

REZUMAT

Cuvinte cheie: micobacterii nontuberculoase, MNT, complexul M. avium, genotipare MIRU-VNTR, spoligotipare.

Prezenta teză de doctorat, intitulată „*Identificarea, caracterizarea și încadrarea taxonomică a tulpinilor de micobacterii nontuberculoase izolate de la om și animale*”, este structurată în două părți principale: **Partea I** - „Stadiul actual al cunoașterii”, care cumulează un număr de 36 pagini și cuprinde o sistematizare a informațiilor extrase din literatura de specialitate privind tema de studiu și **Partea a II-a** - „Contribuții personale”, care cuprinde un total de 103 pagini, în care sunt prezentate rezultatele cercetărilor întreprinse în perioada studiilor doctorale.

Prima parte, „*Stadiul actual al cunoașterii*”, cuprinde o sistematizare a principalelor aspecte de actualitate identificate în literatura medicală de specialitate privind micobacteriile nontuberculoase, caracterizarea și implicațiile patologice ale acestora, aspecte epidemiologice și ecologice și metodele de diagnostic. Această parte este structurată în două capitole: **Capitolul 1** - „*Aspecte bibliografice privind micobacteriile nontuberculoase*” și **Capitolul 2** - „*Principalele specii de micobacterii nontuberculoase cu implicații în patologia veterinară și umană*”.

Partea a II-a, „*Contribuții personale*” este structurată în șapte capitole (3 – 9), în fiecare dintre acestea fiind descrise studiile efectuate privind tema de cercetare propusă, material, metodă și rezultatele obținute, iar în ultimul capitol sunt sistematizate concluziile generale desprinse în urma analizei de ansamblu.

Capitolul 3, „*Scopul cercetărilor, obiectivele propuse și cadrul organizatoric*” aflat în deschiderea părții a doua a tezei, cuprinde, conform uzanțelor, descrierea succintă a scopului și a obiectivelor urmărite cât și cadrul organizatoric în care au fost efectuate cercetările.

Având în vedere importanța acordată micobacteriilor nontuberculoase în ultimele două decenii de către veterinari și medici umani, numărul redus de cercetări efectuate în țara noastră pe acest subiect, capacitatea patogenă oportunistă, numărul mare de gazde și frecvența izolării acestor specii din diverse nișe de mediu naturale sau artificiale, scopul primordial al prezentei teze a fost evaluarea diversității MNT identificate la animale și oameni, contribuind astfel la o mai bună înțelegere a aspectelor de ordin epidemiologic referitoare la principalele specii din acest grup, în regiunea nord-estică a României.

O serie de obiective și activități au fost urmărite și implementate pentru atingerea scopului propus: estimarea seroprevalenței CMA prin testarea unui eșantion de probe recoltate de la mistreți și vulpi, izolarea și identificarea MNT cu implicații în patologia infecțioasă veterinară, evaluarea diversității MNT izolate de la pacienți umani, caracterizarea și analiza filogenetică a speciilor identificate și compararea cu datele

furnizate de literatura de specialitate și cu cele înregistrate în bazele de date de profil, Mac INMV.

Capitolul 4, denumit „*Investigații seroepidemiologice privind infecția cu M. avium la mistreți și vulpi*”, a urmărit realizarea unei investigații epidemiologice privind prevalența anticorpilor anti-MAC în probe de ser de la mistreți (n=275) din 4 județe din zona de est a țării noastre: Iași (n=209), Botoșani (n=11), Bacău (n=17) și Galați (n=27) și un județ din zona central-estică, Covasna (n=11), recoltate în perioada sezoanelor de vânătoare 2017-2018. Alături de acestea au mai fost incluse în studiu și 92 de probe de lichide toracice de la vulpi, provenind din cinci județe din aceeași regiune de studiu: Iași (n=30), Suceava (n=20), Neamț (n=19), Vaslui (n=11) și Galați (n=12), testate anterior în scopul verificării eficacității vaccinării antirabice cu momeli vaccinale, în sezonul 2015.

Distribuția și datele de identificare a probelor de mistreți (fondul de vânătoare, sexul și vârsta animalelor) au fost cunoscute și sistematizate doar pentru probele din județul Iași.

Testarea probelor s-a realizat cu ajutorul kitului comercial ID Screen® Mycobacterium avium Indirect Multi-species (ID.vet, Innovate Diagnostics, Franța), conform protocolului specificat de producător. O singură probă din eșantionul testat de la vulpi, provenind din județul Galați, a fost pozitivă (1,08%). Lipsa expunerii la micobacteriile nontuberculoase CMA constituie, cel mai probabil, explicația rezultatelor negative obținute și s-ar putea datora unei distribuții reduse a acestora în mediu cât și unui număr redus de animale sălbatice cu infecții determinate de acești agenți bacterieni. Absența seroconversiei la mistreți și vulpi demonstrează un rol limitat pe care aceste animale îl au în menținerea și diseminarea speciilor CMA în zona de Est a țării.

Ratele de seroprevalență identificate în populațiile de animale sălbatice din alte țări europene sugerează necesitatea completării acestui studiu preliminar, prin mărirea numărului de probe testate de la aceeași specie cât și prin diversificarea speciilor de animale evaluate.

Capitolul 5, „*Izolarea, identificarea și caracterizarea tulpinilor de micobacterii nontuberculoase de la animale*” cuprinde rezultatele obținute în urma aplicării metodelor de diagnostic bacteriologic, histopatologic și molecular pe diverse probe de țesuturi și materiale patologice recoltate de la animale suspecte de infecție cu micobacterii, respectiv opt găini, cinci bovine, două ovine, un cerb și doi câini. Pentru cultivare, au fost utilizate medii de cultură (Löwenstein-Jensen cu și fără micobactină cât și Middlebrook 7H9) și tehnici de decontaminare conforme cu cele descrise în Manualul de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre al Organizației Mondiale pentru Sănătatea Animalelor (WHO-OIE). Identificarea moleculară s-a realizat prin TaqMan PCR în timp real, utilizând ca ținte o serie de elemente de inserție pentru identificarea și diferențierea membrilor CMA, conform protocolului de lucru utilizat în cadrul Laboratorului pentru Sănătatea animalelor, Unitatea Zoonoze Bacteriene, ANSES, Maisons Alfort, Franța.

Leziunile granulomatoase specifice tuberculozei aviare au putut fi observate pentru toate păsările luate în studiu, nodulii tuberculoși fiind variabil diseminați la nivelul ficatului, splinei, intestinelor și ovarelor, cu dimensiuni de la câțiva mm la peste un centimetru și aspect gri-gălbui. Examenul histopatologic, utilizând colorația Ziehl-Neelsen modificată, a

facilitat evidențierea prezenței bacililor acido-alcoolo-rezistenți (BAAR) cât și a leziunilor de tip granulomatos în diverse stadii evolutive. Pe mediul solid s-a putut observa aspectul coloniilor, acestea fiind netede, fine, miliare, inițial nepigmentate și devenind alb-gălbui odată cu îmbătrânirea. În urma testării moleculare a extractelor din culturi și a celor din țesuturi s-a putut identifica cu certitudine specia *M. avium* subsp. *avium*, pe baza răspunsului la țințele specifice IS1245 și IS901.

Leziuni histopatologice specifice infecțiilor micobacteriene au putut fi evidențiate în probe recoltate de la o ovină și o bovină. Prezența granuloamelor tuberculoase a fost evidențiată în secțiunile din pulmon (la o bovină), caracterizarea ulterioară a micobacteriei identificate fiind inclusă în Capitolului VIII. Concludent a fost și examenul histopatologic efectuat pe probele de la o ovină, fiind evidențiată prezența BAAR și a granuloamelor mature și în formare la nivelul limfonodurilor mezenterice, precum și infiltrat inflamator în secțiunile din regiunea ileonului. Coroborarea rezultatelor obținute în urma testărilor efectuate a condus la identificarea speciei *M. avium* subsp. *paratuberculosis* pentru două dintre rumegătoarele domestice testate (oaie 1: CT IS900 = 27,38, vacă 5: CT IS900 = 27,21). Investigațiile realizate în cazul celor doi câini de vânătoare suspecti au putut pune în evidență implicarea micobacteriilor în infecțiile cutanate nodulare, fără a stabili diagnosticul de granulom leproid canin.

În cadrul **capitolului 6**, „Izolarea și identificarea tulpinilor de micobacterii nontuberculoase de la oameni” sunt prezentate rezultatele studiilor efectuate privind diversitatea MNT izolate în probe respiratorii umane, în cadrul Laboratorului de bacteriologie BK al Spitalului Clinic de Pneumoftiziologie Iași, în perioada mai 2015-martie 2017. Astfel, izolarea primară a urmărit protocolul de lucru utilizat în cadrul instituției mai sus menționate, produsele patologice fiind decontaminate cu hidroxid de sodiu 4% iar cultivarea fiind realizată pe mediul solid Löwenstein-Jensen și în sistemul automat din dotare BACTEC™ MGIT 960™ (Becton, Dickinson & Company). Diferențierea față de membrii complexului *M. tuberculosis* s-a realizat în baza caracterelor fenotipice exprimate și în baza răspunsului la testul rapid, imunocromatografic de detecție a antigenului MPT64. Pentru identificarea speciilor izolate s-a recurs la testarea moleculară cu ajutorul tehnicii TaqMan PCR în timp real, secvențierea regiunilor care codează elementele *Hsp65*, *rpoB* și 16S ARNr și analiza filogenetică (server BLAST NCBI, Seaview, Mega7) a secvențelor obținute.

Rata globală de izolare identificată este de aproximativ 0,25 %, cu variații ale ratelor lunare de la 0 la 1,33%. Majoritatea MNT au fost izolate din probe de spută (70%). Frecvența izolării a fost mai ridicată în rândul pacienților cu vârstă de peste 60 de ani, 30% în intervalul 60 - 70 ani iar 57% din izolate au provenit de la pacienți de sex masculin. Caracterele fenotipice observate au fost variate: colonii netede și rugoase, pigmentate gălbui sau galben-portocaliu.

Analiza moleculară și bioinformatică a condus la identificarea la nivel de specie și subspecie a 82% din izolate, 10% fiind identificate doar la nivel de complex CMA iar 8% nu au putut fi identificate mai în amănunt, fiind încadrate în categoria *Mycobacterium spp.* Micobacteriile din CMA și complexul *M. fortuitum* au fost cel mai cel mai frecvent

identificate (29% și 32%). În cadrul CMA, *M. avium* subsp. *hominissuis* a fost specia preponderent izolată (13%), aceasta fiind un important agent patogen oportunist pentru oameni și suine. Alături de acestea, în rândul speciilor cu creștere lentă au mai fost identificate *M. lentiflavum* (7%), *M. gordonae* (5%) și *M. terrae* (2%).

Dintre speciile cu creștere rapidă, în studiul nostru au fost identificate: *M. peregrinum* (15%), *M. chelonae* (13%), *M. fortuitum* (7%) și într-un procent mai scăzut *M. septicum*/*M. porcinum*, *M. setense*, *M. insubricum*, *M. peregrinum*/*M. porcinum*, *M. mucogenicum* și *M. mageritense*.

Constatările desprinse din acest studiu sunt în concordanță cu datele furnizate de studii colaborative extinse la nivel mondial dar și de raportările ce vizează teritorii mai restrânse. Astfel, la nivel european, cele mai frecvent izolate specii sunt *M. avium*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. intracellulare* și *M. fortuitum* (van der Werf ș.a., 2014), cu variații teritoriale, aceste rezultate fiind reflectate și în prezentul studiu. Astfel, cercetările efectuate aduc contribuții importante, completând tabloul epidemiologic al MNT.

Prezența MNT în diverse nișe de mediu, în sistemele de distribuție ale apei face ca izolarea din specimene nesterile să se poată datora contaminării sau colonizării. Relevanța clinică a unui izolat micobacterian nontuberculos variază în funcție de origine, context clinic și capacitatea patogenă. Infecțiile cu MNT nu sunt notificate în mod sistematic, făcând astfel neclară situația epidemiologică la nivel mondial. De asemenea, interpretarea unui izolat MNT în cazul pacienților umani se face într-un context amplu de factori, cel mai adesea în baza criteriilor stabilite de Societatea Americană Toracică (Griffith ș.a., 2007).

În cadrul **capitolului 7**, „Investigații privind diversitatea moleculară a tulpinilor de micobacterii încadrate în complexul *Mycobacterium avium*” sunt prezentate rezultatele obținute în urma investigațiilor privind diversitatea moleculară a tulpinilor de MNT identificate la animale și oameni și incluse în complexul *M. avium*. Tehnica de tipizare moleculară utilizată a fost MIRU-VNTR, urmând protocolul de lucru și panelul de opt loci de repetiții în tandem MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 și 32, conform metodei descrise de Thibault și colaboratorii (Thibault ș.a., 2007).

Au fost selectate pentru această studiu 20 de izolate de la oameni și 6 probe de la animale, în baza răspunsului puternic (valoare $CT \leq 30$) la ținta *hsp65* obținut la TaqMan PCR în timp real. Prin analiza ampliconilor obținuți în urma amplificării fiecărui locus urmărit au fost obținute profiluri numerice, care au fost ulterior comparate cu datele din platforma on-line “Mac INMV database” - <http://mac-inmv.tours.inra.fr> (INMV = INRA Nouzilly MIRU-VNTR).

Analiza diversității genetice a izolatelor umane a condus la identificarea a trei profile complete: 03331158 (16 izolate), 02331128 (un izolat) și 24131127 (două izolate) și, pentru un singur izolat, a unui profil parțial 033311-8, în lipsa amplificării specifice pentru locusul VNTR10. A fost obținut un profil majoritar (80% din izolate)-INMV 209-03331158, corespunzător lui *M. avium* subsp. *hominissuis*. Profilul 02331128 corespunde INMV 165 (*M. avium* subsp. *hominissuis*) iar 24131127- INMV 100 (*M. avium* subsp. *avium*). Profilul parțial obținut este identic în numărul de repetiții prezente cu cel majoritar.

Capacitatea de discriminare a metodei, în contextul probelor provenite de la oameni, fiind caracterizată de un indice $DI = 0.3632$ (4 profile).

Pentru probele de la animale incluse în studiu, au fost identificate cinci profile diferite: 23131127 (INMV 67, o probă), 24131127 (INMV 100, două probe), 24131117 (INMV 99, o probă) pentru *M. avium* subsp. *avium* și 32332228 (INMV 2, o probă), 5834111(5,8) pentru *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Puterea de discriminare în cadrul acestor probe se caracterizează printr-un indice DI ridicat, de 0,933, capacitatea discriminatorie a metodei fiind concentrată pe trei *markeri* variabili: X3, 292 și 32, locusul X3 ($DI = 0,8$) prezentând o variabilitate mai mare comparativ cu analiza probelor de la oameni.

În România, tehnica MIRU-VNTR a fost utilizată de Macovei I., în 2014, în scopul caracterizării diversității genetice a izolatelor *M. avium* de origine animală, fiind identificate profilele INMV 100, INMV 99 și INMV1. Profilul INMV 100, identificat în studiul prezent în două din probele de găină dar și în două izolate clinice umane, a fost descris în literatură pentru sușe izolate de la diverse specii: suine, bovine, caprine, păsări sălbatice sau domestice (Radomski N., 2007). Profilul majoritar identificat în izolatele umane, INMV 209, a fost descris de către Scherrer și colaboratorii într-un studiu efectuat în Elveția pentru o tulpină de *M. avium* subsp. *hominissuis* izolată din limfonoduri fără modificări patologice de la o bovină sănătoasă (Scherrer ș.a., 2018).

În ansamblu, metoda a exprimat un $ID = 0,612$, puterea cea mai ridicată de discriminare fiind exprimată de locii VNTR 10, MIRU X3 și MIRU 292.

Din datele disponibile și consultate de către noi până în prezent, rezultă că utilizarea tehnicii MIRU-VNTR pentru caracterizarea izolatelor MNT de la oameni a fost realizată pentru prima dată în țara noastră, conferind un caracter inovativ prezentei lucrări.

În **capitolul 8**, „Identificarea și caracterizarea tulpinilor de micobacterii din CMTB identificate la animale” cuprinde rezultatele obținute în urma identificării și caracterizării micobacteriilor incluse în complexul *M. tuberculosis* (CMTB), în probe provenite de la două nurci și o bovină. Tot în acest studiu sunt incluse și datele obținute pentru două izolate de *M. tuberculosis* de origine umană. Identificarea și încadrarea în CMTB s-a realizat prin TaqMan PCR în timp real, utilizând ca ținte secvențele de inserție IS6110, IS1081, IS1561 dar și RD4 și LepA. Caracterizarea micobacteriilor tuberculoase a fost realizată utilizând spoligotiparea cu microbule magnetice în fază lichidă (tehnologia Luminex).

Cercetările efectuate au evidențiat prezența speciei *M. caprae* în probele de origine animală cercetate (nurci și bovină). În urma consultării literaturii de specialitate, apreciem că aceasta este prima identificare a *M. caprae* la nurci. Răspunsul particular observat pentru ținta RD4 (RD4 negativ) sugerează prezența unei deleții în cadrul genomului micobacteriei.

În urma spoligotipării, a fost obținut un profil comun pentru *M. caprae* identificat în probele de origine animală, 200003777377600 (BOV_4-CAPRAE, SIT *shared-type number* 467), caracterizat de absența spacerilor (distanțierelor) 39-43 în comparație cu profilele obținute din probele umane testate. Caracteristică speciei *M. caprae* este și absența primului spacer cât și a celor de la 3 la 16. Pentru cele două izolate *M. tuberculosis* au fost obținute două profile diferite, cel corespunzător probei I 17-034 - 73777777760771 (T1,

SIT 205) fiind caracterizat de absența spacerilor 4, 33-36 iar celui corespunzător probei I 17-064 - 777777764020771 (H1, SIT 45) îi lipsesc spacerii 24, 26-31 și 33-36.

Ultimul capitol, **9**, intitulat „*Concluzii finale*” sumează principalele concluzii desprinse în urma analizei de ansamblu a rezultatelor obținute. Prezenta teză de doctorat aduce o contribuție importantă în ceea ce privește studiul diversității și implicațiilor patologice ale MNT, atât la animale cât și la oameni și constituie o treaptă de pornire pentru cercetări ulterioare, subliniind importanța determinării incidenței micobacteriozelor la nivel național și a riscului zoonotic al acestora.