nečistoća iz mlijeka i odbijanje organoleptički anormalnog mlijeka bitne mjere učinkovitog izdvajanja uzročnika tuberkuloze iz trgovačkog pasteriziranog mlijeka. Pribavljanje mlijeka dobre kvalitete dovelo je razaranju uzročnika tuberkuloze HTST pasterizacijom mlijeka (128) pa se navodi da preživljavanje bacila tuberkuloze može biti posljedica njihovog zaštićivanja tijekom zagrijavanja flokuliranim bjelančevinama i povećanom zastupljenosti somatskih stanica u mlijeku krava koje boluju od tuberkuloze.

Prilikom pasterizacije valja jamčiti potrebnu opreznost:

I Neispravna ili manje stroga pasterizacija zbog grešaka u mjerenju trajanja, naročito kada su intervali izlaganja kratki pri temperaturama iznad 65,6°C.

II Nedovoljno miješanje koje dozvoljava stvaranje opne (denaturirane bjelančevine) na površini mlijeka dozvoljava zaštitu stanica uključenih u opne.

III Neuspjeh u održavanju temperature pjene na površini mlijeka.

Literatura

- 1 Koch, R. Die Aetiologie der Tuberculose, Berlin Klin. Wchschr. 19:220-221 (1882). In: G.P. Kubica & L.G. Wayne (Editors), The Mycobacteria - A Source Book. Marcel Dekker Inc., New York (1984).
- 2 Smith, T. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. J. Exp. Med. 3:451-511 (1898).

- 3 Thorel, M.F. Isolation of *Mycobacterium africanum* from a monkey. *Tubercle* 61: 101-104 (1980).
- 4 Wells, A. & Oxan, D. Tuberculosis in wild voles. *Lancet* 1:1221 (1961).
- 5 Tsukamura, M., Mizuno, S. & Toyama, H. Taxonomic studies on the *Mycobacterium tuberculosis* series. *Microbiol. Immunol.* 29:285-299 (1985).
- 6 Tsukamura, M. Adansonian classification of mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 45: 253-273 (1966).
- 7 Tsukamura, M. Identification of mycobacteria. *Tubercle* 48: 311-338 (1967).
- 8 Wayne, L.C., & Lin, K.Y. Glyoxylate metabolism and adoption of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect. Immunol.* 3: 1042-1049 (1982).
- 9 Cruickshank, R. *Medical Microbiology. A Guide to the Laboratory Diagnosis and Control and Infection*, 11th edition. E&S Livingstone Ltd., Great Britain (1969).
- 10 Kubica, G.P. & Rigdon, A.L. The arylsulfatase activity of acid-fast bacilli. III. Preliminary investigation of rapidly growing acid-fast bacilli. *Am. Rev. Resp. Dis.* 83: 737-740 (1961).
- 11 Wayne, L.G. Recognition of *Mycobacterium fortitum* by means of a three-day pehnolphthalein sulphate test. *Am. J. Clin. Pathol.* 36: 185-187 (1961).
- 12 Bonicke, R.E., Rohrschedt & Pascoe, E. Die Verbreitung der Nitrate-dukatare innerhaib der Gattung *Mycobacterium*. *Sonderdr. Naturwiss.* 49: 43-44 (1962).
- 13 Kappler, W. Acetyl-naphthylamin-esterase-aktivat Mykobakterien Beitr. Klin. Tuberk Spezif Tuberk-Forsch. 130: 1-4 (1965).
- 14 Wayne, L.G. & Englack, H.C. et al. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*. Tests for pigment, urease resistance to NaCl, hydrolysis of Tween-80 and β -galactosidase. In *J. Syst. Bacteriol.* 24: 412-419 (1974).
- 15 Wayne, L. G. & Engel, H. W. G. et al. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*. Tests for niacin and catalase and for resistance to isoniazid, Thiophene 2-carboxylic acid hydrazide, hydroxylamine and p-nitrobenzoate. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26:311-318 (1976).
- 16 Murphy, D. B. & Hawkins, J. E. Use of urease test disks in the identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1:465-468 (1975).
- 17 Wayne, L. g. & Kubica, G. P. *Mycobacteria*. In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Hold (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore (1986).
- 18 Wayne, I. G. & Diaz, G. a. Serologic, taxonomic and kinetic studies of the T and M classes of mycobacterial cultures. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:296-304 (1982).
- 19 Schaefer, W. B. Type-specificity of atypical mycobacteria in agglutination and antibody adsorption tests. *Am. Rev. Resp. Dis.* 96:1165-1168 (1967).
- 20 Brennan, P., Mayer, H., aspinall, G. & Shin, J. N. Structures of the glycopeptidolipid antigens from serovars in the *Mycobacterium avium/Mycobacterium intracellulare/Mycobacterium scrofulaceum* sero complex. *Eur. J. Biochem.* 115:7-15 (1981).
- 21 Middlebrook, G. & Dubos, R. J. Specific serum agglutination of erythrocytes sensitised with extracts of tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* 88:521 (1948).
- 22 Hilson, G. R. F. & Elek, S. D. The heamagglutination reaction in tuberculosis. *J. Clin Pathol.* 4: 158 (1951).

- 23 Norlin, M. Unclassified mycobacteria, Comparison between a serological and a biochemical classification method. *Bull. Int. Union, Tubercle* 36:25-32 (1965).
- 24 Stanford, J. L. & Grange, J. M. The meaning and structure of species as applied to mycobacteria. *Tubercle* 55:143-152 (1974).
- 25 Chaparas, S. D., Brown, T. M. & Hyman, I. S. Antigenic relationships among species of *Mycobacterium* studied by fused rocket immunoelectrophoresis. *Int. J. Syst. Bacteriol* 28:547-560 (1978).
- 26 Magnusson, M. Classification and identification of mycobacteria on the basis of sensitin specificity. In: Meissner, Sdimie-del, Nelles & Pfaffenberg (Editors), *Mykobaktein* Gustav Fisher Verlag, Jena, pp. 319-348 (1980).
- 27 Lind, A. & Ridell, M. Mycobacterial species; immunological classification, immunodiffusion and immuno-electrophoresis. In: G. P. Kubica & L. G. Wayne (Editors), *The Mycobacteria - A Source Book, Part A*. Marcel Dekker Inc., New York, p. 67 (1984).
- 28 Fukui, Y., Hirai, T., Uchida, T. & Yoneda, M. Extracellular proteins of tubercle bacilli. IV. Alpha-and beta-antigens as major extracellular protein products and as cellular components of a strain (H35 RV) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biken J.* 8:189-199 (1965).
- 29 Daniel, T. M. & Ferguson, L. e. Purification and characterization of two proteins from culture filtrates of *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra strain. *Infect. Immun.* 1:164-168 (1970).
- 30 Kuwabara, S. Purification and properties of tuberculin-active protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 250: 2556-2562 (1975).
- 31 Daniel, T. M. & Anderson, P. a. The isolation by immuno absorbent affinity chromatography and physico-chemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am. Rev. Resp. Dis.* 117:533-539 (1978).
- 32 Patarroyo, M. E., Perra, C., Pinilla, C., Portillo, P. d. Lozanda, D., Oramas, M., Torres, M., Clavijo, P., Ramirez, C., Fajardo, N., Cruz, N. & Jimenez, C. New approaches for the prevention of tuberculosis. In: M. E. Patarroyo, J. B. Zabriskie & D. Pizano-salazar (Editors), *Modern Biotechnology & Health: Perspectives for the Year 2000*. A. P. Inc., New York, p. 155 (1987).
- 33 Bishop, P. J. & Neuman, G. The history of Ziehl-Neelson stain. *Tubercle* 51:196-206 (1970).
- 34 Davis, H. L. *Bacteriology of the mycobacteriosis*. Centre for Disease Control, Atlanta. PHS, HEW (1976).
- 35 Smithwick, R. W. *Laboratory Manual for Acid-fast Microscopy*, 2nd edition. Centre for Disease Control, Atlanta (1976).
- 36 Kinyoun, J. J. a note on Uhlenhuth's method for sputum examination for tubercle bacilli. *Am. J. Pub. Health* 5:867-870 (1915).
- 37 Lennette, E. H., Spaulding, E. H. & Truant, J. P. *Manual of Clinical Microbiology*, 2nd edition. American Society for Microbiology, Washington, DC (1974).
- 38 Kubica, G. P. & Good, R. C. The genus *Mycobacterium* (except *M. leprae*). In: H.P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balowa & H. G. Schigel (Editors), *The Prokaryotes*, Vol. 2. Springer-Verlag, pp. 1982-1984 (1981).
- 39 Collee, J. G., Puguidd, J. P., Fraser, A. G. & Marmion, B. P. Mackie and McCartney *Practical Medical Microbiology*, 13th edition. Churchill Livingstone, London (1990).

- 40 Engback, H. C., Vergmann, B. & Bentzon, M. W. The sodium lauryl sulphate method in culturing sputum for mycobacteria. *Scand. J. Resp. Dis.* 48:268-284 (1967).
- 41 Wolinsky, E. & Rynearson, T. K. Micobacteria in soil and their relation to disease associated strains. *Am. Rev. Resp. Dis.* 97:1032-1037 (1968).
- 42 Smithwick, R.M., Statigos, C. B. & David, H. L. Use of cetl. pyridinum, chloride and sodium chloride for decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin Microbiol.* 1:411-413 (1975)
- 43 Mitchison, D. A., Allen, B. W., Carrol, L., Dickinson J. M. & Aber, V. R. A selective oleic acid albumin agar. *J. Med. Microbiol.* 5:165 (1972).
- 44 Mitchison, D. A., Allen, B. W. & Manickavasagar, D.J. *Clin. Pathol.* 36: 1357 (1983).
- 45 Middlebrook, G. & Dubos, R. J. In: R. J. Dubos (Editor), *Bacterial and Mycotic Infections of Man*, 3rd edition. Pitman Medical Publishing Co., Ltd., London (1958).
- 46 German Commission Report. The microbiological methods for the examination of milk and dairy products. *Deutsche Kommission Zur Milch, Milch produkte und Molkerihilfsstoffe (methode Komission). Milchwissenschaft* 15:120 (1960).
- 47 Jensen, K. a. *Advances in the control of zoonoses. FAO and WHO Mongograph Series No. 19, Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome, Italy* (1953).
- 48 Marks, J. Culture media for mycobacteria. *Lab. Pract.* 14 (1965).
- 49 Aleksandrov, N. A. Culturing of *Mycobacterium tuberculosis* from milk. *Vet. Moscow. USSR, No. 3:107-108* (1973).
- 50 Peterson, A. B. & Winmill. Note on the use of Dubos liquid medium for cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* from milk. *J. Comp. Pathol.* 60:219 (1950)
- 51 Davis, B. D. & Dubos, R. J. The inhibitory effect of lipase on bacterial growth in media containing fatty acid esters. *J. Bacteriol.* 55:11 (1948)
- 52 Ribe, O. Paratuberculosis in Norway. *Vet. Bull., Wegbridge* 35:18 (1964).
- 53 William Smith, H. Demonstration of tubercle bacilli in milk. *J. Pathol. Bacteriol.* 65:67 (1953).
- 54 Cutler, R. R., Wilson, P. & Clarke, F. V. The effect of polyoxyethylene stearate (POES) on the growth of mycobacteria in radiometric 7H12 Middlebrook TB medium. *Tubercle* 68:209 (1987).
- 55 Runyon, E. H., Karlson, A. G. Kubica, G. P. & Wayne, L. G. *Mycobacterium*. In: E. H. Lennette, E. H. Spaulding & J. P. Traunt (Editors), *Manual of Clinical Microbiology*, 2nd edition. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 148 (1974).
- 56 Vestal, A. L. Procedures for the Isolation and identification of mycobacteria. DHEW Publication No. (HSM) 15-8230. Centre for Disease Control, Atlanta (Revised 1975).
- 57 Kubica, G. P., Gross, W. M., Hawkins, J. E., Sommers, H. M. Vestal, A. L. & Wayne, L. g. Laboratory services for micobacterial diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.* 112:773-787 (1975).
- 58 Laszlo, A., Gill, P. et at. *J. Clin. Microbiol.* 18:1335 (1983).
- 59 Roberts, G. D., Goodman, N. L. et al. *J. Clin. Microbiol.* 18:698 (1962). Cited by Grange, J. M. *The Mycobacteria*. In: M. T. Parker & B. Duerdin (Editors), *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Vol. 2. Systematic Bacteriology*, 8th edition. Edward Arnold, London, pp. 74-101 (1990).
- 60 Redmond, W. B., Bates, J.H. & Engel, H. W. B. Methods for bacteriophage typing of mycobacteria. In: T. Bergan & J. R. Norris (Editors), *Methods in Microbiology, Vol. 13. Academic Press, London, Chapter III, pp. 345-376* (1979).

- 61 Guha, A. N. & Sarkar, P. B. Study of tuberculosis amongst cattle in Calcutta. *Indian Vet. J.* 47: 196-200 (1970).
- 62 Nielsen, F. W & Plum, N. Pulmonary tuberculosis as a source of infection for cattle. *Vet. J.* 96:6 (1940).
- 63 Mitscherlich, E. & Reuss, V. *Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr.* 60:487 (1953). Cited by Kaplan, M. M. Abdussalam, M. & Bijlenga, G. Diseases transmitted through milk. In: *Milk Hygiene. WHO Monograph Series No. 48, WHO, Geneva*, pp 11-74 (1962).
- 64 Nassal, J. *Rindertuberk. Brucell.* 5:189 (1956). Cited by Kaplan, M.M., Abdussalam, M. & Bijlenga, G. Diseases transmitted through milk. In: *Milk Hygiene. WHO Monograph Series No. 48, WHO, Geneva*, pp 11-74 (1962).
- 65 Schliesser, T. *Rindertuberk. Brucell.* 7:102 (1958). Cited by Kaplan, N. M., Abdussalam, M. & Bijlenga, G. Diseases transmitted through milk. In: *Milk Hygiene, WHO Monograph Series No. 48, WHO, Geneva*, pp. 11-74 (1962).
- 66 Griffith, A. S. Human tubercle bacilli in milk of a vaccinated cow. *J. Pathol. Bacteriol.* 17:323-328 (1913).
- 67 Lesslie, I. W. Cross infections with mycobacterium between animals and man. *Bull. Int. Chion Against Tuberculosis* 41:285-288 (1968).
- 68 Lepper, A. W. D. et al. Serological responses in experimental bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 53:301 (1977).
- 69 Szulga, T., Szaro, A., Madra, J. & Kowalczyk, H. Classification of acid-fast bacilli isolated from the milk of cows and from sewage used for fertilising pastures. II. Type determination of virulent bacilli. *Therap. Expl.* 13:331-335 (1965).
- 70 Appuswamy, S., Batish, V. K., Prakash, O. & Ranganathan, B. Prevalence of mycobacteria in raw milk supplied in Karnal, India. *J. Food Prot.* 43:778-781 (1980).
- 71 Mallick, Agarwal & Dua. An investigation into the incidence and type of tuberculosis infection in cattle at Amristar with special reference to human infection. *Indian Med. Gaz.* 77:668 (1942).
- 72 Salle, A. J. *Fundamental Principles of Bacteriology*, 87th edition. Tata McGraw Hill Publishing Co., New Delhi, pp. 923-929. (1974).
- 73 Riley, R. L. & Mills, C.C. et.al. Infectiousness of air from a tuberculosis ward, ultraviolet irradiation of infected air: Comparative infectiousness of different patients. *Am. Rev. Resp. Dis.* 85:511-525 (1962).
- 74 Cornet, G. Z. *Hyg. Infektionskr.* 5:191 (1989). Cited by Greng, J. M. Tuberculosis. In: M. T. Parker & L. H. Collier (Editors), *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunology* (1990).
- 75 Flugge, C. *Zeitschrift fur Hygiene and Infektion skrankhei*, 30:107 (1899). Cited by Grange, J. M. Tuberculosis. In: G. R. Smith & C. S. F. Easman (Editors), *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunology*, Vol. 3 (1990).
- 76 Wells, W. F. *am. J. Hyg.* 30:611 (1934). Cited by Grange, J. M. Tuberculosis. In: G. R. Smith & C. S. F. Easman (Editors), *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology & Immunity*. Vol. 3, *Bacterial Diseases*, 8th edition. Edward Arnold, London, pp. 93-121 (1990).
- 77 Kolesnik, N. S. Excretion of tuberculosis pathogens in milk and faeces of cows on reactor isolation stations and on putatively clean farms in the Zhiatchev district of L'Vov region. *Sb. Rab. Iengr. Vat.Inst.* 28:83-89 (1967).

- 78 Eissa, A. A., El-Sadek, G.M. & Shadi, A. Z. A. Incidence of Mycobacterium tuberculosis in cow's milk and buffalo's milk and marked Domietti cheese in Egypt. *J. Egypt. Pub. Health. Assoc.* 32:305-311 (1957).
- 79 Nassal, J. Demonstration of tubercle bacilli in milk of positive and negative reactors from newly infected herds. *Tierarztl. Umsch.* 16:34 (1961).
- 80 Donchenko, A. S. Excretion of Mycobacterium tuberculosis in the milk of diseased cows. *Vet. Moscow, USSR* 6:46-48 (1972).
- 81 Trossarelli, L. & Borello, A. Examination of Turin market milk for M. tuberculosis. *G. Batt. Immun.* 21:545-548 (1938).
- 82 Thomas, B. F. Incidence of mycobacteria and Brucella abortus in milk from mid and west Wales. *Abstr. Proc. Soc. Agric. Bact.* (1944). Cited: *Dairy Sci. Abstr.* 2:63 (1944).
- 83 Wilson, C. S. & Miles, A. A. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunology*, Vol. II, 4th edition. Edward Arnold Ltd., London (1955).
- 84 Saulita, E. Milk as a source of tuberculosis infection. *Med. Naukapraktika Reg.* 2:64 (1960).
- 85 MacAnder, G. W. The presence of mycobacteria of the type of humins and bovis in Warsaw market milk. Cited: *Dairy Sci. Abstr.* 25:245 (1963).
- 86 Schliesser, T. & Unertl, B. Presence of mycobacteria in raw milk. I. *Arch. Lebensmitt.-Hyg.* 21:84 (1970).
- 87 Guindi, S. M., Ahmed, O. L., Awad, W. M. & El-Saban, M. S. Incidence of bovine and human tubercle bacilli in milk and milk products. *Agric. Res. Rev.* 58:75-84 (1982).
- 88 Katrandzhiev, K. Viability and variability of Mycobacterium tuberculosis in cream and butter during storage. *Nauchi Trud.* 1:26-31 (1959).
- 89 Davis, J. G. *A Dictionary of Dairying*, 2nd edition. Leonard Hill Books Ltd., p. 531 (1963).
- 90 Meyer, J., Touillier, J. & Malgras Factors destroying tubercle bacilli in cheese. *Lait* 32: 512 (1952).
- 91 Grecz, N. In: N. Molin (Editor), *Microbial Inhibitors in Foods*. 4th Int. Symp. Food Microbiol., Stockholm, Almqvistand, Wicksell, p. 307. (1964).
- 92 Hammer, B. W. & Babel, F. J. *Dairy Bacteriology*, 4th edition. John Wiley and Sons Inc., New York (1957).
- 93 Hahn, H. Is manufacture of Emmental cheese from raw milk safe from the viewpoint of public health? *Tieraerztl. Umsch.* 14:254-256 (1959).
- 94 Iotov, I. & Todorov, D. Study of survival of Mycobacterium tuberculosis in Bulgarian white cheese during ripening and storage. *Nauchi Trud.* 1:33-38 (1959).
- 95 Obiger, G., Neuschulz, J. & Schonberg, A. Examination of French varieties of soft cheese for brucellosis and tuberculosis bacteria. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wachschr.* 83:318-319 (1970).
- 96 Wallgren, a. The time table of tuberculosis. *Tubercle* 29:245 (1948).
- 97 Lowell, A. M. Tuberculosis: Its social and economic impact and some thoughts on epidemiology. In: G. P. Kubica & L. G. Wayne (Editors), *The Mycobacterium - A source Book*. Marcel Dekker Inc., New York (1984).
- 98 CDC MMWR Report. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 39(33):557-572 (1990).
- 99 Grzybowski, S., Styblo, K. & Dorken, E. Tuberculosis in Eskimos. *Tubercle* 57: Suppl. p.1 (1976).

- 100 Thomas, O. f. & Borthwick, W. M. et.al. Lancet 1:1308 (1954). Cited by Grange, J. M. Tuberculosis. In: G. T. Smith & C. S. F. Easman (Editors), Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology & Immunity. Vol. 3, Bacterial Diseases, 8th edition. Edward Arnold, London, pp. 93-121 (1990).
- 101 Raleigh, J. W. & Wichelhausen, R. Exogenous reinfection with Mycobacterium tuberculosis confirmed by phage typing. Am. Rev. Resp. Dis. 108:639 (1973).
- 102 Stead, W. W. Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man. Recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection. Am. Rev. Resp. Dis. 95:729 (1967).
- 103 Canetti, G. Ann. N. Y. Pathogenesis of tuberculosis in man. Acad. Sci. 154.13 (1968).
- 104 Canetti, G., Sutherland, I. & Svandova, E. Bull. Int. Union Tuberc. 47:116 (1972).
- 105 Styblo, K. Bull. Int. Union Tuberc. 53:141 (1978). Infektionskrankheiten and o ihre Erreger 4: Part IV:77 (in English). In: D. C. Flenley & T. L. Petty (Editors), Recent Advances in Respiratory Medicine, No. 4. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 77 (1986).
- 106 Duncanson, F. P., Hewlett, D. et al. Tubercle 67:295 Cited by Grange, J. M. Tuberculosis. In: G. R. Smith & C. S. F. Easman (Editors), Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology & Immunity. Vol. 3, Bacterial Diseases, 8th edition. Edward Arnold, London, pp. 93-121 (1990).
- 107 Pederson, C. & Nielson, J. D. Schandinavian J. Infect. Dis. 19:289 (1987). Cited by Grande, J. M. Tuberculosis. In: G.T. Smith & C. S. F. Easman (Editors), Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Verology & Immunity. Vol. 3, Bacterial Diseases, 8th edition. Edward Arnold, London, pp. 93-121 (1990).
- 108 WHO Report. British Thoracic and Tuberculosis Association Report. A survey of tuberculosis mortality in England and Wales in 1968. Tubercle 52:1-18 (1971).
- 109 Skorodumova, A. M. Antibiotic properties of lactose fermenting yeast. Dokl. Akad. Nauk SSSR. 20:257-259 (1951).
- 110 Skorodumova, A. M. Antibiotic properties of "Medicinal" sour milk products. Vop. Pitan 15(2):32-36 (1956).
- 111 Franc, Z., Hais, I. M. & Horesovsky, O. Anti-tuberculous factor of milk. Nature (London) 192:884-885 (1958).
- 112 Tomic-Karovic, K., Sudic, D. & Tomljenovic, C. Antibiotic aciton of Lactobacillus acidophilus upon M. tuberculosis. Bull. Sci. Yougoslavia 5:16-18 (1959)
- 113 Tomic-Karovic, K., Sudic, D. & Marjanovic, C. The efect of acifophilus whey in vitro and in vivo on M. tuberculosis. Bull. Sci. Cams. acds. RSF., Yougosl. 9:163-165 (1964).
- 114 Goldstein, V. D. Ponomareva, N. S., Girin, D. V., Fondaminskaya, L. D., Gureev, V. I., Smelyanskaya, B. S. & Yakubaitis, V. I. Effect of Koumiss therapy on vitamin metabolism and serum transaminase activies in patients with pulmonary tuberculosis. Probl. Tuberk. 47:23:29 (1969).
- 115 Khisanfova, L. P. Antimicrobial properties of Koumiss from cows and mares milk. Moloch. Promst. 30:16-19 (1969).
- 116 Shamgin, V. K., Zalashko, D. S., Mochalova, K. V. & Pastukhova, Z. M. a. new type of Koumiss from cow's milk and its curative profits. XX Int. Dairy Congr. E: p. 266 (1978).

- 117 Kim, D. S. Effects of Koumiss on pulmonary tuberculosis. *Korean J. Dairy Sci.* 4: 197-201 (1982).
- 118 CDC Guidelines. Guidelines for isolation precautions in hospitals. Dept. Health and Human Services, Public Health Services, Centre for Disease Control. DHHS Publication (1983).
- 119 Riley, R. L. Air-borne infection. *Am. J. Med.* 57:466-475 (1974).
- 120 Horne, N. W. (1971). Epidemiology and control of tuberculosis. Cited in: D. A. J. Tyrrell, I. Phillips, C. S. Goodwin & R. Blowers (Editors). *Microbial Disease: The Use of the Laboratory Diagnosis, Therapy and Control*. Edward Arnold, London, p. 229 (1979).
- 121 Sadilek, J. & Stepanek, M. The influence of peroxide-catalase treatment of milk on some pathogens. 16th Int. Dairy Congr. C: 1029-1033 (1962).
- 122 Kubin, M. Distribution and ecology of nonliving reservoir, opportunists and pathogens. In: G. P. Kubica & L. G. Wayne (Editors), *Mycobacteria - A Source Book*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1313-1338 (1984).
- 123 Chalmers, C. H. Bacteria in relation to the milk supply. *A Practical Guide for the Commercial Bacteriologist*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London (1962).
- 124 North, C. E. & Park, W. H. Standards for milk pasteurisation. *Am. J. Hyg.* 7:147-173 (1927).
- 125 Sterinini, C. Destruction by heat of human Mycobacterium tuberculosis in some liquid dairy products, *Araispedall S. Ann. di Ferrara* 11 (6):1161-1166 (1958).
- 126 Penna, R. & Panizza, D. Research on Mycobacterium pasteurised milk. *G. Batt. Virol. Immunol.* 57:567 (1966).
- 127 Wright, R. C. Mycobacterium tuberculosis in pasteurized milk. *Br. Med. J. II*: 108 (1967).
- 128 Trendtel. Problems of modern milk hygiene and the provision of milk of good quality toruined towns. *Zbl. Bakt., I. Orig.* 158:296-97 (1952).
- 129 Moureau, M. H., Bretey, J. & Roy, D. Heat resistance of Mycobacterium tuberculosis: relationship to pathogenicity, human, bovine, BCG, avian and paraterbecular stains. *Ann. Inst. Pasteur* 99:421-432, 586-599 (1960).
- 130 Harrington, R. & Kalson, A. G. Destruction of various kinds of mycobacteria in milk by pasteurization. *Appl. Microbiol.* 13:494-495 (1965)
- 131 Donchenko, A. S., Donchenko, V. N., Fatkeeva, E. A., Kibasov, M. & Zernova, L. A. Destruction of tubercle bacilli in camel's milk and 'sherbat', a lactic acid product. *Vet., Moscow, USSR* (1975).
- 132 Anantantaramaiah, S. N., Sreenivasan, R. A. & Sirsi, M. Thermal destruction of pathogenic bacteria in milk and cream. *Abstr. Pap. Indian Inst. Sci. Golden Jubilee Symposia*, p. 3 (1959).
- 133 Pavlas, M. The heat resistance of Mycobacterium tuberculosis in milk. *Ved. Bruc. Vyzlust. Vet. tek., Bruo* 2:21-30 (1962).