



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
ANPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007 - 2013



Instrumente Structurale
2007 - 2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
'ION IONESCU DE LA BRAD' DIN IAȘI

REZUMAT

Cuvinte cheie: IS901, IS1245, IS6110, INH, *Mycobacterium avium subsp. avium*, *Myocobacterium tuberculosis*, NTM, PAW

Teza de doctorat cu titlul „*Cercetări privind modificările fenotipice și genotipice induse de agenți fizici și chimici la micobacteriile izolate de la om și animale*” se întinde pe un număr de 265 de pagini și conform normativelor aflate în vigoare este constituită din două părți principale: prima parte, intitulată „Stadiul actual al cunoașterii” care cuprinde 69 de pagini și partea a doua, intitulată „Contribuții personale” extinsă pe 115 de pagini.

Investigațiile cu privire la tema studiată, s-au desfășurat în cadrul a șapte instituții: Facultatea de Medicină Veterinară din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu de la Brad”, Iași, Spitalul de Pneumoftiziologie, Laboratorul de Bacteriologie din Iași, Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni", Iași, Facultatea de Medicină Pierre et Marie Curie, Paris, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, Centrul funcțional de experimentare din cadrul Facultății de Medicină Pierre et Marie Curie, Paris, și Institutul Pasteur, Paris, pe parcursul a patru ani de studiu în perioada 1 octombrie 2010 – 1 septembrie 2014.

„**Stadiul actual al cunoașterii**” cuprinde patru capitole, în care sunt expuse succint informații din literatura de specialitate cu referire la subiectul tezei de doctorat și care au fost utilizate ulterior pentru interpretarea și compararea datelor obținute în partea de cercetări proprii.

Primul capitol, intitulat „**Caractere generale și particularități structurale ale micobacteriilor**” este structurat în cinci subcapitole ce sintetizează informații din literatura de specialitate cu privire la clasificarea micobacteriilor după principalele caracteristici ale micobacteriilor ca: acido-alcool-rezistență, acizii micolici, conținutul ridicat de guanină-citozină în ADN și în funcție de patogenitate. La ora actuală, în genul *Mycobacterium* s-au adăugat multe specii, toate caracterizate prin acidorezistență, considerându-se că sunt 178 de specii din care unele sunt agenți patogeni pentru animale, altele pentru oameni. Mai mult de 130



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRUFondul Social European
POSDRU 2007 - 2013Instrumente Structurale
2007 - 2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI,
CERCETĂRII,
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
CIPOSDRUUNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
"ION IONESCU DE LA BRAZA" DIN IAȘI

de specii au fost identificate ca și specii nontuberculoase (NTM), iar aproximativ 60 de specii sunt suspectate sau cunoscute ca fiind patogene. Micobacteriile prezintă 5 grupări reprezentative: *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium fortuitum* complex, *Mycobacterium chelonae-abscessus* complex și *Mycobacterium terrae* complex. În acest capitol sunt redată și înfomații legate de celula micobacterienă studiată la nivel ultrastructural și implicit arhitectura peretelui celular care a adus la clarificări solide legate de compuşii de la acest nivel. Au fost detaliate următoarele glicolipide: factorul cord (trehaloză 6,6'-dimicolat; TDM), lipoarabinomanan-ul, (LAM) și acizii micolici care sunt componente esențiale pentru supraviețuirea intracelulară a membrilor genului *Mycobacterium*. A fost tratată și permeabilitatea peretelui celular care reprezintă 40-60% din greutatea uscată a bacteriilor cu porinele, proteine care traversează membrana și formează canale hidrofilice ce permit trecerea pasivă a moleculelor mici hidrofile. Deasemenea, sunt redată informații privind principalele caracteristici ale genomului la micobacterii, structura antigenică și factorii de patogenitate la micobacterii.

Al doilea capitol intitulat „**Diagnosticul infecțiilor micobacteriene**” sunt descrise principalele metode fenotipice și genotipice în identificarea micobacteriilor. Dintre tehnicile fenotipice a fost descris examenul bacterioscopic ca și examen prezumtiv în tuberculoză; examenul bacteriologic prin relatarea principalelor medii de cultură speciale. Au fost sintetizate informații și despre testarea chimiosensibilității tulpinilor de *M. tuberculosis* la substanțele antituberculoase cu menționarea metodele standardizate (metoda proporțiilor, Canneti, Franța și metoda concentrațiilor absolute, Meissner, Germania); descrierea principalelor tehnici de indentificare moleculară, de genotipare, clasificare filogenetică a tulpinilor de *Mycobacterium* prin RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorfrism), MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units Variable Number Tandem Repeat), secvențierea ARNr 16S (Kirschner și colab., 1993) și LSPs (Large Sequence Polymorphisms Classify).

Capitolul III, intitulat „**Rezistența micobacteriilor la agenți fizici și chimici**” descrie principalii agenți fizici cu rol micobactericid. Deasemenea, au fost detaliate principalele antibiotice disponibile care după activitatea antimicrobiană și toxicitate sunt clasificate în antituberculostatice din grupa 1 (izoniazida, rifampicina, pirazinamida și etambutol) și din grupa a 2-a aminoglicozidele (streptomicina, kanamicina, amikacina și capreomicina), fluoroquinolone, tioamidele (etionamida-protionamida), cicloserina, acidul para-aminosalicilic; precum și menționarea antibioticelor în dezvoltare. În acest capitol sunt sintetizate și informații despre rezistența naturală a micobacteriilor caracterizate printr-o rezistență la un număr mare de



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
ANPDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007 - 2013



Instrumente Structurale
2007 - 2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI,
CERCETĂRII,
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OPOSDRU



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
'ION IONESCU DE LA BRAD' DIN IASI

antibiotice cu selectare rapidă de mutații de rezistență și rezistența dobândită care este mereu legată de mutantele de la nivelul genelor cromozomiale.

În ultimul capitol din prima parte „**Chimioterapia experimentală în tuberculoză**”, sunt redate modelele experimentale utilizate în acest studiu. S-a utilizat chimioterapia experimentală pe modelul murin de tuberculoză care în cercetările actuale este cel mai frecvent utilizat. Chimioterapia experimentală în tuberculoză a permis evaluarea *in vivo*: a activității antimicrobiene a unor medicamente, prin compararea cu alte medicamente existente; activitatea sinergică sau antagonistă a unui antibiotic, atunci când se administrează cu alte antibiotice și capacitatea sa de a steriliza leziunile animalelor infectate experimental. Deasemenea, au fost descrise principalele linii de șoareci disponibile (Balb/c, C57BI/6, C3H, KO, SCID, și C3HeB/FeJ). Dar, cei mai frecvent utilizați în modelul tuberculozei sunt șoarecii non-consagvini, denumiți Swiss cu o eterogenitate imunitară ce oferă posibilitatea de a demonstra diferențele între grupurile testate. Pentru testarea imunodeficienței, sunt recomandați șoarecii atimici, denumiți Nude, care trebuie menținuți în permanență într-un izolator, în condiții complet sterile.

În vederea evaluării eficacității chimioterapiei experimentale pe modelul murin, s-a folosit izoniazida sau hidrazida acidului izonicotinic, un analog al nicotinamidei, la fel ca etionamida și pirazinamida ce face parte din Grupa 1 de medicamente tuberculostatice (din prima linie de AB orale) conform încadrării date de OMS. Isoniazida este un pro-medicament, care este activat de către enzima catalaz-peroxidaza KatG (Zhang, 1992). În acest capitol pentru izoniazidă s-a descris: activitatea bactericidă a INH; modul lor de acțiune (care deși este descoperit de mai bine de 50 de ani, este încă controversat); mecanismul de rezistență, precum și complexe particulare a acesteia ce implică multe gene. Aproximativ 80% dintre tulpinile rezistente la izoniazidă prezintă mutații punctiforme la nivelul genei *katG* (provoacă un nivel ridicat de rezistență), deleții parțiale sau complete ale genei. Mutațiile punctiforme sunt dintre cele mai frecvente, în special cele care afectează serina în poziția Ser315Thr. În funcție de studiile realizate până în prezent există 70% de tulpini cu această localizare (Musser și colab., 1996; Ramaswamy și colab., 2003; Cardoso și colab., 2004; Guo și colab., 2006). Mutațiile în promotorul genei *inhA* (provoacă un nivel scăzut de rezistență), și mult mai rar în gena *inhA* în sine, s-au observat la aproximativ 10-40% din tulpinile rezistente la izoniazidă (Musser și colab., 1996; Lavender și colab., 2005; Hazbón și colab., 2006). Studii recente, au enumerat alte gene potențiale, implicate în rezistența izoniazidei dar fără demonstrarea mecanismului de rezistență (*ndh*, *ahpC*, *kasA*, *mabA*, *furA*) (Ramaswamy și colab., 2003). Gena *katG*, codată de catalaz-peroxidaza, a fost identificată ca fiind responsabilă pentru activarea izoniazidei (Zhang și colab.,



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007 - 2013



Instrumente Structurale
2007 - 2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI,
CERCETĂRII,
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
"ION IONESCU DE LA BRAZA" DIN IAȘI

1992) iar gena *inhA* codifică enoil-ACP reductaza, fiind identificată ca o altă “țintă” pentru INH (Banerjee, 1994).

S-a realizat o sinteză bibliografică privind al doilea model experimental inovator cu utilizarea plasmei reci ca și tehnică de decontaminare în curs de dezvoltare. Au fost descrise principalele tipuri de descărcări electrice care în general, cu aer umed, produc o explozie de electroni cu energie mare. Cum aerul umed conține o varietate de specii moleculare (N_2 , O_2 și H_2O), $OH\cdot$ și $NO\cdot$, radicalii principali în faza non-termală (Ming Du și colab., 2012), se formează după descompunerea acestor elemente în câmpul electric (Benstali și colab., 2002).

Partea a doua a tezei, intitulată „**Contribuții personale**” este structurată în șase capitole, fiecare din ele urmând o structură bine stabilită și se încheie cu prezentarea concluziilor.

Primul capitol intitulat “**Izolarea și identificare de tulpini micobacteriene la om și animale**” constă în dezvoltarea a două subcapitole. Primul subcapitol relevă investigații privind **izolarea și identificarea de tulpini micobacteriene patogene la om**. Chiar dacă speciile din cadrul complexului *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) sunt responsabile pentru majoritatea infecțiilor cu micobacterii la nivel mondial, studiul a fost orientat spre infecțiile oportuniste, datorate micobacteriilor non-tuberculoase (NTM) deoarece incidența acestora este în creștere în ultimii ani (Kankya și colab., 2011; van Ingen și colab., 2009), reprezentând o provocare pentru sănătatea publică. Deși în Europa s-au realizat studii cu privire la prezența și distribuția tulpinilor non-tuberculoase, în România nu există informații. În acest context ne-am propus să efectuăm un studiu ce a implicat raportarea frecvenței tulpinilor non-tuberculoase în Spitalul de Pneumoftiziologie, Iași, pe o perioadă de 5 ani, din ianuarie 2010 până în septembrie 2014. Identificarea tulpinilor nontuberculoase la om s-a realizat fenotipic, prin parcurgerea examenelor microscopice (optic, fluorescență), examenelor culturale pe mediul de cultură Lowenstein-Jensen și Middlebrook 7H9 în sistemul automat MB/BacT și antigenic prin utilizarea unui test rapid imunocromatografic ce constă în identificarea proteinei MPT64. Metoda de decontaminare a fost metoda cu hidroxid de sodiu fără centrifugare (metoda cu picătura, recomandată de OMS).

După testarea antigenică au fost identificate 122 de tulpini non-tuberculoase. Dintre acestea, 101 NTM (82.78%) au fost izolate din probe pulmonare (spută, aspirat bronșic, lavaj bronhoalveolar (BAL), și lavaj gastric) și 21 NTM (12.21%) din probele extrapulmonare (puroi, biopsii, ganglioni limfatici axilari). Ponderea cazurilor extrapulmonare și pulmonare a fost de 82.79% și 17.21%. Rata de izolare a tulpinilor NTM a fost de 13.93% în anul 2010, 20.49% în 2011, 21.31% în 2012, 25.40% în 2013 și 18.85% în 2014. Datele obținute în Spitalul de Pneumoftiziologie, Iași, indică o creștere clară a frecvenței izolatelor NTM în ultimii 4 ani cu 11,47%.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007 - 2013



Instrumente Structurale
2007 - 2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI,
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OPOSDRU



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
'ION IONESCU DE LA BRAD' DIN IASI

Al doilea subcapitol a avut ca și scop **izolarea și identificarea fenotipică, antigenică și genotipică a tulpinilor micobacteriene patogene la nurci și găini**. În acest scop s-a realizat examenul necropsic, examenul histopatologic, examenul bacterioscopic și examenul bacteriologic. Izolarea tulpinilor micobacteriene de la nurci și păsări s-a realizat atât prin inocularea produsului patologic pe mediul solid cât și lichid: Löwenstein-Jensen, Löwenstein-Jensen cu micobactină, Herrold cu ou (HEYM) și micobactină și Middlebrook 7H9. În vederea izolării sușelor la nurci și păsări s-au utilizat și flacoanele MB/BacT introduse în sistemului automat MB/BacT. Identificarea speciilor de micobacterii s-a realizat prin tehnica PCR, cu amplificarea secvențelor IS6110 la nurci și IS901 și IS1245 la găini; iar caracterizarea moleculară a speciilor la nurci s-a realizat prin secvențiere (metoda Sanger) și compararea secvențelor de interes cu secvențele de nucleotide prezente în PBIL (Pole Biôinformatique Lyonnase Network Protein Sequence Analysis). După evaluarea modificărilor macroscopice și histopatologice la nurci s-au observat multiple granuloame aflate în stadii diferite de dezvoltare în majoritatea organelor. Predominanța organelor afectate a variat de la animal la animal, dar pulmonii, splina și limfonodurile mezenterice au fost frecvent implicate; s-au putut observa și leziuni diseminate în aproape toate organele din cavitatea toracică și abdominală. Leziunile histopatologice au fost caracteristice infecției tuberculoase cu prezența granuloamelor tuberculoase aflate în diferite stadii de evoluție de la granulomul tânăr, caracterizat printr-o reacție macrofagică cu prezența de celule gigante de tip Langhans, apoi cu formarea zonelor de necroză oxifile și granulomul matur format din celule gigante de tip Langhans și fibre de collagen. După evaluarea semicantitativă a rezultatelor examenului microscopic, s-au observat numeroși bacili acido-alcoolo-rezistenți (BAAR), neputându-se cuantifica numeric datorită densității bacilare. Bacilii AAR, au fost prezenți în aproape toate organele și sistemele: pulmon, splină, ficat, glanda suprarenala, ovar, corpul uterin, peretele cavității toracice, limfonod mezenteric, mediastinal și epigastric. După examenul cultural, toate nurcile au fost pozitive. După analiza PCR, care a fost găsită pozitivă pentru *Mycobacterium tuberculosis* complex, proba a fost secvențiată cu succes și a fost identificată ca fiind *Mycobacterium tuberculosis*.

Păsările au prezentat deasemenea leziuni macroscopice specifice tuberculozei aviare. Tabloul lezional a fost dominat de noduli tuberculoși specifici, de dimensiuni variabile, bine delimitați, proeminenți, unii noduli având aspect cazeo-necrotic, observați cel mai des la nivel hepatic și apoi splenic. La examenul cultural ca și la bacterioscopie, găinile au fost pozitive, cu observarea primei colonii după 4-7 zile. După o săptămână de la însămânțare s-au putut observa colonii mici caracteristice pentru *M. avium subsp. avium*. Utilizând IS901 și IS1245, s-a putut confirma infecția cu *Mycobacterium avium subsp. avium*, la toate găinile suspecte de



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
ANPSSR



Fondul Social European
POSDRU 2007 - 2013



Instrumente Structurale
2007 - 2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI,
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OPOSDRU



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
'ION IONESCU DE LA BRAZA' DIN IASI

tuberculoză, examenul biomolecular fiind o metodă mult mai rapidă și mai precisă decât cultura convențională.

Capitolul intitulat „**Evaluarea eficacității izoniazidei în terapia tuberculozei indusă experimental la șoarecii imunocompetenți și imunodeficienți**” a avut în vedere evaluarea activității izoniazidei pe modelul murin. În funcție de acțiunea sa, s-a precizat natura acțiunii tuberculostaticului folosit: bacteriostatic sau bactericid, dacă este capabil să întrețină moartea șoarecilor folosiți în acest studiu și mai ales dacă este capabil să împiedice moartea șoarecilor. Liniile genetice de șoarecii folosiți în studiu au fost femelele Swiss (imunocompetenți) și atimici, Nude (imunodeficienți) de patru săptămâni. Modelul de testare experimentală a fost modelul așa-zis “curativ”, astfel că tratamentul șoarecilor a fost demarat la 14 zile după inocularea lor. Scopul acestui studiu a fost de a compara mutațiile rezistente la izoniazidă *in vivo* între șoarecii imunocompetenți și imunodeficienți. Specia tip folosită în acest studiu a fost tulpina de referință *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv care este sensibilă, bine caracterizată și cu genomul complet secvențializat. Metoda de repartizare a șoarecilor, a fost randomizarea în blocuri, una din cele mai utilizate proceduri de repartizare aleatorie a șoarecilor la condițiile de experimentare folosite în cercetare. În acest studiu experimental *in vivo* eficacitatea tratamentului cu izoniazida a fost evaluată la diferite perioade de timp ale tratamentului prin măsurarea următoarelor criterii: rata de supraviețuire a șoarecilor, greutatea șoarecilor, greutatea splinei, leziunile macroscopice pulmonare, încărcătura bacteriană pulmonară, procentajul șoarecilor la care culturile au fost pozitive și selecția de mutante rezistente la izoniazidă. Analizând diferența între prima lună și a doua lună de tratament, descreșterea încărcăturii micobacteriene pentru șoarecii Swiss a fost echivalentă cu aproximativ 2 log₁₀ UFC și pentru șoarecii Nude a crescut cu 4 log₁₀ UFC, ca urmare a selecționării mutanților rezistenți. Pentru șoarecii Swiss între luna a doua și a treia, a existat de asemenea o descreștere cu 1.3 log₁₀ UFC. Activitatea bactericidă inițială a izoniazidei este de aproximativ 0.5 – 0.7 log₁₀ pe zi și s-a dovedit a fi cel mai puternic tuberculostatic. Cu toate acestea, această activitate scade după a doua zi de tratament (0.113 log₁₀ pe zi), declin ce se datorează selectării rapide de mutante rezistente.

În capitolul VII intitulat „**Selecționarea mutantelor rezistente la izoniazidă *in vivo***” a constat în selecționarea și determinarea tipului de mutații asociate cu profilul de rezistență la tulpinile micobacteriene testate față de izoniazidă pe modelul murin cu șoareci imunocompetenți și imunodeficienți. Prin testarea *in vivo*, obiectivul a fost de a selecționa și de a stabili proporția mutațiilor, pornind de la următoarele ipoteze: dezvoltarea unei rezistențe la nivelul unei populații micobacteriene rezultă din acțiunea combinată a două fenomene: mutațiile spontane la nivelul cromozomului, urmate de selecția mutantelor ca urmare a unei chimioterapii inadegvate. Astfel,



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRUFondul Social European
POSDRU 2007 - 2013Instrumente Structurale
2007 - 2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI,
CERCETĂRII,
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRUUNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
"ION IONESCU DE LA BRAZA" DIN IAȘI

ADN-ul codant pentru genele *katG*, *inhA* și promotorul acesteia, a fost secvențializat pentru a verifica prezența sau absența mutațiilor și descrierea acestora la cele două linii genetice de șoareci folosiți pentru izoniazidă. A fost realizată extracția ADN-ului, reacția PCR pentru amplificarea genelor *katG* totale, *inhA* și promotorul *inhA*, pentru toți subiecții de la care au fost selecționate mutante. Pentru calitatea materialului genetic, s-a realizat purificarea produșilor amplificați în vederea secvențierii (metoda enzimatică Sanger), după care s-a realizat din nou o purificare a produșilor secvențiați. Astfel, toate fragmentele ADN obținute și luate în studiu au fost supuse secvențierii. Datele au fost prelucrate cu ajutorul programului «ABI Prism DNA Sequencing Analysis V 3.4.1». Secvențele nucleotidice obținute au fost analizate cu ajutorul software-ului SeqScape® v.2.5. A fost modelată și studiată poziția și consecințele noilor mutații punctiforme detectate în *katG*, *in vivo*, atât la șoarecii Nude cât și Swiss prin intermediul structurii cristalografice a proteinei *Mycobacterium tuberculosis* KatG (Zhao și colab., 2006; PPB, 2CCA), cu soft-ul Pymol.

La șoarecii Nude au fost găsite 16 mutații punctiforme, și nici o singură dată S315T, situație în care sunt mai puține macrofage pentru a distruge celulele micobacteriene, deci *Mycobacterium tuberculosis* la șoarecii Nude are mai puțin nevoie de o proteină KatG cu o bună activitate a catalaz-peroxidazei, acesta fiind motivul pentru care am identificat mai multe mutațiile în *katG*, care ar putea avea activitatea catalaz-peroxidazei foarte diminuată. La șoarecii Swiss, au existat două tipuri de mutații (W341R și V469V), aceasta putând conserva o bună activitate a catalaz-peroxidazei ce este necesară pentru a se apăra față de radicalii de oxigen ai macrofagelor. Mutația R498L (n=4) a fost frecvent detectată la șoarecii Nude, a prezentat un polimorfism fenotipic silențios. Localizarea sa în KatG fiind foarte departe de situsul catalitic care conține hem-ul. Mutațiile îndepărtate de situsul activ, sunt de obicei asociate cu un nivel scăzut de rezistență la INH. Mutația R484C (n=3) selectată la șoarecii Nude a fost localizată adiacent de canalul de apă din structura proteinei KatG. Mutațiile aproape de marele canal de apă sunt în general asociate cu un nivel ridicat de rezistență la INH. Mutațiile identificate ar putea perturba dimerizarea KatG, reducând stabilitatea generală a acesteia sau împiedicând interacțiunile cu alte proteine *in vivo*.

În capitolul VIII intitulat „**Selecționarea *in vitro* a mutantelor rezistente pentru izoniazidă**” au fost selectate mutante INH-R *in vitro*, cu scopul de a studia într-un context izogenic, efectul mutațiilor de la tulpinile micobacteriene. Pentru acest studiu, s-au utilizat două tulpini de referință, respectiv *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv și *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra. Selectarea mutațiilor *in vitro* la *Mycobacterium tuberculosis* pentru cele două tulpini de referință s-a realizat pe mediul de cultură Middlebrook 7H11 care conține INH. A fost realizată



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRUFondul Social European
POSDRU 2007 - 2013Instrumente Structurale
2007 - 2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI,
CERCETĂRII,
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRUUNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
"ION IONESCU DE LA BRAZA" DIN IAȘI

reacția PCR pentru amplificarea genelor *katG* (KatG total), *inhA* și promotorul său pentru tulpinile la care s-au observat mutante *in vitro*. Pentru gena *katG* s-au amplificat și secvențiat 3 perechi de primeri (*katA* și *katCas*, *kat2* și *kat4as*, *katC* și *katEas*). Regiunea promotorului *inhA* și gena *inhA* a fost amplificată și secvențiată cu primerii *Pro1* și *Pro2*, *FabG1* și *FabG2*, *INH1* și *INH2*, și *INH3* și *INH4*. Secvențele obținute au fost comparate cu secvențele din GenBank cu numărul de acces X68081 pentru gena *katG* și numerele de acces U66801 și U02492 pentru operonul *Maba-Inha*. Secvențele nucleotidice obținute au fost analizate și înregistrate cu software SeqScape® V.2.5, iar modificările au fost puse în evidență prin compararea secvențelor de referință importate din Genbank. Toate izolatele obținute *in vitro* au prezentat mutații numai în *katG*, modificări care cel mai adesea sunt asociate cu nivel înalt rezistență la izoniazidă. La tulpinile studiate au fost identificate 63 de mutații INH-R. Mutațiile detectate în *katG*, au fost constat în deleții (parțiale sau totale), mutații punctiforme, mutații în codonul STOP și inserții. Proporția medie a mutațiilor în *katG* a fost reprezentată de deleții cu 28.12% (12 parțiale și 6 complete), mutațiile în codonul STOP au fost de 28.87%, mutațiile punctiforme au fost 18.75%, iar inserțiile au fost 3.12%, ceea ce sugerează că mutațiile în *katG* sunt mai susceptibile de a fi foarte rezistente.

Pentru 28.12% din mutațiile INH-R obținute *in vitro*, nicio mutație nu a fost găsită în *katG*. Pentru toate mutantele selectate *in vitro*, nicio mutație nu a fost identificată în *inhA* și promotorul acestuia, sugerând că rezistența *in vitro* nu reflectă mecanismele obișnuite de rezistență la INH observate la izolatele clinice. Faptul că nicio mutație nu a fost observată în *inhA* și promotorul ei, evidențiază complexitatea mecanismelor de rezistență la INH în *M. tuberculosis*.

Cu scopul de a realiza modelarea moleculară următoarele mutații punctiforme în *katG* au fost incluse: G494D (n=1), T275I (n=1), T394M (n=1), P232L (n=2), R484H (n=3) și D137Y (n=1). Dintre aceste mutații, doar prezența G494D a fost descrisă până acum în izolatele clinice (Brossier, 2011), restul fiind noi mutații în *katG*. După modelarea moleculară P232L și T275I au indicat o reducere a activităților enzimatică în acord cu modelarea moleculară. D137Y a reușit împreună cu Ser 315, atenuarea activității enzimatică (peroxidazice) din KatG. Pentru restul mutațiilor, activitățile enzimatică nu au fost reduse în mod semnificativ și rolul acestora este dificil de explicat.

Capitolul IX, intitulat “**Efectul micobactericid al apei activate cu plasmă rece**”, s-a investigat efectul apei activate cu plasmă rece (PAW), asupra unor specii patogene din cadrul genului *Mycobacterium*. Montajul experimental utilizat în acest studiu a constat într-un reactor electrochimic de tip plasmă rece, care funcționează la presiune atmosferică și la temperatura



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRUFondul Social European
POSDRU 2007 - 2013Instrumente Structurale
2007 - 2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI,
CERCETĂRII,
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRUUNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
"ION IONESCU DE LA BRAD" DIN IAȘI

mediului ambiant. Față de reactoarele electrochimice folosite în alte studii, în această lucrare s-a folosit un algoritm nou experimental, propus și brevetat de echipa lui Hnatiuc și colaboratorii, ce are la bază un sistem multielectrod, cu folosirea unui reactor electrochimic de tipul GlidArc, dar cu electrozi auxiliari și descărcare plană, volumetrică și rotativă. Pentru tratarea cu PAW, au fost folosite 8 tulpini de referință: *M. avium subsp. avium* (CECT 7407), *M. abscessus* (CECT 8517), *M. chelonae* (CECT 8519), *M. kansasii* (CECT 3030), *M. peregrinum* (CECT 3023), *M. marinum* (CECT 7091), *M. smegmatis* (CECT 3017) și *M. tuberculosis* K₃₇Ra, Lehmann și Neumann (ATCC 25177) și 10 tulpini non-tuberculoase dintre care nouă au fost izolate de la om (NTM) și una de la găină (*Mycobacterium avium subsp. avium*). Ținând cont că tuberculoza chimiorezistentă ridică serioase obstacole în controlul tuberculozei în lume și în România și mai ales că tulpinile chimiorezistente sunt la fel de contagioase ca și cele sensibile, s-au luat în studiu 5 tulpini sensibile (WT), 10 tulpini multidrog-rezistente (MDR) și 10 tulpini ultrarezistente (XDR). S-a folosit o suspensie bacteriană cu concentrația inițială de 10⁸ UFC. Pentru fiecare serie de experimente, timpii de tratare au fost de 5 minute, 10 minute, 15 minute, 20 minute și 30 minute. Eficiența inactivării micobacteriilor tratate cu PAW, a fost apreciată prin calcularea indicelui de reducere logaritmică (I_r) iar analiza statistică a variațiilor a fost realizată cu ajutorul soft-ului GraphPad Prism®, utilizând testul statistic ANOVA. S-a constatat de asemenea, o reducere logaritmică la micobacterii după contactul cu PAW, pentru perioade de tratare de până la 30 minute. După 15 minute de tratament cu PAW, reducerea logaritmică a fost mai mare de 5 log₁₀, astfel încât toate tulpinile luate în studiu au fost inactivate, ceea ce a certificat efectul antimicobacterian. Astfel că la un timp de expunere de 20 minute, gradul de inactivare a fost complet. Activitatea bactericidă față de micobacterii se pare că este dependentă de un nivel ridicat de specii reactive de oxigen ce implică afectarea ultrastructurii peretelui celular.

Ultimul capitol intitulat “**Analiza instrumentală a micobacteriilor tratate cu plasmă rece**” a investigat modul de acțiune al PAW, deoarece până în prezent nu se cunoaște cu exactitate mecanismul de acțiune al plasmei reci și nici al PAW (Naïtali și colab., 2010). În acest sens, s-a utilizat microscopia electronică prin baleiaj pentru a observa în mod direct modificările morfologice ale micobacteriilor după tratamentul cu PAW, spectrofotometria UV și spectroscopie de fotoelectroni cu raze X. Specia tip folosită în acest studiu a fost tulpina de referință *M. smegmatis* 3017 (CECT), bine caracterizată și cu genomul complet secvențiat. Cuantificarea spectrofotometrică a concentrației de proteine și a ADN-ului după tratarea cu PAW a fost analizată la timpii de tratare de 5 minute, 10 minute și 15 minute. Astfel, s-a obținut o medie a concentrației de proteine de 1.01 μg/mL după 5 minute, 3.65 μg/mL după 15 minute și 5.24 μg/mL după 30 minute de tratare cu PAW. Concentrația medie a acizilor nucleici a fost de 1

$\mu\text{g/mL}$ după 5 minute, $1.5 \mu\text{g/mL}$ după 15 minute și de $1.7 \mu\text{g/mL}$ după 30 de minute de tratare cu PAW. După tratamentul cu PAW, conținutul de oxigen (O) a crescut de la 16.91% până la 25.94%, în timp ce conținutul relativ de carbon (C) a crescut dar nu în mod semnificativ de la 49.80% până la 57.55%. Astfel, raportul O/C a crescut cu 9.03% și 7.75%, ca rezultat al oxidării semnificative a ADN-ului la *Mycobacterium smegmatis*, după tratarea cu PAW. În schimb concentrația azotului (N) a scăzut cu 16.49% de la 32.76% la 16.27%, la fel a fost și în cazul fosforului (P) cu 0.3%, de la 0.53% la 0.23%, după tratarea cu PAW. Au fost investigate cu exactitate și modificările de la nivelul acizilor micolici specifici pentru *Mycobacterium smegmatis* (α -micolați, α' -micolați și epoximicolați), esențialî în supraviețuirea micobacteriei, precum și arabinogalactanul (AG), atașat de acizii micolici. Astfel, că după tratamentul cu PAW, conținutul de oxigen (O) din stratul superior al peretelui celular a crescut de la 27.43% până la 37.84%, în timp ce conținutul relativ de carbon (C) a scăzut dar nu în mod semnificativ de la 66.31% până la 58.52%.

Rezultatele au indicat faptul că structurile chimice ale ADN-ului și ale principalelor lipide din structura peretelui celular la *Mycobacterium smegmatis* au fost modificate ca urmare a oxidării cu PAW. Complexul acid micolic-arabinogalactan-peptidoglican care este recunoscut pentru rigiditate structurală ce o conferă peretelui celular micobacterian, a prezentat de asemenea modificări majore.