



REZUMAT

Cuvinte cheie: *Mycobacterium avium ssp. avium*, *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, IS900, IS901, LSPs, MIRU-VNTR

Teza de doctorat intitulată: **Epidemiologia și diagnosticul infecțiilor cu *Mycobacterium avium*** a fost elaborată în cadrul Școlii Doctorale a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” din Iași, ca parte a proiectului *Sprijinirea participării doctoranzilor la programele doctorale*, POS-DRU8/1,5/S/52176, proiect cofinanțat din Fondul Social European, prin intermediul Ministerului Muncii, Familiei și Protecției Sociale, respectiv Autoritatea de Management pentru Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Rezervelor Umane (AM POSDRU), în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 – 2013.

Lucrarea a fost întocmită pe parcursul a patru ani de studii, în perioada 01.10.2009-01.10.2013 și este structurată în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți principale: prima parte, reprezentată de **Stadiul actual al cunoașterii**, ce cuprinde un număr de 45 de pagini și reprezintă 33% din conținutul lucrării și ce-a de-a doua parte, de **Contribuții personale**, cu un număr de 80 de pagini reprezentând reprezintă 66%.

Conținutul primei părți, **Stadiul actual al cunoașterii**, este structurat în trei capitole în care sunt relatate, în sinteză, informații din literatura de specialitate națională și internațională cu privire la subiectul acestei lucrări.

Primul capitol, intitulat **Caractere generale ale mycobacteriilor** are ca prim subiect **Taxonomia și clasificarea mycobacteriilor** unde sunt prezentate diferite clasificări ale mycobacteriilor. **Bacteriologia** împarte mycobacteriile în mycobacterii cu creștere lentă și mycobacterii cu creștere rapidă iar în **funcție de patogenitate** mycobacteriile se clasifică în: mycobacterii patogene, oportuniste și saprofite. **Runyon** (1959) împarte mycobacteriile în patru categorii (I, II, III, IV): mycobacterii fotocromogene, scotocromogene, non-fotocromogene și mycobacterii cu creștere rapidă. În următorul subcapitol sunt prezentate caracteristicile generale ale mycobacteriilor, cu structura morfologică, fiziologia și particularitățile biologice ce le diferențiază de celelalte bacterii.

Luând în considerare mycobacteriile patogene cu importanță pentru medicina umană și cea veterinară, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* și *Mycobacterium*

paratuberculosis, subiectul **capitolului II, Metode principale de depistare și diagnostic ale infecțiilor cu mycobacterii**, descrie metodele de diagnostic utilizate în practică pentru identificarea maladiilor determinate de agenți etiologici menționați mai sus. Testarea hipersensibilității întârziată se utilizează în etapele de diagnostic ale tuberculozei la om, în depistarea tuberculozei la bovine și identificarea infecțiilor cu *M. paratuberculosis* sau *M. avium* la rumegătoare. Ca orice metodă de diagnostic, testul alergic prezintă avantaje și dezavantaje: este o metodă standard de testare *in vivo* a răspunsului imun mediat celular, cu un cost redus dar nu se poate face automatizat, uneori este dificil de citit și nu se poate aprecia stadiul infecției. Ceea ce conferă testului intradermic nesiguranță este cross-reactivitatea, prin apariția reacțiilor fals-pozitive iar în cazul infecțiilor extinse, a reacțiilor fals-negative (anergie).

O evaluare a unui individ infectat se poate realiza și cu ajutorul testelor serologice, ELISA sau teste rapide precum imunocromatografia, cu identificarea diferiților markeri umorali specifici (IgM, IgG și IgA anti-A60). Testele serologice, comparativ cu examenul bacteriologic (cultura), au o sensibilitate (1-60%) și o specificitate (53- 99%) mai mică dar prezintă avantaje: se obține un rezultat în decurs de câteva ore (chiar minute), sunt mai practice pentru copii (elimină mai greu sputa) și în cazul pacienților suspecți de tuberculoză extrapulmonară [WHO, 2008, Steingart și colab, 2011].

Programul strategic de supraveghere și control al Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor (ANSVSA), prin campaniile de colectare de seruri de la animalele din efectivele țării, facilitează laboratoarelor de diagnostic teritoriale utilizarea de teste serologice de tip ELISA pentru detecția paratuberculozei. Testul serologic utilizat în diagnosticul tuberculozei bovine se bazează pe detecția gama-interferonilor în combinație cu testul alergic.

Izolarea și identificarea agentului etiologic în infecțiile cu mycobacterii reprezintă o etapă importantă în stabilirea unui diagnostic de certitudine. În subcapitolul **Examenul bacteriologic**, sunt descrise tehnicile și mediile de cultură speciale de izolare a mycobacteriilor. În ultima perioadă s-a realizat automatizarea acestei etape de diagnostic prin utilizarea de medii de cultură lichide și sisteme de detecție a unei creșteri bacteriene cum sunt sistemele MB/BacT, BACTEC-MGIT 960, ESP Culture System II și MB Redox [Bemer și colab., 2004]. Indiferent de mediul de cultură utilizat, examenul bacteriologic reprezintă metoda standard (*“golden standard technique”*) pentru diagnosticul infecțiilor mycobacteriene [Aziz și colab., 2007, Mueller și colab., 2008].

Progresele ce au fost făcute în biologia moleculară au permis facilitarea diagnosticului infecțiilor mycobacteriene prin evitarea timpului de așteptare necesar în cazul culturii, răspunsul

unui test de diagnostic molecular fiind obținut în decurs de câteva zile. Actualmente există teste comerciale ce permit identificarea de ținte moleculare specifice speciei sau subspeciei mycobacteriene căutate. Determinarea răspândirii și persistenței unei anumite sușe mycobacteriene se realizează cu ajutorul tehnicilor de tipare ca RFLP sau MIRU-VNTR [Smith și colab., 2006, Sahraoui și colab., 2009, Collins, 2011].

Capitolul III, intitulat **Grupul *Mycobacterium avium***, prezintă caracterele generale ale grupului *Mycobacterium avium* și sunt descriși cei patru membri ai grupului: *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. avium* ssp. *silvaticum* și *M. avium* ssp. *hominissuis*, cu asemănările și deosebirile dintre ei dar și implicațiile patologice ale acestora. Dintre maladiile cele mai cunoscute amintim tuberculoza aviară, paratuberculoza rumegătoarelor și boala Crohn la om. Faptul ce intrigă cel mai mult este implicația zoonotică a membrilor grupului *M. avium*, cu determinarea de leziuni granulomatoase și afectarea în mod special a persoanelor imunodeficiente, bariera inter-specie fiind foarte ușor depășită. Dacă în cazul animalelor o boală determinată de o mycobacterie nu își justifică tratamentul, în cazul omului identificarea speciei sau subspeciei infectante este vitală pentru a putea stabili diagnosticul și tratamentul corespunzător, în funcție de sensibilitatea la antibiotice a mycobacteriei infectante.

Cea de-a II-a parte a acestei teze, **Contribuții personale**, este alcătuită din cinci capitole. **Scopul și obiectivele cercetărilor** motivează tema de cercetare a prezentei teze, prin importanța studiului și a utilizării metodelor moderne de diagnostic în infecțiile determinate de *Mycobacterium avium* ssp. *avium* și *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

În capitolul V, intitulat **Anchetă epidemiologică privind infecția cu *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* în România** sunt prezentate, în cadrul secțiunii **Materiale și metode**, tipurile de studii epidemiologice, examenul serologic cu recoltarea și stocarea probelor și principiul metodei ELISA indirectă. În acest studiu s-au utilizat două teste de diagnostic ELISA comerciale: „Pourquier® ELISA paratuberculosis antibody verification. Institut Pourquier” și „LSIVet™ Ruminant Paratuberculosis Advanced-Serum ELISA kit”. În cadrul secțiunii de **Rezulate și discuții**, este mai întâi prezentată o situație a infecției cu *Mycobacterium paratuberculosis* în România, bazată pe studiile efectuate în țară dar și pe baza datelor epidemiologice ale site-ului Oficial de Epizootii. Aprofundarea studiului sero-epidemiologic s-a concentrat apoi pe seroprevalența paratuberculozei în județele Iași și Neamț între anii 2005-2010. **Ancheta de seroprevalență a paratuberculozei în estul României** a constatat într-un studiu realizat pe parcursul a doi ani, 2009-2011, pe 318 animale (bovine, oi și capre), cu scopul de a identifica indivizi serologic pozitivi pentru infecția cu *Mycobacterium paratuberculosis*. Analizând datele de la examenul serologic, s-a determinat o seroprevalență de 6,25% pentru

infecția paratuberculoasă la bovine, 19,54% la ovine și 28,2% la capre. În ceea ce privește vârsta animalelor cu răspuns pozitiv serologic la infecția cu *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP), oile și caprele se încadrează în același interval și anume de 3-4 ani.

În capitolul VI, intitulat **Investigații etiologice în infecțiile cu *Mycobacterium avium ssp. avium* și *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*** am urmărit identificarea agentului etiologic prin metodele clasice de laborator și anume: test alergic cutanat, examen bacterioscopic, examen histopatologic și bacteriologic. Materialul biologic a fost format din 38 de cazuri: 12 păsări, 21 de oi și patru bovine. O parte din păsări și din rumegătoarele miciau fost testate alergic cu tuberculină aviară, cu citirea reacției la 48 de ore de la inoculare.

Examenul histopatologic s-a realizat în cadrul Laboratorului de Histopatologie al Facultății de Medicină Veterinară Iași. Prelevarea probelor de țesut s-a făcut conform regulilor propedeutice iar examenul a vizat prelucrarea și colorarea acestora cu hematoxilină-eozină (HE), hematoxilină-eozină-albastru de metilen (HEA) iar pentru a vizualiza agentul etiologic s-a folosit colorația Ziehl-Neelsen (ZN). În cazul găinilor, histopatologia s-a efectuat pe nouă probe de țesut: ficat, splină și intestin de la patru subiecți iar tabloul lezional descris în subcapitolul **Rezultatele examenului histopatologic** la găini a fost caracteristic infecției cu *Mycobacterium avium ssp. avium*: granuloame tuberculoase în diferite stadii de formare la nivel hepatic, splenic și intestinal, cu prezența de celule gigant de tip Langhans și cu evidențierea de bacili acido-alcool-rezistenți (BAAR) prin colorația Ziehl-Neelsen. În ceea ce privește rumegătoarele, nu s-au observat leziuni macroscopice caracteristice infecției cu MAP. La examenul histopatologic s-au evidențiat modificări celulare cu suspiciune de infecție paratuberculoasă la o vacă și la un berbec: infiltrație macrofagică și prezența de celule gigante Langhans în secțiuni intestinale de valvulă ileo-cecală și perete rectal. Prin colorația Ziehl-Neelsen, s-au evidențiat bacili acido-alcool-rezistenți în secțiuni realizate din limfonodmezenteric și din perete rectal provenite de la un berbec.

În cadrul **Examenului bacteriologic**, decontaminarea probelor de țesut și de fecale s-a realizat cu hexadecilpiridinium (HPC) 0,75%, conform protocolului de lucru recomandat de Oficiul Internațional de Epizootii iar mediile de cultură utilizate au fost medii speciale pentru mycobacterii: Löwenstein-Jensen și Herrold cu ou și mycobactină J. Examenul bacteriologic la găini nu a întâmpinat dificultăți, după aproximativ 7 zile de incubare pe mediile Löwenstein-Jensen dar și Herrold cu ou și mycobactină J observându-se primele colonii de *M. av. ssp. avium*. La această etapă, confirmarea dezvoltării de colonii mycobacteriene s-a realizat prin efectuarea de frotiuri colorate Ziehl-Neelsen direct din cultură.

Probele de țesut de la rumegătoare au fost deasemenea prelucrate în vederea însămânțării pe mediul HEYM (Herrold cu ou) cu mycobactină J. După o incubare de două luni la 37°C, în atmosferă cu CO₂, s-au observat colonii asemănătoare celor de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* din izolatele de la bovine. Confirmarea dezvoltării de colonii de *Mycobacterium paratuberculosis* s-a realizat pe baza mycobactin-dependenței, a timpului de dezvoltare a coloniilor și pe baza acido-alcool-rezistenței prin colorația Ziehl-Neelsen a frotiurilor realizate din cultură. Pentru prelevatele de la oi însămânțate pe mediul HEYM (Herrold cu ou) cu mycobactină J nu s-a observat dezvoltarea de colonii de *M. avium* ssp. *paratuberculosis* chiar și după opt luni de incubare la 37°C, în atmosferă cu CO₂.

În continuare, în cadrul **Capitolului VII**, intitulat **Identificarea și caracterizarea moleculară a sușelor de *Mycobacterium avium* izolate de la animale** s-a urmărit utilizarea de metode de biologie moleculară în vederea confirmării diagnosticului de paratuberculoză și tuberculoză aviară stabilit anterior prin tehnicile uzuale: test cutanat, examen bacterioscopic, examen bacteriologic, examen histopatologic și serologic. Marele avantaj al tehnicilor moleculare constă în rapiditatea obținerii unui răspuns dar și posibilitatea caracterizării speciilor/subspeciilor indetificate atât din prisma distribuției geografice - descrierea de profiluri diferite (MIRU-VNTR) dar și stabilirea gradului de patogenitate prin evidențierea anumitor secvențe genice (LSPs). Extracția ADN-ului mycobacterian s-a făcut cu un kit comercial (Macherey Nalgel) cu membrane de siliciu, pentru probele biologice prelevate și prin liza prin șoc termic pentru izolatele din cultură.

Identificarea subspeciei infectante s-a efectuat prin determinarea secvențelor de inserție specifice IS. Izolatele de *M. avium* ssp. *avium* de la păsări au fost identificate prin amplificarea secvențelor IS 901 și IS 1245 specifice. Materialul biologic utilizat a fost reprezentat de probe de țesut (ficat) și de culturi izolate în urma însămânțărilor. Din 12 păsări studiate, opt au prezentat leziuni specifice tuberculozei aviare iar examenul PCR IS 901 și IS 1245 realizat pe probele de țesut și culturile izolate a confirmat infecția cu *M. avium* ssp. *avium*.

Izolatele de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* de la rumegătoare (oi, vaci și capre) au fost identificate prin realizarea unor reacții PCR pentru determinarea secvenței IS900. Materialul biologic utilizat a fost reprezentat de probe de țesut (porțiuni de intestin, limfonoduri mezenterice) și fecale. Izolatele din culturile de la bovine au fost confirmate prin examen PCR IS900 din cultură.

Etapa următoare a constat în analiza izolatelor de *Mycobacterium paratuberculosis* și *Mycobacterium avium* prin două tehnici de caracterizare moleculară: LSPs (Large Sequence

Polymorphisms)-identificarea de secvențe polimorfe și MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units -Variable Number Tandem Repeat)- identificarea de repetiții în tandem.

Studiile recente susțin că secvențele polimorfe întinse (LSPs) au un rol major în diversitatea genetică, inclusiv în rândul microorganismelor MAC și sunt importante surse de variabilitate genetică. Teste comparative prin *microarray* realizate de Semret și colab. (2004), utilizând sușa *Mycobacterium avium ssp. avium* 104 ca referință, au identificat regiuni ce le-au denumit LSP^As, specifice pentru *M. av. ssp avium* dar absente la izolatele de *M. avium ssp. paratuberculosis*. În studiul de față am utilizat primerii descriși de Semret și colab.(2006) pentru detecția LSP^A20 și LSP^A4. Materialul genetic analizat a constatat din extracte de ADN provenite de la trei ovine și patru bovine ce inițial au fost identificate ca fiind IS 900 pozitive. Astfel, utilizarea tipajului LSP a permis diferențierea sușelor de MAP de tip ovin „S” față de cele de tip bovin „C”.

Secvența LSP4 are un rol important în metabolismul mycobacterian, mai precis în metabolismul lipidic prin sinteza de mycobactină. Lipsa secvenței LSP 20 determină creșterea lentă a culturilor de *M. paratuberculosis*.

Metoda de tipaj MIRU-VNTR a fost realizată cu ajutorul a multiple reacții PCR ce amplifică locii corespunzători repetițiilor în tandem și a permis obținerea unui cod numeric în ordinea următoare: MIRU 292, X3, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 și 32. Un număr de profil a fost atribuit fiecărei sușe urmată de INMV (Inra Nouzilly Miru Vntr). Această notare permite schimbul de rezultate între laboratoare și se evită astfel erorile de transcripție a numărului de repetiții. Pentru realizarea acestei metode de tipaj s-a utilizat ADN extras de la opt izolate de *Mycobacterium avium ssp. avium* de la păsări, ADN extras de la sușe de *M. paratuberculosis* izolate de la patru vaci și ADN extras din probe de țesut (limfonod mezenteric și intestin) de la trei ovine pozitive serologic pentru infecția paratuberculoasă.

Rezultatele obținute în urma amplificărilor pentru cei opt markeri MIRU-VNTR au descris trei profile diferite: INMV 106 (25131127), INMV 99 (24131117) și INMV 100 (24131127) pentru izolatele aviare, variabilitatea acestora fiind marcată de repetițiile markerilor genici MIRU X3 și VNTR 10. Din cele șapte izolate de la rumegătoare, la patru dintre acestea amorsele repetițiilor în tandem nu au realizat amplificarea segmentelor specifice. Din probele analizate, pentru trei izolate am obținut un profil MIRU-VNTR complet: două profile bovine IMNV 1 (242332228) și un profil ovin 52131118, acesta din urmă fiind diferit de profilele descrise până în prezent. Variabilitatea MIRU-VNTR în izolatelor de *M. avium ssp. paratuberculosis* a fost marcată de repetițiile genice VNTR 22 și MIRU X3.

În încheierea acestui studiu am notat un număr de **12 Concluzii finale** din care subliniem următoarele:

- Faptul că, în urma cercetărilor noastre, **testul alergic** a revelat infecția mycobacteriană la 71% din animalele pozitive serologic, că **examenul necropsic** al rumegătoarelor serologic- pozitive nu a evidențiat leziuni caracteristice, că **examenul histopatologic** a relevat modificări tisulare doar în cazul a două animale pozitive serologic și că **examenul bacteriologic** a dat rezultate concludente doar la bovine, reconfirmă **valoarea orientativă** de diagnostic a alergiei și serologiei, metode ce trebuiesc utilizate obligatoriu în combinație și **coroborate** cu celelalte, readucând astfel în discuție **dificultatea stabilirii unui diagnostic de certitudine** pentru paratuberculoza rumegătoarelor.
- Diagnosticul în **tuberculoza aviară** nu întâmpină dificultăți, coroborarea examenelor necropsic, bacterioscopic direct, morfopatologic și histopatologic, cu evidențierea bacililor acido-alcool-rezistenți, reprezintă metode de certitudine în stabilirea infecției cu *M. avium* ssp. *avium* la păsări. Toate cazurile de găini cu leziuni specifice de tuberculoză au fost confirmate ulterior prin examen bacteriologic și prin PCR.
- Prin utilizarea **tehnicilor de biologie moleculară** (PCR), cu amplificarea de secvențe specifice de subspecie ale grupului *M. avium* (IS 900, IS 901 și IS 1245), s-a confirmat prezența *M. avium* ssp. *avium* în prelevatele de la păsări și prezența *M. avium* ssp. *paratuberculosis* în prelevatele de la rumegătoare, aceste tehnici putând fi considerate **de referință** și utilizate cu succes acolo unde sunt disponibile.
- Utilizarea **tehnicilor moleculare** de identificare și caracterizare (LSP, MIRU-VNTR etc.) constituie o **alternativă rapidă și utilă** pentru diagnostic dar mai ales pentru înțelegerea și explicarea unor aspecte fundamentale încă neclare ale infecțiilor cu bacterii din grupul *Mycobacterium avium*, în general.