

REZUMAT

Micoplasmele sunt cele mai mici forme libere de viață capabile de auto-replicare descoperite până în prezent. Dimensiunile lor variază de la 0,2 μm la 0,8 μm , putând trece prin filtre utilizate pentru îndepărtarea bacteriilor. Genomul lor variază de la 580 Kb (*Mycoplasma genitalium*) la 1358 Kb (*Mycoplasma penetrans*), acest lucru ducând la economisirea drastică a resurselor genetice și obligarea la un stil de viață parazită. Lipsa unor căi metabolice, dată de dimensiunea mică a genomului, necesită medii complexe pentru izolarea lor. O trăsătură caracteristică care distinge micoplasmele de alte bacterii este lipsa peretelui celular.

Speciile patogene de *Mycoplasma* aviare sunt cauze importante pentru bolile și pierderile de producție în sistemul intensiv de creștere a păsărilor (Chin și col., 2003; Kleven, 2003b; Ley, 2003). Găina și/sau curca sunt gazde naturale a 12 specii de *Mycoplasma*, în timp ce 23 specii sunt recunoscute la păsări (Bradbury, 1998; Kleven, 2003a). Cu toate acestea numai speciile *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* și *M. iowae* sunt considerate a fi semnificativ patogene pentru păsări (Bradbury, 1998; Kleven, 2003).

Cele mai importante entități sunt: micoplasmoza respiratorie aviară produsă de *Mycoplasma gallisepticum*, sinuzita infecțioasă a curcilor produsă de *Mycoplasma gallisepticum*, aerosaculita curcilor (produsă de *Mycoplasma meleagridis*) și sinovita infecțioasă (produsă de *Mycoplasma sinoviae*).

În România s-a descris pentru prima dată micoplasmoza respiratorie aviară produsă de *Mycoplasma gallisepticum* de către Stoenescu și Săndulescu în anul 1958 în urma importului de pui din Canada.

Teza de doctorat cu titlul „**Epidemiologia și diagnosticul infecțiilor cu *Mycoplasma* spp. la păsări**” se întinde pe un număr de 216 pagini și conform normelor în vigoare este constituită din două părți principale: prima parte, intitulată „**Stadiul actual al cunoașterii**” care cuprinde 52 de pagini și partea a doua, intitulată „**Contribuții personale**” extinsă pe 108 pagini.

„**Stadiul actual al cunoașterii**” cuprinde trei 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 „**Contribuții personale**”.

Primul capitol, intitulat „**Biologia și patogenitatea mycoplasmelor**” este structurat în șapte subcapitole și sintetizează informațiile din literatura de specialitate cu privire la clasificarea filogenetică, ecologie, morfologie și ultrastructură, metabolism, factorii de virulență și



interacțiunea cu sistemul imunitar al gazdei și modul de transmitere al mycoplasmelor. La ora actuală sunt recunoscute peste 23 de specii de mycoplasme la păsări (Bradbury, 1998; Kleven, 2003a) iar numărul lor este în continuă creștere. Mycoplasmele nu sunt asociate cu producția de toxine, însă, în urma metabolismului acestora rezultă peroxidul de hidrogen și radical superoxid. Acești produși cauzează distrugerii oxidative membranei celulelor gazdă (Razin, 1991). Principalii factori de virulență sunt reprezentați de adevizine și neuraminidaze. În România nu sunt studii actualizate în ceea ce privește speciile de *Mycoplasma* prezente la păsări.

Al doilea capitol, intitulat „**Descrierea principalelor infecții produse de *Mycoplasma spp.* la păsări**”, tratează implicațiile mycoplasmelor în patologia aviară. Infecția cu *M. gallisepticum* este deosebit de importantă la puii de găină și curcă provocând afecțiuni respiratorii și scăderea producției de carne și ouă (Bradbury, 2001; Ley, 2003). Pot de asemenea produce boli ale căilor respiratorii superioare la păsările de interes vânătorească. Manifestarea asimptomatică este una dintre principalele caracteristici ale micoplasmozei și mai ales cea cauzată de *Mycoplasma synoviae*, infecția tipică inducând o deteriorare semnificativă a sănătății gazdei, putând provoca suprimarea sistemului imunitar (Stipkovits L, Kempft I., 1994; Kleven, 2003). Până în prezent, nu există raportări în baza de date a Oficiului Internațional de Epizootii privind micoplasmoza aviară în România.

În ultimul capitol din prima parte, „**Diagnosticul de laborator al micoplasmozelor aviare**” descrie în patru subcapitole principalele metode de depistare și diagnostic al infecțiilor mycoplasmice din efectivele de păsări. Depistarea serologică este cel mai frecvent utilizată. În fermele de păsări se utilizează seroaglutinarea rapidă pe lamă, care este o metodă rapidă și ieftină și dă informații despre statusul imunitar al unui efectiv. Testul ELISA este mai scump însă are o sensibilitate și specificitate superioară. Testele de imunofluorescență și imunoperoxidază sunt în general aplicate pentru culturile suspecte obținute în laborator și mai rar direct pe exudatele sau țesuturile infectate. Acest lucru se datorează faptului că organismele sunt prea mici pentru a se recunoaște în mod concludent la lumina microscopului și pentru că probele corespundente negative și pozitive de exudat/țesut pentru control este puțin probabil să fie ușor disponibile. Izolarea mycoplasmelor este dificilă necesitând mult timp și se face pe medii speciale suplimentate cu ser sangvin, extract de drojdie, glucoză, peptone, vitamine etc.. Aceste medii se cunosc sub numele de bulion și agar PPLO. Până în prezent nu s-a descris un mediu universal, capabil să asigure cultivarea tuturor speciilor cunoscute. Morfologia coloniilor de micoplasme nu trebuie, în nici un caz, considerată specifică, ea fiind dependentă de o multitudine de factori, între care compoziția mediului, gradul de umiditate al agarului, concentrația inoculului. O alternativă la cultivarea convențională sunt metodele de detecție ale ADN-ului specific.



Identificarea rapidă a acestor organisme este de mare importanță pentru creșterea păsărilor în sistemul intensiv. Spectrometria de masă MALDI-TOF este o tehnică nouă, rapidă și precisă dar pentru care nu s-a realizat încă o bază de date semnificativă pentru compararea rezultatelor.

Începând cu anul 2011, în România, prin adoptarea Deciziei 2011/214/UE în Programul Strategic de către Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor, impune prin intermediul Direcțiilor Sanitar-Veterinare și a Laboratoarelor Sanitar-Veterinare de Stat o supraveghere a păsărilor domestice (găini și curci) din exploatațiile comerciale de reproducție pentru micoplasmoza aviară.

Partea a doua a tezei, intitulată „**Contribuții personale**” este structurată în cinci capitole, fiecare din ele urmând o structură bine stabilită, în ultimul capitol prezentându-se concluziile finale.

Deși în Europa s-au realizat multe studii despre prezența și distribuția mycoplasmelor în diferite sisteme de creștere a păsărilor, în România există foarte puține informații. Tema de cercetare își propune realizarea unui screening epidemiologic al infecțiilor cu bacterii ale genului *Mycoplasma* la păsări și de asemenea izolarea, identificarea și caracterizarea diverselor specii ale acestui gen pe teritoriul României.

În capitolul IV, intitulat „**Investigații epidemiologice privind infecțiile produse de mycoplasma spp. la pasărele domestice în Nord-Estul României**” s-a urmărit realizarea unei anchete sero-epidemiologice privind prevalența infecției cu *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* și *M. meleagridis* la găini și curci crescute în sistem intensiv și extensiv din zona de lucru.

Probele prelevate au provenit din ferme de creștere în sistem intensiv a curcanilor pentru carne și a puilor broileri, ferme de găini pentru reproducție și din exploatații în sistem extensiv (gospodăriile populației), aflate pe teritoriul județului Iași, Bacău, Suceava, Botoșani, Vaslui și Brașov. Investigațiile s-au realizat pe un număr de 90 de probe ser provenite de la curci pentru carne, crescute în sistem intensiv, 384 probe provenite de la găini pentru reproducție, 90 probe de la găini ouătoare, 120 probe provenite de la broileri de găină crescuți în sistem intensiv și 50 de probe provenite de la găini crescute în sistem extensiv. Recoltarea probelor s-a efectuat în perioada 2011-2012, de la păsări care, în general, nu prezentau semne clinice de boală caracteristice infecțiilor mycoplasmice, dar și de la păsări ce manifestau semne respiratorii specifice.

Probele de ser au fost analizate cu ajutorul seroaglutinării rapide pe lamă folosind antigen colorat *Nobilis® Mycoplasma gallisepticum antigen* și *Nobilis® Mycoplasma synoviae antigen* (Intervet) și prin testul imunoenzimatic ELISA cu ajutorul kit-urilor *Mycoplasma gallisepticum*

antibody test kit, *Mycoplasma synoviae antibody test kit* și *Mycoplasma meleagridis antibody test kit*, produse de Affini Tech, LTD, SUA. Răspunsul serologic contra *M. iowae* este slab, descriindu-se reacții nespecifice pentru această specie. Nu există pentru această specie un test serologic fiabil în teren (Bradbury și Kleven, 2003). Aceste teste detectează anticorpii din serul sangvin al păsărilor infectate (imunoglobulina G).

În urma examenului ELISA din 90 de probe analizate, provenite de la curci pentru carne, neimunizate, 40 de probe au fost pozitive pentru *M. gallisepticum*, 7 pentru *M. synoviae* și 5 pentru *M. meleagridis*, ceea ce denotă prezența infecției mixte în efectiv. Din 90 de probe de ser de la găini ouătoare neimunizate, crescute în sistem extensiv, 71 (79%) au fost pozitive pentru MG și 53 (59%) au fost pozitive pentru MS.

În cazul probelor recoltate de la broileri de găină, infecția a fost depistată într-o singură hală din cele șase luate în studiu. Astfel, 2 (11%) probe au fost pozitive pentru MG și 3 (16%) probe au fost pozitive pentru MS. Prezența infecțiilor cu *Mycoplasma* în efectivele de broileri este strâns legată de respectarea regulilor zootehnice : popularea cu material avicol indemn, dezinfecția și respectarea vidului sanitar, respectarea regulilor generale de biosecuritate.

Pentru probele provenite de la găini de reproducție imunizate cu vaccin atenuat și/sau vaccin inactivat, rezultatele obținute au fost în strânsă corelație cu vaccinul utilizat. Astfel, rezultatele au fost negative pentru serurile găinilor vaccinate cu vaccin atenuat (vaccinul dă o imunitate de tip celular, fără producerea de anticorpi) pe când probele provenite de la găini imunizate cu vaccin inactivat au fost pozitive (vaccinul dă imunitate umorală cu producerea de anticorpi serici).

În sistemul gospodăresc, din totalul probelor analizate, toate cele 50 de probe au fost pozitive pentru *M. gallisepticum* iar 46 (92%) de probe au fost pozitive pentru *M. synoviae*. Titrul de anticorpi obținut a fost foarte ridicat, fiind situat între 8570 și 12338. Valoarea ridicată a titrului de anticorpi se explică prin infecțiile naturale repetate la care sunt supuse păsările de curte. Testul de seroaglutinare rapidă a furnizat rezultate asemănătoare testului ELISA dar cu o fidelitate mai redusă, reacțiile încrucișate putând fi cauza principală a rezultatelor fals pozitive. Acest test este recomandat pentru stabilirea statusului imunitar al unui efectiv, având avantajul că este ieftin, rapid și se poate efectua pe loc, în fermă.

Rezultatele obținute arată prezența infecțiilor mycoplasmice în toate efectivele de păsări analizate, cu o incidență foarte mare în fermele de găini ouătoare sau cu mai multe categorii de vârstă și în sistemul gospodăresc.



În capitolul V, intitulat „**Diagnosticul infecțiilor produse de *Mycoplasma spp.* la păsări domestice în Nord-Estul României**”, s-a urmărit izolarea, cultivarea și identificarea mycoplasmelor prin examene culturale și tehnici biomoleculare.

Un număr de 135 probe de organe prelevate de la păsări care au murit cu mai puțin de 12 ore înainte de data recoltării sau păsări bolnave, în agonie, ce exprimau semne clinice specifice micoplasmozei provenite de la 54 păsări crescute în sistem intensiv și extensiv au fost puse în cultură pe medii speciale. Mediile utilizate au fost mediul lichid **FM4 (Frey)** pentru mycoplasmele ce fermentează glucoza și **mediu cu Arginină** pentru mycoplasmele ce hidrolizează arginina. În paralel s-au recoltat și probe de sânge prin sondaj, de la păsările vii ale efectivului din care proveneau cadavre sau direct de la păsările în agonie ce au fost luate în studiu. Pentru testele serologice s-au utilizat kit-urile ELISA cantitative ***Mycoplasma gallisepticum Antibody Test Kit*** și ***Mycoplasma synoviae Antibody Test Kit*** (BioChek Poultry Immunoassays).

Ancheta serologică efectuată în două exploatații intensive și în 9 extensive, a arătat o prevalență a infecției cu *M. gallisepticum* situată între 4% și 30% în fermele de broileri de găină și de 100% în sistemul gospodăresc. Pentru *M. synoviae* s-a înregistrat o prevalență situată între 5% și 46% în fermele de broileri de găină și 100% în sistemul gospodăresc, rezultate comparabile cu cele obținute anterior.

Au fost supuse examenului bacteriologic un număr de 65 probe de organe recoltate de la 34 de broileri cu semne și leziuni suspecte de micoplasmoză, prin cultivarea pe mediu FM4 și pe mediu cu Arginină, obținându-se 42 de culturi primare și 41 tulpini prin clonare. Contaminarea a fost întâlnită frecvent la diluția 10^{-1} , pe mediul cu Arginină observându-se la aproape 100% din cazuri.

De la păsări bolnave din sistemul gospodăresc (15 găini, 1 fazan, 2 prepelițe, 1porumbel și 1 bibilică), au fost supuse cultivării 70 de probe de organe, obținându-se 57 de culturi primare și 56 tulpini pe mediul FM4 și 43 culturi primare și 85 tulpini pe mediul cu arginină. Comparativ, gradul de contaminare al culturilor a fost mult mai redus față de probele provenite din sistemul intensiv. Unele sușe au produs o ușoară turbiditate a mediului și formarea unui depozit care la agitare forma flocoane mici în suspensie asemănătoare unui „glob cu zăpadă” (în special în cazul culturilor obținute de la fazan). În final s-au obținut 141 de sușe.

Principala problemă constatată a fost imposibilitatea obținerii unei culturi imediat după clonare sau dacă aceasta era posibilă, nu s-au mai putut obține culturi la un nou pasaj pe mediul solid sau lichid. De asemenea, prin clonarea coloniilor de diferite tipuri morfologice obținute în cultura primară pe mediul solid, s-au obținut culturi uniforme ca aspect morfologic în subculturi,



diferite de tipul clonat. *M. synoviae* este foarte sensibilă la variațiile mediului de cultură și are o creștere mai lentă, motiv pentru care etapa de clonare a eșuat de cele mai multe ori.

Pentru identificare prin PCR s-au utilizat primeri specifici pentru *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* și *Mycoplasma spp.*(VK). Au fost supuse testării la toate cele 4 tipuri de PCR probele de organ (constituite în suspensia inițială), culturile primare, și sușele obținute. Extractul de ADN s-a obținut prin metoda descrisă de Kellogg și Kwok

În sistemul intensiv au fost identificate 4 suspensii inițiale pozitive *M. synoviae* și s-au obținut 16 tulpini de *M. gallisepticum* și 10 de *M. synoviae*.

În sistemul extensiv, s-au identificat 12 suspensii inițiale pozitive pentru *M. synoviae* și 7 pentru *M. gallisepticum*. Dintre cele 56 tulpini obținute pe mediul FM4, au fost identificate prin PCR 45 tulpini de *Mycoplasma spp.*, din care doar 8 au fost *M. gallisepticum* și 2 *M. synoviae* iar dintre cele 85 de tulpini izolate pe mediul cu arginină, 80 au fost identificate prin PCR ca fiind *Mycoplasma spp.* și doar 2 *M. gallisepticum* și 9 *M. synoviae*.

La prepelițele cu semne clinice de sinuzită și conjunctivită s-a izolat și identificat doar *M. gallisepticum*. Prin investigațiile făcute se **descrie pentru prima dată în România implicația *M. gallisepticum* în sinuzita și conjunctivita prepelițelor.**

În urma cercetărilor se constată că în sistemul intensiv de creștere al găinilor evoluează doar *M. gallisepticum* și *M. synoviae* cu foarte rare excepții iar în sistemul gospodăresc evoluează mai mult de două specii.

Nu s-a identificat nici o cultură pozitivă pentru *Mycoplasma iowae*.

Clonarea reprezintă o etapă foarte importantă în izolarea și identificarea mycoplasmelor, mai ales în infecțiile mixte, când se întâlnesc mai multe specii de *Mycoplasma* în aceeași cultură. Se impune astfel clonarea unui număr ridicat de colonii

În cadrul capitolului VI, intitulat „**Caracterizarea biomoleculară a tulpinilor de *Mycoplasma spp.* izolate de la păsări în Nord-Estul României**” s-a utilizat secvențierea pentru identificarea și caracterizarea sușelor neidentificate prin testele PCR obișnuite. Au fost selectate un număr de 42 tulpini ce au provenit de la 12 păsări (11 găini cu vârsta cuprinsă între 40 de zile și un an, de sex diferit și un fazan) din 9 exploatații diferite de pe raza județului Iași și Suceava. Tulpinile s-au izolat din diferite organe (sinus infraorbital, sac conjunctival, laringe, trahee, pulmoni, saci aerieni, testicul și cloacă). Identificarea speciei s-a făcut prin secvențierea regiunii 16S a ARN ribozomal cu ajutorul secvențiatorului automat ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Pentru secvențierea produșilor PCR purificați a fost utilizat kitul de secvențiere ciclică Big Dye™ Terminators (Applied Biosystems). ARN-ul ribozomal are aceeași funcție importantă în celulă, indiferent de specie, ceea ce înseamnă că genele



corespunzătoare sunt sub aproximativ aceeași presiune evolutivă. Aceste proprietăți fac analiza ARNr foarte potrivită pentru studiile filogenetice (Olsen, 1993) și evolutive (Woese, 1987).

După etapa de secvențiere, cromatogramele obținute au fost analizate cu ajutorul programului informatic CHROMAS și GENEIOUS v. 8.0.3. Catenele sens și antisens au fost aliniate în vederea obținerii catenei consensus. Pe baza catenei consensus obținută s-a reușit identificarea tuturor tulpinilor luate în studiu, având o identitate de 97%-100% cu secvențele din GenBank. S-au identificat astfel 7 specii de *Mycoplasma*, din care, șase au fost identificate, după cunoștințele noastre, pentru prima dată în România: *Acholeplasma modicum*, *M. struthionis*, *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. pullorum* și *M. iners*. De asemenea, speciile de *Acholeplasma modicum* și *Mycoplasma struthionis* sunt izolate și identificate, după cunoștințele noastre, pentru prima dată la găină.

Prin analiza filogenetică, tulpinile de *M. gallinaceum* izolate de la fazan se diferențiază ca un grup separat în cadrul speciei, fapt ce demonstrează introducerea unei tulpini noi, diferite de cele autohtone, prin importul de fazani. Tulpinile identificate au poziții diferite pe scara evolutivă în cadrul grupului fapt ce demonstrează diversitatea acestora în cadrul speciei.

În capitolul VII cu titlul „**Caracterizarea antibiorezistenței prin determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) a unor tulpini de *Mycoplasma spp.***” sunt determinate valorile CMI a unor antibiotice folosite în mod curent pentru tratamentul micoplasmozelor. Controlul infecțiilor mycoplasmice prin vaccinare este limitat deoarece sunt puține vaccinuri la dispoziție iar controlul acestor infecții prin chimioterapie este uneori necesar alături de măsurile de biosecuritate pentru a reduce pierderile economice și transmiterea pe verticală și pe orizontală.

Pentru testare au fost selectate 10 tulpini de *Mycoplasma* din diferite specii: *M. gallisepticum*, *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. pullorum* și *M. iners* și șase antibiotice: enrofloxacină, oxitetraciclină, tylozină, tilmicozină, florfenicol și spectinomycină. CMI a fost realizată pe mediu lichid în microplăci. Concentrația minimă inhibitorie este definită ca fiind concentrația cea mai slabă de antibiotic pentru care nu s-a observat schimbarea culorii mediului cu condiția ca martorul fără antibiotic să-și schimbe culoarea. Pentru acest test, culturile au fost titrate și standardizate la o concentrație de 10^4 CCU.

În urma testării, două tulpini de *M. gallisepticum* izolate din pulmon respectiv cloacă de la aceeași pasăre au prezentat valori ale CMI diferite, fapt ce demonstrează prezența a două tulpini diferite în cadrul aceleiași specii. Tulpinile de *M. gallinarum* luate în studiu ce provin din exploatații și locații geografice diferite au prezentat sensibilitate diferită la antibioticele folosite, fapt ce demonstrează diversitatea tulpinilor din cadrul aceleiași specii. Existența infecțiilor cu



două tulpini sau două sau mai multe specii de *Mycoplasma* diferite la același individ, ce au sensibilitate diferită la diverse antibiotice, poate explica eșecul unor tratamente în efectivele infectate.

Tulpinile de *Mycoplasma gallinarum* luate în studiu au prezentat cele mai mari valori ale CMI. Sensibilitatea cea mai scăzută a fost observată în cazul oxitetraciclinei, urmată de tilmicozină și florfenicol, la polul opus fiind enrofloxacină, tylozina și spectinomycină.

În încheierea acestui studiu sunt prezentate un număr de 24 concluzii finale.