

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. GHEORGHE SAVUȚA**

**Doctorand,
IOANA ALEXANDRA ANTON (RĂȚOI)**

**IAȘI
2019**

**“ION IONESCU DE LA BRAD” UNIVERSITY
OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE OF IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: INFECTIOUS DISEASES**

DOCTORAL THESIS

**PhD coordinator,
Prof. univ. dr. GHEORGHE SAVUȚA**

**PhD student,
IOANA ALEXANDRA ANTON (RĂȚOI)**

**IAȘI
2019**

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE**

**IDENTIFICAREA, CARACTERIZAREA ȘI
ÎNCADRAREA TAXONOMICĂ A
TULPINILOR DE MICOBACTERII
NONTUBERCULOASE IZOLATE DE LA
OM ȘI ANIMALE**

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. GHEORGHE SAVUȚA**

**Doctorand,
IOANA ALEXANDRA ANTON (RĂȚOI)**

**IAȘI
2019**

**“ION IONESCU DE LA BRAD” UNIVERSITY
OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE OF IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: INFECTIOUS DISEASES**

IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND TAXONOMY OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM HUMANS AND ANIMALS

**PhD coordinator,
Prof. univ. dr. GHEORGHE SAVUȚA**

**PhD student,
IOANA ALEXANDRA ANTON (RĂȚOI)**

**IAȘI
2019**

CUPRINS

INTRODUCERE.....	9
MULȚUMIRI.....	11
REZUMAT.....	15

PARTEA I STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. ASPECTE BIBLIOGRAFICE PRIVIND MICOBACTERIILE NONTUBERCULOASE.....	28
1.1. Genul <i>Mycobacterium</i> : Taxonomie, caracteristici generale ale micobacteriilor, clasificare	28
1.1.1. Încadrare taxonomică.....	28
1.1.2. Caracteristici morfo-structurale generale ale micobacteriilor	29
1.1.3. Clasificarea micobacteriilor	37
1.2. Micobacteriile nontuberculoase: aspecte generale, clasificare.....	39
1.2.1. Clasificarea micobacteriilor nontuberculoase (MNT)	42
1.3. Cercetări în țară și în străinătate privind aspectele ecologice, diversitatea și distribuția micobacteriilor nontuberculoase	46
CAPITOLUL 2. PRINCIPALELE SPECII DE MICOBACTERII NONTUBERCULOASE CU IMPLICAȚII ÎN PATOLOGIA VETERINARĂ ȘI UMANĂ	51
2.1. Principalele specii de micobacterii nontuberculoase cu implicații în patologia veterinară	51
2.1.1. Complexul <i>M. avium</i> (CMA)	52
2.1.2. <i>M. marinum</i>	57
2.1.3. Complexul <i>M. terrae</i>	57
2.1.4. <i>M. kansasii</i>	57
2.1.5. Alte MNT.....	57
2.2. Implicațiile micobacteriilor nontuberculoase în patologia umană.....	58
2.2.1. Infecția pulmonară	58
2.2.2. Limfadenita.....	59
2.2.3. Infecția diseminată.....	60
2.2.4. Infecțiile cutanate, ale țesuturilor moi și ale oaselor	60
2.3. Aspecte generale privind diagnosticul micobacteriilor nontuberculoase	61

PARTEA A II-A CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL 3. SCOPUL CERCETĂRIILOR, OBIECTIVELE PROPUSE ȘI CADRUL ORGANIZATORIC	65
CAPITOLUL 4. INVESTIGAȚII SEROEPIDEMIOLOGICE PRIVIND INFECȚIA CU <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> LA MISTREȚI ȘI LA VULPI SĂLBATICE	68
4.1. Material și metodă	69
4.1.1. Recoltarea și condiționarea probelor.....	69
4.1.2. Evaluarea serologică	71
4.2. Rezultate și discuții.....	72
4.3. Concluzii parțiale.....	74
CAPITOLUL 5. IZOLAREA, IDENTIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA TULPINILOR DE MICOBACTERII NONTUBERCULOASE DE LA ANIMALE.....	75
5.1. Material și metodă	76
5.1.1. Recoltarea și condiționarea probelor.....	76
5.1.2. Examenul necropsic și histopatologic	77
5.1.3. Examenul bacterioscopic direct	79
5.1.4. Examenul bacteriologic.....	81
5.1.5. Identificarea moleculară a micobacteriilor nontuberculoase din probele de origine animală, utilizând tehnica Taqman PCR în timp real	84
5.1.5.1. Extracția acidului nucleic (ADN).....	85
5.1.5.2. Identificarea MNT prin tehnica TaqMan PCR în timp real.....	87
5.2. Rezultate și discuții.....	89
5.2.1. Rezultatele examinării morfopatologice și histopatologice la păsări	89
5.2.2. Rezultatele diagnosticului bacteriologic la păsări	92
5.2.3. Rezultatele obținute în urma analizei probelor de la găini testate prin TaqMan PCR în timp real.....	94
5.2.4. Rezultatele examinării morfopatologice și histopatologice a probelor de la rumegătoare	95
5.2.5. Rezultatele diagnosticului bacteriologic efectuat pe probele recoltate de la bovine, ovine și cerb	98
5.2.6. Rezultatele obținute în urma analizei moleculare a probelor recoltate de la bovine, ovine și cerb prin TaqMan PCR în timp real	100
5.2.7. Rezultatele examinării bacterioscopice a probelor recoltate de la câine	101

5.3. Discuții generale	103
5.4. Concluzii parțiale.....	104
CAPITOLUL 6. IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA TULPINILOR DE MICOBACTERII NONTUBERCULOASE DE LA OAMENI.....	106
6.1. Material și metodă.....	107
6.1.1. Colectarea și condiționarea probelor.....	107
6.1.2. Examenul bacterioscopic direct.....	110
6.1.3. Examenul bacteriologic.....	111
6.1.4. Diferențierea MNT de membrii CMTB prin detecția antigenului MPT64.....	112
6.1.5. Identificarea moleculară a MNT izolate de la pacienți umani	113
6.1.5.1. Extracția acidului nucleic (ADN)	113
6.1.5.2. Identificarea MNT prin tehnica TaqMan PCR în timp real	113
6.1.5.3. Amplificarea genică	113
6.1.5.4. Secvențierea nucleotidelor.....	115
6.1.5.5. Analiza filogenetică.....	115
6.2. Rezultate	117
6.2.1. Rezultatele examenului bacteriologic.....	117
6.2.2. Rezultatele identificării MNT prin TaqMan PCR în timp real.....	117
6.2.3. Caracterizarea și analiza filogenetică a tulpinilor de MNT izolate din probe de origine umană ..	119
6.3. Discuții.....	125
6.4. Concluzii parțiale.....	127
CAPITOLUL 7. INVESTIGAȚII PRIVIND DIVERSITATEA MOLECULARĂ A TULPINILOR DE MICOBACTERII ÎNCADRATE ÎN COMPLEXUL <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i>	129
7.1. Identificarea profilelor MIRU-VNTR pentru tulpinile de MNT de origine umană aparținând Complexului <i>Mycobacterium avium</i>	133
7.1.1. Material și metodă.....	133
7.1.1.1. Probe	133
7.1.1.2. Amplificarea genică prin tehnica PCR clasic	134
7.1.2. Rezultate și discuții	138
7.2. Identificarea profilelor MIRU-VNTR a tulpinilor de MNT de origine animală aparținând Complexului <i>Mycobacterium avium</i>	143
7.2.1. Material și metodă.....	143
7.2.2. Rezultate și discuții	144
7.3. Concluzii parțiale.....	148
CAPITOLUL 8. IDENTIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA TULPINILOR DE MICOBACTERII DIN CMTB DE LA ANIMALE	149
8.1. Material și metodă.....	152
8.1.1. Colectarea și condiționarea probelor	152
8.1.2. Extracția acidului nucleic (ADN).....	153
8.1.3. Amplificarea genică prin TaqMan PCR în timp real	153
8.1.4. Spoligotiparea cu microbile magnetice în fază lichidă (tehnologia Luminex)	154
8.2. Rezultate	156
8.2.1. Detecția elementelor de interes în probele testate prin tehnica TaqMan PCR în timp real.....	156
8.2.2. Rezultatele obținute la spoligotiparea cu microbile magnetice în fază lichidă (tehnologia Luminex)	158
8.3. Discuții.....	159
8.4. Concluzii parțiale.....	163
CAPITOLUL 9. CONCLUZII FINALE.....	165
BIBLIOGRAFIE	169
Anexa 1. PROPRIETĂȚI DIFERENȚIALE ALE UNOR SPECII DE MNT	185
Anexa 2. REZULTATELE SPECIFICITĂȚII INCLUZIVE	186
Anexa 3. LISTA TABELELOR	187
Anexa 4. LISTA FIGURILOR	189
Anexa 5. ABREVIERI.....	192
Anexa 6. LISTA LUCRĂRILOR	193

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	12
ACKNOWLEDGEMENTS.....	14
SUMMARY	21
PART I CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
CHAPTER 1. GENERAL ASPECTS REGARDING NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA	28
1.1. <i>Mycobacterium</i> genus: Taxonomy, general characteristics of mycobacteria, classification	28
1.1.1. Taxonomy	28
1.1.2. General morpho-structural features of mycobacteria	29
1.1.3. Classification	37
1.2. Nontuberculous mycobacteria (NTM): general aspects, classification	39
1.2.1. Classification	42
1.3. Researches conducted in Romania and abroad regarding ecological aspects, diversity and distribution of nontuberculous mycobacteria	46
CHAPTER 2. NONTUBERCULOUS <i>MYCOBACTERIUM</i> SPECIES INVOLVED IN VETERINARY AND HUMAN PATHOLOGY	51
2.1. The main nontuberculous mycobacteria species involved in veterinary pathology	51
2.1.1. <i>M. avium</i> Complex (MAC)	52
2.1.2. <i>M. marinum</i>	57
2.1.3. <i>M. terrae</i> Complex.....	57
2.1.4. <i>M. kansasii</i>	57
2.1.5. Other NTM	57
2.2. Implications of nontuberculous mycobacteria in human pathology	58
2.2.1. Pulmonary Disease.....	58
2.2.2. Lymphatic Disease.....	59
2.2.3. Disseminated disease	60
2.2.4. Skin, Soft Tissue and Bone Disease.....	60
2.3. General aspects regarding NTM diagnosis	61
PART II PERSONAL CONTRIBUTIONS	
CHAPTER 3. RESEARCH GOAL, OBJECTIVES AND THE ORGANIZATIONAL FRAMEWORK.....	65
CHAPTER 4. SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION REGARDING <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> INFECTION IN WILD BOARS AND WILD FOXES	68
4.1. Material și methods.....	69
4.1.1. Collection and conditioning of samples	69
4.1.2. Serological testing.....	71
4.2. Results and discussions.....	72
4.3. Partial conclusions	74
CHAPTER 5. ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA STRAINS FROM ANIMALS	75
5.1. Materials și methods	76
5.1.1. Collection and conditioning of samples	76
5.1.2. Morphopathological and histopathological examination.....	77
5.1.3. Microscopy	79
5.1.4. Bacteriological examination.....	81
5.1.5. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria from animal samples using TaqMan real-time PCR.....	84
5.1.5.1. Nucleic acid extraction (DNA).....	85
5.1.5.2. NTM identification by TaqMan real-time PCR.....	87
5.2. Results and discussions.....	89
5.2.1. Results of morphopathological and histopathological examination in hens.....	89
5.2.2. Results of bacteriological diagnosis in hen	92
5.2.3. Results obtained from TaqMan real-time PCR analysis of the hen samples	94
5.2.4. Results of morphopathological and histopathological examination of ruminant specimens	95
5.2.5. Results of the bacteriological diagnosis performed on samples collected from cattle, sheep and deer	98
5.2.6. The results obtained from the molecular analysis of samples collected from cattle, sheep and deer	100
5.2.7. Results of bacterioscopic examination of dog specimens	101

5.3. General discussions.....	103
5.4. Partial conclusions	104
CHAPTER 6. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA FROM HUMAN SAMPLE	106
6.1. Material și methods.....	107
6.1.1. Collection and conditioning of samples	107
6.1.2. Smear microscopy	110
6.1.3. Bacteriological examination.....	111
6.1.4. Detection of MPT64 antigen for differentiation of MTBC members from NTM.....	112
6.1.5. Molecular identification of NTM human isolates	113
6.1.5.1. Nucleic acid extraction (DNA).....	113
6.1.5.2. NTM identification by TaqMan real-time PCR.....	113
6.1.5.3. Target amplification for sequencing.....	113
6.1.5.4. Sequencing	115
6.1.5.5. Phylogenetic analysis	115
6.2. Results.....	117
6.2.1. Bacteriological examination results	117
6.2.2. Real-time PCR results	117
6.2.3. Characterization and phylogenetic analysis of NTM strains isolated from samples of human origin	119
6.3. Discussions	125
6.4. Partial conclusions	127
CHAPTER 7. INVESTIGATIONS REGARDING MOLECULAR DIVERSITY OF <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> COMPLEX STRAINS	129
7.1. Identification of MIRU-VNTR profiles for <i>Mycobacterium avium</i> Complex NTM strains of human origin.....	133
7.1.1. Materials and methods	133
7.1.1.1. Samples	133
7.1.1.2. PCR amplification for each locus	134
7.1.2. Results and discussions	138
7.2. Identification of MIRU-VNTR profiles for <i>Mycobacterium avium</i> Complex NTM samples of animal origin.....	143
7.2.1. Materials and methods	143
7.2.2. Results and discussions	144
7.3. Partial conclusions	148
CHAPTER 8. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE MTBC MYCOBACTERIA FROM ANIMAL SAMPLES	149
8.1. Materials and methods	152
8.1.1. Collection and conditioning of samples	152
8.1.2. Nucleic acid extraction (DNA).....	153
8.1.3. Real-time PCR identification	153
8.1.4. Microbead-based spoligotyping (Luminex technology).....	154
8.2. Results.....	156
8.2.1. Real-time PCR identification results	156
8.2.2. Microbead-based spoligotyping results	158
8.3. Discussions	159
8.4. Partial conclusions	163
CHAPTER 9. FINAL CONCLUSIONS.....	167
BIBLIOGRAPHY	169
Annex 1. DIFFERENTIAL PROPERTIES OF SELECTED NTM SPECIES	185
Annex 2. RESULTS OF INCLUSIVE SPECIFICITY	186
Annex 3. LIST OF TABLES	187
Annex 4. LIST OF FIGURES.....	189
Annex 5. ABBREVIATIONS.....	192
Annex 6. LIST OF PUBLICATIONS.....	193

INTRODUCERE

Afecțiunile determinate de micobacterii constituie reale provocări pentru sănătatea omului și animalelor. Și astăzi, în secolul XXI, tuberculoza (TBC) rămâne endemică în majoritatea regiunilor, fiind inclusă în rândul primelor 10 cauze de deces și fiind prima în rândul celor datorate unui singur agent infecțios. Conform raportului Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), numai în 2017, TBC a provocat aproximativ 1,3 milioane de decese în rândul persoanelor non-HIV, la care se pot adăuga cele aproximativ 300.000 de decese din rândul pacienților HIV pozitivi (OMS, 2018). În fiecare an, milioane de persoane se îmbolnăvesc de tuberculoză.

România prezintă cea mai ridicată valoare a incidenței tuberculozei (cazuri noi și recidive) de la nivelul Uniunii Europene, dar și printre cele mai mari de la nivelul regiunii europene a Organizației Mondiale a Sănătății. În 2017, rata mortalității cauzate de TBC în România, estimată la 100.000 de locuitori, a fost de 4,9 - comparativ cu media regiunii europene, de 3,1 (OMS, 2018).

Tuberculoza bovină și tuberculoza zoonotică (147,000 cazuri noi/2016) sunt incluse în rândul Obiectivelor pentru Dezvoltare Durabilă (SDG) 2016-2030 ale Organizației Națiunilor Unite și în programul OMS „END TB”, care urmărește oprirea epidemiei globale de TBC până în 2030, fiind astfel dezvoltată o abordare în spiritul conceptului sănătății unice - One Health („Roadmap for zoonotic tuberculosis”, 2017). Deși majoritatea deceselor sunt înregistrate în țările în curs de dezvoltare, regiunile dezvoltate continuă să se lupte cu tuberculoza, dar și cu provocările date de rezistența la medicație (MDR - tulpini multidrog rezistente și XDR - tulpini cu chimioresistență extinsă), de imigrație, pacienți cu imunosupresie și riscul privind infecțiile determinate de micobacteriile nontuberculoase - MNT (OMS, 2018).

În ciuda faptului că au fost identificate cu peste un secol în urmă, interesul pentru micobacteriile nontuberculoase implicate în medicina omului poate fi considerat un fenomen recent, mai evident în ultimii 20 de ani. Sub titulatura de *nontuberculoase* sunt incluse bacteriile din genul *Mycobacterium*, exceptând cele din complexul *M. tuberculosis* (CMTB) și *M. leprae*.

Înrădăcinarea unei denumiri uniform acceptate pentru un grup atât de variat s-a realizat în timp, în paralel cu identificarea de noi membri și cu creșterea frecvenței raportărilor privind infecțiile determinate de aceste microorganisme. O serie de denumiri alternative, precum micobacterii atipice, micobacterii *altele decât cele tuberculoase* (MOTT) sau micobacterii saprofite, de mediu au fost utilizate de-a lungul timpului de către cercetători. Primele raportări și denumirea de „atipice” au survenit din contextul clinic al diferențierii față de *M. tuberculosis*.

Acest grup cuprinde actualmente peste 160 de specii, izolate dintr-o varietate de nișe din mediu și gazde. Prezintă capacitatea de a supraviețui, de a se multiplica și persista în soluri și ape naturale dar și în sistemele și rețelele de alimentare cu apă. Printre cel mai frecvent izolate specii incluse în acest grup sunt cele din complexul *M. avium* (CMA), *M. abscessus*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, membrii complexului *M. terrae*, *M. goodii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum* sau *M. kansasii*. Infecțiile determinate de MNT determină o gamă largă de manifestări clinice la pacienții umani, cea mai importantă fiind infecția pulmonară.

MNT au numeroase implicații și în patologia veterinară. Printre cele mai cunoscute entități patologice micobacteriene se numără: paratuberculoza rumegătoarelor, o enterită cronică granulomatoasă care poate afecta deopotrivă rumegătoarele domestice și sălbatice, determinată de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* și tuberculoza aviară, cauzată de *Mycobacterium avium* subsp. *avium*.

Paratuberculoza, cunoscută și sub denumirea „boala lui Johnne”, a fost descrisă pentru prima dată în 1895 (Johnne și Frothingham, 1895) însă a intrat în atenția veterinarilor încă din prima parte a secolului XIX. La începutul secolului XX, boala era deja observată în efectivele de animale din Europa (Olanda, Belgia Norvegia, Franța, Elveția sau Marea Britanie) și SUA (Barkema ș.a, 2010) iar astăzi înregistrează o distribuție globală, având un impact negativ considerabil, mai ales asupra sănătății și productivității bovinelor de lapte.

Implicațiile zoonotice ale MNT nu sunt de neglijat, în special pentru persoanele imunocompromise, în cazul consumului de carne și produse din carne crude sau nepreparate termic corespunzător sau de lapte nepasteurizat de la animale infectate. De asemenea, a fost evidențiat potențialul zoonotic al unor specii de MNT precum *M. marinum* și *M. ulcerans*, care pot determina infecții de tip granulomatos la pești, sau cele incluse complexul *M. avium*.

Infecțiile cauzate de MNT la oameni nu se raportează oficial iar tehnicile de diagnostic implementate sunt diverse și neuniforme, aceste aspecte influențând calitatea și comparabilitatea datelor epidemiologice furnizate de literatura de specialitate. În țara noastră, datele cu privire la distribuția și frecvența speciilor de MNT sunt limitate, atât pentru oameni cât și pentru animale sau mediu. Reiese astfel importanța temei alese, într-un context general care stimulează cercetarea în această direcție prin numeroasele raportări și evaluări realizate.

Prezenta lucrare urmărește evaluarea diversității speciilor nontuberculoase izolate de la animale și de la pacienți umani, cercetările efectuate dorind să contribuie la actualizarea și completarea datelor epidemiologice dar și etiologice ale infecțiilor cu MNT și evidențierea potențialului zoonotic. Identificarea principalelor specii de micobacterii nontuberculoase cu implicații patologice în medicina veterinară și umană și caracterizarea acestora contribuie la un mai bun control epidemiologic în zona studiată. Utilizarea diverselor metode de diagnostic, atât clasice, bacteriologice cât și moderne, moleculare a facilitat obținerea unor rezultate relevante și de real interes pentru tema propusă.

MULȚUMIRI

Cu profundă recunoștință, mă adresez conducătorului de doctorat, domnului Prof. dr. Savuța Gheorghe, căruia îi mulțumesc pentru îndrumarea și susținerea oferite pe parcursul anilor de studii doctorale și în conceperea și redactarea tezei de doctorat.

Cu gratitudine, mulțumesc distinșilor membri ai comisiei de referenți, pentru interesul și munca depuse pentru parcurgerea și evaluarea tezei mele de doctorat.

Conducerii Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași, îi mulțumesc pentru oportunitățile și contextul educațional academic puse la dispoziție pe durata studiilor doctorale.

Alese mulțumiri adresez doamnei Dr. Maria-Laura Boschioli, director de cercetare, șefa Laboratorului Național de Referință pentru Tuberculoză, ANSES, Franța și doamnei Dr. Lorraine Michelet, manager proiecte științifice și tehnice pentru îndrumarea, coordonarea și sprijinul acordate în realizarea cercetărilor.

Mulțumesc comisiei de îndrumare pentru efort și pentru sugestiile oferite în perioada studiilor doctorale. Colegilor, le mulțumesc pentru înțelegere și pentru ajutorul acordat de-a lungul acestor ani.

Familiei mele îi mulțumesc cu toată dragostea, pentru susținerea, suportul constant și încrederea oferite pe întreaga perioadă a studiilor și a formării mele intelectuale, profesionale și personale de până acum.

INTRODUCTION

Mycobacterial diseases pose real challenges to human and animal health. In the 21st century, tuberculosis (TB) still remains endemic in most regions, being included among the top 10 death causes, and first among the causes due to a single infectious agent. According to the World Health Organization (WHO) report, in 2017 alone, TB caused approximately 1.3 million deaths among non-HIV people, to which approximately 300,000 deaths of HIV-positive patients could be added (WHO, 2018). Every year, millions of people get tuberculosis.

Romania presents the highest value for global incidence of tuberculosis (new and recurrent cases) among the European Union countries and the European Region of the World Health Organization (WHO). In 2017, in our country, the TB mortality rate estimated for 100,000 inhabitants was 4,9, compared to the European average of 3,1.

Bovine tuberculosis and zoonotic tuberculosis (147,000 new cases / 2016) are included in the United Nations' Sustainable Development Goals (SDG) 2016-2030 and in the WHO END TB program to stop the global TB epidemic by 2030, thus developing an approach in the spirit of the single health concept - *One Health* („Roadmap for zoonotic tuberculosis”, 2017).

Although most deaths are signaled in developing countries, the developed regions continue to struggle with the disease, but also with other related challenges, such as: drug resistance (MDR – multidrug resistant strains and XDR - extensively drug resistant), patients with immunosuppression, immigration or nontuberculous mycobacteria – NTM infections risk (WHO, 2018).

Despite the fact that NTM were identified more than a century ago, the interest in them, in human medicine field, can be considered a recent phenomenon, more obvious in the last 20 years. NTM group comprises all the members of the genus *Mycobacterium*, except *M. tuberculosis* complex (CMTB) and *M. leprae*.

The rooting of an uniformly accepted name for such a diverse group occurred over time, in parallel with the identification of new members and the increasing frequency of reports of infections caused by these microorganisms. A number of alternative names, such as atypical mycobacteria, mycobacteria other than tuberculous (MOTT) or environmental, saprophytic mycobacteria have been used over the years by researchers. The first reports and the name "atypical" occurred from the clinical context of differentiation from *M. tuberculosis*.

This group currently comprises over 160 species, isolated from a variety of environmental niches and hosts. NTM present the ability to survive, multiply and persist in soils and natural waters, but also in water supply systems and networks. Among the most frequently isolated species included in this group are *M. avium* complex members (MAC),

M. abscessus, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. terrae* complex species, *M. goodii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum* or *M. kansasii*. NTM infections have a wide range of clinical manifestations in human patients, most notably pulmonary infection.

NTM have many implications in veterinary pathology. The most well known mycobacterial diseases include: ruminants paratuberculosis, a chronic granulomatous enteritis which can affect both domestic and wild ruminants, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and avian tuberculosis, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *avium*.

Paratuberculosis, also known as "Johnne's disease", was first described in 1895 (John and Frothingham, 1895), but came to the attention of veterinarians in the early part of the 19th century. At the beginning of the 20th century, the disease was already observed in livestock in Europe (the Netherlands, Belgium, Norway, France, Switzerland or Great Britain) and the USA (Barkema et al., 2010) and today has a global distribution with considerable negative impact, especially on the health and productivity of dairy cattle.

Zoonotic implications of NTM species are of particular interest especially for immunocompromised persons, in case of consumption of undercooked or raw meat or unpasteurized milk from infected animals. The zoonotic potential of some NTM species such as *M. marinum*, *M. ulcerans*, that may cause granulomatous infections in fish, or *M. avium*, in birds, should not be neglected.

Human infections caused by NTM are not reported and the implemented diagnostic techniques are diverse and non-uniform, these aspects influencing the quality and comparability of the epidemiological data provided by the literature. In our country, data on the distribution and frequency of NTM species isolated from human patients, animals or environment are limited. Thus, the importance of the chosen topic is reflected, in a general context that stimulates research in this direction through the numerous reports and assessments.

The present thesis seeks to evaluate the diversity of nontuberculous isolates from animals and human patients, the research being aimed at improving the epidemiological and etiological data on NTM infections and highlighting any zoonotic potential. The identification of the main species of NTM with pathological implications in veterinary and human medicine and their characterization contribute to obtaining a first epidemiological framework in the studied area. The use of various diagnostic methods, both classical, bacteriological and modern, molecular has facilitated the achievement of relevant results for the proposed theme.

ACKNOWLEDGEMENTS

With deep gratitude, I address to the PhD coordinator, Prof. Savuța Gheorghe PhD, DVM, whom I thank for the guidance and support offered during the years of doctoral studies and in designing of the PhD thesis.

I thank the distinguished members of the doctoral referee committee, for their courtesy to evaluate my doctoral thesis.

To the leading board of the "Ion Ionescu de la Brad" University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi I thank for the opportunities and the academic educational context during the doctoral period.

Special thanks to Maria Laura Boschioli, PhD, Research Director, Head of the National Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, ANSES, France, and Lorraine Michelet, PhD, Scientific and Technical Project Manager, for their guidance, coordination and support in my research activities.

I thank the doctoral guidance committee for the suggestions offered during the doctoral studies. I would also like to thank my colleagues for their understanding and help over these years.

My family, I thank with all my love for their constant support and trust provided throughout my studies and during my intellectual, professional and personal development so far.

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 (III – IX), 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 sezonelor 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.

SUMMARY

Key words: *non-tuberculous mycobacteria*, *MNT*, *M. avium complex*, *MIRU-VNTR genotyping*, *spoligotyping*.

The present PhD thesis entitled "*Identification, characterization and taxonomic classification of nontuberculous mycobacterial strains isolated from human and animals*" is structured into two main parts: **Part I** - "Current state of knowledge", which accumulates a number of 36 pages and includes a systematization of the information extracted from the specialized literature on the topic of study and **Part II** - "Personal contributions", comprising a total of 103 pages, in which the results of the researches undertaken during the doctoral studies are presented.

The first part, "*Current state of knowledge*", includes a systematization of the topical issues identified in the specialized medical literature on non-tuberculous mycobacteria, their characterization and pathological implications, epidemiological and ecological aspects and diagnostic methods. This part is structured in two chapters: Chapter 1 - "*Bibliographic aspects of nontuberculous mycobacteria*" and Chapter 2 - "*Main species of nontuberculous mycobacteria with implications in veterinary and human pathology*".

Part II, "Personal Contributions", is structured in 7 chapters (III - IX), each of them describing the studies carried out on the proposed research theme, the material, the method and the results obtained, and in the last chapter are summarized the general conclusions following analysis.

Chapter 3, "*Research goal, objectives and the organizational framework*" in the opening of the second part of the thesis, includes a brief description of the purpose and objectives pursued and the organizational framework in which the researches were carried out.

Considering the importance given to nontuberculous mycobacteria in the last two decades by veterinarians and human physicians, the scarce research conducted in our country on this subject, the opportunistic pathogenic capacity, the large number of hosts and the isolation frequency of these species from various natural and man-made environmental niches, the primary purpose of this thesis was to assess the diversity of the NTM identified in animals and humans, thus contributing to a better understanding of the epidemiological aspects of the main species in this group, in the northeastern region of Romania.

A number of objectives and activities have been pursued and implemented to achieve the proposed goal: estimation of MAC seroprevalence by testing samples collected from wild boars and foxes, isolation and identification of NTM with implications in

veterinary infectious pathology, assessment of NTM diversity from human patients, phylogenetic characterization and analysis of the identified species and comparison with the data provided by the medical literature and those recorded in the Mac INMV database.

Chapter 4, called "*Seroepidemiological investigation regarding *M. avium* infection in wild boars and wild foxes*", aimed at an epidemiological investigation regarding the prevalence of anti-MAC antibodies in wild boar serum samples (n = 275) from 4 counties in the eastern area of our country: Iași (n = 209), Botoșani (n = 11), Bacău (n = 17) and Galați (n = 27), collected during the 2017-2018 hunting seasons. A total of 92 samples of fox thoracic fluids were also tested, collected from five counties in the same study region: Iași (n = 30), Suceava (n = 20), Neamț (n = 19), Vaslui (n = 11) and Galați (n = 12), previously tested for the purpose of checking the efficacy of rabies vaccines, in the 2015 season.

The distribution and identification data of the wild boar samples (hunting fund, sex and age of animals) were known and systematized only for the samples from Iași County.

Sample testing was performed using the ID Screen® *Mycobacterium avium* Indirect Multi-species (ID.vet, Innovate Diagnostics, France) kit, according to the protocol specified by the manufacturer. A single sample from foxes, from Galați County, was positive (1.08%). Lack of exposure to MAC mycobacteria is most likely the explanation for the negative results obtained and could be due to their reduced distribution in the environment as well as to a reduced number of wild animals with infections caused by these bacterial agents. The absence of seroconversion in boars and foxes demonstrates the limited role that these animals have in maintaining and spreading CMA species in the eastern region of the country.

The seroprevalence rates identified in wild animal populations, in other European countries, suggest the need to complete this preliminary study by increasing the number of tested samples from the same species and through diversification of the animal species evaluated.

Chapter 5, "*Isolation, identification and characterization of nontuberculous mycobacterial strains from animals*" includes the results obtained by applying bacteriological, histopathological and molecular diagnostic methods on various samples of tissues and pathological materials collected from animals suspected of mycobacterial infection, respectively eight hens, five cows, two sheep, one deer and two dogs. The culture media (Löwenstein-Jensen with and without mycobactin and Middlebrook 7H9) and decontamination techniques used are compliant with the guidelines described by the World Organization for Animal Health (WOAH OIE) - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Molecular identification was performed by real-time PCR using a series of insertion elements to identify and differentiate MAC members, according to the working protocol used in the ANSES's Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, Maisons-Alfort, France.

Avian tuberculosis specific granulomatous lesions could be observed for all birds in the study, disseminated in the liver, spleen, intestines and ovaries, with sizes ranging

from a few millimeters to more than one centimeter and a yellowish-gray appearance. The histopathological examination, using modified Ziehl-Neelsen staining, facilitated the observation of Acid-Fast Bacilli (AFB) and granulomatous lesions in various evolutionary stages. On solid media, the appearance of the colonies was noticeable: smooth, small, initially non-pigmented and white-yellowish on ageing. After molecular testing of extracts from cultures and tissues, *M. avium* subsp. *avium* was identified, based on the response to the IS1245 and IS901 targets.

Histopathological lesions specific to mycobacterial infections were highlighted in tissue samples collected from a sheep and a cow. The presence of granulomas was observed in the pulmonary sections (in a bovine), the subsequent characterization of the identified mycobacteria being included in Chapter VIII. The histopathological examination performed on the ovine samples was also conclusive, with the presence of BAAR, granulomas (mature - type I and in the early steps of formation) in mesenteric lymph nodes, as well as inflammatory infiltration in the sections of the ileum. The corroboration of the results obtained in the conducted diagnostic procedures led to the identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* for two of the tested animals (sheep 1: CT IS900 = 27.38, cow 5: CT IS900 = 27.21). The investigations carried out on two hunting dogs were able to highlight the involvement of mycobacteria in cutaneous nodular infections without establishing the diagnosis of canine leproid granuloma.

Chapter 6, "*Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from human samples*", presents the results of the studies conducted on the diversity of NTM isolated from human respiratory samples in the Bacteriology Laboratory of the Clinical Hospital of Pneumology, Iasi, between May 2015 and March 2017. The primary isolation followed the protocol used in the above-mentioned institution, the samples being decontaminated with 4% sodium hydroxide and the culture carried out on Löwenstein-Jensen solid medium and in the BACTEC™ MGIT960™ automated system (Becton, Dickinson & amp; Company). The differentiation from *M. tuberculosis* complex members was based on the phenotypic characteristics and on the response to the rapid immunocromatographic MPT64 antigen detection assay. For species identification, molecular testing was performed using real time PCR and sequencing targeting Hsp65, rpoB and 16S rRNA genes and phylogenetic analysis (BLAST NCBI, Seaview, Mega7) of the obtained sequences.

The overall isolation rate identified is 0.25%, with variations in monthly rates from 0 to 1.33%. Most NTMs were isolated from sputum samples (70%). The isolation frequency was higher among patients over 60 years, 30% between 60-70 years, and 57% of isolates were from male patients. The phenotypic characters observed were varied: smooth and rough colonies, non-pigmented or with yellow or yellow-orange pigment.

Molecular and bioinformatic analysis led to the identification of species and subspecies of 82% of isolates, 10% were identified only at CMA complex level and 8% could not be further identified, being classified as *Mycobacterium* spp. MAC and *M. fortuitum* complex members were most commonly identified (29% and 32%). Within the complex, *M. avium* subsp. *hominissuis* was the predominantly isolated species (13%), a

major opportunistic pathogen for humans and swine. Additionally, from the slow growing group *M. lentiflavum* (7%), *M. gordonae* (5%) and *M. terrae* (2%) were isolated.

Among the rapid growers, the following species were identified: *M. peregrinum* (15%), *M. chelonae* (13%), *M. fortuitum* (7%) and less frequent *M. septicum*/*M. porcinum*, *M. setense*, *M. insubricum*, *M. peregrinum*/*M. porcinum*, *M. mucogenicum* and *M. mageritense*.

These findings are in line with the data provided by collaborative global studies, but also with reports targeting narrower territories. Thus, in Europe, the most frequently isolated species are *M. avium*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. intracellulare* and *M. fortuitum* (van der Werf et al., 2014), with territorial variations, these results being reflected by the present study. Thus, the results obtained in this chapter make important contributions, completing the NTM epidemiological information.

Due to the presence of NTM in various environmental niches, in water distribution systems, isolation from non-sterile specimens may be due to contamination or colonization. The clinical relevance of a nontuberculous mycobacterial isolate varies according to origin, clinical context and pathogenicity. MNT infections are not systematically notified, thus making the epidemiological situation in the world unclear. Furthermore, interpretation of an isolated NTM from human respiratory sample is made considering a wide range of factors, most often based on criteria established by the American Thoracic Society (Griffith et al., 2007).

Chapter 7, "*Investigations on the molecular diversity of Mycobacterium avium mycobacteria strains*", presents the results of the investigations on the molecular diversity of NTM strains identified in animal and human samples and included in the *M. avium* complex. The molecular typing technique used was MIRU-VNTR following the working protocol and panel of eight tandem repeats loci, MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 and 32, described by Thibault et al. (Thibault et al., 2007).

Twenty human isolates and 6 samples from animals were selected for this study, based on the strong response ($CT \leq 30$) to the *hsp65* target obtained at real time PCR. By analyzing the obtained amplicons for each locus, numerical profiles were obtained, which were then compared with data from the on-line "Mac INMV database" - <http://mac-inmv.tours.inra.fr> (INMV = INRA Nouzilly MIRU-VNTR).

Analysis of the genetic diversity of human isolates led to the identification of three complete profiles: 03331158 (16 isolates), 02331128 (one isolate) and 24131127 (two isolates) and, for a single isolate, a partial profile 033311-8, without amplification specific for the VNTR10 locus. A major profile (80% of isolates) was obtained - INMV 209-03331158, corresponding to *M. avium* subsp. *hominissuis*. Profile 02331128 corresponds to INMV 165 (*M. avium* subsp. *hominissuis*) and 24131127 to INMV 100 (*M. avium* subsp. *avium*). The partially obtained profile is identical in the present number of repeats with the major profile. The discriminatory power of the method, in the context of human samples, is characterized by a DI = 0.3632 (4 profiles).

For the animals samples, five different profiles were identified: 23131127 (INMV 67, one sample), 24131127 (INMV 100, two samples), 24131117 (INMV 99, one sample)

for *M. avium* subsp. *avium* and 32332228 (INMV 2, one sample), 5834111 (5.8) for *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. The discriminatory power within these samples is characterized by a high DI of 0.933, the discriminating ability of the method being concentrated on three loci: X3, 292 and 32. The X3 locus (DI = 0.8) exhibited the greatest variability, compared with the analysis of human samples.

In Romania, the MIRU-VNTR technique was used by Macovei I. in 2014 to characterize the genetic diversity of *M. avium* isolates of animal origin, and INMV 100, INMV 99 and INMV1 profiles were identified. The INMV 100 profile, identified in the present study in two of the chicken samples but also in two human isolates, has been described in the literature for strains isolated from various species: swine, bovine, goats, wild or domestic birds (Radomski, 2007). The major profile identified in human isolates, INMV 209, has been described by Scherrer et al., in a study conducted in Switzerland, for a strain of *M. avium* subsp. *hominissuis* isolated from lymph nodes without pathological changes from a healthy bovine (Scherrer et al., 2018).

Overall, the method expressed an DI of 0.612, the highest discriminatory power being expressed by the VNTR 10, MIRU X3 and MIRU 292 loci.

From the available data consulted by us to date, it appears that the use of the MIRU-VNTR technique for the characterization of NTM isolates with human origin has been carried out for the first time in our country, conferring an innovative character to the present thesis.

In **Chapter 8**, "*Identification and characterization of the CMTB mycobacteria from animal samples*" comprises the results obtained in the identification and characterization of mycobacteria included in the *M. tuberculosis* complex (CMTB) in samples from two minks and a cow. Also included in this study are the data obtained for two isolates of *M. tuberculosis* of human origin. Identification was performed by real time PCR, using the insertion sequences IS6110, IS1081, IS1561 as well as RD4 and *LepA* as targets. Characterization of tuberculous mycobacteria was performed using microbead-based spoligotyping (Luminex technology).

The research has revealed the presence of *M. caprae* in the investigated animal samples (mink and bovine). After consulting the literature, we appreciate that this is the first identification of *M. caprae* in minks. The particular response observed for the RD4 target (RD4 negative) suggests the presence of a deletion in the mycobacterium genome, further studies are to be performed in order to characterize the extent of the deletion.

The same *M. caprae* profile was obtained, 200003777377600 (BOV_4-CAPRAE, SIT shared-type number 467), characterized by the absence of the 39-43 spacers compared to the profiles obtained from the human samples tested. Characteristic of the *M. caprae* is also the absence of the first spacer and the ones from 3 to 16. For the two isolates of *M. tuberculosis*, two different profiles were obtained, the one corresponding to the sample I 17-034 - 73777777760771 (T1, SIT 205) characterized by the absence of spacers 4 and 33 to 36, and the one corresponding to sample I 17-064 - 77777764020771 (H1, SIT 45) lacks spacers 24, 26-31 and 33-36.

The final chapter, entitled "*Final Conclusions*", encompasses the main conclusions drawn from the overall analysis of the obtained results. This doctoral thesis makes an important contribution to the study of the diversity and pathological implications of NTM in both animal and human pathology and is a starting point for further research, emphasizing the importance of determining the incidence of mycobacteriosis at a national level and their potential zoonotic implications.

PARTEA I
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

PART I
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CAPITOLUL 1. ASPECTE BIBLIOGRAFICE PRIVIND MICOBACTERIILE NONTUBERCULOASE

CHAPTER 1. GENERAL ASPECTS REGARDING NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA

Familia *Mycobacteriaceae* cuprinde un singur gen, *Mycobacterium* (Lehman și Neumann, 1896). Inițial, în acest gen au fost încadrați doar bacilii tuberculozei și leprei, ulterior fiind incluse numeroase alte specii micobacteriene. Conform nomenclaturii actuale, genul cuprinde peste 190 de specii (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html> accesat la 20 Decembrie 2018, Euzéby, 1997). Denumirea genului provine din grecescul mukês = *fung* și latinescul *bacterium* (Magee și Ward, 2012).

Descoperirea lui *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) de către Robert Koch, în 1882, poate fi considerată temelia microbiologiei micobacteriilor. Prin cercetările sale, Koch a reușit să demonstreze postulatul lui Henle (1840), care a descris microorganismele ca agenți responsabili pentru provocarea bolilor, actualmente fiind recunoscut drept "postulatul lui Koch". Prima micobacterie cunoscută de cercetători nu a fost *M. tuberculosis* ci un bacil descris încă din 1873 de Armauer Hansen, ulterior denumit *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), izolat dintr-un nodul cutanat de la un pacient cu lepră din Bergen, Norvegia. În lipsa unor metode adecvate de colorare, Hansen a demonstrat prezența bacteriei într-un frotiu nativ, eliberând bacilii din celule cu ajutorul unei soluții hipotonice. Imposibilitatea cultivării pe medii artificiale a lui *M. leprae* a constituit un impediment important până la multiplicarea cu succes pe animale de laborator (Magee și Ward, 2012).

1.1. Genul *Mycobacterium*: Taxonomie, caracteristici generale ale micobacteriilor, clasificare

1.1.1. Încadrare taxonomică

Din punct de vedere filogenetic, micobacteriile fac parte din încrengătura *Actinobacteria*, clasa *Actinomycetes*, ordinul *Corynebacteriales*, familia *Mycobacteriaceae* (Chester, 1897), genul *Mycobacterium* (Lehman și Neumann, 1896). Alături de micobacterii, din ordinul *Corynebacteriales* mai fac parte și familiile *Corynebacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Nocardiaceae*, *Segniliparaceae* și *Tsukamurellaceae*. Analiza filogenetică a secvenței genei 16S ARNr arată că actinomicetele care conțin acid micolic formează un

grup bine definit în ordinului Corynebacteriales (anterior subordnul *Corynebacterineae*), în cadrul căruia micobacteriile se disting. Acizii micolici non-micobacterieni variază în lungimea (22-74 atomi de carbon) și în numărul de legături duble (0-5).

Familiiile anterior menționate circumscriu unui model caracteristic al nucleotidelor în poziții definite, conform clasificării propuse de Stackebrandt ș.a. în 1997, ce au la bază modelul nucleotidic al genei 16S ARNr (Stackebrandt ș.a., 1997; Zhi ș.a., 2009). În acest sens, familia *Mycobacteriaceae* se caracterizează printr-un profil ce constă în localizarea nucleotidelor în următoarele poziții: 128:233 (G–C), 250 (U), 316:337 (C–G), 418:425 (C–G), 586:755 (U–G), 599:639 (U–G), 662:743 (C–G), 987:1218 (G–C), 1000:1040 (A–U) și 1026:1035 (U–G).

În studiile recente efectuate de Radhey S. Gupta, Brian Lo și Jeen Son (Gupta ș.a., 2018), în baza analizei genomice a 150 de specii micobacteriene, s-a sugerat divizarea genului *Mycobacterium* într-un gen *Mycobacterium*, care include toți agenții patogeni majori umani ("*Tuberculosis-Simiae*") și alte patru genuri noi: *Mycolicibacterium* gen. nov. ("*Fortuitum-Vaccae*"), *Mycolicibacter* gen. nov. ("*Terrae*"), *Mycolicibacillus* gen. nov. ("*Triviale*") și *Mycobacteroides* gen. nov. ("*Abscessus-Chelonae*"), fiind identificate caractere sinapomorifice pentru fiecare nouă grupare (caractere derivate din cele ancestrale, care au evoluat în cadrul unui grup taxonomic și sunt comune mai multor specii). Această clasificare s-a realizat în baza *indelilor* (inserții și deleții) și proteinelor conservate caracteristice fiecărui nou grup și prin analiza arborilor filogenetici complecși.

1.1.2. Caracteristici morfo-structurale generale ale micobacteriilor

Această familie monogenică este caracterizată de bogăția în lipide, prezența acizilor micolici cu număr mare de atomi de carbon, acidoo-alcooloo rezistența și procentul ridicat de G+C (guanină citozină) din ADN-ul micobacterian, 57–73 mol% (Magee și Ward, 2012) cu excepția lui *M. leprae* (55 mol%). Specia tip a genului este *M. tuberculosis*.

Micobacteriile sunt bacili aerobi, unii microaerofili, ușor curbați sau drepiți, cu dimensiuni aproximative de $0,2-0,6 \times 1,0-10 \mu\text{m}$ (3-5 μm), care prezintă acido-alcooloo rezistență. Cele mai multe specii sunt greu de colorat prin metoda Gram dar sunt de obicei considerate Gram-pozitive. Celulele sunt imobile și nesporulate, necapsulate și fără hife aeriene. Coloniile pot fi colorate în nuanțe ce variază de la alb la crem iar unele tulpini produc colonii pigmentate, datorită prezenței pigmentilor carotenoizi, galbene sau portocalii, cu (fotochromogene) sau fără (scotochromogene) stimulare luminoasă (Magee și Ward, 2012).

În funcție de condițiile de creștere și vârsta culturii, micobacteriile pot varia în mărime și formă, de la coccobacilli până la tije lungi. În condiții nefavorabile: limitare de nutrienți, hipoxie, temperatură, pH sau salinitate inadecvate, își pot modifica aspectul. Acest aspect, observat inițial în frotiuri și adesea contestat, a fost elucidat odată cu utilizarea unor tehnici moderne de vizualizare, precum microscopia electronică de transmisie (abreviată TEM) și de baleiaj (SEM) sau cea de forță atomică (AFM), în particular pentru *M. tuberculosis*, care își reduce lungimea în culturile vechi, devine filamentos în macrofage și

ovoid în cazul privării de nutrienți (Velayati și Farnia, 2012). Variațiile morfologice ale lui *M. tuberculosis* se pot observa fie în faza exponențială de creștere: bacil, formă V, Y, ramificată sau muguri, fie în condiții de stres, când pot apărea forme rotunjite, ovale (Fig. 1), pseudo-spor sau forme L, cu deficit de perete celular (Velayati și Farnia, 2011).

Un rol important în menținerea formei bacilare îl au cele două zone reacționale biochimice implicate în sinteza peptidoglicanilor, unul fiind responsabil de alungirea peretelui lateral iar celălalt de formarea septului (Velayati și Farnia, 2012).

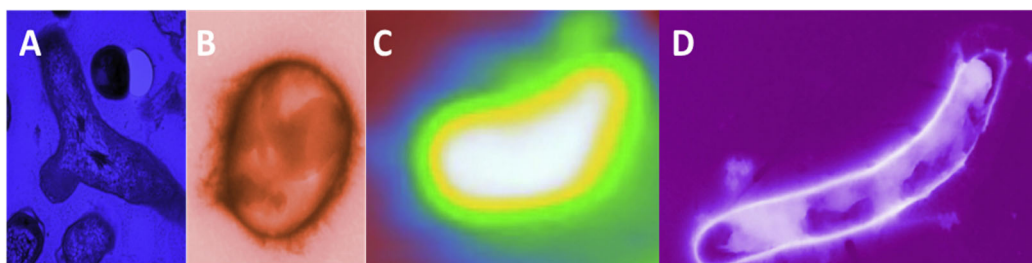


Figura 1.1 Variabilitatea morfologică a lui *M. tuberculosis*: A–formă Y (TEM), B–formă rotundă, C – formă de bastonaș (fază exponențială, AFM), D – formă de bacil (TEM), (sursă: Velayati și Farnia, 2016)

Figure 1.1 The morphological variability of *M. tuberculosis*: A–Y shape (TEM), B–round shape, C–rod shape (exponential phase, AFM), D - rod shape (TEM), (source: Velayati and Farnia, 2016)

Diversitatea morfologică a fost observată și pentru alte specii de micobacterii. Astfel, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* prezintă formă cocobacilară, cu dimensiuni de 1-2μm, în comparație cu alte subspecii ale lui *M. avium* care apar sub formă de bacili (Magee și Ward, 2012). Aspectul diferit din frotiuri (colorația Kinyoun) al micobacteriilor cultivate pe mediu lichid MGIT (mycobacterial growth indicator tubes) a fost analizat de Tu ș.a., (2003), fiind observată atât gruparea caracteristică în „corzi” cât și alte tipuri: puncte, scări, bile, ace.

La începutul secolului XX au fost descrise mai multe forme fenotipice ale lui *M. tuberculosis*, unele fiind ne-acidorezistente (Seiler ș.a., 2003). Formele CWD au fost descrise pentru prima dată în 1883, de către Malassez și Vignal, pentru *M. tuberculosis*, ca forme cocoide, delimitate de o materie vâscoasă și cu structură deficitară a peretelui. În general, formele CWD/formele L sunt protoplaști (pierdere totală a peretelui celular) și sferoplaști (pierdere parțială), capabili de creștere și propagare în medii cu caractere osmotice apropiate (Beran ș.a, 2006). Formele L se caracterizează printr-o pierdere completă sau parțială a unor componente din peretele celular, în conformitate cu denumirea de forme CWD, termen utilizat actualmente în literatură.

Este cunoscut faptul că tratamentul combinat cu glicină/lizozim este capabil să inducă *in vitro* conversia micobacteriilor de la formele bacilare la cele CWD. Apariția lor se realizează și în mod natural, *in vivo*, ca răspuns la diferiți factori antimicrobieni, cum ar fi lizozimul eliberat de celulele fagocitare (Rosu ș.a., 2013).

Interesul medical crescut pentru aceste forme bacteriene este dat de rolul significant al acestora în patogeniza unor afecțiuni cronice atât la om cât și la animale (forme bacteriene în stare latentă). Much descrie, încă de la începutul secolului XX (1907), forme

virulente rotunde ale lui *M. tuberculosis* dar care nu se colorează Ziehl-Neelsen (nu prezintă acido-rezistență). Michailova ș.a., în 2005, observă forme CWD ale lui *M. tuberculosis* rezistente la izoniazidă și streptomycină (Beran ș.a., 2006).

Forme CWD ale *M. avium* subsp. *paratuberculosis* au fost izolate de la pacienți umani cu sarcoidoză și boala Crohn, în ciuda faptului că această micobacterie este considerată patogenă pentru animale. În acest context, s-a suspectat faptul că formele cu deficit la nivelul peretelui celular joacă un rol în patogeniza acestor boli, prin persistența în țesuturile afectate și declanșând un răspuns imunitar localizat (Hulten ș.a., 2000).

O reală provocare este realizarea distincției între membrii complexului *M. tuberculosis* (CMT) și micobacteriile nontuberculoase (MNT), o distincție taxonomic imprecisă dar importantă din punct de vedere clinic. Utilizarea mediilor de cultură lichide și a sistemelor automate cât și progresele din sfera diagnosticului molecular face însă ca identificarea bazată pe caracterele morfologice să treacă pe plan secund, fiind mai puțin relevantă. Cu toate acestea, diagnosticul bacteriologic al MNT se bazează pe izolarea acestor microorganisme din probe biologice, folosind tehnicile standard.

Morfologia coloniilor micobacteriilor nontuberculoase variază foarte mult (Fig. 1.2). *M. abscessus* poate prezenta atât colonii netede cât și rugoase, acestea din urmă fiind asociate cu boli invazive și fiind mai greu de cultivat și adesea rezistente la antibiotice (van Ingen ș.a., 2017). *M. avium* subsp. *avium* produce colonii cu aspect neted, în aproximativ 2-4 săptămâni de incubare. Uneori, pot fi observate și variante rugoase (Terrestrial Manual - A).

La izolarea primară, pe mediul HEYM (*Herrold Egg Yolk and mycobactine*) coloniile de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, tipul bovin, sunt foarte mici, convexe, moi, ne-mucoide și inițial incolore, translucide. Dimensiunea coloniei (0,25-1 mm) poate să rămână redusă în cazul în care coloniile sunt numeroase pe panta mediului. Pe măsură ce incubarea continuă, coloniile devin mai mari, atingând dimensiuni de 2mm, mai opace și își modifică culoarea, spre bej, putând deveni rugoase și mamilate (Terrestrial Manual - B). Pe un mediu solid, cu adaos de piruvat, coloniile de *M. bovis* sunt netede și de culoare albă. Microorganismul crește lent, la 37°C iar în subculturi coloniile pot prezenta aspect rugos (Terrestrial Manual - C).

Unele colonii, cum ar fi cele ale *M. fortuitum* și *M. xenopi* pot prezenta aspect miceliar în stadiile inițiale de creștere iar coloniile mai vechi prezintă extensii filamentoase ramificate, atât pe suprafața cât și în grosimea mediului.

Pe medii lichide, creșterea micobacteriilor pornește de la capătul tubului, urcând treptat spre suprafață, unde se pot observa pelicule proeminente.

Majoritatea micobacteriilor sunt obligatoriu aerobe dar există și specii care tolerează concentrații reduse de oxigen. Dioxidul de carbon, preluat fie din atmosferă sau din suplimente, este de asemenea necesar pentru creștere. Micobacteriile prezintă variații considerabile în substraturile utilizate ca surse de carbon și azot, variații ce pot constitui caractere de diferențiere a speciilor. Suplimentarea cu săruri de fier, magneziu, potasiu, sodiu și sulf poate fi necesară (Magee și Ward, 2012).

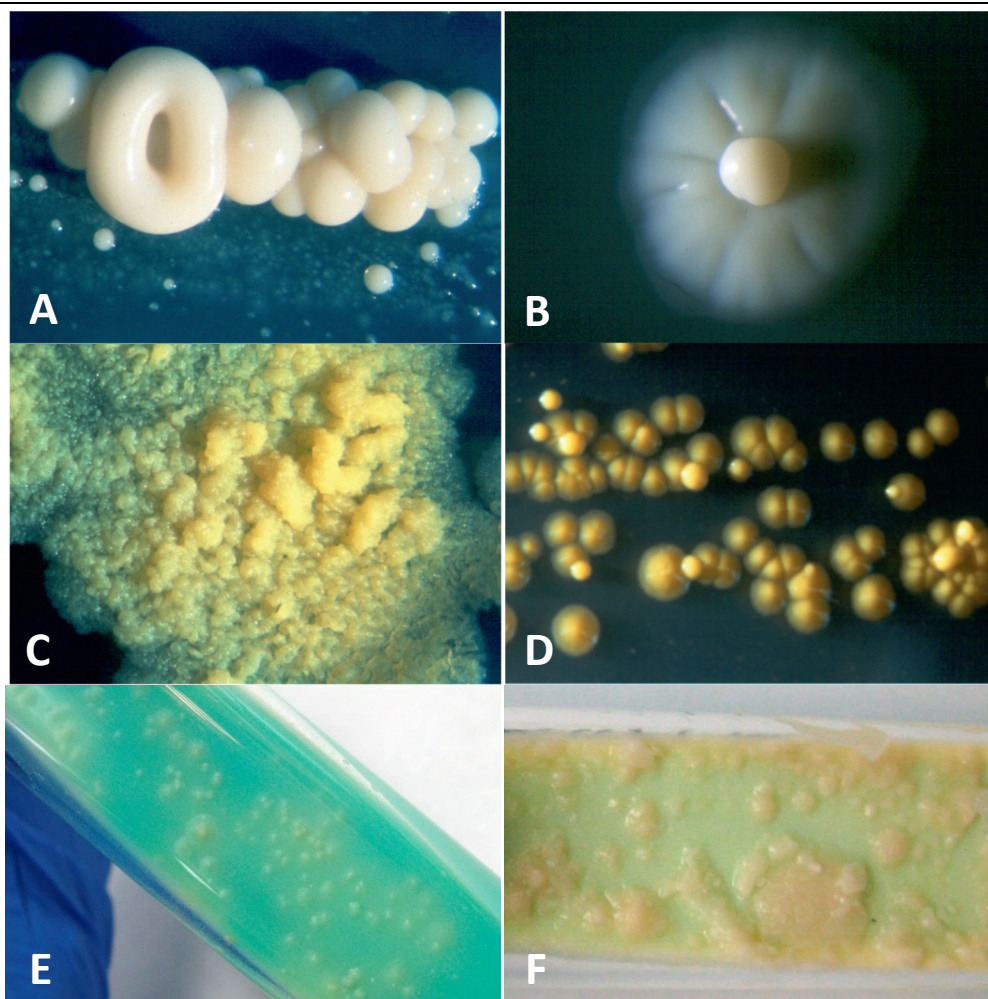


Figura 1.2 Diversitatea morfologică a coloniilor de micobacterii: A-*M. avium*, colonii bej-opace și translucide, mici (Middlebrook 7H10), B-*M. fortuitum*, colonii nepigmentate, netede (Middlebrook 7H10), C-*M. kansasii*, colonii fotocromogene (Middlebrook 7H10, după expunerea la lumină), D-*M. scrofulaceum*, colonii scotocromogene (Middlebrook 7H10), E - *M. bovis* (Löwenstein Jensen), F - *M. caprae* (Coletsos) (Sursa: A-D: van Ingen, 2017, E, F: <https://www.visavet.es/bovinontuberculosis/bt-images-database.php>)

Figure 1.2 Morphological diversity of mycobacterial colonies: A - *M. avium*, beige opaque and small, translucent colonies, (Middlebrook 7H10); B - *M. fortuitum*, unpigmented, smooth colonies (Middlebrook 7H10); C - *M. kansasii*, photochromogenic after exposure to light (Middlebrook 7H10); D-*M. scrofulaceum*, scotochromogenic (Middlebrook 7H10); E-*M. bovis* (Löwenstein Jensen), F-*M. caprae* (Coletsos) (Source: A-D: van Ingen, 2017, E, F: <https://www.visavet.es/bovinontuberculosis/bt-images-database.php>)

Multiplificarea micobacteriilor este un proces lent sau foarte lent, cu timpi de generație de la 2 ore la mai mult de 20 de ore. Pe medii solide, la temperaturi optime, perioada necesară apariției unor colonii vizibile variază de la câteva zile până la peste 8 săptămâni. Temperaturile optime variază foarte mult în funcție de specie, de la 22°C (*M. kansasii*, *M. terrae*) până la 45°C (*M. xenopi*, *M. phlei*). Trei specii importante din punct de vedere clinic au temperaturi de creștere optime mai mici (30°C): *M. ulcerans*, *M. marinum* și *M. Haemophilum* (van Ingen, 2017).

Cele mai multe specii se adaptează rapid creșterii pe substraturi foarte simple, folosind aminoacizi sau amoniac ca surse de azot și glicerol ca sursă de carbon, în prezența sărurilor minerale. Genul cuprinde și organisme fastidioase, care necesită suplimentarea mediilor de cultură cu hemin (*M. haemophilum*), micobactină (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*) sau alți compuși cu rol în transportul fierului. *M. leprae* nu a putut fi cultivat pe medii de cultură sintetice (Magee și Ward, 2012).

Identificarea biochimică convențională este un procedeu lent, laborios și inexact datorită puterii discriminatorii și a reproductibilității limitate și de aceea utilizarea sa este mult redusă în laboratoarele clinice. Câteva precizări privind caracteristicile de diferențiere pentru unii membrii din grupul MNT sunt redată în Anexa 1.

Structura peretelui celular

Complexitatea moleculară a peretelui celular micobacterian constituie un caracter distinctiv al genului *Mycobacterium* față de alte procariote. Deși sunt încadrate în grupul organismelor gram-pozitive, micobacteriile prezintă similitudini la nivelul peretelui celular cu bacteriile gram-negative, precum bariera impermeabilă externă. Minnikin propune, în 1982, modelul structural acceptat pentru arhitectura peretelui celular, un aranjament multistratificat al învelișului celular micobacterian, favorizând analogia cu membrana bistratificată a bacteriilor gram-negative (Minnikin 1982; Alderwick ș.a., 2015).

Peretele celular micobacterian este bogat în acid micolic și alte lipide complexe, ceea ce îi conferă impermeabilitate la soluțiile colorante apoase. Unitatea structurală de bază a peretelui micobacterian este complexul mycolil-arabinogalactan-peptidoglican (mAGP) (Alderwick ș.a., 2015).

Rezistența la decolorare cu soluții acide este o caracteristică a micobacteriilor dar și a altor actinomicete relaționate. Această proprietate este corelată cu prezența barierei lipidice, ce împiedică penetrarea agentului de decolorare. Variațiile conținutului lipidic conduc la apariția unor diferențe între speciile micobacteriene în ce privește gradul de rezistență la decolorare (Magee și Ward, 2012).

Stratul granular, aflat între peptidoglicani și membrana plasmatică, de care este legat, este compus din proteine care pot lega penicilina, lipoproteinele și acizii lipoteichoici (Fig. 1.3). Acest strat a putut fi vizualizat prin intermediul CEMOVIS (cryo-electron microscopy of vitreous sections), însă structura precisă și funcția acestuia nu sunt pe deplin cunoscute (Zuber ș.a., 2008; Zuber ș.a., 2006). Un spațiu periplasmic desparte peretele celular de membrana plasmatică bistratificată convențională.

„Miezul” peretelui celular este alcătuit din peptidoglicani (PG), atașați covalent de arabinogalactani (AG) și acizi micolici, ulterior formând complexul mycolyl - arabinogalactan - peptidoglican (mAGP), esențial pentru menținerea unei structuri robuste și pentru susținerea următorilor componenți. Stratul superior cuprinde lipide libere legate de acizi grași. Această parte cuprinde diferite proteine de perete celular, lipomanani (LM), lipoarabinomanani (LAM) și fosfatidilinozitol - manozide (PIM) (Fig. 1.3).

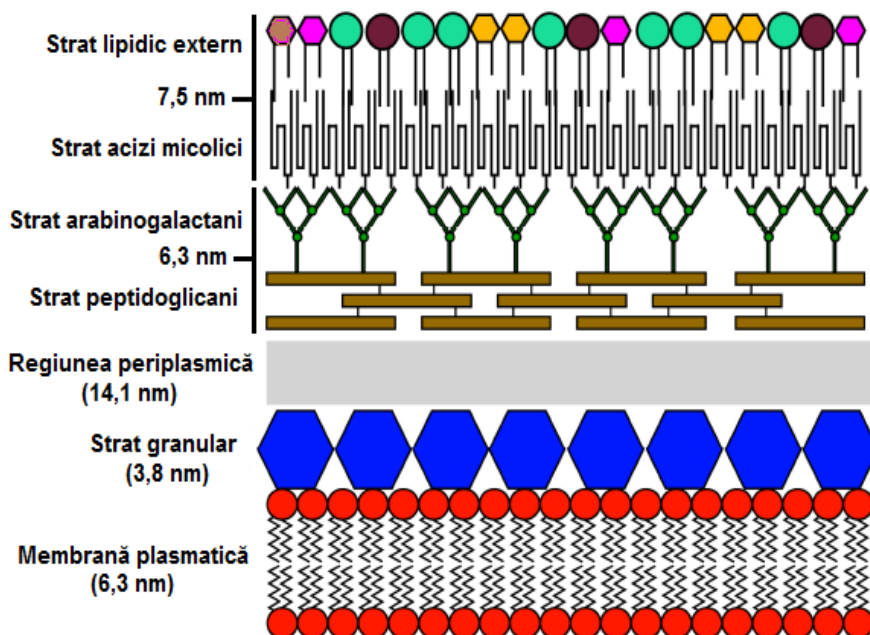


Figura. 1.3 Reprezentare schematică a peretelui celular micobacterian
(după Zuber ș.a., 2008 și Vincent ș.a., 2018)

Figure 1.3 A schematic representation proposed for the mycobacterial cell wall
(after Zuber et al., 2008; Vincent et al., 2018)

Peptidoglicanii (PG) sunt compuși din resturi de N-acetilglucozamină (GlcNAc) și reziduuri de acid muramic modificat (Mur), legate într-o configurație β (1-4). Au roluri esențiale în menținerea rigidității și stabilității osmotice optime, contribuind astfel la păstrarea integrității și formei celulare (Alderwick ș.a., 2015).

Arabinogalactanii (AG) sunt heteropolizaharide compuse din galactoză și arabinoză sub formă furanoidă (Vincent ș.a., 2018), reprezentând aproximativ 35% din masa totală a învelișului celular. Se estimează că aproximativ 10% - 12% din reziduurile de acid muramic ale PG sunt legate covalent la AG. Împreună, PG și AG formează un macro-polimer, poziționat între membrana citoplasmatică și stratul de acizi micolici (Alderwick ș.a., 2015).

Alături de AG și PG, în structura peretelui intră și micomembrana. Stratul interior al acesteia cuprinde acizi micolici (AM). Aceștia prezintă variații structurale, de la amestecuri relativ simple de componente saturate și nesaturate (la corynebacterii), la amestecurile foarte complexe, caracteristice micobacteriilor. Acizii micolici micobacterieni sunt acizii grași cu catenă lungă, au între 60 și 90 de atomi de carbon, cu până la 4 legături duble (Magee și Ward, 2012, Marrakchi ș.a., 2014). Există fie liberi, nelegați, putând fi extrași cu solvenți organici, fie esterificând unitățile terminale pentaarabinofuranozil ale arabinogalactanilor (Marrakchi ș.a., 2014). Aceștia constituie o barieră în calea moleculelor hidrofilice, fiind incluse în această categorie multe antibiotice, și totodată reprezintă ținta unor substanțe antituberculoase de linia I și a II-a, inclusiv Isoniazida, unul dintre principalele efecte importante ale acestui medicament fiind inhibarea sintezei AM (Marrakchi ș.a., 2014).

Stratul exterior al micomembranei este eterogen, în componența sa intrând fosfolipide, factorul cord, lipoglicani, lipopeptidolipide iar la periferia sa (stratul cel mai exterior) se găsesc proteine și cantități reduse de carbohidrați și lipide (Chiaradia ș.a., 2017). Complexitatea și specificitatea acestei structuri au dus la îngreunarea caracterizării sale, excepție făcând *M. tuberculosis* și alte micobacterii cu creștere lentă. Această membrană exterioară conține *porine* cu rol în absorbția moleculelor hidrofile mici, caracterizate doar pentru *M. smegmatis* (Stahl ș.a., 2001) și este totodată implicată în secreția factorilor de virulență, precum ESAT-6 și Cfp10 (Chiaradia ș.a., 2017).

Micozidele sunt responsabile pentru controlul permeabilității celulare (rezistență la enzime solubile în apă, antibiotice și dezinfectanți). Ele sunt asociate cu *factorul cord* și *ceara D* (D wax), o micozidă care sporește răspunsul imun și care, alături de diferite proteine, induce hipersensibilitatea de tip întârziat. Glicolipidele sunt toxice, contribuie la un răspuns granulomatos și sporesc supraviețuirea micobacteriilor fagocitate (Carter și Wise, 2004).

Factor cord (6,6'-dimicolat de trehaloză) este cel mai abundent glicolipid din peretele celular micobacterian, este toxic pentru celulele mamiferelor și intervine în răspunsul imun al gazdei, inhibând migrarea neutrofilelor polimorfonucleare. În mediu apos factorul cord formează micle, iar pe suprafețe hidrofobe se structurează sub formă de monostrat. Aceste conformații conferă proprietăți biologice diferite. Astfel, în forma micelară, acest compus este netoxic, dar în monostrat devine foarte toxic (Rajni ș.a., 2011). În componența sa intră lipide cu catenă lungă, moleculele fiind constituite din trehaloză (α -D-glucopyranosyl-(1-1)- α -D-glucopyranoside) esterificată la două reziduuri de acid micolic. Factorul de cord este responsabil pentru morfologia microscopică specifică - dispunerea în corzi sau serpentine (Goyal ș.a., 2011).

Prin structura sa (trehaloză atașată la componente hidrofobe), factorul cord acționează ca o barieră în calea fuziunii moleculelor fosfolipidice, precum cea dintre fagozom și lizozom, crescând astfel forța de hidratare și generând un obstacol steric (Rajni ș.a., 2011).

Lipoarabinomananul (LAM) este un factor de virulență asociat lui *M. tuberculosis*. Este o componentă principală a peretelui celular și permite micobacteriei să supraviețuiască în celula gazdă, prin afectarea rezistenței și a răspunsului imun. LAM suprimă proliferarea celulelor T prin blocarea transcripției acelor gene activate de γ -interferon în macrofage, interferând cu activarea macrofagelor suplimentare, elimină radicalii citotoxici liberi de oxigen produși de macrofage și inhibă activitatea proteinkinazei C (Goyal ș.a., 2011). A fost demonstrat faptul că acest compus determină eliberarea factorului de necroză tumorală FNT *in vitro*, în monocite din sânge uman și *in vivo*, la șoareci, aspect ce poate fi corelat cu pierderea în greutate, febra și necroza mediată de citokine din tuberculoză (Goyal ș.a., 2011). Localizarea LAM este încă dezbătută, unele studii evidențiind prezența acestui compus la nivelul membranei plasmatică (Chiaradia ș.a., 2017).

Genomul micobacterian

Genomul micobacteriilor prezintă o structură cromozomială bacteriană tipică, adică o singură moleculă de ADN circulară mare, cu un conținut ridicat de G+C, de 60-70% mol (cu excepția *M. leprae*; <57%). *M. tuberculosis* a fost printre primele specii bacteriene al cărei genom a fost complet secvențiat - 4,41 Mb (Cole ș.a., 1998; Brodin ș.a., 2005). Multe specii MNT conțin plasmide, a căror mărime și număr sunt variabile, fiind specifice speciei, fără dovezi de transfer. Cele mai multe prezintă gene implicate în rezistența la factorii de mediu, precum metalele grele. *M. tuberculosis* nu conține plasmide (van Ingen, 2017).

Analiza genomului complet a evidențiat diferențe în cadrul complexului *M. tuberculosis*. Astfel, prin compararea *M. tuberculosis* H37Rv (izolat uman virulent pentru șoareci) cu Bacilul Calmette-Guérin (BCG)-Pasteur, a fost descoperită regiunea de diferențiere 1 (RD1), care codează doi factori de virulență importanți: ESAT-6 și CFP-10 și secreția acestora. Regiunea RD1 este absentă la tulpinile de *M. Bovis*-BCG (Mahairas ș.a., 1996). Dimensiunea genomului *M. bovis*, de 4,345,492 pb, este semnificativ mai mică decât cea a *M. tuberculosis* (4,411,529pb) (Garnier ș.a., 2003).

Analiza genomului lui *M. leprae* (3,268,210 bp) arată importanța pierderii genelor din punct de vedere al virulenței și specificității de gazdă. Prin comparație cu *M. tuberculosis*, agentul etiologic al leprei a pierdut peste 2000 de gene, și peste 1000 au fost identificate ca *pseudogene*, adică genele defecte care nu au fost încă eliminate complet (Cole ș.a., 2001, Magee și Ward, 2012).

Progrese rapide ale tehnologiei de secvențiere fac ca în prezent să fie disponibile public secvențele complete de genom pentru 150 de membri din genul *Mycobacterium* (Gupta ș.a., 2018), 65 de genomuri fiind descrise pentru membrii complexului *M. avium* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

Aspecte generale privind imuno-patogenitatea micobacteriilor

Patogenitatea micobacteriilor în gazdele imunocompetente este corelată cu răspunsul imun al gazdei cât și cu proprietățile de virulență ale bacteriilor. Principalul factor de virulență al micobacteriilor este capacitatea de a invada și de a persista sau a se multiplica în macrofage. Bacilii pătrund în macrofag prin fagocitoză și odată internalizați, sunt înconjurați de o vacuolă legată de membrană - un fagozom. Odată cu maturarea fagolizozomului, bacilii sunt expuși la o varietate de factori antimicrobieni, incluzând intermediari reactivi de oxigen, pH foarte acid și activitate hidrolitică. Micobacteriile virulente obstrucționează maturarea fagozomilor, inhibând acidificarea și în acest mod pot evada în citoplasmă (van Ingen, 2017, Houben ș.a., 2012).

Răspunsul imun mediat celular este în primul rând implicat în patogeneză. Acesta implică activarea macrofagelor pentru identificarea și inhibarea sau uciderea micobacteriilor și detectarea și liza fagocitelor, în care micobacteriile cresc și se multiplică.

Antigenii micobacterieni sunt prezentați de monocite/macrofage, rezultând secreția de interleukină (IL)-2 și proliferarea limfocitelor CD4+ și CD8+. Antigenii micobacterieni proveniți din fagozom sunt prezentați de molecule de clasă II ale complexului major de histocompatibilitate (CMH) iar cei din citoplasmă de molecule MHC de clasa I. Astfel,

celulele pot fi stimulate sau distruse, prezentarea antigenului din citoplasmă explicând imposibilitatea controlului bacililor (van Ingen, 2017).

Eliberarea γ -IFN de către clonele CD4 și într-o mai mică măsură de către CD8, celulele naturale ucigașe (NK) și celulele $\gamma\delta$ activează macrofagele, care eliberează factorul de necroză tumorală (FNT). La locul infecției apar în ordine: granulocite polimorfonucleare (PMN), celule NK, $\gamma\delta$ și apoi celule $\alpha\beta$ T, care în timp devin predominante în răspunsul celular. Ordinea recrutării este corelată și cu proximitatea celulelor față de locul infecției; de exemplu, celulele $\gamma\delta$ sunt susceptibile de a fi printre primele la locul infecției cu *M. tuberculosis* în plămâni (van Ingen, 2017).

Celulele T au capacitate citotoxică iar celulele PMN produc enzime puternic proteolitice, care determină distrugerii tisulare. Macrofagele activate au o capacitate crescută de a distruge micobacteriile, însă producția de FNT contribuie la necroza tisulară și, prin urmare, la exprimarea patologiei (Lenaerts ș.a., 2015).

Granuloamele apar în infecția cronică, fiind constituite din agregate de celule epitelioid și limfocite, situate de obicei la periferie. Bacilii pot persista în celulele gigant Langhans (celulele epitelioid fuzionate), ducând la imposibilitatea sterilizării granulomului. Cu timpul, un perete de collagen va încapsula granulomul iar centrul acestuia poate deveni necrotic, cu un aspect cazeos (Perianu, 2012). Toate micobacteriile pot determina leziuni granulomatoase la animalele de experiență, dacă este inoculată o cantitate suficientă de bacili (Wayne și Kubica, 1986 citați de Magee și Ward, 2012).

1.1.3. Clasificarea micobacteriilor

Inițial, clasificarea taxonomică a micobacteriilor a fost realizată din punct de vedere clinic, fiind analizate diferitele tipuri de micobacterii în relație cu *M. tuberculosis*. Acest fapt este reflectat de utilizarea termenului "micobacterii atipice" pentru tulpinile diferite de *M. bovis* sau *M. tuberculosis*. La mijlocul secolului trecut, a fost realizată o clasificare mult mai potrivită și utilă de către Ernest Runyon (Runyon, 1959), bazată pe producerea de pigment și pe rata de creștere în culturi, clasificare ce va fi detaliată în subcapitolul 1.2.

Odată cu mărirea genului *Mycobacterium*, au fost utilizate și alte scheme de clasificare. Clasificarea adansoniană (taxonomie numerică) are la bază analiza câtor mai multe caractere, în egală proporție, similitudinea între perechile de tulpini (calculată în baza numărului de caractere comune) și gruparea micobacteriilor care împărtășesc multe caractere comune. Pentru a facilita analiza relațiilor dintre membrii genului, în 1967 a fost înființat un grup internațional de lucru pentru taxonomia micobacteriilor (IWGMT), care a condus la îmbunătățiri taxonomice semnificative (Magee și Ward, 2012).

Cross și Goodfellow (1973) au propus o clasificare în baza producției de pigmenti, împărțind micobacteriile cu crește rapidă în nepigmentate și scotocromogene. Kubica (1973) a formulat o schemă de grupare în baza ratei de creștere și a unor caracteristici precum: producția de niacină, reducerea nitraților, producția de catalază, fotochromogenitatea, hidroliza Tween 80, reducția teluritică, toleranța la clorură de sodiu, activitatea aril-sulfatazei și creșterea pe mediul MacConkey (Velayati și Farnia, 2016).

Înțelegerea curentă a relațiilor în cadrul genul *Mycobacterium* are la bază analiza secvențelor genei 16S ARNr și caracteristicile fenotipice și biochimice.

Speciile micobacteriene pot fi clasificate în două grupuri, pe baza ratei de creștere: specii cu creștere lentă (eugonică), care necesită 7 sau mai multe zile de incubare la o temperatură optimă, pentru a produce colonii vizibile și micobacterii cu creștere rapidă, care sunt observabile în mai puțin de 7 zile, în aceleași condiții. Speciile relevante din punct de vedere clinic sunt, adesea (nu exclusiv), incluse în grupul celor cu creștere lentă (Magee și Ward, 2012).

Structurarea arborilor filogenetici în baza genei 16S ARNr dar și a altor secvențe conservate, *rpoB*, *hsp65* susține această separare. Studii recente au evidențiat însă prezența unor grupări distincte în rândul micobacteriilor cu creștere lentă sau rapidă. De exemplu, *M. terrae* și speciile strâns relaționate, care prezintă viteză lentă spre intermediară de creștere, pot fi diferențiate de alte micobacterii cu creștere lentă printr-o inserție caracteristică de 14 nucleotide în helixul 18 al genei 16S ARNr (Magee și Ward, 2012, Tortoli, 2012).

Între rata de creștere și numărul existent al operonilor ribozomali există o asocieră. Bercovier și colaboratorii (1986) au arătat că tulpinile cu creștere rapidă au de obicei doi operoni (ARNr și *rrnB*), în timp ce tulpinile cu creștere lentă au unul singur. Operonul micobacterian este alcătuit dintr-o regiune conducătoare, o genă 16S ARNr, spacer-1 intergenic (ITS-1), o genă 23S ARN, ITS-2 și o genă 5S ARNr.

Unele specii cu creștere lentă precum membrii complexului *M. terrae* (creștere lentă-intermediară), *M. celatum*, *M. xenopi* conțin două copii ale operonului ARNr, iar unele specii cu creștere rapidă, precum speciile incluse în grupul *M. abscessus*-*M. chelonae*, prezintă o singură copie.

Astfel, în grupul micobacteriilor cu creștere lentă sunt incluse specii precum membrii CMTB: *M. avium*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. haemophilum*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. terrae* iar specii precum *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. porcinum* sau *M. phlei*, formează colonii în mai puțin de 7 zile.

Clasificarea micobacteriilor se poate realiza și în funcție de aspectele ecologice și cele de patogenitate. Astfel, Kazda ș.a. divizează speciile în trei mari categorii: patogene obligatoriu, potențial patogene și saprofite (sau din mediu).

Din prima categorie, cea a micobacteriilor obligatoriu patogene, face parte *M. leprae*, alături de membrii complexului *M. tuberculosis*. Aceste specii prezintă virulență ridicată, fiind cele mai avansate evolutiv și agenți etiologici ai unor afecțiuni micobacteriene importante, la oameni și animale domestice și sălbatice, respectiv tuberculoza și lepra. În cazul micobacteriilor tuberculoase, la oameni, transmiterea pe cale respiratorie se realizează prin particule de mici dimensiuni, sub 5 μ în diametru, care rămân în aer perioade îndelungate. Mărima redusă a acestor particule facilitează traversarea epitelului ciliat (Kazda ș.a., 2009).

În grupul micobacteriilor cu potențial patogen sunt incluse atât specii cu creștere lentă, precum *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. marinum* sau membrii complexului *M. avium*, cât și specii cu creștere rapidă - *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. chelonae*, *M. abscessu*,

putând fi considerate forme de tranziție între grupul micobacteriilor obligatoriu patogene și grupul celor de mediu, saprofite.

Acestea au ca sursă fie diferite nișe din mediu, pe care le colonizează și în care se pot multiplica, fie gazdele vii susceptibile, la care pot determina micobacterioze. Numărul în creștere al membrilor acestui grup se datorează atât inovațiilor aduse diagnosticului molecular, care a făcut posibilă diferențierea dintre specii dar și atenției ridicate acordate infecțiilor cu micobacterii nontuberculoase la persoanele imunosupresate (Kazda ș.a., 2009).

Micobacteriile saprofite reprezintă cel mai cuprinzător grup. Acestea au fost izolate inițial din diverse tipuri de medii, specii de mușchi, surse variate de apă, atât potabilă cât și ape de suprafață sau material organic din sol. Au fost socotite ca agenți contaminanți mult timp, fiind des izolate din specimene clinice. Specii precum *M. hiberniae* sau *M. cookii* pot determina apariția unei sensibilizări nespecifice la tuberculinarea bovinelor. Aceste specii nu sunt patogene pentru animalele de laborator (Kazda ș.a., 2009).

Există specii de micobacterii necultivabile pe medii de cultură sintetice, cel mai evident exemplu fiind *M. leprae*. Alte specii incluse în acest grup sunt: „*M. lepromatosis*” (cauzează forma difuza lepromatoasă a leprei, endemică în Mexic), „*M. visible*” - cauzează micobacterioză granulomatoasă multisistemică la pisici, *M. lepraefelis* și *M. tarwinense* - cauzează lepra felină, *M. uberis* - cauzează telită nodulară și inflamație la nivelul scrotului, la bovine și ovine, *Mycobacterium* sp. (o specie nedenumită), care determină granulomul leproid canin, *M. tilburgii* - identificat la pacienți cu infecții diseminate (Turenne, 2019).

Pe lângă 16S ARNr, relațiile dintre speciile micobacteriene au fost de asemenea examinate, utilizând secvențele spacer 16S-23S și câteva gene înalt conservate precum: *gyrA* (Guillemin ș.a., 1995), *gyrB* (Kasai ș.a., 2000), *rpoB* (Tortoli, 2012), *hsp65* (Tortoli ș.a., 2015).

Actualmente, utilizarea secvențelor de genom complet face posibilă distingerea corectă și definitivă între specii și subspecii. Studiile genomice comparative conduc la identificarea markerilor moleculari sau a caracteristicilor comune membrilor unui grup de microorganisme înrudite evolutiv, demonstrându-și utilitatea în diferențierea grupurilor taxonomice diferite și în înțelegerea relațiilor dintre acestea.

1.2. Micobacteriile nontuberculoase: aspecte generale, clasificare

Grupul cuprinzător al micobacteriilor nontuberculoase (MNT), cu peste 160 de specii, reunește toți membrii genului *Mycobacterium*, excepție făcând speciile incluse în CMTB și *M. leprae*. Prezența acestor micobacterii în diverse nișe din mediu a fost remarcată imediat după descoperirea bacilului tuberculos de către Robert Koch, dar au trecut câteva decenii înainte ca acestea să fie asociate cu infecțiile la om.

MNT au fost descrise în literatură sub diverse denumiri, ca "atipice", "anonime", "micobacterii altele decât TB (MOTT)", "de mediu", "oportuniste, de mediu", cel mai frecvent însă fiind întâlnite sub denumirea de "nontuberculoase" sau "MNT". Termenul de

atipice a fost utilizat pentru prima dată de Pinner, în 1935, în lucrarea sa "Microorganisme atipice acido-rezistente" (Pinner, 1935). Nici unul dintre acești termeni nu a fost universal acceptat, însă denumirea de nontuberculoase este cea mai răspândită, aceasta fiind utilizată de Societatea Americană Toracică (ATS), în declarația din 2007 (Griffith ș.a., 2007).

Interesul actual ridicat față de infecțiile determinate de MNT, cu precădere în medicina omului, a apărut în urma asocierilor dese a acestora la patologia pacienților cu SIDA, dar și frecvența tot mai ridicată a afecțiunilor pulmonare determinate de aceste microorganisme la populația non-SIDA. Creșterea gradului de conștientizare a importanței acestor micobacterii se datorează totodată și tehnicilor actuale de izolare și identificare a agenților microbieni, diversitatea mediilor de izolare, utilizarea sistemelor automate, dar mai ales a tehnicilor moleculare.

Afecțiunile cauzate de aceste micobacterii au manifestări variate, nu sunt de obicei transmise de la om la om și au fost, în linii mari, grupate sub denumirea de micobacterioze. Afectează o gamă largă de specii: păsări, reptile, pești, mamifere sălbatice și domestice și omul. Pentru persoanele imunocompromise, infecțiile datorate micobacteriilor nontuberculoase (MNT) reprezintă un pericol major, reprezentând o cauză importantă de morbiditate și mortalitate în țările occidentale (Katoch, 2004). După tuberculoză și lepră, cea de-a treia boală determinată de micobacterii, mai frecventă în Africa dar probabil și în alte părți ale lumii, este declarată a fi „Buruli”, sau „Barnesdale ulcer”, cauzată de *M. ulcerans*.

MNT au fost izolate nu doar din organismele animale, ci și din mediu, unde ocupă numeroase nișe, cum ar fi: materie organică din soluri, ape naturale și sisteme de apă urbane, amibe, aerosoli și praf, mușchi, vegetația din zonele mlăștinoase dar și alte plante, biofilme, uleiuri sau alte lichide utilizate în fabricarea pieselor metalice. Aceste micobacterii sunt întâlnite la nivel global, cu variații de specie (Hruska K. și Kaevska, 2012), prezentând o rezistență crescută la dezinfectante și oferind un răspuns defectuos la medicația antituberculoasă. Un rezervor important este constituit din amibe (Ovrutsky et al., 2013). Capacitatea de a supraviețui și a se multiplica în protozoare este relaționată cu rezistența intracelulară în macrofagele, atât la om cât și la animale.

În medicina veterinară, infecțiile determinate de MNT au căpătat treptat teren, odată cu scăderea incidenței tuberculozei bovine și creșterea presiunii de supraveghere în țările în care sunt implementate programe de control împotriva tuberculozei bovine. MNT creează două probleme principale: în primul rând, interferența cu programele de depistare a tuberculozei la bovine și a altor micobacterioze majore, cum ar fi paratuberculoza și în al doilea rând, potențialul de a provoca infecții semnificative sau oportuniste, care duc la pierderi economice considerabile (Biet și Boschioli, 2014).

Factorii care pot conduce la rezultate fals pozitive, dar și fals negative la testarea intradermică cu tuberculină, pot fi corelați cu infecțiile MNT, adesea subestimate. Coalergenii sunt incriminați ca responsabili pentru reacțiile nespecifice, în special atunci când se utilizează testul unic (TU), fiind astfel recomandată utilizarea intradermo-reacțiilor comparative (TCS). Mai multe MNT pot coexista la nivelul unui efectiv de animale sau chiar în același individ, determinând astfel diagnosticarea greșită atât la nivel individual, cât

și la nivel de turmă. Compoziția tuberculinei PPD este complexă și include antigene care pot reacționa încrucișat, fiind proteine comune tuturor micobacteriilor (Francis ș.a., 1978). Expunerea animalelor la speciile complexului *M. avium* (MAC) sau la micobacterii precum ar fi *M. hiberniae*, *M. cookii* poate conduce la sensibilizarea nespecifică a bovinelor testate (Biet și Boschioli, 2014). *M. avium* subsp. *paratuberculosis* este una dintre cele mai importante cauze ale reacțiilor fals pozitive, atât la tuberculina aviară (PPD A) cât și la cea bovină (PPD B).

Măsurarea răspunsului imun mediat celular în testul de detecție a γ -IFN, poate de asemenea să fie influențat de expunerea la diferite micobacterii, situații observate în Africa de Sud la animale expuse la *M. fortuitum* (Michel, 2008) sau la *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Barry ș.a., 2011) în Irlanda (Gormley ș.a., 2013) sau Franța (Faye ș.a., 2011).

Izolarea MNT de la nivelul conținutului intestinal sau al limfonodurilor mezenterice de la animale sugerează o cale de contaminare digestivă, însă nu sunt excluse căile de transmitere respiratorie (inhalare în timpul pășunatului) sau cutanată (inoculare).

Numeroase specii MNT sunt incriminate ca agenți etiologici ai infecțiilor la animale. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* este agentul etiologic al paratuberculozei (boala lui Johne), cunoscută încă de la sfârșitul secolului al XIX-lea, o enterită granulomatoasă cronică, care afectează rumegătoarele domestice și sălbatice (bovine, ovine, caprine, camelide și bivoli, cervide) și este distribuită la nivel global (Terrestrial Manual - B). Bacteria a fost izolată și de la alte specii: mistreți, urși, rozătoare, vulpi, raton, maimuțe (cu leziuni similare cu cele întâlnite în boala Crohn la om). *M. avium* subsp. *avium* este agentul cauzator al tuberculozei aviare, care afectează păsările de companie, cele exotice, sălbatice și domestice (Terrestrial Manual - A), fiind de asemenea izolat de la bovine, porcine sau cabaline (Coelho ș.a., 2013). *M. avium* subsp. *hominissuis* este o bacterie de mediu care provoacă infecții oportuniste la porcine, caracterizată de obicei prin leziuni granulomatoase în ganglionii limfatici asociați sistemului digestiv, dar și în unele organe interne cum ar fi ficatul, plămânii și rinichii. Leziunile sunt de obicei descoperite la inspecția de abator, ducând la pierderi economice importante (Johansen ș.a., 2014).

M. fortuitum și *M. smegmatis* pot provoca mastite sau dermatite nodulare la ovine și bovine (Perianu, 2012). *M. fortuitum* a fost izolat de la reptile, amfibieni, mistreți, bivoli sau foci (Bercovier și Vincent, 2001). *M. szulgai*, *M. kansasii* sau *M. avium* pot provoca leziuni cutanate la câini și pisici (Gross ș.a., 2005). Speciile *M. tilburgii*, *M. simiae*, *M. genavense* au fost incriminate în etiologia *granulomului leproid canin*, care afectează țesuturile cutanate și subcutanate, cu un caracter nodular, auto-limitant, al cărui factor cauzal este încă necaracterizat (Gross ș.a., 2005; Malik ș.a., 2013). Sindromul are o distribuție geografică largă, fiind întâlnit frecvent în Australia și Brazilia, dar multe cazuri au fost raportate și în Noua Zeelandă, în Zimbabwe, Columbia și în diferite zone ale Statelor Unite ale Americii (Greene, 2011).

Deși MNT sunt inofensive pentru majoritatea persoanelor, la nivel global sunt raportate din ce în ce mai multe cazuri de infecții. Mulți pacienți umani prezintă factori

predispozanți, cum ar fi: breșe traumatice ale pielii, patologii pulmonare sau defecte arhitecturale, tuberculoză, fibroză chistică, boala pulmonară obstructivă cronică, tulburări imunosupresoare generalizate, congenitale sau dobândite (de exemplu HIV).

Manifestările clinice la oameni includ infecția pulmonară, infecția diseminată, infecția cutanată sau limfadenita. Infecțiile pulmonare sunt cele mai frecvente tipuri de boli provocate de MNT și se produc adesea la pacienții cu afecțiuni respiratorii preexistente. Limfadenita este al doilea tip comun de manifestare, putând afecta un singur limfonod sau un grup de ganglioni limfatici din regiunea cervico-facială la copii imunocompetenți sau poate să apară sub formă de limfadenopatie generalizată (Griffith ș.a., 2007).

Infecția cutanată se poate prezenta fie localizat (adesea cauzată de *M. marinum* sau de *M. ulcerans*, în zonele endemice) la gazdele imunocompetente expuse prin abraziuni minore ale pielii, fie diseminat, la pacienții imunocompromiși (cel mai frecvent fiind implicate speciile cu creștere rapidă precum *M. abscessus*). Mai rar întâlnite sunt infecțiile diseminate, cele ale oaselor, articulațiilor sau ale țesuturilor moi și infecțiile genito-urinare (Griffith ș.a., 2007).

1.2.1. Clasificarea micobacteriilor nontuberculoase (MNT)

Conform clasificării lui Runyon (Runyon, 1959), MNT pot fi diferențiate în funcție de rata de creștere și formarea de colonii pigmentate, în patru tipuri. Grupurile I, II, și III formează colonii pe medii de cultură în peste 7 zile iar tipul IV cuprinde micobacterii cu creștere rapidă și nepigmentate (Tabelul 1.1).

Tabelul 1.1/ Table 1.1
Clasificarea MNT conform lui Runyon (sursă: după Runyon, 1959)
Runyon classification of the MNT (after Runyon, 1959)

Creștere	Producția de pigment	Specii
LENTĂ (>7 zile)	FOTOCROMOGENE (I)	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i>
	SCOTOCROMOGENE (II)	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. syulgai</i>
	NEPIGMENTATE (III)	MAC <i>M. xenopi</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. terrae</i> <i>M. haemophilum</i>
RAPIDĂ (< 7 zile)	NEPIGMENTATE (IV)	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. peregrinum</i>

Multe specii de micobacterii au capacitatea de a produce pigmenți carotenoizi (caroten și xantofile). Producția de carotenoizi este puternic influențată de compoziția mediilor de cultură și de condițiile de creștere. Lumina are un efect semnificativ asupra producției de pigmenți pentru unele specii. Speciile scotocromogene (tipul II), de ex. *M.*

scrofulaceum sau *M. szulgai*, produc un pigment galben-orange în absența luminii, în timp ce micobacteriile fotocromogene (tipul I), de exemplu *M. kansasii*, produc pigment la stimularea cu lumină. Noncromogenii (tipul II), precum *M. avium*, nu produc carotenoide. Funcția carotenoidelor micobacteriene este în mare parte necunoscută, fiind sugerat faptul că acestea ar oferi protecție împotriva efectelor fototoxice.

Tabelul 1.2/ Table 1.2

Clasificarea MNT cu creștere rapidă în funcție de producția de pigment și patogenitate (Sursă: García-Agudo, García-Martos, 2011)

MNT rapid growers classification according to pigment production and pathogenicity (Source: García-Agudo, García-Martos, 2011)

Tipul de pigmentare	Patogeni oportuniști	Patogeni ocazionali	Rar patogeni	Nepatogeni
Fotocromogene	<i>M. marinum</i> *	<i>M. novocastrense</i>	-	-
Scotocromogene		<i>M. aurum</i> <i>M. cosmeticum</i> <i>M. flavescens</i> * <i>M. neoaurum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. vaccae</i>	<i>M. austroafricanum</i> <i>M. confluentis</i> <i>M. hassiacum</i> <i>M. hodleri</i> <i>M. holsaticum</i> <i>M. lacticola</i> <i>M. monacense</i> <i>M. rhodesiae</i>	<i>M. acapulcense</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. diernhoferi</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. engbaeckii</i> <i>M. gadium</i> <i>M. gilvum</i>
Scotocromogene			<i>M. tokaiense</i> <i>M. rhodochrous</i>	<i>M. komossense</i> <i>M. madagascariense</i> <i>M. murale</i> <i>M. obuense</i> <i>M. poriferae</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. thamnopheos</i> <i>M. vanbaalenii</i>
Nepigmentate	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. mucogenicum</i>	<i>M. bolletii</i> <i>M. bonickii</i> <i>M. brisbanense</i> <i>M. brumae</i> <i>M. conceptionense</i> <i>M. goodii</i> <i>M. houstonense</i> <i>M. immunogenum</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. massiliense</i> <i>M. neworleansense</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. septicum</i> <i>M. wolinskyi</i>	<i>M. alvei</i> <i>M. aubagnense</i> <i>M. barrassiae</i> <i>M. canariensis</i> <i>M. elephantis</i> <i>M. hackensackense</i> <i>M. phocaicum</i>	<i>M. agri</i> <i>M. chitae</i> <i>M. confluentis</i> <i>M. fallax</i> <i>M. friedmanii</i> <i>M. morioakaiense</i> <i>M. pulveris</i> * <i>M. salmoniphilum</i> <i>M. sphagni</i>

* specii care pot prezenta și creștere rapidă, *M. engbaeckii*= *M. hiberniae* subsp. *engbaeckii* (Tortoli ș.a.,2017)

Acest sistem de clasificare a fost definitoriu în dezvoltarea sistematizării micobacteriilor însă prezintă unele limitări. De exemplu, membrii complexului *M. avium* nu sunt fotocromogeni, fiind incluși în categoria III–micobacterii nepigmentate, deși unele izolate produc colonii ușor pigmentate, aspect ce ar putea conduce la o sistematizare greșită, ca scotocromogeni. De asemenea, grupul IV include membrii care pot produce pigmenți carotenoizi. Micobacteriile cu creștere rapidă pot fi clasificate în funcție de producția de pigment și patogenitate, după cum sunt prezentate în tabelul 1.2.

Dintre cele peste 160 de specii de MNT, unele pot structura complexe, pe baza similitudinii genetice: complexul *M. avium*, complexul *M. fortuitum*, complexul *M. abscessus-chelonae*, complexul *M. terrae*, complexul *M. simiae*, grupul *M. xenopi*.

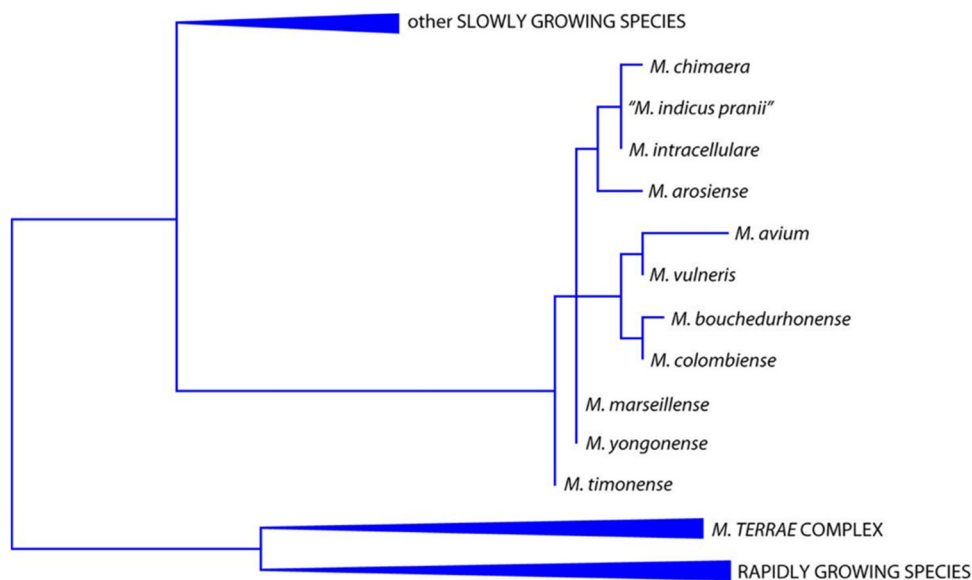


Figura 1.4 Arbore filogenetic care include membrii CMA, bazat pe analiza secvenței 16S ARNr (sursă: Tortoli, 2014)

Figure 1.4 Phylogenetic tree including MAC members, based on the analysis of 16S rRNA gene (source:Tortoli,2014)

Complexul *M. avium* (CMA), anterior cunoscut și sub denumirea de *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI), este un grup de micobacterii cu creștere lentă, cuprinzând *M. avium*, cu cele patru subspecii: *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH), *M. avium* subsp. *silvaticum* (MAS) și *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. intracellulare* și alte specii incluse mai recent: *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. yongonense*, *M. timonense*, *M. paraintracellulare*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. vulneris*, *M. bouchedorhonense* (Figura 1.4) (Cayrou ș.a., 2010, van Ingen ș.a., 2009, Ben Salah ș.a., 2009) și *M. lepraemurium* (Benjak ș.a., 2017).

Analiza WGS a dus la modificări în această clasificare, fiind propusă încadrarea ca subspecii ale *M. intracellulare* următorii membri ai complexului: *M. chimaera*, *M. yongonense* și *M. intracellulare*, iar *M. paraintracellulare* ca tulpină *M. intracellulare*

(Tortoli ș.a., 2017). La nivel global, membrii acestui complex sunt principalele MNT implicate în patologia pulmonară umană.

Membrii complexului *M. terrae* sunt: *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. paraterrae*, *M. triviale*, *M. hiberniae*, *M. kumamotonense*, *M. longobardum*, *M. algericum*, *M. engbaekii*, *M. senuense*, *M. heraklionense*, *M. sinense*, *M. arupense*, *M. hiberniae*, *M. minnesotense*. Aceste micobacterii cu creștere lentă, nepigmentate, produc rareori infecții umane. (Tortoli ș.a., 2014).

Complexul *M. fortuitum* includea în mod tradițional trei taxoni, *M. fortuitum*, *M. peregrinum* și o biovariantă nedenumită. Acum cuprinde peste 15 specii, definite de absența pigmentilor, creșterea în mai puțin de 7 zile, producție de arilsulfatază în 3 zile, reducerea nitraților, absorbția și creșterea în prezența a 5% NaCl. Analiza genei 16S ARNr și a altor regiuni conservate a făcut posibilă includerea altor specii înrudite în acest grup: *M. alvei*, *M. porcinum*, *M. conceptionense*, *M. senegalense*, *M. farcinogenes*, *M. setense*, *M. boenickei*, *M. houstonense*, *M. neworleansense*, *M. brisbanense*, *M. septicum* (Adékambi ș.a., 2006; Lamy ș.a., 2008).

Grupul *M. smegmatis* cuprinde *M. smegmatis sensu stricto* și încă două specii, *M. goodii* și *M. wolinskyi* (Brown ș.a., 1999). Analize filogenetice sugerează gruparea speciile producătoare de mycolactonă: *M. ulcerans*, *M. shinshuense*, *M. liflandii*, *M. pseudoshottsii* și unele tulpini de *M. marinum* (Pidot ș.a., 2010).

Complexul *M. abscessus-chelonae* cuprinde bacterii din mediu care au capacitatea de a provoca infecții oportuniste la om, în special infecții pulmonare și cutanate. Sunt incluse în acest grup micobacterii cu creștere rapidă, multirezistente, fiind printre cele mai frecvente micobacterii nontuberculoase (MNT) izolate din probele clinice, implicate în infecții cronice, recurente și dificil de tratat. Grupul cuprinde speciile *M. abscessus* și *M. chelonae*, cât și *M. salmoniphilum*, *M. immunogenum*, *M. stephanolepidis* și *M. saopaulense* a căror taxonomie a fost intens studiată (Adekambi ș.a., 2017).

Recent, două noi specii au fost adăugate acestui complex, *Mycobacterium franklinii* (Nogueira ș.a., 2015) și *Mycobacterium fukienense* (Zhang ș.a., 2013). Leao și colaboratorii au propus modificarea taxonomică a grupului, desemnând speciile *M. massiliense* și *M. bolletii* într-o singură subspecie, *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Leao ș.a., 2011). *M. abscessus* cuprinde astăzi trei subspecii: subsp. *massiliense*, subsp. *bolletii* și subsp. *abscessus* (Tortoli ș.a., 2016), iar *M. chelonae* este de asemenea divizată în trei subspecii: subsp. *chelonae*, subsp. *bovis* și subsp. *gwanakae* (Kim ș.a., 2018).

Complexul *M. simiae* cuprinde 18 specii: *M. simiae*, *M. intermedium*, *M. kubicae*, *M. montefiorensis*, *M. sherrisii*, *M. interjectum*, *M. lentiflavum*, *M. florentinum*, *M. genavense*, *M. parmense*, *M. parascrofulaceum*, *M. palustre*, *M. triplex*, *M. eurapaeum*, *M. paraense*, *M. saskatchewanense*, *M. stomatepieae* și *M. heidelbergens* care au fost izolate din variate surse de apă și sol. Din cadrul acestui grup, *M. simiae* este specia cel mai frecvent implicată în patologia umană (Hamieh ș.a., 2018).

1.3. Cercetări în țară și în străinătate privind aspectele ecologice, diversitatea și distribuția micobacteriilor nontuberculoase

Pentru a înțelege dinamica distribuției micobacteriilor este necesară evaluarea principalelor medii care pot contribui la multiplicarea și/sau la răspândirea lor.

Dinamica distribuției micobacteriilor nontuberculoase (MNT) în mediu este un fenomen complex. Acestea împart diverse nișe cu oamenii și animalele domestice și sălbatice iar expunerea repetată este un factor de risc asociat infecțiilor cu MNT.

Principalii factori biotici pentru micobacteriile heterotrofe cuprind acele substanțe nutritive care sunt disponibile sau eliberate în timpul descompunerii substanțelor organice complexe sau sunt sintetizate de microorganisme autotrofe.

Existența altor organisme concurente, în special cele aparținând familiei *Enterobacteriaceae*, poate duce la un consum rapid al nutrienților, mai ales în medii acvatice puternic poluate. Timpul de generație al *Escherichia coli* este redus (20 minute) în comparație cu cel al micobacteriilor. În condiții optime de laborator, *M. tuberculosis* necesită 16 ore. Astfel, "strategia" micobacterilor este de a coloniza nișe care asigură condiții potrivite pentru multiplicarea lor și să restrângă sau să excludă alte microorganisme din flora competitivă. Un astfel de factor restrictiv este acidifierea mediului, care aduce beneficii multiplicării micobacteriilor (Každa, 2009).

Factorii abiotici includ condițiile fizice și chimice, cum ar fi temperatura, umiditatea, pH-ul, aderența la suprafețe și capilaritatea externă a plantelor. Biotopurile care prezintă condiții favorabile pentru multiplicarea micobacteriilor sunt considerate medii de habitat pentru acestea. Mușchiul de turbă sau alte briofite aparțin acestui grup. Dar, în ciuda numeroaselor studii privitoare la izolarea micobacteriilor din mediu, a numărului mare de probe examinate și diversitatea speciilor izolate, trebuie exclusă abordarea greșită că micobacteriile sunt omniprezente în sol și apă (Každa, 2009).

O contribuție importantă în abordarea modernă a ecologiei micobacteriilor a fost adusă de Chapman (1971), care a introdus noțiunea de "infecția micobacteriană - ca rezultat al nișelor ce se suprapun". Acesta a arătat că micobacteriilor din mediu sunt departe de a fi "pretențioase" cu privire la cerințele lor nutriționale și la temperatura optimă de creștere și că multe au abilitatea de a se multiplica într-un interval de pH larg (Chapman și Bernard, 1962).

J. O. Falkinham și echipa sa au efectuat studii cu privire la izolarea micobacteriilor din medii diverse și condițiile în care acestea se pot multiplica. Ei au propus termenul "*ecologie fiziologică*" pentru a distinge aceste experimente de simpla izolare din mediu. Au demonstrat, prin urmare, că tulpini din complexul *M. avium*, izolate din apă poluată cu metale grele, tolerează concentrații mai mari de săruri de metale grele și oxianioni (Falkinham ș.a., 1984). Abilitatea de detoxifiere, mai curând decât metabolizare a metalelor și altor compuși, contribuie astfel la colonizarea și persistența micobacteriilor în mediul acvatic. Acest aspect a condus la o creștere a interesului pentru condițiile în care se pot dezvolta în micobacteriile în medii specifice.

Tehnicile de diagnostic bazate pe PCR (Reacția de polimerizare în lanț) au constituit un instrument valoros pentru detectarea micobacteriilor din mediul înconjurător și a permis distincția diverselor specii, contribuind la descrierea ecologiei genului. A fost posibilă observarea „traseelor” micobacteriilor între habitate dar și determinarea factorilor ce contribuie la răspândirea lor. Alte tehnici, precum polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție (RFLP - restriction fragment length polymorphism), electroforeza în câmp pulsatoriu (PFGE), secvențierea unităților repetitive (VNTR - variable number of tandem repeats), au permis distincția detaliată a micobacteriilor în funcție de distribuția lor geografică.

O contribuție suplimentară la ecologia micobacteriilor au adus Beerwerth și Schurmann (1969), care au examinat un total de 3434 de probe de sol, ape uzate, furaje și fecale de animale domestice, au izolat bacteriile din 86,1% și 70,3% din probele de sol arabil și fânețe și din 70.5% din probele de fecale de bovine aflate la pășunat (Každa, 2009).

MNT sunt organisme vii, libere, prezente în mediu. Acesta are un impact puternic asupra virulenței acestora, prin temperatură, pH, inhibitori naturali și lumina UV. Principalele surse menționate în literatura de specialitate analizată au fost: apa, în special din zonele dezvoltate, orașe și periferiile acestora, vegetația (mușchiul de turbă, vegetația din zonele mlăștinoase), solul, aerul (aerosoli MNT), biofilme, produse alimentare sau echipamentele medicale (Každa ș.a., 2009, Thomson ș.a., 2013 Kankya ș.a., 2011).

Multe specii de MNT au fost izolate dintr-o mare varietate de sisteme acvatice. Sunt menționate ca surse: apele de suprafață, naturale, lacuri, mlaștini, ape reziduale, apa industrială, apa de la robinet cât și spațiile destinate activităților de înot, căzi cu hidromasaj, dușuri sau acvarii, micobacteriile dovedind rezistență la metodele de decontaminare uzuale, precum clorinarea, datorită structurii complexe a peretelui celular și organizării în biofilme. Numeroase specii, precum *M. peregrinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. arupense*, *M. gordonae*, *M. chitae*, *M. chelonae*, *M. abscessus* au fost izolate din apa de băut, din rețelele urbane de apă, în diverse țări de pe glob: Finlanda, Mexic, China (Castillo-Rodat ș.a., 2012; Liu ș.a., 2012; Torvinen ș.a., 2010; Shin ș.a., 2008).

Din rețelele spitalicești de distribuție a apei, din zonele de admisie și evacuare, au fost izolate specii precum *M. gordonae* și *M. avium* (Crago ș.a., 2014). *M. chelonae* și *M. avium* au fost izolate din apele de suprafață, împreună cu alte specii rare de micobacterii - *M. psychrotolerans*, *M. setense*, *M. insubricum*, *M. porcinum*, *M. llatzerense*, *M. austroafricanum* și *M. arupense*, folosind medii și metode speciale de decontaminare (Radomski ș.a., 2010).

Într-un studiu realizat în zona metropolitană a orașului Teheran, Iran, pe probe recoltate din apa de la robinet ce ajunge în consum, apa curentă din rețeaua de distribuție și din sol, au fost izolate: *M. farcinogens*, *M. kansasii*, *M. simiae* și *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*. Prin compararea rezultatelor cu izolatele de la pacienți umani, s-a descoperit că *M. simiae* și *M. chelonae* sunt frecvente la pacienții rezidenți (Akbar-Velayati ș.a., 2014). *M. abscessus* a fost izolat din zece surse diferite de apă potabilă în Brisbane, Australia (Thomson ș.a., 2013).

Plante acvatice, amibe, vertebrate și nevertebrate acvatice, biofilme pot constitui rezervoare MNT, în cadrul ecosistemelor acvatice. Micobacteriile pot împărtăși habitatele cu amibe libere (*FLA-Free-living amoeba*) și se pot dezvolta în interiorul lor, ca endosimbionți. În acest mod sunt protejate de acțiunea dezinfectanților și antibioticilor. Într-un studiu cu privire la co-prezența amoebelor libere și MNT în rețelele de apă din spitale din America, MNT și FLA au fost decelate în probe de apă și în biofilmele colectate. Principalele specii izolate au fost *Hartmannella vermiformis* și *Acanthamoeba* sp., care prezintă o răspândire largă în mediu, fiind constant izolate din sistemele publice de apă potabilă și care pot coexista cu diverse microorganisme, precum *Mycobacterium* spp., *Legionella* spp. sau alți patogeni oportuniști (Ovrutsky ș.a., 2013; Coulon ș.a., 2010; Thomas și Ashbolt, 2011). Dintre micobacterii, au fost izolate: *M. gordonae*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. avium* și *M. mucogenicum*. *M. avium* poate nu doar supraviețui, ci se poate și multiplica în diverse FLA, mai frecvent în *Acanthamoeba lenticulata*, des recuperată din probe din mediu, inclusiv de apă potabilă (Ovrutsky ș.a., 2013).

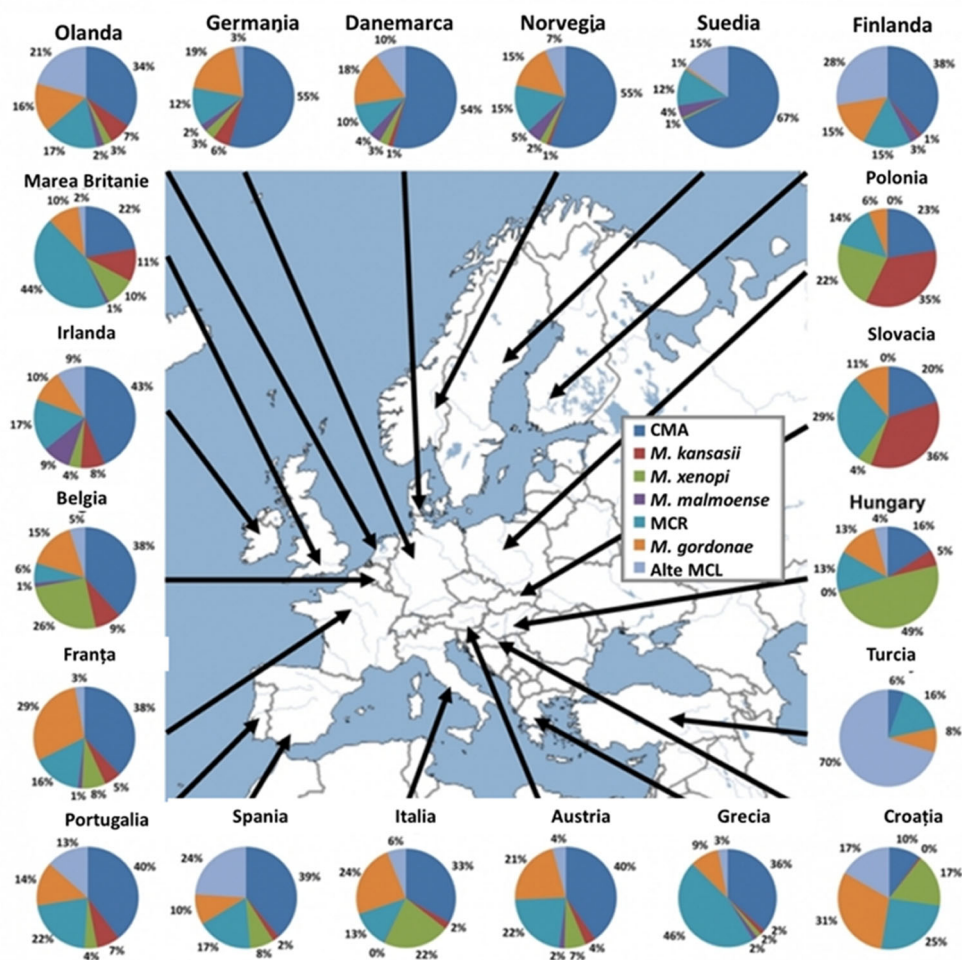


Figura 1.5 Distribuția diverselor specii de MNT în Europa (sursa: Hoefsloot ș.a., 2013)

Figure 1.5 NTM diversity and distribution in Europe (source: Hoefsloot et al., 2013)

În ecologia MNT, un rol important îl ocupă și plantele, această nișă fiind influențată de sol și de apă. *M. phlei* a fost izolat din porumb, *M. bolletii* din culturi de orez, *M. avium* din stuf iar *M. paratuberculosis* din siloz și plante. MNT au fost izolate din diferite tipuri de sol, din păduri, din gospodării sau cel arabil. *M. lentiflavum*, *M. heidelbergense*, *M. austroafricanum* au fost identificate prin amplificarea PCR a genei 16S ARNr (Kopecky ș.a., 2011).

Distribuția globală largă a MNT este susținută de raportările din diferite țări și continente, în ceea ce privește izolarea din surse de mediu sau, mai important, din izolate clinice provenite de la pacienți umani sau animal, cu diferite infecții micobacteriene sau asimptomatice. Un studiu colaborativ MNT-NET (Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group) ilustrează diversitatea geografică globală a micobacteriilor nontuberculoase în probele pulmonare de la pacienți umani, în 2008. Au fost izolate 91 de specii diferite de MNT, dintr-un total de 20182 probe din 30 de țări, de pe 6 continente. Cele mai utilizate tehnici de identificare folosite au fost: GenoTypeCM/AS, AccuProbe, hsp65 PCR-PRA (analiza enzimelor de restricție), Inno-LiPAMycobacteria v2 și secvențierea 16S ADNr (Hoefsloot ș.a., 2013).

Cu unele variații teritoriale, membrii CMA au fost cel mai frecvent izolați din speciile clinice respiratorii, în majoritatea țărilor europene și America, urmați procentual de *M. gordonae* și *M. xenopi*. În Africa de Sud și Australia, specia prevalentă a fost *M. intracellulare*. Dintre micobacteriile cu creștere rapidă, cel mai frecvent au fost izolate *M. abscessus* și *M. fortuitum*. Aceste date sunt susținute de numeroase alte rapoarte prezentate în literatura de specialitate.

În România, studiile privind micobacteriile nontuberculoase sunt centralizate pe sfera clinică veterinară și pe membrii CMA, în special *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Investigațiile de ordin histopatologic efectuate de Paul (Paul, 1982), alături de studiile efectuate de Andrei N. cu privire la aspectele clinice și prognosticul paratuberculozei rumegătoarelor (Andrei N., 1979), au adus o contribuție importantă în înțelegerea acestei patologii infecțioase.

De asemenea, o preocupare constantă a fost perfecționarea tehnicilor de diagnostic serologic, reacția de fixare a complementului (RFC) și ELISA și stabilirea seroprevalenței, importante fiind contribuțiile lui Răducanu (1986), Oneț și Constantinescu (1978) și Savuța (2000), Petriceanu și colaboratorii (2007), Papastergiou și colaboratorii (2009). Implementarea metodelor moleculare (PCR) în diagnosticul paratuberculozei a fost descrisă pentru prima dată, în țară, de către Savuța G. (Savuța, 1999 și 2000).

Macovei I. (2014) efectuează studii epidemiologice pe efective de rumegătoare mari și mici din regiunea Moldovei, înregistrând o seroprevalență de 19.54% și 32.35 % la ovinele, respectiv la caprinele testate iar la bovine de 6.25%. Confirmarea infecțiilor micobacteriene, atât la rumegătoare cât și la păsări, a fost realizată prin examen bacterioscopic, cultural și prin identificarea elementelor de inserție specifice: IS 1245 și IS901 (*M. avium* subsp. *avium*) și IS900 pentru *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, fiind totodată caracterizate sușele obținute prin tehnica MIRU-VNTR.

Bostănu Andra, într-un studiu efectuat pe o perioadă de 4 ani, semnalează aspecte privitoare la MNT, cu preponderență legate de pacienții umani dar și alte aspecte referitoare la spectrul de sensibilitate/rezistență a tulpinilor micobacteriene. A fost evaluată incidența MNT la pacienții umani (Spitalul Clinic de Pneumoftiziologie Iași), în baza diferențierii lor de membrii CMTB prin testul rapid imunocromatografic, fiind menționat faptul că eficiența și rapiditatea testului conferă o alternativă la testele fenotipice și genotipice în stabilirea diagnosticului (Bostănu, 2014; Bostănu ș.a., 2014).

Testul imunocromatografic rapid a fost utilizat și de către Stavri H. și colaboratorii, într-un studiu efectuat pe pacienți umani privind izolarea MNT, subliniind utilitatea acestui test și în diagnosticul curent al micobacteriozelor, facilitând începerea rapidă a tratamentului (Stavri ș.a., 2005).

În literatura de specialitate din țara noastră, evaluată până în acest moment, sunt semnalate puține studii privind prevalența speciilor nontuberculoase în mediu. Datele fac referire la izolarea MNT din mediile spitalicești și de la pacienți umani. Într-o încercare de a stabili măsuri eficiente de prevenire a infecțiilor nosocomiale în unități oncologice și pediatrie, între 1994-1997, 21 de tulpini de MNT au fost izolate din 500 de probe de apă de robinet și praf (4,2% probe pozitive), cea mai frecventă specie recuperată fiind *M. marinum* (Toma, 1998). Stavri și colectivul de autori (2011) demonstrează utilitatea testului ELISA pentru serodiagnosticul infecțiilor umane datorate micobacteriilor de mediu, utilizând un panel de antigeni glicolipidici pentru CMA, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. scrofulaceum* și *M. gordonae* pe 195 de seruri, rezultatele examenului cultural pentru CMA corelându-se cu rezultatele analizei serologice (Stavri ș.a., 2011).

CAPITOLUL 2.

PRINCIPALELE SPECII DE MICOBACTERII NONTUBERCULOASE CU IMPLICAȚII ÎN PATOLOGIA VETERINARĂ ȘI UMANĂ

CHAPTER 2.

NONTUBERCULOUS *MYCOBACTERIUM* SPECIES INVOLVED IN VETERINARY AND HUMAN PATHOLOGY

MNT constituie o populație diversă al cărei impact asupra sănătății animalelor și oamenilor este deopotrivă direct, provocând infecții mai mult sau mai puțin severe și pierderi de productivitate sau indirect, prin interferența cu diagnosticul și controlul tuberculozei și paratuberculozei bovine. Numărul tot mai mare de specii micobacteriene identificate face extrem de importantă înțelegerea relațiilor inter-specifice precum și a rolului lor în patologia veterinară și în cea umană (Claeys și Robinson, 2018). Diversitatea mediilor din care MNT au fost izolate constituie o dovadă a adaptabilității lor remarcabile.

2.1. Principalele specii de micobacterii nontuberculoase cu implicații în patologia veterinară

Deși animalele intră constant în contact cu MNT, dezvoltarea lentă a simptomelor face ca aceste infecții să nu fie observate la anumite categorii de animale, importante din punct de vedere zootehnic, cum ar fi bovinele de carne, puii broiler sau curcanii, datorită duratei scurte de viață. Astfel, majoritatea datelor privind infecțiile cu MNT la animale sunt observate la bovinele de lapte și porcine, mai ales cele de reproducție și la animalele de companie.

Cu excepția lui *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, datele privitoare la MNT la animale nu sunt evaluate sistematic. Cel mai frecvent, aceste specii sunt izolate atunci când se urmărește evidențierea lui *M. bovis* în practica curentă a programelor de supraveghere și combatere a tuberculozei bovine. Principalele probe analizate sunt limfonodurile asociate sistemului respirator, însă acestea nu sunt mereu potrivite pentru detectarea MNT având în vedere mai frecventa asociere a acestora cu țesuturile digestive (limfonoduri, intestin). În plus, metodele de decontaminare pot avea efecte drastice asupra supraviețuirii MNT și a ratelor ulterioare de recuperare (Biet și Boschioli, 2014).

Totodată, diferitele MNT pot coexista cu cele tuberculoase, atât la nivel de individ cât și la nivel de turmă, putând conduce la interpretări greșite (Reddington ș.a., 2011).

2.1.1. Complexul *M. avium* (CMA)

Frecvența izolării membrilor CMA se corelează cu anumite caracteristici fizico-chimice ale habitatului lor natural (adică ecologia fiziologică). Acestea sunt recuperate în număr mai mare din apele și solurile cu pH acid, cu conținut scăzut de oxigen și ridicat de materie organică. Permeabilitatea scăzută a solului din timpul anotimpurilor ploioase este benefică pentru supraviețuirea și multiplicarea micobacteriilor.

Infecția cu CMA la bovine este în general urmată de leziuni vizibile non-progresive iar uneori de o hiperplazie tranzitorie în limfonoduri, în special la nivelul tubului digestiv (Biet și Boschioli, 2014). Ocazional, a fost observată implicarea acestor microorganisme în mastite, metrite, infecții testiculare, pneumonii, precum și infecții sistemice (Dvorska ș.a., 2004; Thorel ș.a., 2001).

De asemenea, infecțiile cu CMA sunt asociate cu dezvoltarea unei hipersensibilități întârziate detectate de PPD A și într-o manieră variabilă de PPD B. Cu unele excepții, infecțiile CMA sunt tranzitorii, eliminarea acestora din organism fiind urmată, după o perioadă, de dispariția răspunsului nespecific (Biet și Boschioli, 2014). Acest interval de timp este dificil de apreciat, el variind între indivizi și fiind corelat cu virulența micobacteriilor și cu doza infecțioasă precum și cu expunerea repetată.

1. *M. avium* subsp. *avium* (MAA)

Este agentul etiologic al tuberculozei aviare, fiind rareori asociat cu infecțiile umane. Prezintă formă bacilară, variații în lungime (1-3μm) și nu se structurează în corzi. Creșterea este lentă, intervalul optim de temperatură variind între 37°C și 42°C. Coloniile sunt în general nepigmentate, netede, translucide iar unele tulpini sunt scotocromogene. Pe mediul Middlebrook 7H10, pentru unele izolate, a fost observată tolerarea unei concentrații de 5% NaCl(g/v) atunci când sunt încorporate într-un mediu Middlebrook 7H10. În infecția experimentală la iepure și șoarece nu sunt observate leziuni granulomatoase vizibile și microorganismul nu este patogen pentru cobai și șobolan (Magee și Ward, 2012).

Tuberculoza aviară este o boală infecțioasă cu răspândire globală produsă de MAA, serotipurile 1,2 și 3 și de *M. genavense*, în mai puțină măsură. Sunt receptive numeroase specii de păsări sălbatice și domestice, inclusiv speciile exotice ținute în captivitate (Tabelul 2.1). Clinic, boala poate fi observată în general la găinile și cocoșii cu vârstă de aproximativ doi ani (Falkinham III, 2015) și nu sunt observate infecții în efectivele de pui de carne, datorită perioadei scurte de viață.

Semnele clinice includ letargia, reducerea ouatului, inapetența urmată de slăbire progresivă, anemie, emaciare și, în cazul localizării viscerale, diaree. Multe păsări infectate pot trăi și pot menține o stare nutritivă bună pentru o perioadă lungă de timp, fiind greu de diferențiat de cele sănătoase.

Mai pot fi prezente și alte localizări: osteo-articulară (artrite și osteoperiostite deformante, fracturi), cutanată, mai frecventă la porumbel în regiunea capului și la nivelul membrilor (noduli netezi sau rugoși până la „corni tuberculoși”), pe mucoase (la papagal) sau pulmonară (Perianu, 2011). La necropsie, pot fi observați noduli tuberculoși variabili în dimensiuni, cadavrele fiind în general cașectice.

Tabelul 2.1/Table 2.1

Micobacterioze la păsări: semne clinice și tulpini izolate (sursă: Tell, Woods și Cromie, 2001)
 Mycobacteriosis in birds: clinical signs and isolated species (source: Tell, Woods și Cromie, 2001)

Specia afectată	Semnele clinice	Specia izolată
Anseriforme (Gâscă Chineză, Rață mandarină, Mallard, Rața cu ochi de șoim, Rața sulițar)	Anorexie, anemiere progresivă, leziuni ulcerativ-cazeoase (zona articulației tibio-tarsienă), noduli cazeoși-ulcerativi pe cap, gât și palpebrum, distensie abdominală.	<i>M. Avium</i> <i>M. avium serotipul 1</i> <i>M. avium serotipul 3</i>
Columbiforme	Anorexie, scădere în greutate, letargie, șchiopături, torticolis, noduli cutanați, tuberculi pe pielea din jurul cloacei.	<i>M. avium</i> <i>M. avium serotipul 2</i>
Gruiforme (Cocor)	Letargie, șchiopătat, picioarele umflate sau păsări clinic normale.	<i>M. avium serotipul 1</i>
Paseriforme (Graur european, Muscarul albastru și alb, Cinteze zebrate, Canari)	Păsări clinic normale sau prezintă semne de emaciare, semne nervoase și respiratorii, slăbiciune, incoordonare, diaree, letargie, penaj ciufulit.	<i>M. avium</i> <i>M. genavense</i>
Psitacide (Macaul cu aripi verzi, Maximilian, Papagalul cu aripi portocalii, Papagali pititci, Parakeet, Papagalul cu cap albastru)	Pierdere în greutate, letargie, umflarea progresivă a pleoapelor, diaree intermitentă, ocazional respirație stertoroasă, apatie; inapetență, pierdere în greutate, noduli pe pleoape, zone deplumate, murmur cardiac, moartea subită.	<i>BAAR</i> <i>M.genavense</i> <i>(M. tuberculosis)</i>
Păsări răpitoare (Uliu porumbar, Șoim Lanner, Uliu cu coada roșie)	Slăbiciune, semne nervoase, cașexie, imposibilitatea de a zbura, ataxie, hiper-reflexie, hiper-extensie ale ambelor picioare.	<i>M. avium serotipul 2</i> <i>BAAR</i>
Ratite (Pasările Nandu, Păsările Emu, Struți, Pasărea Kiwi)	Letargie, pierdere progresivă în greutate, moarte, prolaps intestinal și leziuni abdominale remarcate în timpul colopexiei, conjunctivite granulomatoase, masă tisulară la nivelul membranei nictitante, recurentă în urma rezecției	<i>CMA</i> <i>M. avium</i>
Alte păsări (Fleming mic, Pescărușul albastru, Șorecarul comun)	Letargie, distensie abdominală, slăbire progresivă, masă tisulară moale la nivelul sinusurilor infraorbitale, cornetelor nazale, oral, cloacal și în musculatura pectorală.	<i>CMA</i> <i>M. avium serotipul 1</i> <i>M. avium serotipul 2</i>

În diagnosticarea ante-mortem a lui MAA se poate utiliza tuberculinarea cu PPD A, la nivelul bărbiețelor, fără un nivel ridicat de sensibilitate și specificitate. Diagnosticul post-mortem implică examinarea microscopică, cultivarea și/sau detecția prin PCR a lui MAA din cultură sau direct din țesuturile cu leziuni.

La cerb, infecția cu MAA este auto-limitantă ca și la alte specii de mamifere. Leziunile pot fi: purulentă, cazeoasă sau granulomatoasă și sunt, în principal, prezente în ganglionii limfatici retrofaringieni și în cei mezenterici. Leziunile granulomatoase sunt, macroscopic și histologic, similare cu leziunile provocate de *M.bovis* (Coelho ș.a., 2013).

MAA poate infecta porcinele, în manieră similară cu MAH (Agdestein ș.a., 2012). La mistreți, în infecția naturală, semnele clinice și leziunile sunt greu decelabile (Cousins ș.a., 2000), MAA fiind izolat din limfonodurile intestinale (Trcka ș.a., 2006). Lara și colaboratorii au izolat mai frecvent, de la mistreții cu limfadenită mezenterică și submaxilară, *M. avium* serovar 1,2 (Lara ș.a., 2011; Coelho ș.a., 2013). Perez de Val și colaboratorii identifică MAA din leziuni granulomatoase și cazeoase din ficat, splină și limfonoduri mezenterice ale carcaselor de porcine domestice din cinci ferme cu furnizor comun de hrană, alimentația fiind principala sursă incriminată (Perez de Val ș.a., 2014).

2. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

MAP este un bacili acido-rezistent, cu dimensiuni de 1-2 μm , fastidios, necesitând adaos de micobactină iar creșterea sa poate fi stimulată și de adaosul de piruvat. Izolarea primară este greoaie din cauza perioadei lungi necesare pentru dezvoltarea coloniilor (3 - 4 luni), ulterior, în subculturi, dezvoltându-se mai rapid. Nu prezintă pigment și coloniile au aspect rugos (Magee și Ward, 2012). Genomul complet al tulpinii MAP K-10, tipul C a fost publicat în 2005 (Li ș.a., 2005), actualmente fiind disponibile secvențele mai multor izolate.

Există două grupuri majore de tulpini, cunoscute sub numele de „tipul ovin” sau „tipul S/I” și „tipul bovin” sau „tipul C/II”, denumite după specia gazdă de la care au fost izolate inițial. Un al treilea grup de tulpini, denumite „tipul III” a fost inițial considerat intermediar între tulpini S și C, dar secvențierea genomului întreg a confirmat că sunt de fapt un subtip S (Stevenson, 2015). Pigmentarea a fost observată la tulpinile de tip S, însă, până în prezent, izolatele producătoare de pigment de tip C sunt extrem de rare (Barbosa ș.a., 2017).

MAP este micobacteria nontuberculoasă cu cel mai puternic impact economic și efect negativ asupra bunăstării animalelor din întreaga lume. Paratuberculoza (sau boala lui Johne) a fost recunoscută ca o boală majoră a rumegătoarelor de la sfârșitul secolului al XIX-lea și continuă să evolueze în majoritatea țărilor industrializate, în ciuda implementării programelor control și eradicare. Paratuberculoza este o boală infecțioasă a rumegătoarelor, cu dezvoltare lentă, caracterizată prin enterită granulomatoasă cronică, care conduce treptat la simptomatologia tipică și la pierderea progresivă în greutate, adesea letală (Biet și Boschioli, 2014, Răpunțean și Răpunțean, 2017).

La bovine, boala se caracterizează printr-o perioadă de incubație lungă și o evoluție extinsă, inițial asimptomatică, urmată de o fază clinică, cu manifestări de enterită cronică. Se observă anemia, slăbirea progresivă și degradarea stării generale și apariția diareei, inițial intermitente, rebelă la tratament iar în etapele finale pot fi observate edeme și sfârșitul letal. În general, leziunile observate interesează limfonodurile mezenterice și intestinul, porțiunea terminală a ileonului dar și cecumul și rectul, mucoasa fiind puternic hipertrofiată, cu aspect cutat, asemănător cu circumvoluțiunile cerebrale iar microscopic se pot observa granuloame difuze în peretele intestinal.

La ovine, boala are o evoluție insidioasă, cronică, fenomenele diareice fiind rar întâlnite. Atunci când apar semnele clinice, se remarcă simptome de enterită, slăbire

progresivă, modificarea aspectului lânii, polidipsie iar leziunile sunt similare (Perianu, 2012).

Din punct de vedere economic, paratuberculoza este considerată una dintre cele mai grave boli din industria bovinelor. Acest aspect este cauzat de pierderile importante prin sacrificarea prematură, scăderea în greutate, creșterea mortalității, reducerea producției de lapte, creșterea ratelor de infertilitate și a costurilor de tratament dar și de costurile indirecte ale politicilor de prevenire și control.

Distribuția bolii la nivel global este asociată cu zonele în care se practică intensiv creșterea rumegătoarelor, zonele cele mai afectate fiind America de Nord, Europa și Australia. Estimarea prevalenței este dificilă din cauza simptomatologiei tardive dar și diagnosticului laborios, perioadei lungi de incubație pentru culturi și ineficienței examenului serologic (ELISA) în cazul animalelor asimptomatice (Biet și Boschioli, 2014).

În Europa, prevalența estimată la nivel de efectiv este de aproximativ 50%, cu rate ridicate ($> 40\%$) raportate în țări precum: Danemarca, Franța, Germania și Olanda. Studiul publicat de EFSA, în 2017, surprinde distribuția infecțiilor cu MAP la rumegătoare domestice și sălbatice, la nivel european fiind raportate în majoritatea statelor membre ale Uniunii Europene, excepție făcând România, Malta și Letonia, țări pentru care nu sunt incluse date. Prevalența în cadrul turmelor de bovine este de 20%, cu valori mai reduse (3-5%) în unele țări. Deși Suedia și Norvegia ar trebui să fie considerate libere de infecție, au fost raportate date cu privire la animale infectate din aceste țări (EFSA AHAW Panel, 2017). În Statele Unite, un studiu reprezentativ arată că prevalența ar putea ajunge la 68% din efective, comparativ cu valorile din 1990, de 40% (Wells și Wagner, 2000). În Canada, prevalența a fost estimată la peste 30% (Van Leeuwen et al., 2001).

În rândul bovinelor pentru carne se înregistrează valori mai scăzute comparativ cu cele de lapte. Datele pentru bovinele de carne, obținute în cea mai mare parte de serologie, indică o prevalență mult mai scăzută decât la bovinele de lapte. Estimarea prevalenței la nivel de individ are la bază izolarea MAP din fecale sau țesuturi, aceasta fiind metoda cea mai fiabilă care însă impune un cost ridicat și o perioadă îndelungată de realizare, sau prin utilizarea serologiei - ELISA. Unele studii au estimat la 20% prevalența la bovine în Europa (Nielsen și Toft, 2009), la 16 și 17% în Canada și respectiv în Statele Unite (Biet și Boschioli, 2014).

Datele privind infecția la ovine sau caprine sunt puține. Un studiu amplu efectuat în Cipru a estimat că există cel puțin un individ infectat în 60,8% respectiv 48,6% din efectivele de ovine și caprine evaluate. În turmele infectate, prevalența reală a infecției cu MAP a fost evaluată la 24,6% la oi și 23,1% la capre (Liapi ș.a., 2011). În centrul Italiei s-a estimat că 73,7% din efectivele de ovine aveau cel puțin un animal seropozitiv (Attili ș.a., 2011) iar în Franța a fost estimată o prevalență la nivel de turmă de 63% (Mercier ș.a., 2010).

MAP poate infecta multe specii de animale, cel mai adesea rumegătoare. Indirect, prezența micobacteriei la alte ungulate sălbatice captive sau libere, cum ar fi cerbul roșu sau bizonul (descrise ca rezervoare importante ale bolii), poate influența prevalența bolii la

bovine și, în plus, poate îngreuna diagnosticul tuberculozei. La cerb, simptomatologia observată este similară cu cea descrisă la rumegătoare domestice, cu diaree și pierderi în greutate (Reyes-Garcia ș.a., 2008). Leziunile observate sunt similare cu cele întâlnite la oi și capre. Se pot observa necroza și mineralizarea ganglionilor mezenterici din regiunea ileonului.

Pe lângă rumegătoare, specia MAP a mai fost izolată și de la diverse alte mamifere sălbatice, precum porci mistreți, urși, raton, bursuci, sconeși sau tatu (Coelho ș.a., 2013). Nu toate aceste specii prezintă aceeași sensibilitate de a dezvolta semne clinice și leziuni atunci când sunt infectate, tabloul clinic exprimat și cel lezional fiind mai subtile. La hermine, vulpi, nevăstuici, șobolani, arici sau vidre, localizarea infecției este la nivel digestiv, fiind observate granuloame și prezența bacililor în număr redus (Matos ș.a., 2012).

MAP a fost izolat de la mistreți, din probe de țesuturi, fără însă a fi descrise modificările histologice (Carta ș.a., 2013). Infecția a fost raportată și la iepurii sălbatici (Judge ș.a., 2006) și poate fi asociată cu proporția mare de vulpi infectate, în urma consumului de lagomorfe infectate. Printre carnivorele libere, s-au efectuat doar câteva studii. Numărul limitat de studii privind infecția la rozătoare face greu de stabilit dacă infecțiile naturale apar la acestea (Florou ș.a., 2008).

3. *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH)

Scenariul evolutiv sugerează că diversele subspecii din CMA au evoluat pornind de la subsp. *hominissuis* (Turenne ș.a., 2008). Diferențierea de MAA se poate realiza prin tipaj molecular (Johansen ș.a., 2007, Radomski ș.a., 2010). MAH este o bacterie de mediu, fiind izolată din apă, sol, praf, paie sau rumeguș. Este ușor patogenă pentru păsări iar la mamifere a fost frecvent izolată de la porci cu leziuni la nivelul limfonodurilor asociate tractului digestiv (Matlova ș.a., 2005). Este, de asemenea, un agent patogen oportunist pentru alte mamifere și ființe umane, mai ales imunocompromise, aspect care i-a influențat denumirea.

Infecția cu MAH a fost raportată la câini, papagali de companie sau cai (Kriz ș.a., 2010, Komatsu ș.a., 2017). Este cea mai frecventă specie de MNT izolată de la bovinele din Elveția (Scherrer ș.a., 2018). La porcine, pot fi observate leziuni granulomatoase în limfonodurile mezenterice dar și în organe precum ficatul, plămânii sau rinichii. Aceste aspecte sunt în general descoperite la inspecția cărnii și pot determina pierderi economice grave pentru producător, dacă sunt detectate la mai mulți porci sau în mai multe organe. Ocazional, apar semne clinice precum scăderea în greutate sau avort (Johansen ș.a., 2014).

4. *M. avium* subsp. *silvaticum* (MAS)

MAS este un bacil acido-rezistent, care formează colonii rugoase după minim două săptămâni de incubație pe medii cu pH acid (pH 5.5) și cu adaos de acid oleic, fără a necesita adaos de micobactină (Magee și Ward, 2012).

Specia a fost izolată de la porumbeii sălbatici, cocori, pinguini, găini, cerbi sau porci mistreți (Rónai ș.a., 2015).

Manifestările clinice care pot fi observate la animalele infectate sunt: pierderea de greutate, tusea intermitentă, lipsa apetitului, tulburări ale sistemului digestiv, leziuni ale

glandei mamare. Mistreții și rumegătoarele prezintă rareori simptomatologie, însă prezența manifestărilor implică progresia infecției până la deteriorarea structurii și funcției țesuturilor afectate. Leziunile pot fi cel mai adesea întâlnite la nivelul limfonodurilor din regiunea capului și la cele intestinale (Falkinham III, 2015).

2.1.2. *M. marinum*

M. marinum este principalul agent micobacterian implicat în patologia infecțioasă a peștilor. Prin pescuit sau acvacultură, expunerea la peștii infectați constituie un factor de risc pentru infecțiile granulomatoase cutanate la om (Gauthier și Rhodes, 2009).

Semnele clinice de micobacterii la pești sunt de obicei nespecifice și includ comportament anormal, frică, pierderea poftei de mâncare, pierdere progresivă în greutate, ascită, pierderea solzilor, modificări de pigmentare la nivel cutanat, leziuni ulcerative dermice și deformări scheletice (curbarea coloanei vertebrale), care fac imposibil înotul. La examinarea post-mortem a peștilor infectați sunt observate leziuni albe, mici (tuberculi) în organele mărite în volum iar examenul histopatologic pune în evidență prezența granulomului tuberculos (Gauthier și Rhodes, 2009).

2.1.3. Complexul *M. terrae*

Infecții umane cu membrii acestui complex au fost identificate ocazional. Membrii complexului *M. terrae*, și în special *M. nonchromogenicum*, sunt bacterii izolate din sol sau din mediul acvatic. *M. nonchromogenicum* a fost izolat de la bovine cu sau fără reacții pozitive la testul cutanat și, de obicei, fără leziuni (Hughes ș.a., 2005; Hughes ș.a., 1993; McCorry ș.a., 2004). Specia a mai fost izolată din mucusul nazal de la 6 bovine negative la testarea intradermică, ce proveneau dintr-un efectiv infectat cu *M. bovis* (McCorry ș.a., 2004). *M. nonchromogenicum* este printre cele mai frecvente MNT izolate în Irlanda de Nord (Hughes ș.a., 2005) sau în Franța (Guerin-Faubleee ș.a., 2013).

2.1.4. *M. kansasii*

Această micobacterie oportunistă este frecvent implicată în patologia umană. La bovine, este asociată cu leziuni în limfonodurile asociate sistemului respirator și a fost izolată de la bovine pozitive la tuberculinare (Waters ș.a., 2010). Reprezintă 48% din MNT izolate în Marea Britanie, altele decât CMA (Vordermeier ș.a., 2006), dar numai 2,1% în Franța (Biet și Boschiroli, 2014). Într-un studiu efectuat de Waters și colaboratorii în 2006, infecția experimentală cu *M. kansasii* la viței a determinat răspunsuri pozitive atât la dozarea γ -IFN cât și la intradermo-reacție, deși acestea au fost mai puțin intense și de durată mai scurtă în comparație cu cele determinate de infecția cu *M. bovis*.

2.1.5. Alte MNT

Numeroase alte specii de MNT au fost izolate de la animale, fapt pentru care eventualele implicații ale acestora în diagnosticul micobacteriilor patogene nu poate fi exclus. *M. gordonae*, *M. vaccae* și *M. fortuitum* au fost incriminate în patologia telitei tuberculoase nodulare (Joubert ș.a., 1963, Shimizu ș.a., 1977). *M. phlei*, *M. chelonae* și *M.*

fortuitum au fost asociate cu răspunsuri nespecifice la tuberculare. De asemenea, *M. szulgai*, *M. flavescens*, *M. kansasii* și *M. gordonae* pot conduce la reacții încrucișate și interpretări greșite în diagnosticul tuberculozei bovine. Aceste specii posedă gene care codifică antigenele ESAT-6 și CFP-10 (Vordermeier ș.a., 2006). *M. neoaurum* („*M. laticola*”) este o specie cu creștere rapidă care a fost izolată de la bovine cu leziuni nodulare (Răpunțean și Răpunțean, 2017)

2.2. Implicațiile micobacteriilor nontuberculoase în patologia umană

Odată cu scăderea incidenței infecțiilor cauzate de specii micobacteriene obligat patogene s-a observat creșterea numărului infecțiilor cauzate de speciile potențial patogene. Printre factorii care au contribuit la această situație pot fi exemplificați următorii: prevalența crescută a bolilor imunosupresive la om (HIV/ SIDA și afecțiunile neoplazice); frecvența crescută a utilizării chimioterapicelor; îmbunătățirea tehnicilor de izolare, identificare și discriminare a MNT-urilor; îmbătrânirea populației la nivelul țărilor dezvoltate; extinderea pe noi areale, habitate ocupate tradițional de micobacteriile potențial patogene și saprofite; perfecționarea tratamentelor apei potabile, care a dus la selecția micobacteriilor rezistente (Kazda ș.a., 2009).

Tabelul 2.2/Table 2.2

Cele mai frecvente 10 specii de MNT izolate de la pacienți umani (sursă: van Ingen, 2017)
The ten most frequent NTM species, isolated from human patients (source: van Ingen, 2017)

Rata de creștere	Specii	Principalele tipuri de infecție
Lentă	<i>M. avium complex</i> (<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , altele)	Pulmonară, ganglionară, diseminată
	<i>M. kansasii</i>	Pulmonară, diseminată
	<i>M. xenopi</i>	Pulmonară
	<i>M. malmoense</i> (Europa de N-V)	Pulmonară, ganglionară
	<i>M. simiae</i>	Pulmonară
	<i>M. ulcerans</i>	Cutanată
Intermediară	<i>M. marinum</i>	Cutanată
Rapidă	<i>M. abscessus</i>	Pulmonară, cutanată, țesuturi moi
	<i>M. chelonae</i>	Cutanată, țesuturilor moi
	<i>M. fortuitum</i>	Pulmonară, cutanată, țesuturi moi

Conform declarației din 2007 a Societății Americane Toracice (ATS) (Griffith ș.a., 2007), principalele forme clinice determinate de MNT la om sunt: infecția pulmonară și pneumonita de hipersensibilitate, limfadenita, infecția diseminată și infecțiile cutanate, ale țesuturilor moi și oaselor (Tabelul 2.2).

2.2.1. Infecția pulmonară

Infecțiile pulmonare cronice sunt printre cele mai frecvente manifestări clinice determinate de MNT la om. Microorganismele cel mai adesea asociate cu boli pulmonare

în Statele Unite ale Americii sunt CMA și *M. kansasii*, însă sunt frecvent izolate de la pacienți și *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. celatum*, *M. asiaticum*, și *M. shimoidei*. Așa cum s-a menționat anterior, distribuția speciilor care cauzează aceste boli variază geografic. De exemplu, *M. xenopi*, care este rar găsit în Statele Unite, este cel de-al doilea ca frecvență în Canada și Europa (Hoefsloot ș.a., 2013).

Pacienții susceptibili, în special pentru CMA, sunt persoanele imunocompromise, copiii, vârstnicii, mai ales persoanele de sex masculin, cele peste cincizeci de ani, fumători, sau care prezintă diverse patologii pulmonare dar și pacienții de sex feminin cu alte patologii respiratorii (Griffith ș.a., 2007).

Tabloul clinic al infecției poate fi destul de variat. Tusea cronică este cel mai frecvent simptom dar febra, starea de rău, scăderea în greutate, dispneea sau hemoptizia pot varia. Afectarea lobilor superiori și prezența leziunilor cavitare este caracteristică în special lui *M. kansasii*. Spre deosebire de infecțiile diseminate, formele pulmonare cu MNT sunt mai rar descrise la pacienții cu HIV (Griffith ș.a., 2007; Jarzembowski and Young, 2008).

O prezentare mai neobișnuită a infecției cu membrii CMA este sindromul Lady Windermere (Reich și Johnson, 1992), observat la femeile în vârstă fără condiții pulmonare preexistente sau fumătoare. Aceste specii au fost de asemenea incriminate în formele nodulare pulmonare, cu noduli solitari și fără alte simptome cât și într-o patologie mai nou descrisă, pneumonita de hipersensibilitate, de obicei relaționată cu expunerea la aerosolii din spațiile de înbăiere și înot („hot tub lung'”) (Griffith ș.a., 2007).

Infecția pulmonară cu MNT poate fi diagnosticată printr-o combinație de criterii clinice, radiografice, bacteriologice și histologice, cum a fost propus de ATS (American Thoracic Society) și Societatea Americană de Boli Infecțioase. Tratamentul infecțiilor pulmonare cu MNT poate fi dificil și implică utilizarea mai multor agenți antimicrobieni, alegerea medicamentelor variind în funcție de specia MNT izolată. Pentru CMA, recomandări actuale includ utilizarea unui macrolid, fie claritromicină sau azitromicină, acestea fiind cele mai eficiente, alături de încă unul sau doi agenți antimicrobieni precum rifampicina, amikacina sau streptomycină, pentru a preveni apariția rezistenței la macrolide (Jarzembowski și Young, 2008, Griffith ș.a., 2007).

2.2.2. Limfadenita

Infecțiile cu MNT localizate la nivelul limfonodurilor sunt cel mai frecvent întâlnite la copii. Cele mai afectate lanțuri ganglionare sunt cele din regiunea capului și gâtului, în special lanțul anterior cervical, dar și cele submandibulare, submaxilare și preauriculare. Ocazional, limfonodurile mediastinale pot fi implicate. Prezentarea clinică comună este de inflamație nedureroasă a unui sau mai multor limfonoduri, fără simptomatologie sistemică și cel mai adesea unilaterală. Se poate complica prin cronicizare și fistulizare (Piersimoni și Scarparo, 2009).

Cel mai frecvent implicate specii sunt cele din CMA, izolate din aproximativ 80% dintre speciile pozitive. *M. scrofulaceum*, considerată cauza predilectă în anii 1970, este actualmente a doua cea mai frecventă MNT izolată în SUA. Alte specii implicate în această patologie sunt: *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. haemophilum*, *M. interjectum*, *M.*

palustre, *M. tusciae*, *M. heidelbergense*, *M. elephantis*, *M. lentiflavum* și *M. bohemicum*. Aproximativ 10% din cazurile de limfadenită micobacteriană la copii sunt cauzate de MTB. Tratatamentul este cel mai adesea chirurgical, curativ în peste 90% din cazuri (Griffith ș.a., 2007; Brown-Elliott și Wallace, 2005).

2.2.3. Infecția diseminată

Infecțiile diseminate determinate de MNT sunt cel mai frecvent întâlnite la pacienții cu HIV în stadii avansate ($CD4^+ < 50/\mu l$). Mai mult de 95% dintre aceste cazuri sunt cauzate de CMA. Alte specii MNT implicate sunt: *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. conspicuum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum*, *M. celatum*, *M. malmoeense*, *M. triplex* și *M. lentiflavum* (Griffith ș.a., 2007; Brown-Elliott și Wallace, 2005). Simptomele sunt în general febra, transpirațiile nocturne, pierderea în greutate, diaree și dureri abdominale. *M. chelonae*, *M. abscessus* și *M. haemophilum* pot determina o formă subcutanată difuză, cu noduli și abcese (Griffith, 2004).

2.2.4. Infecțiile cutanate, ale țesuturilor moi și ale oaselor

Spectrul afecțiunilor MNT la nivelul țesuturilor moi și ale scheletului este larg, fiind observate abcese sau noduli, tenosinovite localizate și osteomielite. De obicei, apar ca urmare a inoculării directe, prin traumatisme penetrante sau prin murdăria ajunsă la nivelul rănilor și fracturilor deschise. Infecția poate fi de asemenea indusă iatrogen, infecții cu MNT fiind raportate în urma utilizării cateterelor intravenoase și peritoneale, șunturilor, injecțiilor intramusculare sau procedurilor de chirurgie estetică.

Speciile cu creștere rapidă *M. abscessus*, *M. fortuitum* și *M. chelonae* sunt cele mai des incriminate etiologic. *M. fortuitum* poate provoca astfel de infecții localizate la persoane imunocompetente, în timp ce pacienții de la care se izolează *M. chelonae* și *M. haemophilum* sunt de obicei immunosupresați. *M. abscessus* poate cauza infecții la ambele categorii de pacienți și alături de *M. fortuitum* și *M. chelonae* poate provoca infecții granulomatoase cronice ale tecilor tendinoase, burselor, articulațiilor sau oaselor (Griffith ș.a., 2007).

M. marinum provoacă o infecție aparte, numită *granulom de piscină* sau *granulom de acvariu*. Aceasta este de obicei observată la persoanele care sunt expuse la un anumit tip de mediu acvatic (de exemplu acvarii sau piscine) și prezintă leziuni granulomatoase pe zone ale extremităților predispuse la abraziune. Leziunile apar inițial ca papule, care apoi ulcerază. Deși afecțiunea este adesea localizată, unii pacienți pot dezvolta o limfangită nodulară (Pavlik ș.a., 2009).

Ulcerul Buruli, determinat de *M. ulcerans*, se caracterizează inițial printr-o leziune cutanată nodulară și pruriginoasă, care treptat devine ulcerativă.

Afecțiunea fost raportată în 33 de țări din Africa, America, Asia și Pacificul de Vest. Cele mai multe cazuri apar în regiunile tropicale și subtropicale, cu excepția celor din Australia, China și Japonia. Majoritatea cazurilor sunt raportate din Africa de Vest și Centrală, inclusiv din Benin, Camerun, Coasta de Fildeș, Republica Democratică Congo și Ghana. Nu există tendințe previzibile în numărul de cazuri raportate anual. În 2015, 13 țări

au raportat un număr de 2046 cazuri, în 2016 au existat 1920 de cazuri iar datele parțiale pentru 2017 indică un număr de 2209 de cazuri (WHO- Buruli ulcer fact sheet).

2.3. Aspecte generale privind diagnosticul micobacteriilor nontuberculoase

Multitudinea de specii de MNT identificate în ultimele decenii este consecința a doi factori importanți: pe de o parte, disponibilitatea și fiabilitatea metodelor noi de secvențiere ADN, care pot diferenția chiar și speciile strâns relaționate iar pe de altă parte, creșterea frecvenței de izolare.

Diagnosticul bacteriologic al MNT a evoluat în paralel cu descoperirea de noi specii și cu necesitatea obținerii unui rezultat cât mai rapid. Utilizarea mediilor de cultură solide este însoțită de dezvoltarea sistemelor automate rapide, care utilizează medii lichide și sunt mai sensibile și de identificarea rapidă prin instrumente moleculare. Tehnicile de prelucrare a probelor și de cultivare a bacteriilor sunt similare cu cele folosite în diagnosticul tuberculozei. Microscopia directă se bazează pe tehnicile de colorare cu substanțe fluorescente, auramină și rodamină sau pe tehnica clasică Ziehl-Neelsen.

Sensibilitatea diagnosticului bazat pe examenul bacteriologic poate fi semnificativ sporită dacă cultivarea se realizează deopotrivă pe medii solide și lichide și dacă incubarea se realizează atât la 30°C cât și la 37°C.

Utilizarea temperaturilor mai scăzute facilitează izolarea unor MNT care sunt implicate în infecții cutanate sau în limfadenite, precum *M. marinum* sau *M. haemophilum* (van Ingen, 2017).

Având o capacitate de a detecta 10^2 microorganisme viabile/ml de probă (pentru *M. tuberculosis*), cultura este mai sensibilă decât microscopia și constituie un mijloc important de monitorizare a eficacității terapiei. O mare varietate de medii solide (Löwenstein-Jensen, Ogawa, Middlebrook, Coletsos) și lichide (Middlebrook 7H9) sunt disponibile. Caracteristicile morfologice ale coloniilor, rata de creștere și pigmentarea constituie aspecte importante în identificarea preliminară.

O serie de sisteme de cultivare în mediu lichid sunt disponibile și recomandate pentru izolarea MNT: BD Bactec MGIT (Becton, Dickinson and Company Diagnostics), BacT/ALERT® MP (BioMerieux, Franța), MB Redox (Heipha Diagnostika) și Septi-check (BD Diagnostics) (Maurya ș.a., 2017).

Pentru a mări rata de izolare și pentru a inhiba creșterea contaminanților, majoritatea mediilor necesită un adaos de suplimente precum OADC (amestec de albumină bovină, dextroză, catalază și acid oleic) sau antibiotice (PANTA - amestec de polimixină B, amfotericină B, acid nalidixic, trimetoprim și azlocilină). În cazul organismelor fastidioase, sunt necesare și unele substanțe precum heminul (*M. haemophilum*) sau micobactina (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*), cu rol în transportul fierului (Maurya ș.a., 2017; Magee și Ward, 2012).

Deși sunt considerate "standarde de aur", metodele convenționale de cultivare a micobacteriilor sunt consumatoare de timp (6-8 săptămâni sau chiar mai mult, în cazul lui

M. avium subsp. *paratuberculosis*) iar în cazul multor MNT sunt insuficiente pentru diferențierea între specii.

Metodele fenotipice de identificare și diferențiere a speciilor de MNT au o utilizare limitată, fiind consumatoare de timp, greu de realizat și inexacte datorită puterii discriminatorii și a reproductibilității reduse. Totuși, o serie de metode biochimice de identificare pot fi utilizate: testul de acumulare a niacinei în mediu, testul producerii de nitrat-reductază, evidențierea catalazei termolabile, hidroliza Tween 80, utilizarea citratului, asimilarea fierului din mediu, hidrolizarea ureei sau reducția teluritică (Bhalla ș.a., 2018).

Testarea moleculară se bazează pe principiul amplificării regiunilor de interes și permite o identificare rapidă și precisă a speciilor, în mai puțin de 24 de ore. Hibridizarea și secvențierea ADN-ului sunt tehnici frecvent utilizate.

Identificarea genotipică, utilizând sonde nucleice, (precum AccuProbe și Gen-Probe, San Diego, CA) este disponibilă pentru CMTB, *M. avium*, *M. intracellulare*, CMA, *M. gordonae* și *M. kansasii* din cultură. AccuProbe se bazează pe utilizarea sondelor de ADN marcate cu ester acridiniu, complementare cu ARNr specific micobacterian, eliberat după liză. Testul INNo-LiPA MYCOBACTERIA (Innogenetics, Belgia) utilizează sonde de 280pb ITS (Internal transcribed spacer) dintre zonele 16S și 23S ARNr, pentru identificarea speciilor din CMTB dar și a unor MNT. Kiturile GenoType (Hain Lifescience, Germania) țintesc gena condantă a 23S ADNr (van Ingen, 2017).

Adesea, relevanța clinică a unui izolat micobacterian variază în funcție de specia identificată. Astfel, identificarea certă la nivel de specie este necesară pentru adoptarea măsurilor de control dar și pentru stabilirea traseelor epidemiologice, mai ales în populațiile de animale. Utilizarea elementelor de inserție, specifice la nivel de complex sau specie precum IS1245, IS901, IS1311, IS900, ISMav2 sau ISMpa02, facilitează identificarea rapidă și discriminarea subspeciilor *M. avium*.

Cea mai frecvent utilizată genă pentru identificarea bacteriilor, 16S ARNr, conferă o identificare fiabilă, contribuind la descoperirea speciilor noi de MNT. Genele *sodA*, *recA*, *gyrB*, *gyrA*, *Hsp65* și *rpoB* sunt frecvent utilizate în studiile filogenetice, fie individual, fie prin analiza filogenetică a secvențelor concatenate. O analiză genetică combinată a acestor elemente determină creșterea capacității de diferențiere (Biet și Boschirolì, 2014).

În cadrul investigațiilor epidemiologice ale speciilor incluse în CMA sunt folosite o serie de tehnici pentru tipizarea moleculară, precum analiza polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție (RFLP) pe baza secvențelor de inserție IS1245 și IS1311 sau analiza unităților repetitive micobacteriene – MIRU-VNTR (Radomski ș.a., 2010).

Secvențierea genomică completă (WGS) a tulpinii *M. tuberculosis* H37Rv a deschis drumul studiilor epidemiologice moderne ale micobacteriilor. Datorită progreselor rapide ale tehnologiei de secvențiere a genomului, în baza de date NCBI sunt disponibile secvențele genomice complete pentru aproximativ 150 de membri din genul *Mycobacterium* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>, Gupta ș.a., 2018). WGS este mult mai precisă în determinarea variabilității între tulpini și permite generarea arborilor filogenetici de înaltă rezoluție și identificarea unei varietăți de markeri genetici specifici.

În medicina omului, atunci când sunt suspectate infecțiile determinate de MNT, diagnosticul de certitudine trebuie să fie întotdeauna susținut de izolarea repetată a micobacteriei din mai multe produse patologice sau dintr-un singur specimen steril, recoltat aseptice (Griffith ș.a., 2007).

Din cauza prezenței lor în mediu, izolarea MNT din probe nesterile de origine umană nu este echivalentă cu infecția sau boala, mai ales în cazul probelor de la nivel respirator. Izolarea repetată, semnele clinice exprimate de pacient, aspectele radiologice, tipul micobacteriei izolate și factorii predispozanți relaționați cu gazda sunt aspecte necesare pentru a determina dacă micobacteria izolată este agentul cauzal sau se datorează colonizării sau contaminării (van Ingen, 2017).

**PARTEA A II-A
CONTRIBUȚII PERSONALE**

**PART II
PERSONAL CONTRIBUTIONS**

CAPITOLUL 3.

SCOPUL CERCETĂRILOR, OBIECTIVELE PROPUSE ȘI CADRUL ORGANIZATORIC

CHAPTER 3.

RESEARCH GOAL, OBJECTIVES AND THE ORGANIZATIONAL FRAMEWORK

Micobacteriile nontuberculoase au dobândit treptat importanță și au ajuns în atenția cercetătorilor, medicilor veterinari și medicilor umani ca agenți etiologici ai micobacteriozelor la o gamă largă de gazde, pacienți umani și numeroase specii de animale domestice, sălbatice sau animale de companie.

MNT sunt adesea izolate din diverse nișe din mediul înconjurător, ape, sol sau vegetație. În ciuda faptului că MNT sunt caracterizate prin patogenitate moderată, incidența infecțiilor cauzate de acestea a înregistrat o creștere, în special în țările dezvoltate (Rindi și Garzelli, 2016).

Înainte de anii 1990, în laboratoarele clinice de micobacteriologie identificarea MNT se realiza în baza caracterelor culturale fenotipice și a testelor biochimice convenționale. Începând cu anii 1990, apariția și dezvoltarea metodelor moleculare, prin PCR și secvențierea genelor pentru identificarea speciilor și subspeciilor, a marcat o nouă eră pentru MNT, cu explozia de noi specii (peste 100) descrise, în comparație cu cele aproximativ 55 de specii identificate în decada anterioară. Actualmente, sfera diagnosticului molecular este marcată de o abordare modernă, prin secvențierea întregului genom (WGS = whole genome sequencing), care aduce clarificări și contribuie la analiza filogenetică a genului *Mycobacterium* și totodată la elucidarea susceptibilității la diverse substanțe antimicrobiene utilizate în terapie.

Majoritatea studiilor privitoare la diversitatea MNT provin din sfera patologiei la om și cel mai adesea tulpinile cercetate sunt izolate din probe recoltate de la nivel respirator. De interes pentru veterinari sunt speciile incluse în CMA, mai ales subspeciile de *M. avium*. După cum a mai fost menționat, membrii acestui complex sunt frecvent implicați și în patologia micobacteriană nontuberculoasă la om.

Tema de cercetare a prezentei lucrări a apărut pe fondul lipsei informațiilor privind diversitatea speciilor micobacteriene nontuberculoase, atât în sfera veterinară cât și în medicina umană din țara noastră. Cercetările realizate anterior în regiunea de N-E a României au fost axate cu precădere pe membrii complexului *M. avium*, tulpini izolate de la păsări și rumegătoare (Macovei, 2014; Bostănar, 2014; Savuța, 2000). Includerea în studiu a tulpinilor de origine umană survine din conceptul integrativ și interdisciplinar al *sănătății unice*, „One health”. Astfel, înainte de evaluarea potențialului zoonotic, este

necesară identificarea și caracterizarea tulpinilor izolate care pot fi încadrate în acest grup (MNT).

Scopul tezei de doctorat cu titlul „**Identificarea, caracterizarea și încadrarea taxonomică a tulpinilor de micobacterii nontuberculoase izolate de la om și animale**” este evaluarea diversității micobacteriilor nontuberculoase din probe biologice de origine umană și animală, rezultatele cercetărilor contribuind la îmbunătățirea cunoștințelor de ordin etiologic și epidemiologic privind speciile prevalente de MNT cu potențial patogen din regiunea de N-E a țării noastre.

Principalele **obiective** urmărite pot fi sistematizate astfel:

- estimarea seroprevalenței CMA în populația de mistreți (*Sus scrofa*) de pe teritoriul județului Iași și din județe învecinate din nord-estul României;
- cercetarea seroconversiei specifice (anticorpi CMA) în probe de lichide toracice provenite de la vulpi sălbatice (*Vulpes vulpes*);
- izolarea și identificarea tulpinilor de MNT implicate în infecții la păsări și rumegătoare domestice;
- identificarea și evaluarea diversității de MNT cu implicații potențiale în patologia respiratorie la pacienți umani;
- caracterizarea și compararea izolatelor micobacteriene de origine animală și umană, selectate în urma identificării moleculare a CMA;
- analiza genotipică a micobacterilor incluse în CMTB, identificate într-un eșantion de probe de la animale (nurci de crescătorie și bovine).

Pentru realizarea obiectivelor și atingerea scopului propus, au fost întreprinse o serie de activități de diagnostic morfologic, serologic, bacteriologic, molecular și de analiză bioinformatică:

- detecția anticorpilor anti-*M. avium* în probe de ser de la mistreți și în lichide toracice de la vulpi, cu ajutorul unui kit comercial;
- evidențierea prezenței MNT în diverse probe de țesuturi de la păsări și rumegătoare, utilizând tehnicile clasice de diagnostic histopatologic, bacteriologic și bacterioscopic;
- detecția moleculară a elementelor specifice speciilor de MNT din CMA, direct din probele de țesut cât și din culturi obținute de la păsări și rumegătoare, prin utilizarea unor protocoale validate și standardizate;
- detecția moleculară a elementelor specifice speciilor de MNT din CMA și secvențierea porțiunilor hipervariabile ale unor gene înalt conservate în genomul micobacterian din izolate de origine umană;
- caracterizarea MNT incluse în CMA, utilizând o tehnică de genotipare cu capacitate înaltă de diferențiere, MIRU-VNTR;
- caracterizarea micobacteriilor din CMTB identificate direct în probele de țesut analizate, utilizând o tehnică modernă de genotipare - spoligotiparea cu microbule (microsfere) magnetice.

Distribuția largă a micobacteriilor în mediu subliniază necesitatea colaborărilor interdisciplinare active. Majoritatea publicațiilor de profil se orientează strict către implicațiile MNT în sfera veterinară sau umană și puține abordează potențialul zoonotic al acestor micobacterii (Thirunavukkarasu ș.a., 2017). O abordare interdisciplinară și uniformizarea tehnicilor de diagnostic în cazul MNT ar contribui substanțial la caracterizarea integrativă a diversității și implicațiilor patologice ale membrilor acestui grup.

Pentru îndeplinirea obiectivelor propuse, activitățile de cercetare întreprinse în perioada studiilor doctorale au fost realizate în următoarele instituții:

- Laboratoarele de Bacteriologie, Serologie și Biologie Moleculară din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași (FMV-IS);
- Laboratorul de Bacteriologie BK din cadrul Spitalului Clinic de Pneumoftiziologie Iași (BK-IS);
- Laboratorul pentru Sănătatea animalelor, Unitatea Zoonoze Bacteriene din cadrul *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*, Maisons-Alfort, Franța (ANSES-FR).

În cadrul laboratoarelor FMV Iași au fost realizate studiile serologice, întreprinse pe 275 de probe de ser recoltate de la mistreți și 92 de probe de lichide toracice de la vulpi sălbatice. Totodată, în cadrul aceleiași instituții au fost efectuate cercetările privind diagnosticul bacteriologic și histopatologic pe probe recoltate de la animale (păsări, bovine, ovine, cerb și câini) cât și extracțiile de ADN în vederea testărilor moleculare. Desfășurarea activităților în această instituție s-a realizat pe întreaga perioadă a studiilor doctorale, 2014 - 2018.

În cadrul laboratorului BK-IS, în perioada mai 2015 - martie 2017 s-au efectuat studiile privind izolarea primară a MNT din probe respiratorii umane, supuse inițial procedurii de diagnostic pentru tuberculoză. Repicajul și pregătirea acestor izolate în vederea testărilor moleculare s-au desfășurat în cadrul laboratoarelor FMV Iași.

În cursul anilor 2017-2018, au fost efectuate două stagii de pregătire și cercetare în cadrul laboratorului pentru Sănătatea animalelor ANSES-FR. Activitățile desfășurate în această instituție, în Laboratorul de Referință pentru Tuberculoza Bovină, listat ca laborator de referință de către Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (WOAH-OIE), au facilitat identificarea și caracterizarea prin tehnici moleculare a MNT din probele evaluate. Dintre activitățile acestei instituții se pot enumera: dezvoltarea și validarea de instrumente de diagnostic, atât fenotipice cât și moleculare, în scopul unei monitorizări epidemiologice a focarelor la animalele domestice și sălbatice, aplicarea de tehnologii moderne, rapide și fiabile în diagnosticul curent și în cercetare, efectuarea studiilor epidemiologice, toate prin prisma conceptului "One Health", vizând interacțiunea dintre agenții patogeni, mediu și speciile gazdă.

CAPITOLUL 4.

INVESTIGAȚII SEROEPIDEMIOLOGICE PRIVIND INFECȚIA CU *MYCOBACTERIUM AVIUM* LA MISTREȚI ȘI LA VULPI SĂLBATICE

CHAPTER 4.

SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION REGARDING *MYCOBACTERIUM AVIUM* INFECTION IN WILD BOARS AND WILD FOXES

Micobacteriile nontuberculoase din CMA pot infecta o gamă variată de animale sălbatice, rumegătoare, omnivore sau carnivore. Când sunt prezente, semnele clinice și leziunile îmbracă aspecte similare cu cele observate la animalele domestice. Majoritatea studiilor menționează faptul că principalele specii nontuberculoase izolate de la animalele sălbatice sunt *M. avium* subsp. *paratuberculosis* și *M. avium* subsp. *avium*.

Porcul mistreț (*Sus scrofa*) este cel mai răspândit ungulat sălbatic în multe regiuni din Europa. Distribuția vastă a speciei, alimentația omnivoră, adaptabilitatea la schimbările de mediu, capacitatea de a traversa barierele naturale, contactul cu diverse specii de animale sălbatice și domestice și susceptibilitatea la infecții micobacteriene constituie aspecte de reală importanță în ceea ce privește capacitatea acestei specii de a intra în contact, de a infecta și disemina MNT. Răspândirea se poate realiza atât prin intermediul excrețiilor, cu precădere fecale, dar și de pe suprafața corporală (Boadella ș.a., 2011; Pavlik ș.a., 2009).

Numeroase cercetări au evidențiat rolul acestei specii în menținerea și răspândirea micobacteriilor din CMA (*M. avium* subsp. *paratuberculosis* și *M. avium* subsp. *avium*) și *M. bovis*, în diverse areale (Pavlik ș.a., 2009). Leziunile sunt rareori observate, mai frecvent la animalele adulte, odată cu creșterea în vârstă și sunt de obicei localizate la nivelul limfonodurilor.

Dovezi ale infecției naturale cu membri CMA la animalele sălbatice sunt furnizate de studiile efectuate în diverse țări: Scoția (Beard ș.a., 2001), Spania (Boadella ș.a., 2011, Marco ș.a., 2002) Portugalia (Matos ș.a., 2014), Norvegia (Tryland ș.a., 2004). Infecțiile CMA la carnivore sunt cel mai adesea localizate la nivel digestiv și apar în urma ingestiei bacililor în timpul hrănirii. Contaminarea din mediu este puțin probabilă. În dieta vulpilor sunt incluse rozătoare mici, păsări și iepuri, acestea fiind cele mai probabile surse.

Determinarea prevalenței infecțiilor micobacteriene nontuberculoase în rândul populațiilor de animale sălbatice aduce un plus de informații semnificative privind distribuția și transmiterea acestor infecții. În contextul unui habitat comun, unde pot exista interacțiuni între animalele domestice și sălbatice și ținând cont de capacitatea infecțioasă

oportunistă a MNT și rezistența lor în mediu, aceste informații pot aduce contribuții semnificative la evaluarea potențialului de transmitere și eficientizarea programelor de control a tuberculozei și paratuberculozei. De asemenea, nu trebuie neglijată nici evaluarea stării de sănătate a populațiilor de animale sălbatice.

Sondajele serologice constituie metode fiabile și des utilizate în medicina veterinară pentru evaluarea prezenței și distribuției unei boli de natură infecțioasă. În țara noastră nu au fost efectuate până acum investigații serologice privind infecțiile cu CMA la animale sălbatice.

Scopul acestui studiu a fost realizarea unei investigații de prevalență a anticorpilor anti-CMA în seruri de la mistreți și în lichide toracice de la vulpi sălbatice din județe din regiunea de Est a României, pentru a obține în final informații preliminare privind distribuția speciilor de micobacterii incluse în acest complex în zona evaluată.

4.1. Material și metodă

4.1.1. Recoltarea și condiționarea probelor

În prezentul studiu au fost testate 275 de probe de seruri provenite de la mistreți din următoarele județe din zona de Est a României: Iași (209 probe), Botoșani (11 probe), Bacău (17), Galați (27). Au mai fost testate 11 probe din județul Covasna (11). Recoltarea a fost realizată de-a lungul sezoanelor de vânătoare din perioada 2017-2018, probele fiind menținute la -20°C , până în momentul testării.

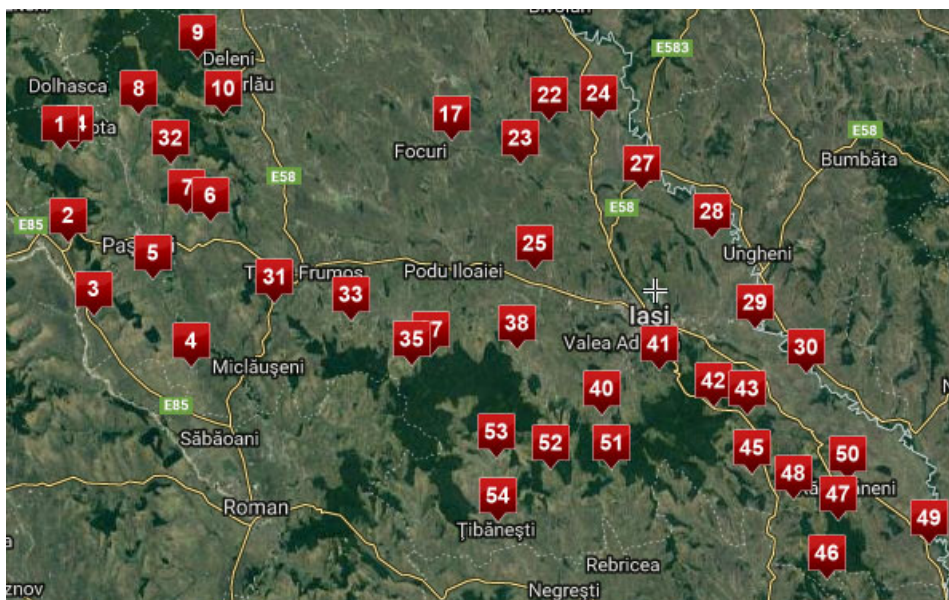


Figura 4.1 Distribuția geografică a fondurilor de vânătoare din județul Iași, din care au provenit probele analizate (numărul marcatorului corespunde cu numărul fondului de vânătoare din tabelul 4.1; creată cu www.scribblemaps.com)

Figure 4.1 Geographical distribution of the Iași County hunting funds, from which originated the analyzed samples (the number on the marker corresponds to the hunting regions described in table 4.1; designed with www.scribblemaps.com)

Date privind distribuția și originea probelor din Județul Iași
Data regarding the distribution and origin of the samples from Iași County

Nr. Crt.	Denumirea fondului de vânătoare (FV)	Nr. de probe testate/ fond	Sex		Categoria de vârstă		
			M	F	Tineret	Maturi	Adulți
1.	1 Tătăruși	1		1			1
2.	2 Moțca	2		2			2
3.	3 Miroslavești	1	1				1
4.	4 Hălăucești	1		1			1
5.	5 Stolniceni Prăjescu	4		4			4
6.	6 Stroești	1	1			1	
7.	7 Hărmanești	1	1				1
8.	8 Sirețel	2	2				2
9.	9 Bahlui	24	8	16		8	16
10.	10 Cătălina	3	2	1	2		1
11.	17 Gropnița	1	1				1
12.	22 Turia Perieni	23	11	12		6	17
13.	23 Larga Jijia	2	1	1			2
14.	24 Probota	3	2	1			3
15.	25 Lețcani	1	1				1
16.	27 Victoria	8	4	4		1	7
17.	28 Golăești	3	2	1	1		2
18.	29 Țuțora	2	2				2
19.	30 Prisăcani	4	4				4
20.	31 Strunga	3	3				3
21.	32 Crivești	5	3	2		4	1
22.	33 Brăiești	6	2	4			6
23.	35 Sinești	4		4	4		
24.	37 Gheorghitoaia	8	8			3	5
25.	38 Horlești	4	2	2	2		2
26.	40 Mogoșești	7	2	5	1	2	4
27.	41 Bârnova	1	1				1
28.	42 Poieni	14	4	10	1	3	10
29.	43 Schitu Duca	4	2	2		2	2
30.	44 Pietrosu	7	1	6		3	4
31.	45 Pocreaca	2	1	1			2
32.	46 Brădicești	3		3		3	
33.	47 Bunești	2	1	1		1	1
34.	48 Crâșnița	14	11	3	1	2	11
35.	49 Gorban	4	3	1		1	3
36.	50 Răducăneni	7	5	2			7
37.	51 Grajduri	16	11	5		3	13
38.	52 Mironeasa	4	1	3		2	2
39.	53 Țibana	1	1			1	
40.	54 Țibănești	4	2	2		2	2

Aspectele privind vârsta și sexul mistreților din județul Iași, de la care au provenit probele testate, sunt redate în tabelul 4.1. Zonele de recoltare a probelor au fost constituite din 40 de fonduri de vânătoare, a căror distribuție este prezentată în figura 4.1. Pentru două probe din județul Iași și pentru probele ce au provenit din alte județe nu au fost disponibile date privind locația fondurilor de vânătoare.

Alături de probele de la mistreți, au mai fost testate 92 de probe reprezentate de lichide toracice recoltate de la vulpi (*Vulpes vulpes*) după perioada campaniilor de vaccinare antirabică din 2015. Aceste probe au fost testate inițial pentru verificarea eficacității vaccinărilor orale antirabice cu ajutorul momelilor, conform planului strategic. În cadrul acestui studiu au fost incluse probe de pe teritoriul a cinci județe din zona de N-E a României, după cum sunt prezentate în figura 4.2.

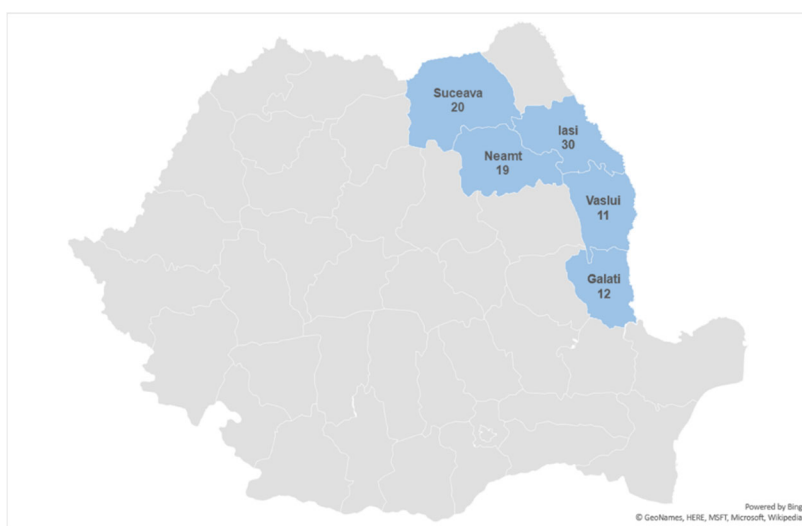


Figura 4.2 Originea geografică a probelor de la vulpi (original)

Figure 4.2 Geographic origin of the fox samples (original)

4.1.2. Evaluarea serologică

Pentru identificarea anticorpilor IgG anti-*Mycobacterium avium* în probele de ser și lichide toracice a fost folosită metoda ELISA indirectă, fiind utilizat un kit comercial: ID Screen® *Mycobacterium avium* Indirect Multi-species (ID.vet, Innovate Diagnostics, Franța). Acest test este conceput pentru a detecta circulația lui *M. avium* subsp. *hominissuis* la nivelul de efectiv, în cazul suinelor domestice dar are o aplicabilitate largă, putând fi utilizat pe probe de ser și plasmă de la o varietate de animale domestice (ovine, caprine, bovine, suine) dar și sălbatice. Conform datelor furnizate de producător și studiilor preliminare, testul ELISA utilizat are o sensibilitate ce variază între 34,48% - 44% și o specificitate de 100% (Lesceu și Pourquier, 2011; Eisenberg ș.a., 2012).

Pentru evitarea răspunsurilor încrucișate, anticorpilor nespecfici, probele se mențin într-o primă etapă de preincubare în soluție tampon cu *M. phlei*, pentru 16-20 de ore, la 4°C, înainte de transferarea în plăcile căptușite. În plăcile cu 96 de godeuri, fiecare probă a fost testată singular iar martorii, pozitiv și negativ, furnizați de producător au fost testați în

duplicat. Probele au fost lăsate la incubat pentru 45 minute. După spălare, a fost adăugat un conjugat multi-specie IgG-peroxidază, care se fixează pe complexele antigen-anticorp formate în etapa anterioară. Placa a fost din nou spălată și pentru revelare s-a adăugat soluția de substrat TMB, care în prezența anticorpilor determină virarea culorii din godeuri în albastru (fig. 4.2 A). În etapa finală, după adăugarea soluției STOP, culoarea se modifică în galben (fig. 4.2 B) în godeurile în care există anticorpi.

Citirea plăcilor s-a realizat la lungimea de undă de 450nm, utilizând cititorul ELISA Sunrise™ Absorbance Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Elveția). Evaluarea rezultatelor obținute a fost realizată conform specificațiilor producătorului. Astfel, pentru validarea reacției s-a urmărit ca media valorilor densităților optice obținute pentru martorii pozitivi să fie peste 0,350 iar raportul dintre mediile densităților optice ale martorilor pozitivi și ale celor negativi să fie mai mare sau egal cu 3.

Exprimarea rezultatelor s-a realizat pentru fiecare probă în parte, procentual, ca raport dintre probă și media martorilor pozitivi, conform formulei:

$$\frac{OD_{450}probă - OD_{450}MN}{OD_{450}MP - OD_{450}MN} \times 100,$$

unde: MN= martor negativ, MP= martor pozitiv, OD_{450} = valoarea densității optice obținute în urma citirii la o lungime de undă de 450nm.

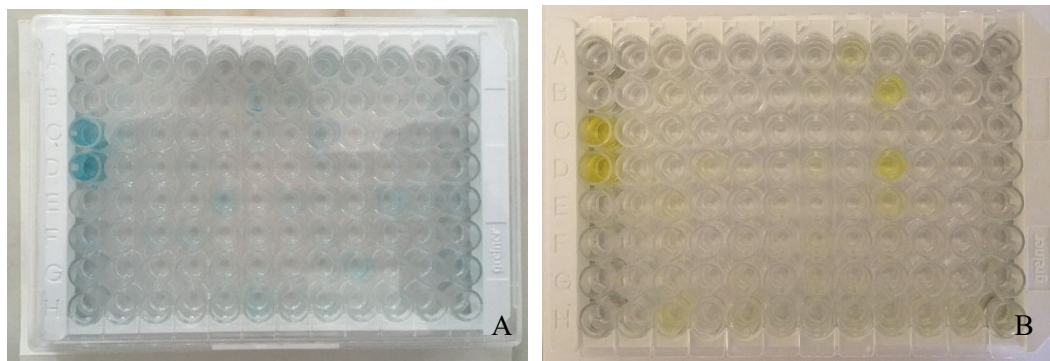


Figura 4.3 Placa de testare ELISA: A - după adăugarea substratului, B - după adăugarea soluției STOP (original)

Figure 4.3 ELISA testing plate: A - after adding the conjugate, B - after adding the STOP solution (original)

Conform instrucțiunilor, rezultatele mai mici sau egale cu 40% din valoarea OD a serului de control pozitiv au fost considerate negative, valorile mai mari sau egale cu 50% - pozitive iar valorile între 40 și 50% au fost încadrate ca dubioase.

4.2. Rezultate și discuții

În urma testării serologice a celor 275 de seruri de mistreț, cu ajutorul unui kit comercial ELISA, nu au fost detectați anticorpi anti-*M. avium* în nici una dintre probele de ser supuse evaluării. Din eșantionul de 92 probe testate de la vulpi, o singură probă, provenită din județul Galați a fost pozitivă (1,08%).

Acesta este primul studiu de seroprevalență a CMA efectuat în țara noastră la specii de animale sălbatice. Utilizarea unei analize serologice limitează contextul discuțiilor la expunere și nu la boală.

Utilizarea metodelor serologice pentru evaluarea infecțiilor determinate de speciile CMA la mamiferele sălbatice nu este realizată pe scară largă, făcând dificilă astfel compararea rezultatelor. Utilizând aceeași metodă de testare, Matos și colaboratorii (Matos ș.a., 2015) identifică o singură probă pozitivă din cele 42 testate (2.4%; CI 95%: 25.4-32.7%). *M. avium* subsp. *paratuberculosis* a fost izolat sau identificat prin PCR la vulpi atât în Europa cât și în America sau în Austria (Beard ș.a., 2001, Anderson ș.a., 2007, Florou ș.a., 2008). În Portugalia, infecția cu această micobacterie este frecventă în rândul carnivorelor sălbatice (Matos ș.a., 2014).

În general, o frecvență scăzută a infecțiilor cu *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, de până la 5 % este de așteptat la mistreți, conform rezultatelor semnalate de Alvarez în Spania sau Machackova în diverse țări din centrul Europei (Alvarez ș.a., 2005, Machackova ș.a., 2003).

Rezultatele negative obținute în acest studiu ar putea fi explicate printr-o lipsă reală de expunere la agenți micobacterieni sau printr-o incapacitate a testului utilizat de a detecta anticorpi la această specie. Al doilea motiv ar putea fi exclus, ținând cont de faptul că reacțiile au fost validate și kitul a fost utilizat și de alți cercetători, pe probe de mistreți, cu rezultate pozitive. Utilizând aceeași metodă, Matos și colaboratorii au identificat o prevalență de 23,9% (CI 17,8-34,2) pentru eșantionul testat de seruri de mistreți din peninsula Iberică (Matos ș.a., 2015).

Rezultatele noastre pot fi corelate cu o distribuție redusă a membrilor CMA în mediu și o prevalență scăzută a infecțiilor determinate de acești agenți bacterieni la animale, fie ele sălbatice sau domestice. Din evaluarea curentă, reiese un rol limitat al vulpilor în epidemiologia infecțiilor micobacteriene nontuberculoase.

Aceste rezultate pot fi corelate și cu numărul scăzut de focare de paratuberculoză identificate în perioada 2014-2018 în țara noastră și raportate în baza de date WAHIS a WOAHO- OIE (27 de focare), în regiunea de N-E a țării fiind semnalate doar în județele Iași (1 focar în 2015) și Botoșani (două focare în 2016).

Studiile privind prezența speciilor din CMA în populațiile de mistreți, mai ales cu referire la *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, sunt reduse ca număr, în ciuda faptului că aceste animale sunt cunoscute ca fiind rezervoare relevante pentru un alt patogen micobacterian, *M. bovis* (Aranaz ș.a., 2004). Mistrețul este un omnivor care, în sălbăcie, se hrănește ocazional și cu animale mici, precum iepuri (*Lepus europeus*), fazani, potârniche (*Perdix perdix*) sau chiar rumegătoare tinere. Mistrețul se hrănește și cu resturi de carcase de la animalele sălbatice moarte sau de la animale domestice (păsări, iepuri de curte) eliminate necorespunzător (Machackova ș.a., 2003). Astfel, infecția cu micobacterii s-ar putea realiza prin ingerarea resturilor de pe pășuni contaminate, în timpul săpării pământului, în contact cu vegetația sau prin ingerarea de țesuturi (organe parenchimatoase, regiuni de tract digestiv) ale animalelor sălbatice moarte (Machackova ș.a., 2003).

Garrido și colaboratorii au observat faptul că în infecția experimentală cu *M. avium* subsp. *avium* la mistreți, semnele clinice sunt absente iar leziunile la nivelul limfonodurilor capului și a celor mezenterice apar la doze infectante de $2,5 \times 10^6$ micobacterii (Garrido ș.a., 2010). Aceste observații sunt întărite de aspectele observate de alți autori în cazul infecțiilor naturale (Biet ș.a., 2005; Machackova ș.a., 2003). Totodată, este sugerat faptul că în funcție de calea de infecție, respiratorie - în urma contactului strâns cu alte animale sau digestivă - prin consumul de carcase infectate, dezvoltarea răspunsului imun este diferită, putând avea un efect asupra potențialului de manifestare a infecției micobacteriene (Garrido ș.a., 2010).

4.3. Concluzii parțiale

1. Animalele **sălbatic**e pot avea un rol important în menținerea și răspândirea micobacteriilor nontuberculoase implicate în patologia veterinară, **estimarea seroprevalenței CMA** fiind, în acest context, de un real interes epidemiologic.
2. Rezultatele studiului nostru au evidențiat **absența seroconversiei** pentru CMA la **mistreții** din zona de Est a României, sugerând astfel faptul că aceștia nu constituie o sursă de menținere și de răspândire a acestor micobacterii.
3. Semnalul pozitiv obținut pentru **o singură vulpe** din cele 92 testate nu este suficient pentru a estima seroprevalența CMA la această specie, fiind necesară evaluarea unui număr mult mai mare de probe din zone geografice diferite.
4. Aceste rezultate ar putea fi explicate atât printr-o **absență reală a expunerii** la CMA cât și printr-o **prevalență scăzută** a infecțiilor cu aceste micobacterii la animale în zona respectivă.
5. Acesta este **primul studiu** de seroprevalență a CMA efectuat în țara noastră la specii de **animale sălbatic**e, constituindu-se într-o cercetare preliminară ale cărei rezultate sugerează ipoteza privind existența unui **rezervor silvatic** care nu trebuie neglijat.
6. **Perspectiv**e de cercetare în această direcție sunt: evaluarea serologică a unui număr mai mare de specii de animale sălbatic, mai ales rumegătoare și leporide; extinderea studiului probelor de mistreți la mai multe județe și nu în ultimul rând, evaluarea serologică a rumegătoarelor domestice crescute în sistem extensiv în aceleași zone.

CAPITOLUL 5.

IZOLAREA, IDENTIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA TULPINILOR DE MICOBACTERII NONTUBERCULOASE DE LA ANIMALE

CHAPTER 5.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NONTUBERCULOS MYCOBACTERIA STRAINS FROM ANIMALS

Identificarea surselor de infecție și a căilor de transmitere și diseminare în mediu constituie aspecte esențiale în epidemiologia tuberculozei și a micobacteriozelor, ca de altfel, în toate bolile infecțioase, subliniind astfel importanța critică a identificării și caracterizării individuale a tulpinilor de *Mycobacterium*. De la descoperirea bacilului tuberculozei și până în prezent, au fost dezvoltate foarte multe tehnici pentru izolarea, identificarea și discriminarea diferitelor specii de micobacterii.

Metodele bacteriologice, fenotipice și biochimice, dezvoltate în principal pentru diagnosticul medical, au fost perfecționate și asociate cu noi tehnici moleculare de identificare și caracterizare, precum amplificarea genică și secvențierea, tehnici care reduc din dezavantajele metodelor clasice, consumatoare de timp, îmbunătățind viteza obținerii diagnosticului de certitudine și analiza tulpinilor în scopuri epidemiologice. Rezultatele obținute prin metodele clasice nu sunt întotdeauna în concordanță cu cele ce rezultă în urma analizelor moleculare, ceea ce îngreunează compararea datelor.

Prevalența emergentă a MNT, îndeosebi pentru speciile ce aparțin complexului *M. avium*, a fost semnalată cu precădere în țările dezvoltate economic, în care se înregistrează o incidență scăzută a tuberculozei. Sunt relatate coinfecții cu membri ai complexului *M. tuberculosis* și unele micobacterii nontuberculoase (Alvarez ș.a., 2008) cât și reacții imunologice încrucișate, ce îngreunează diagnosticul tuberculozei bovine dar și al altor micobacterioze, cum ar fi paratuberculoza (Jenkins ș.a., 2018, Biet și Boschioli, 2014).

Expansiunea teritorială a populației umane și interacțiunea tot mai strânsă dintre fauna sălbatică, cea domestică și om modifică ecologia micobacteriilor, adăugând astfel mai multe dificultăți în procesul de diagnostic.

Cu excepția agenților patogeni micobacterieni recunoscuți și anume *M. avium* subsp. *paratuberculosis* și *M. avium* subsp. *avium*, agenții etiologici ai paratuberculozei rumegătoarelor, respectiv ai tuberculozei aviare, informațiile privind micobacteriozele la animale sunt puține. Cercetări recente cu privire la infecțiile determinate de specii din CMA la animale în România sunt disponibile într-un număr limitat de studii. Investigațiile realizate de Macovei I. descriu izolarea și identificarea subspeciilor *M. avium* prin metode

convenționale și prin PCR (IS901, IS1245, IS900), cât și caracterizarea moleculară a izolatelor prin LSP și MIRU-VNTR (Macovei, 2014). Bostănaru A. utilizează, de asemenea, metode de diagnostic bacteriologic și molecular pentru a identifica *M. avium* subsp. *avium* în probe de splină și ficat de la păsări de curte (Bostănaru, 2014).

Scopul acestui studiu este utilizarea tehnicilor de diagnostic clasic și molecular în vederea izolării, identificării și caracterizării micobacteriilor obținute din probele de țesuturi testate, provenite de la păsările și rumegătoarele suspectate de infecții provocate de germeni din genul *Mycobacterium*.

5.1. Material și metodă

5.1.1. Recoltarea și condiționarea probelor

În evaluarea curentă au fost incluse prelevate de organe de la animale și păsări suspectate de infecții determinate de MNT, analizate în perioada februarie 2015 - martie 2018 în cadrul Laboratorului de Bacteriologie al FMV Iași. În urma examenelor necropsice efectuate, au fost recoltate probe de organe și țesuturi cu modificări, în scopul construirii unei bănci de probe.

Tabelul 5.1/Table 5.1

Date privind probele evaluate de la găini
Data regarding the evaluated chicken samples

Nr. Crt	Identificare	Tipul probei	Anul și Județul recoltării
1	Găină 1	Ficat	2015, Iași
2		Splină	
3	Găină 2	Ficat	2015, Iași
4		Splină	
5	Găină 3	Ficat	2015, Iași
6		Splină	
7	Găină 4	Ficat	2015, Iași
8		Splină	
9	Găină 5	Ficat	2017, Iași
10		Splină	
11		Pulmon	
12	Găină 6	Splină	2015, Iași
13		Ficat	
14	Găină 7	Splină	2017, Iași
15		Intestin	
16		Ficat	
17	Găină 8	Ficat	2017, Iași

Au fost incluse în acest studiu prelevate de la 8 găini (*Gallus gallus domesticus*), 5 bovine (*Bos taurus*), 2 ovine (*Ovis ories*), un cerb (*Cervus elaphus L.*) și doi câini (*Canis lupus familiaris*), provenind din sistemul gospodăresc de pe raza județului Iași dar și a județelor învecinate: Suceava, Neamț, Botoșani (Tabelul 5.1 și 5.2).

Tabelul 5.2/Table 5.2

Date privind probele evaluate de la ruminante și câine
Data regarding the ruminant and dog samples evaluated

Nr. Crt	Identificare	Tipul probei	Anul și județul recoltării
1	Vacă 1	Intestin	2015, Neamț
2		Limfonod mezenteric	
3		Fecale	
4	Vacă 2	Intestin	2015, Neamț
5		Limfonod mezenteric	
6		Fecale	
7	Vacă 3	Pulmon	2017, Iași
8	Vacă 4	Limfonod mediastinal	2015, Botoșani
9		Pulmon	
10	Vacă 5	Limfonod mezenteric	2016, Iași
11		Jejun	
12		Rect	
13		Intestin-regiune ileo-cecală	
14		Fecale	
15	Oaie 1	Intestin	2017, Botoșani
16		Limfonod mezenteric	
17		Fecale	
18	Oaie 2	Intestin	2016, Botoșani
19		Limfonod mezenteric	
20		Fecale	
21	Cerb	Ficat	2015, Suceava
22		Splină	
23		Intestin	
24	Câine 1	Puncție nodul subcutanat	2015, Iași
25		Țesut nodul subcutanat	
26	Câine 2	Puncție nodul subcutanat	2015, Iași

Stocarea probelor s-a realizat în recipiente sterile de tip Falcon, volum 15 ml și Eppendorf, de 2 ml, în scopul realizării băncii de probe și prelucrării acestora prin examene bacteriologice și moleculare. Acestea au fost menținute la -20°C. Pentru examenele histopatologice, porțiuni din țesuturile cu leziuni de tip granulomatos (ficat, splină, pulmon) au fost fixate în soluție de formol 10%.

5.1.2. Examenul necropsic și histopatologic

Examele necropsice și histopatologice au fost efectuate în Laboratorul de Anatomie Patologică din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași. Pentru evidențierea modificărilor tisulare specifice infecțiilor cu micobacterii și prezenței BAAR, au fost examinate porțiuni de ficat și splină de la cele opt păsări și de pulmon, intestin și limfonoduri

mezenterice de la rumegătoare, fiind utilizate colorațiile Ziehl-Neelsen și Hematoxină-Eozină, conform protocoalelor de lucru descrise de Macovei și Alexandru (Macovei I., 2014; Alexandru, 1995).

În scopul examinării organelor și identificării leziunilor caracteristice, a fost utilizată tehnica de necropsie Abricosov pentru sisteme și aparate organice. Având în vedere contextul lezional, la recoltare s-au urmărit zonele marginale ale leziunilor, astfel încât porțiunile de țesut prelevate să cuprindă atât structurile normale cât și cele modificate.

Soluția fixatoare (formol 10%) a fost schimbată după 48 ore, când s-a realizat fasonarea probelor în blocuri cu o grosime de aproximativ 0,5 cm. În procesarea țesutului biopsic, fixarea reprezintă o etapă obligatorie, care menține arhitectura celulară și implicit tisulară, păstrând proteinele și alte fragmente bioactive în relația lor spațială, astfel încât acestea să poată fi studiate. Formolul realizează fixarea țesuturilor în urma metilenizării proteinelor celulare.

Pentru includerea fragmentelor în parafină au fost parcurse următoarele etape inițiale: *deshidratarea*-în trei băi cu alcool de concentrații progresive: 80%, 90% și 100%, timp de câte 10 minute și *clarificarea*-în trei băi de xilen, câte 20 de minute, pentru eliminarea etanolului utilizat în deshidratare, care nu este miscibil cu parafina. Piesa astfel tratată este impregnată cu parafină în termostatul de includere, în trei etape de câte două ore, la temperatura de 56 °C iar la final se realizează montarea într-un bloc din aceeași substanță (Bostănuș A., 2014).

Obținerea secțiunilor ce urmează a fi colorate se realizează cu ajutorul microtomului (5 μm), acestea fiind preluate de pe baia de apă (40-50°C) cu lama port-obiect. Pentru colorare, se realizează etapele de deparafinare și rehidratare. Au fost folosite trei băi succesive de xilen sau benzen, de câte 20 minute și trei băi de alcool, în concentrații descrescătoare: 100%, 90% și 80%, timp de câte 10 minute. Ulterior, se utilizează o baie de apă pentru două, trei minute (Bostănuș A., 2014, Macovei I. 2014).

A mai fost utilizată și schema de deshidratare-clarificare cu trei băi de alcool: 70%, 96%, absolut (x3), de câte 1,5 ore, urmate de o baie în acetona peste noapte și trei băi de benzen de 1,5 ore (Alexandru, 1995). Ulterior, lamele cu secțiunile obținute după includerea la parafină au fost deparafinate și hidratate în trei băi de benzen (timp ajustabil: 15 minute - 2 ore) și patru de alcool (100% x2, 80%, 50%), iar la final în apă distilată.

Etapele și timpii de lucru utilizați în tehnicile de colorare Ziehl Neelsen modificată și Hematoxină-Eozină sunt redată în tabelele 5.3 și 5.4. Colorația clasică Ziehl-Neelsen cuprinde următoarele etape: colorare în fucsina fenolată, pentru 45 minute la 56°C, decolorarea în trei băi de alcool lactic, pentru câte 20 secunde, clătire cu apă de robinet, pasaj în carbonat de litium, recolorarea cu albastru de metilen (10 secunde), spălarea (apă deionizată) și menținerea într-o baie de alcool-acetonă, pentru maxim 7 minute (Macovei, 2014).

Etapele de colorare sunt urmate de o nouă deshidratare și clarificare. Deshidratarea a fost realizată cu ajutorul a trei băi de alcool, de concentrații crescătoare 70%, 95% și 100% - menținere un minut/baie (Macovei, 2014) sau 80%, 90% și absolut (x2), doar prin trecere

(câteva secunde). Clarificarea s-a efectuat în băi de xilen sau toluen, pentru câte 20 de minute (Alexandru, 1995).

Tabelul 5.3/Table 5.3

Etapele colorației Ziehl- Neelsen modificată – ZNM (sursă: Alexandru, 1995)

Modified Ziehl Neelsen staining steps – MZN (source: Alexandru, 1995)

Nr.	ETAPĂ	TIMPI
1	Hematoxină Mayer (soluție alcoolică)	3-10 minute
2	Apă distilată	clătire
	Apă robinet	clătire
3	Apă litinată	1-3 minute
4	Apă robinet	clătire
	Apă distilată	clătire
5	Fucsină fenolată	40-60 minute
6	Soluție acid- alcool (HCl)	1 minut
7	Alcool 70%	spălare
8	Apă distilată	clătire
9	Apă supralitată	tatonare
10	Apă distilată	clătire

Tabelul 5.4/Table 5.4

Etapele colorației Hematoxină-Eozină-HE (sursă: Alexandru, 1995)

Hematoxylin-Eosin procedure-HE (source: Alexandru, 1995)

Nr.	ETAPĂ	TIMPI
1	Alaun de fier și amoniu 4%	30 minute (≤ 24 ore)
2	Apă distilată	I spălare
		II spălare
		III spălare
3	Hematoxină Heidenhain	30 minute (≤ 24 ore)
4	Apă robinet	3 minute
5	Alaun de fier și amoniu 1,5%	tatonare
6	Apă distilată	I spălare
		II clătire
7	Eozină 1%	30 secunde-1 minut
8	Apă distilată	I clătire
		II clătire

5.1.3. Examenul bacterioscopic direct

În ciuda numeroaselor progrese recente înregistrate în sfera micobacteriologiei, diagnosticul precoce de laborator al tuberculozei și micobacteriozelor se bazează încă pe examinarea frotiurilor. Nu numai că este cea mai ușoară, mai ieftină și cea mai rapidă procedură, dar oferă informații preliminare importante.

Tehnica originală de colorare a bacililor acido-alcool rezistenți (BAAR), care permite vizualizarea microbacteriilor prin examen microscopic direct, a fost dezvoltată de cercetătorul german Robert Koch, la sfârșitul anilor 1870. Metoda, care a suferit modificări de-a lungul timpului, are la bază proprietatea de acido-alcool rezistență a micobacteriilor, care se datorează structurii complexe a peretelui celular (vezi partea I - studiu bibliografic).

Acido-alcool-rezistența va oferi avantajul menținerii colorantului primar la nivelul celulei bacteriene atunci când aceasta este supusă unui tratament cu o soluție decolorantă de acizi și alcooli. Astăzi, două metode de colorare sunt utilizate în mod predominant: tehnica de colorare Ziehl-Neelsen (ZN), care facilitează vizualizarea BAAR prin microscopie în câmp luminos și tehnica de colorare Auramină-O/Auramină- Rodamină (Truant), care necesită un microscop cu fluorescență. O altă metodă de colorare utilizată pentru evidențierea micobacteriilor este colorația Kinyoun.

Tehnicile de colorare a frotiurilor pot evidenția prezența bacililor acido-alcool-rezistenți (BAAR), însă nu se poate realiza diferențierea celor tuberculoși de MNT doar în baza acestei examinări (Truffot-Pernot ș.a., 2006).

Frotiurile au fost realizate din diverse materiale patologice, precum fecale, raclat de mucoasă rectală (paratuberculoză) sau din țesuturi cu modificări caracteristice: limfonoduri, porțiuni din intestin, pulmon (rumegătoarele suspicionate cu paratuberculoză și tuberculoză), ficat, splină, ovar (la găinile suspicionate cu tuberculoza aviară). A mai fost analizat și conținutul extras din nodulii cutanați observați la doi câini.

A fost utilizată colorația de referință Ziehl-Neelsen, conform tehnicii descrise în „Îndrumar de tehnici de laborator de bacteriologie BK” (Homorodean ș.a., 2005). Prepararea reactivilor, etapele și timpii de lucru au respectat precizările făcute în acest ghid, fiind conforme cu precizările Organizației Mondiale a Sănătății (OMS). Examinarea a fost realizată în cadrul Laboratorului de Bacteriologie din incinta Facultății de Medicină Veterinară Iași.

Tabelul 5.5/Table 5.5
Etapile colorației Ziehl-Neelsen din examenul bacterioscopic direct
(după Homorodean ș.a., 2005)

Ziehl-Neelsen staining steps in direct bacterioscopy (after: Homorodean ș.a., 2005)

ETAPĂ	REACTIVI	PERIOADĂ
Colorare	Fucsină fenicată 0,3%	10 minute
	Încălzirea frotiurilor până la apariția vaporilor	
Spălare	Apă robinet	-
Decolorare	Soluție acid - alcool 3%	Până la 3 minute
Spălare	Apă robinet	-
Recolorare	Albastru de metilen 0.3%	30-60 secunde
Spălare	Apă robinet	-

În cazul leziunilor granulomatoase de mici dimensiuni, etalarea materialului patologic pe frotiuri a fost realizată prin ștergere, amprentare sau strivire. Uscarea a fost realizată la temperatura camerei iar fixarea prin trecerea suprafeței ne-etilate a lamei prin flacăra becului de gaz, cu precauție pentru a nu carboniza bacilii (Carp-Cărare și colab., 1997). Metoda de colorare este redată în tabelul 5.5.

Trebuie precizate o serie de detalii operaționale:

- lamele au fost poziționate distanțat pe suportul de colorare, pentru a preveni eventualele scurgeri de reactivi de pe un frotiu pe altul;
- în etapa de colorare, încălzirea frotiurilor până la apariția vaporilor s-a realizat cu ajutorul becului de gaz și s-a repetat de 3-4 ori la începutul colorării (primele trei minute), cu evitarea carbonizării BAAR;
- în cazul în care a fost necesar, au fost completate cu fucsină fenicată frotiurile unde aceasta s-a scurs ori s-a uscat;
- etapa de decolorare a fost repetată în situațiile în care acest lucru s-a considerat necesar, până la obținerea unei culori alburii sau roz-pal a materialului etalat. Repetiția acestei etape nu este considerată o greșeală, micobacteriile fiind rezistente la soluția de acid-alcool utilizată;
- excesul de apă de la clătiri a fost absorbit prin poziționarea lamei perpendicular pe o hârtie de filtru;
- uscarea finală a frotiurilor a fost realizată în poziție înclinată, pe stativ.

Fixarea fucsinei de către micobacterii este facilitată de utilizarea căldurii. Astfel, frotiul final va avea o culoare albastră în urma recolorării iar eventualii BAAR prezenți vor fi roșii. Examinarea s-a realizat la microscopul optic, cu obiectivul de imersie și ocular 10x/7x, suportul tehnic utilizat cuprinzând microscopalele OLYMPUS CX31, Leica ICC50 HD și sistemul Leica Acquire Software.

5.1.4. Examenul bacteriologic

Timp de mai multe decenii, diagnosticul infecțiilor determinate de micobacterii a fost efectuat pe baza semnelor clinice, a microscopiei și a cultivării. Dintre aceste modalități, cultivarea rămâne „standardul de aur”, confirmând infecțiile active. Cu toate acestea, metoda este costisitoare, solicitantă din punct de vedere tehnic, necesită resurse de laborator, este supusă unei presiuni din partea contaminanților și consumă mult timp.

Tehnicile de cultură și de identificare pentru *M. bovis*, *M. caprae* sau MAP din specimene clinice veterinare nu sunt standardizate la nivel mondial, prin urmare, în laboratoarele veterinare de diagnostic din întreaga lume, se utilizează o gamă variată de medii de cultură lichide și solide. Timpul necesar pentru izolarea acestor specii poate fi de până la 12-14 săptămâni iar testele ulterioare necesare pentru a confirma și identifica un izolat (Ziehl-Neelsen, PCR sau qPCR, tipizarea moleculară) necesită timp suplimentar, costuri și formarea de personal calificat (Stewart L. D. și colab., 2017).

Diferențierea MNT de micobacteriile care determină tuberculoza bovină este în prezent posibilă numai prin metode de amplificare a acidului nucleic, cum ar fi PCR clasic și în timp real, metode care sunt specifice dar sunt provocatoare din punct de vedere tehnic și necesită instrumente sofisticate care le fac scumpe.

Izolarea MAP de la un animal furnizează diagnosticul definitiv al infecției cu microorganismul. Deși cultivarea bacilului este dificilă din punct de vedere tehnic și consumatoare de timp, este singurul test care are o specificitate 100%. Rezultate fals pozitive pot fi obținute atunci când se testează probe de fecale de la animale neinfectate, dar care trăiesc în spații contaminate. Se pot detecta majoritatea animalelor infectate, aflate în

stadii avansate de evoluție a bolii, însă doar o parte din cele aflate în stadiile inițiale pot fi identificate.

Eșantioanele nesterile au fost prelucrate cu soluții de detergenți, alcali sau cu acizi pentru a elimina microorganismele cu creștere rapidă înainte de a însămânța mediile specifice.

O varietate de medii de cultură solide (de exemplu, Löwenstein-Jensen, Ogawa, Middlebrook 7H10, 7H11, Coletsos) și lichide (Middlebrook 7H9) sunt disponibile pentru cultivarea micobacteriilor din probele clinice. Este recomandat să se utilizeze o combinație de medii solide și lichide, pentru a se asigura o bună recuperare și pentru a facilita identificarea ulterioară a speciilor (van Ingen, 2017).

Dintre mediile solide, pe bază de ou, cel mai adesea utilizat este mediul Löwenstein-Jensen. În prezentul studiu a fost utilizat acest mediu, atât în forma comercială (Sanimed) fără micobactină, cât și mediul „*in house*” preparat în laboratorul de bacteriologie, cu adaos de micobactină J. În structura mediului de bază, liofilizat, intră următorii compuși: făină de cartofi (18,75g/l), L-asparagină (2,25g/l), monofosfat de potasiu (1,5g/l), citrat (0,375g/l) și sulfat de magneziu (0,15g/l) și verde malachit (0,25g/l).

Prepararea mediului solid LJ s-a realizat pornind de la o cantitate de 600 ml mediu de bază, realizat din 37,2 g LJ liofilizat, 600 ml apă și 12 ml glicerol, conform specificațiilor producătorului. Mediul astfel preparat a fost menținut timp de 15 minute pe baie marină, cu apa fierbând, fiind amestecat în permanență și ulterior atoclat (15 minute la 120°C). Pentru prepararea adaosului de gălbenuș de ou au fost utilizate 20-24 de ouă (în funcție de mărimea acestora), menținute inițial timp de o oră în soluție de etanol 95% pentru decontaminarea cojii. Suplimentarea cu micobactină susține creșterea micobacteriilor fastidioase. Micobactina J este un siderofor disponibil în comerț, izolat din *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Mediul a fost repartizat în tuburi sterile (6 ml/tub). Pentru coagulare, tuburile se mențin în poziție înclinată, timp de 90 minute la 85°C, ulterior fiind păstrate la temperatură de refrigerare, până la utilizare.

Mediul lichid utilizat a fost Middlebrook 7H9, suplimentat cu ADC și micobactină. Acest mediu conține săruri anorganice, care susțin creșterea micobacteriilor și se pretează pentru îmbogățirea culturilor, însă poate fi utilizat și pentru izolarea primară (Battaglioli ș.a., 2014). Citratul de sodiu din componența sa furnizează ioni citrat în mediu, care păstrează cationi anorganici în soluție. Suplimentul de creștere Middlebrook ADC conține albumină bovină, dextroză și catalază. Dextroza reprezintă o sursă de energie, în timp ce albumina protejează micobacteriile de agenți toxici iar catalaza de acțiunea radicalilor toxici.

Pentru obținerea mediului, au fost efectuați următorii pași, conform protocolului din cadrul Laboratorului Național de Referință pentru Tuberculoza Bovină, ANSES-FR:

- se dizolvă 4.7 g de mediu Middlebrook 7H9 liofilizat (Middlebrook 7H9 Broth Base, SIGMA-ALDRICH) în 900 ml de apă ultrapură;
- se adaugă 0.6 ml de Tween 80 (TWEEN® 80 SIGMA-ALDRICH detergent non-ionic utilizat ca agent de emulsifiere);

- se prepară soluția de micobactină J (ID.VET, Montpellier, France) pentru utilizare, cu 4 ml de etanol absolut și se asigură o dizolvare completă a produsului, care se adaugă mediului anterior preparat;
- se asigură un amestec omogen de soluție alcoolică de micobactină și mediu;
- mediul astfel obținut se va steriliza, 15 minute la 121°C;
- se alicotează întreaga cantitate în flacoane de 180ml și 360 ml. Astfel preparat, mediul este stabil pentru un an, la temperatură de refrigerare;
- adaosul de supliment ADC (Middlebrook ADC Growth Supplement SIGMA-ALDRICH) se realizează ulterior, câte 20 ml la fiecare 180 ml de mediu;
- se distribuie în eprubete câte 9 ml din mediul astfel preparat.

La izolarea primară din materiale patologice nesterile este obligatorie realizarea unei etape de decontaminare, pentru eliminarea eventualilor contaminanți bacterieni, a căror multiplicare pe mediu ar împiedica izolarea micobacteriilor. Au fost utilizate metoda cu hidroxid de sodiu (NaOH) și centrifugare și metoda cu HPC (clorură de hexadecilpiridiniu).

Metoda cu hidroxid de sodiu și centrifugare

- o cantitate de 15g de țesut a fost triturată cu ajutorul bilelor metalice și a micro-dismembratorului Sartorius;
- țesutul fin macerat a fost resuspendat în 40 ml apă ultrapură și apoi s-au alicotat 10 ml de soluție din supernatant;
- un volum egal de soluție de NaOH 4% cu indicator de pH (albastru de bromtimol) s-a adăugat peste soluția obținută în etapa anterioară și s-a menținut la temperatura camerei pentru 15 minute;
- neutralizarea produsului a fost realizată cu HCl 8%, până la obținerea unei soluții cu pH neutru (se măsoară cu hârtie indicator de pH);
- s-a completat cu apă ultrapură, până la capacitatea recipientului;
- s-a centrifugat pentru 15 minute la 3000 rpm și s-a decantat supernatantul;
- sedimentul obținut a fost resuspendat în 2 ml de apă distilată sterilă (sau de supernatant reținut din etapa anterioară);
- o cantitate de 0,2 ml din produsul decontaminat a fost însămânțată pe mediul de cultură.

În cazul în care cantitatea de țesut disponibilă investigației nu era suficientă, au fost strivite și omogenizate 5g de țesut și resuspendate în 13 ml de apă ultrapură, ulterior decontaminarea fiind continuată după etapele descrise mai sus.

Metoda de decontaminare cu HPC

- cu ajutorul unui bisturiu, au fost mărunțite 2g din țesutul de prelucrat;
- probele au fost omogenizate (un minut) în câte 25 ml de soluție HPC de concentrație 0,75% și apoi menținute la temperatura camerei, până se decantează porțiunile mari și dispare spuma;
- omogenatul de țesut obținut a fost transferat într-un tub tip Falcon de 50 ml și menținut timp de 30 de minute;

- ulterior, au fost recoltați 10 ml din suspensie și transferați într-un recipient cu volum de 30 ml, pentru o incubare la 37°C, timp de 3 ore;
- s-a centrifugat suspensia obținută, 30 de minute la 2396 rpm;
- depozitul obținut a fost resuspendat într-o cantitate de 1 ml soluție de antibiotice cu amfotericină B și acid nalidixic, reconstituită anterior conform specificațiilor producătorului (MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit, bioMérieux, Franța), pentru eliminarea eventualelor contaminanți indezirabili;
- s-a lăsat la incubat la 37°C, peste noapte, produsul astfel obținut fiind optim pentru inocularea mediului lichid.

Decontaminarea probelor de fecale a urmărit protocolul descris în Manualul terestru (Terrestrial Manual - B). S-a realizat o etapă de hidratare (1g fecale, 20ml apă distilată) pentru 24 de ore, urmată de agitare și decantarea fragmentelor grosiere. O cantitate de 5 ml din supernatantul obținut a fost decontaminat în 20 ml soluție de HPC de concentrație 0,75%, peste noapte. Materialul decontaminat a fost centrifugat (3000 rpm, 20 minute) iar depozitul obținut a fost resuspendat într-un ml de apă distilată sterilă și folosit pentru însămânțarea mediului LJ cu micobacterină.

După însămânțare, tuburile cu mediu Löwenstein Jensen au fost incubate la 37°C, în poziție oblică și cu capacele întredeschise, pentru o perioadă de 24-48 ore. Apoi, capacele au fost închise și tuburile menținute în poziție verticală, la aceeași temperatură, pe întreaga perioadă de incubare. Verificarea s-a realizat săptămânal. Mediile lichide însămânțate au fost menținute în poziție verticală timp de minim două săptămâni, până a fost observată pozitivarea culturilor.

5.1.5. Identificarea moleculară a micobacteriilor nontuberculoase din probele de origine animală, utilizând tehnica Taqman PCR în timp real

Identificarea tradițională a micobacteriilor pe baza evaluării caracteristicilor fenotipice și biochimice poate dura câteva săptămâni și nu reușește mereu să ofere o identificare precisă. Utilizarea reacției de polimerizare în lanț - PCR (Polymerase Chain Reaction) de către microbiologi a permis dezvoltarea de noi abordări pentru studierea genomului bacterian și pentru detectarea și identificarea microorganismelor din diferite ecosisteme, probe clinice și studii filogenetice. Comparativ cu metodele clasice, consumatoare de timp, tehnicile bazate pe PCR permit identificarea microorganismelor fără minusurile asociate cu capacitatea slabă a micobacteriilor de a crește *in vitro*.

Creșterea numărului de secvențe micobacteriene din bazele de date publice (NCBI) și aplicarea instrumentelor de bioinformatică au facilitat descoperirea unor loci ADN specifici, adecvați pentru detectarea prin PCR (Slany și Pavlik, 2012).

Secvențierea poate fi considerată "standardul de aur" pentru identificarea moleculară. Identificarea elementelor specifice în cadrul regiunilor variabile ale unor gene conservate, cum ar fi gena 16SADNr sau gena hsp65, a dus la dezvoltarea de protocoale PCR folosind primeri specifici genului, urmată de secvențierea directă a ampliconilor

obținuți (van Ingen, 2017). Mai pot fi utilizate și gena *rpoB* care codifică subunitatea β a ARN polimerazei sau secvența 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer).

Utilizarea 16S ARNr asigură o identificare fiabilă și rapidă a micobacteriilor. Frecvent utilizată, gena a adus contribuții semnificative la descoperirea de specii noi, încadrate în acest gen (Biet și Boschirol, 2014). Gena *RpoB* și-a dovedit utilitatea pentru identificarea izolatelor de origine animală care aparțin în mare parte complexului CMA (Higgins et al., 2011). O utilizare combinată a acestor două elemente crește capacitatea de diferențiere.

Identificate în 1990, secvențele de inserție sunt ținte genetice utile pentru detectarea micobacteriilor, ele fiind de asemenea folosite în metode de tipizare (IS1245 - RFLP, IS900 - RFLP). În România, nu sunt realizate studii extensive cu privire la diversitatea infecțiilor cu germeni ce aparțin genului *Mycobacterium* la animale. Savuța G. descrie pentru prima dată utilizarea PCR pentru identificarea a trei izolate de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Savuța, 2000). Bostănuș A. identifică *M. avium* subsp. *avium* cu ajutorul elementelor de inserție IS1245 și IS901 (Bostănuș, 2014). Aceleași elemente au fost utilizate și de Macovei I. în cercetări efectuate pe izolate de la păsări, alături de elementul IS900 pentru izolate de la rumegătoare, în scopul confirmării infecției cu *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Macovei, 2014), toate aceste studii utilizând tehnica PCR clasic.

Cercetările noastre au fost efectuate în cadrul laboratoarelor de bacteriologie și biologie moleculară ale FMV Iași și în laboratorul cu nivel de biosecuritate 3 (BSL3) și în cel de biologie moleculară din cadrul Unității de Zoonoze Bacteriene, ANSES-FR.

5.1.5.1. Extracția acidului nucleic (ADN)

În scopul identificării moleculare a coloniilor de micobacterii nontuberculoase, dar și a micobacteriilor din probele de țesut care nu au oferit un răspuns optim la cultivare, a fost realizată extracția ADN-ului micobacterian prin mai multe metode:

1. Extracția prin șoc termic
2. Extracția cu ajutorul kiturilor comerciale NucleoSpin® Tissue (Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Germania) și High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Germania) direct din țesut.

1. *Extracția prin șoc termic* a fost folosită atât în cazul culturilor bogate obținute pe mediul solid Löwenstein Jensen cât și în cazul culturilor obținute pe mediul de îmbogățire Middlebrook 7H9. Inactivarea suspensiilor prin încălzire pe baie de apă este rapidă și eficientă, însă produsul de extracție obținut nu este la fel de pur ca în cazul extracției cu ajutorul kiturilor comerciale.

Cultivarea pe mediul de îmbogățire a fost realizată utilizând una sau mai multe colonii izolate de pe mediul solid care au fost inoculate într-un tub de mediu Middlebrook 7H9 și sunt incubate la 37°C, în medie 1 până la 2 săptămâni. De îndată ce cultura pe mediu lichid este suficient de bogată, se verifică prin examen bacterioscopic. Extracția a fost realizată conform protocolului utilizat în cadrul Laboratorului Național de Referință pentru Tuberculoza Bovină din cadrul ANSES- FR, fiind respectate următoarele etape:

- tuburile de Middlebrook 7H9 au fost incubate pe baie de apă, la 80°C timp de o oră;

- suspensiile obținute au fost agitate și stocate în tuburi Falcon de 15 ml;
 - spălarea și liza parțială a suspensiilor a fost precedată de centrifugarea probelor, timp de 15 min, la 4600 rpm;
 - depozitul obținut a fost resuspendat prin aspirație/refulare într-un ml de NaCl (150 mM) iar apoi transferat într-un tub Eppendorf de 1,5 ml;
 - centrifugare - cel puțin 5 minute la 13000 rpm;
 - se resuspendă depozitul în 120 μ l Tris EDTA (pH8).
- ADN-ul a fost menținut la -20 °C, până la testarea moleculară.

2. *Extracția* ADN-ului micobacterian din țesuturi a fost realizată *cu ajutorul kiturilor comerciale* Genomic DNA from Tissue Nucleospin (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) și High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Systems, Inc.; referință: 11796828001). Procedura a urmărit aceleași etape generale, conform metodologiilor descrise de producători și conform protocolului elaborat în cadrul ANSES-FR, redactat de Henault Sylvie și aprobat de Boschiroli Maria-Laura.

Etapile premergătoare extracției propriu-zise implică prepararea reactivilor și triturarea țesuturilor. Au fost reconstituite soluțiile de lucru de Proteinază K și tampon de legare (B5). Astfel, soluția de tampon B5 se poate păstra la temperatura camerei (18-25°C) pentru cel puțin un an iar cea de proteinază K este stabilă la -20°C pentru cel puțin 6 luni.

În cazul kitului Roche, o cantitate de aproximativ 5 g de țesut a fost triturată în tuburile speciale, cu bile metalice ale IKA ULTRA TURRAX Tube Drive Control (1 minut/6000rpm). Țesuturile au fost depuse alături de tampon fosfat salin (PBS) și triturate grosier pentru ca mai apoi, din supernatantul obținut, să fie alicotată o cantitate de 1,8 ml în două tuburi Eppendorf (2ml). Acestea au fost centrifugate timp de 5 minute la 13500rpm. S-a resuspendat depozitul într-un ml TE și apoi s-a realizat o nouă centrifugare, timp de două minute la 13500rpm. Se recomandă repetarea acestei etape.

Depozitul s-a resuspendat în 600 μ l tampon TE și a fost transferat în tuburile pentru ribolizaj, pentru destrucția structurilor celulare cu ajutorul aparatului Precellys FastPrep 24, versiunea 3.0. (MP Biomedicals), timp de 15 secunde (X3, cu pauze de 15 secunde) la 6000rpm. Această etapă se poate repeta dacă se mai observă prezența unor detritusuri celulare. La 200 μ l din *ribolizatul* obținut pentru fiecare probă s-au adăugat 200 μ l Proteinază K și 40 μ l tampon de liză și probele au fost lăsate peste noapte la incubat, pe baie de apă, la 56°C.

După ce s-a adăugat tamponul de legare BB (200 μ l) probele au fost menținute pentru 10 minute la 70°C, pe baia de apă. Pentru precipitarea ADN-ului s-a folosit alcool isopropilic (100 μ l). Proba a fost transferată în coloane și centrifugată timp de 1 min la 9300 rpm iar lichidul din tubul colector a fost eliminat. Pentru eliminarea inhibitorilor s-a utilizat tamponul IB și proba a fost din nou centrifugată la 9300rpm, un minut. Membrana de siliciu a fost spălată în două etape, cu câte 500 μ l tampon de spălare și câte o centrifugare conform parametrilor anterior menționați. S-a realizat o centrifugare rapidă (10 secunde), la viteză mare (aproximativ 13200 rpm), pentru uscarea membranei.

Pentru eluție, coloanele au fost transferate în tuburi Eppendorf de 1.5ml, a fost adăugată o cantitate de 200 μ l tampon de eluție în fiecare coloană iar acestea au fost centrifugate timp de 1 minut la 9300 rpm.

Pentru validarea extracțiilor efectuate a fost utilizat martorul de control intern (IPC LSI), câte 5 μ l, care se adaugă, alături de Proteinaza K și de tamponul de liză, atât probelor cât și martorilor pozitivi și negativi utilizați. Astfel, acesta trebuie detectat în fiecare probă și la același număr de cicluri. Acest martor reprezintă un mijloc de control și verificare a procedurii efectuate. În cadrul fiecărui experiment s-a utilizat câte un martor pozitiv și doi negativi:

- T+SE = supernatant de țesut negativ și extract martor, suspensie de *M. bovis* (11Z119 SBr 1,53 10^3) 3,06x10³ bact/ml, valoare de CT așteptată: 33-35;
- T-SE = supernatant omogenat țesut negativ;
- T-NE = proteinaza K, tampon de liză și controlul intern al extracției IPC Diogenode.

5.1.5.2. Identificarea MNT prin tehnica TaqMan PCR în timp real

În scopul identificării probelor, a fost folosită tehnica TaqMan PCR în timp real, utilizând reactivii și protocolul de lucru prezentat în tabelele 5.6, 5.7 și 5.9. Secvențele specifice primerilor și sondelor sunt detaliate în tabelul 5.8. Reacția s-a desfășurat într-un volum total de 15 μ l, 13 μ l amestec reacțional și 2 μ l ADN de testat pentru extractele obținute prin șoc termic și de 25 μ l pentru extractele ADN din țesuturi (5 μ l extract și 20 μ l Master mix). Evaluarea probelor prin această metodă s-a realizat conform protoalelor de lucru din cadrul Laboratorului de Referință pentru Tuberculoza Bovină, ANSES, Maisons-Alfort, Franța.

Tabelul 5.6/Table 5.6
Componența amestecului de reacție pentru TaqMan PCR în timp real

TaqMan real time PCR Master mix		
Reactivi	Cantitate/ reacție (extracte din cultură)	Cantitate/ reacție (extracte din țesut)
Apă ultrapură	4 μ l	5 μ l
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix 2X	7,5 μ l	12,5 μ l
Primer Forward 3 μ M	1,5 μ l	2,5 μ l
Primer Reverse 3 μ M		
Sondă 2,5 μ M		
Volum total	13 μ l	20 μ l

Fiecare probă a fost testată într-o etapă inițială pentru evaluarea prezenței unei specii de micobacterii, cu o țintă generală și apoi pentru țintele specifice speciilor de MNT în parte, utilizând termociclorul Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. În urma răspunsului pentru ținta generală, au fost selectate extractele cu valoarea CT cea mai mică pentru fiecare probă testată.

TaqMan® Fast Advanced Master Mix a fost proiectat pentru a se potrivi sau depăși performanța amestecurilor standard, oferind timpi de rulare mai scurți (<40 minute),

sensibilitate superioară, precizie, interval dinamic și specificitate în comparație cu amestecurile standard. Amestecul conferă o stabilitate ridicată la temperatura camerei timp de până la 72 de ore. TaqMan® Fast Advanced Master Mix conține ADN polimerază rapidă AmpliTaq®, uracil-N glicozilază (UNG), dNTP cu dUTP, colorant ROX™ (referință pasivă) și componente tampon optimizate. Se livrează la o concentrație inițială de 2X.

Tabelul 5.7/Table 5.7

Programul de amplificare utilizat
PCR amplification protocol

Etapă	Temperatură	Durată	Număr de cicluri
Denaturare inițială	50°C	2 minute	1
	95°C	20 secunde	1
Amplificare	95°C	3 secunde	45 cicluri
	60°C	30 secunde	

Rezultatele amplificării prin PCR în timp real se obțin la încheierea programului de amplificare, după ce se realizează poziționarea pragului limită de detecție și se observă curbele de amplificare atât în modul logaritmice cât și în cel liniar. Setarea pragului duce la calcularea automată a valorilor Ct (cycle threshold - ciclul prag).

Tabelul 5.8/Table 5.8

Secvențele primerilor și sondelor utilizate
Primers and probes

Secvența țintă	Primeri și sonde	Secvențele nucleotidice 5'-3'
Hsp65 (Msp)	Msp F	GCC AAG GAG GTC GAG ACC AA
	Msp R	CTC CTC GAC GGT GAT GAC
	Msp P	(FAM)-ACC TTG TCC ATC GCC TCG GCG AT-(BHQ1)
IS6110	IS6110 F	GGT AGC AGA CCT CAC CTA TGT GT
	IS6110 R	AGG CGT CGG TGA CAA AGG
	IS6110 P	(FAM)-CAC GTA GGC GAA CCC-(MGB-NFQ)
IS1081	IS1081 F	CCG CCA CCG TGA TTT CGA
	IS1081 R	GCC AGT CCG GGA AAT AGC T
	IS1081 P	(FAM)-CCG CAA CCA TCG ACG TC -(MGB-NFQ)
IS1245	IS1245 F	GCC GCC GAA ACG ATC TAC
	IS1245 R	TGA CCC GGT GCG CAG CTT
	IS1245 P	(FAM)-TCG CGT CCG CGC ACG CTG TCC A-(BHQ1)
IS901	IS901 F	GTG ATC AAG CAC CTT CGG AA
	IS901 R	GCT GCG AGT AGC TTG ATG AG
	IS901 P	HEX-AAC AAC ATC GAC ACG ATC GCC GAC AA-BHQ
IS900	TR IS900 F	ACC GCT AAT TGA GAG ATG CGA TT
	TR IS900 R	TGC CAC AAC CAC CTC CGT AA
	TR IS900 P	(FAM)-GTC GGC GTG GTC GTC TGC TGG GT-(BHQ1)

*F= primer sens, *R= primer antisens, *P=sondă

Tabelul 5.9/Table 5.9

Specie	Diferențierea CMA în baza țintelor utilizate MAC differentiation based on used targets					
	Msp (Hsp65)	IS6110	IS1081	IS1245	IS901	IS900
CMTB	+	++	++	-	-	-
<i>M. avium subsp. avium</i>	+	-	-	++	++	-
<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	+	-	-	-	-	++
<i>M. avium subsp. hominissuis</i>	+	-	-	++	-	-
<i>M. avium subsp. silvaticum</i>	+	-	-	++	++	-
<i>M. intracellulare</i>	+	-	-	-	-	-

Pentru testarea IPC - Controlul inhibiției și validarea extracțiilor, ADN-ul IPC Diogenode (concentrație finală 1X) a fost adăugat în fiecare probă de testat din placă (0.5 μl/probă). În amestecul reacțional a fost de asemenea adăugată o cantitate de 2,5 de amestec amorse și sondă, în scop determinativ. Pentru extractele realizate cu kitul Roche, IPC Diogenode a fost adăugat în prima etapă a extracției (câte 10 μl). Amplificările au fost realizate cu ajutorul termociclorului Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR Systems.

5.2. Rezultate și discuții

5.2.1. Rezultatele examinării morfofopatologice și histopatologice la păsări

Suspicionarea infecției cu *M. avium* la păsări s-a realizat în baza leziunilor observate la examenul histopatologic efectuat. Principalele localizări ale leziunilor au fost observate la nivelul ficatului, splinei, ovarelor și intestinului (Figurile 5.1, 5.2, 5.3, 5.4). S-a remarcat prezența nodulilor diseminați, cu precădere la nivelul ficatului și splinei, de culoare gri-gălbui și cu dimensiuni variate, de la 1-2 milimetri la peste 1cm. Organele afectate apar mărite în volum, hipertrofiate, cu un contur neregulat iar pe suprafața lor se observă granuloame proeminente, neuniforme. La nivel intestinal, nodulii sunt de asemenea proeminenți și pot fi palpați (Fig. 5.2).

Totodată, a fost remarcată friabilitatea organelor și aspectul cașectic al carcaselor, cu reducerea masei musculare, emaciare și evidențierea carenei sternale (Fig. 5.1). Secționarea nodulilor a fost realizată cu ușurință, mineralizarea fiind un proces rar întâlnit în tuberculoza aviara. Prezența leziunilor granulomatoase a putut fi evidențiată la toate păsările luate în studiu, cu precădere în ficat și splină.

Din punct de vedere microscopic, leziunile constau în granuloame cu o necroză centrală, fie coagulativă, fie cazeoasă și celule gigante multinucleate. Bacilii acido-alcoolorezistenți sunt numeroși în zona centrală sau necrotică a granuloamelor. Aspecte similare au fost semnalat și în literatura de specialitate consultată (Dhama ș.a., 2011, Kaboudi ș.a., 2017).



Figura 5.1 Diseminarea nodulilor tuberculoși în ficat, găină (original)

Figure 5.1 Dissemination of granuloma, chicken liver (original)



Figura 5.2 Leziune de tip tuberculos la nivelul duodenului, găină (original)

Figure 5.2 Nodule in duodenum ,chicken, (original)

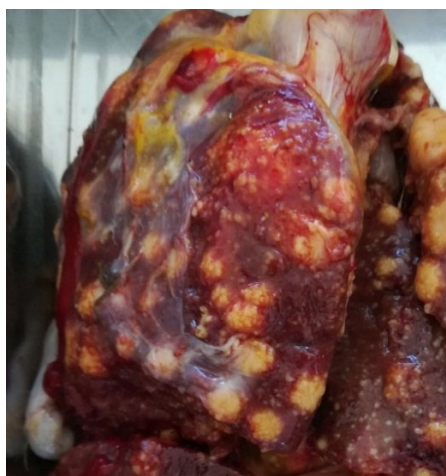


Figura 5.3 Ficat de găină cu leziuni de tip granulomatous (original)

Figure 5.3 Chicken liver with granulomatous lesions (original)



Figura 5.4 Splină de găină cu leziuni de tip granulomatous (original)

Figure 5.4 Chicken spleen with granulomatous lesions (original)

În afară de organele afectate observate în acest studiu, leziunile specifice tuberculozei aviare la păsările domestice sau sălbatice pot avea și alte localizări: la nivelul oaselor, pulmonilor, țesutului conjunctiv subcutanat și, mai rar, în sistemul nervos (Zhu ș.a., 2016). Aspecte macroscopice similare au fost evidențiate și în alte două studii anterioare, la găini provenite din aceeași regiune, gospodării din județul Iași (Bostănar , 2014; Macovei, 2014).

A fost evidențiată prezența granuloamelor în diferite organe ale cadavrelor de pasări examinate. Într-adevăr, ficatul, splina, intestinul și rinichii sunt principalele organe în care s-a remarcat prezența unor granuloame multiple, cu o zonă centrală de necroză, înconjurată

de macrofage, celule epitelioide și celule gigante, de tip Langhans (Fig. 5.5 - 5.10). Zona periferică, în cazul granuloamelor cu stadii avansate de dezvoltare, se constituie dintr-o cămașă de țesut conjunctiv și câteva limfocite.

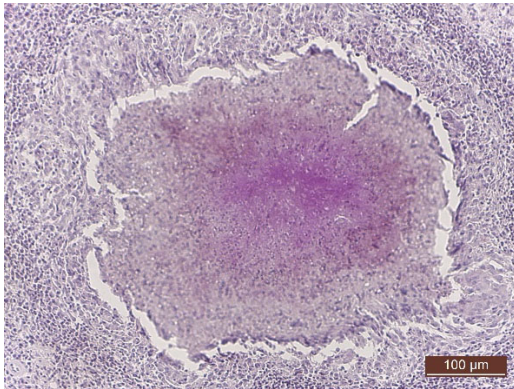


Figura 5.5 Granulom matur (tip 3) cu zonă de necroză centrală oxifilă, macrofage, celule epitelioide, limfocite și celule gigant prezente în apropierea zonei centrale, Ficat găină, colorație ZNM, 100x (original)

Figure 5.5 Mature granuloma, central oxiphilic necrotic area, macrophages, epithelioid cells, lymphocytes and giant cells near the central area, hen liver, MZN staining, 100x (original)

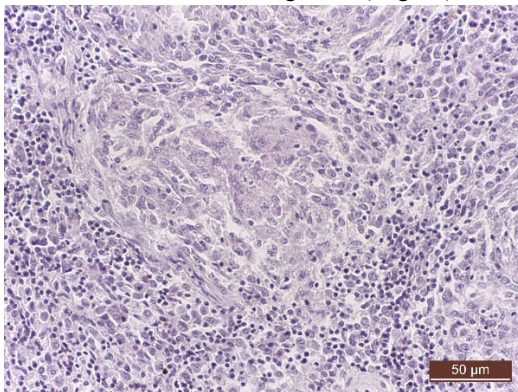


Figura 5.7 Granulom tânăr, BAAR prezenți în macrofage, zonă centrală difuză, Ficat găină, colorație ZNM, 400x (original)

Figure 5.7 Young granuloma, AFB present in epithelioid macrophages, central diffuse area, hen liver, MZN staining, 400x (original)

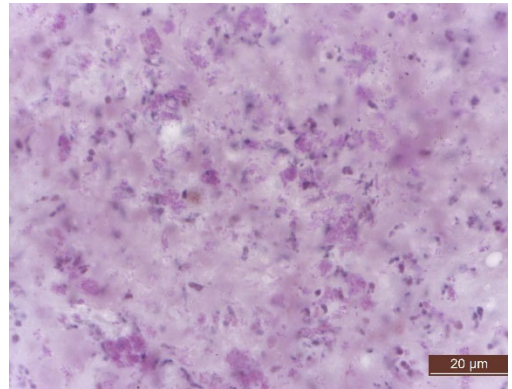


Figura 5.6 BAAR liberi, prezenți în zona centrală (detaliu), Ficat găină, colorație ZNM, 1000x (original)

Figure 5.6 AFB free in the central area (detail), hen liver, MZN staining, 1000x (original)

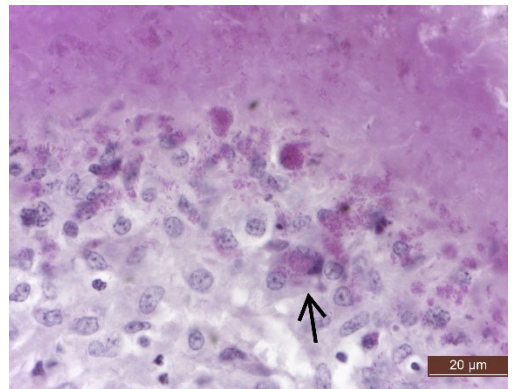


Figura 5.8 Detaliu – periferie, zonă de necroză, BAAR grupați, celule gigant (marcat), macrofage epitelioide, Ficat găină, colorație ZNM, 1000x (original)

Figure 5.8 Detail - the periphery of the central necrosis area, grouped AFB, giant cell (marked), epithelioid macrophages, hen liver, MZN staining, 1000x (original)

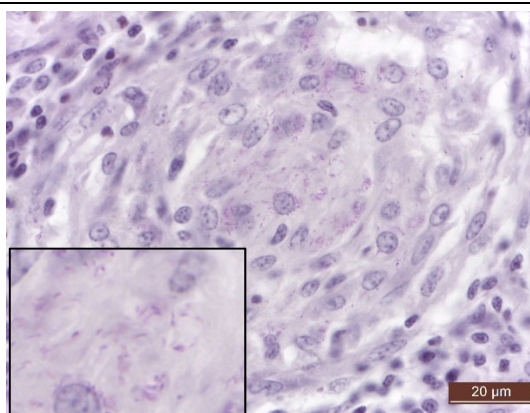


Figura 5.9 Granulom tânăr, în formare, BAAR prezenți (detaliu), celule epitelioid aplatizate, ficat găină, colorație ZNM, 1000x (original)

Figure 5.9 Young granuloma, AFB present (detail), flattened epithelioid macrophages, hen liver, MZN staining, 1000x (original)

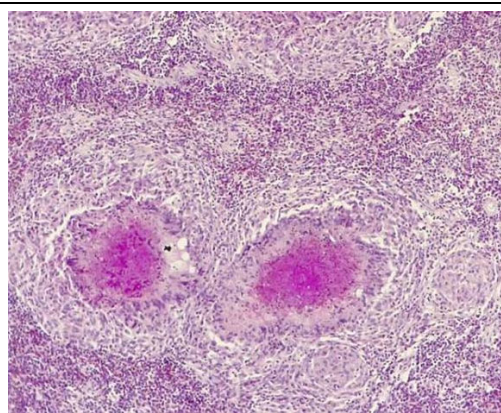


Figura 5.10 Granuloame multiple aflate în diferite stadii evolutive, Ficat găină, colorație ZNM, 100x (original)

Figure 5.10 Multiple granulomas in different evolution stages, hen liver, MZN staining, 100x (original)

5.2.2. Rezultatele diagnosticului bacteriologic la păsări

Frotiurile directe au fost realizate prin amprentare, ștergere sau strivire și colorate apoi prin metoda Ziehl Neelsen, pentru a putea evidenția prezența BAAR (Fig. 5.11 și 5.12). Pentru a evidenția prezența micobacteriilor, examenul bacterioscopic este util în evaluarea directă a anumitor probe clinice. Cu toate acestea, sensibilitatea metodei este scăzută și pot apărea răspunsuri fals-negative. Un astfel de răspuns este exclus în studiul prezent, frotiurile fiind efectuate direct din organele afectate. Se remarcă o abundență caracteristică a BAAR în câmpurile examinate.

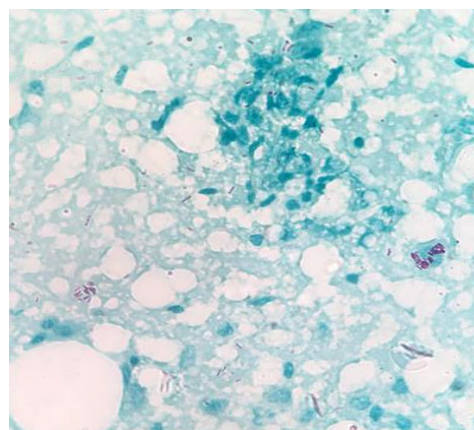


Figura 5.11 BAAR, Frotiu din ovar, găină, colorație ZN, 1000x (original)

Figure 5.11 AFB, chicken ovary, ZN staining, 1000x (original)

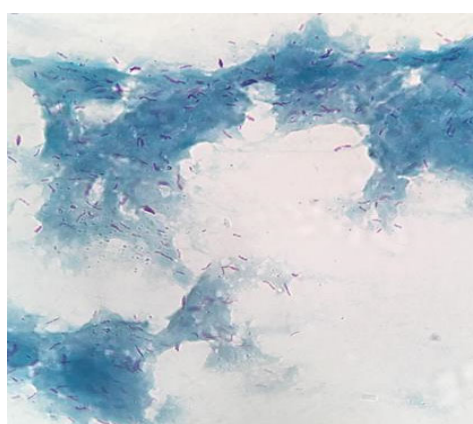


Figura 5.12 BAAR, Frotiu din splină, găină, colorație ZN, 1000x (original)

Figure 5.12 AFB, chicken spleen, ZN staining, 1000x (original)

Coloniile observate pe mediul solid au prezentat morfologia caracteristică speciei *M. avium* subsp. *avium*: culoare alb-gălbuie, aspect fin, miliar, neted, creștere în apropierea lichidului de condensare, treptat ocupând panta mediului (Figura 5. 13).

Slaba dezvoltare a coloniilor observată pe mediul solid LJ (Tabelul 5.10) ar putea fi explicată de faptul că metodele de decontaminare utilizate pentru cultivarea micobacteriilor pot avea efecte drastice asupra supraviețuirii MNT și a ratelor ulterioare de recuperare. Mediul lichid Middlebrook 7H9 este recomandat pentru utilizarea în procedurile de izolare și cultivare a speciilor din genul *Mycobacterium*. Acesta conține săruri anorganice, care contribuie la creșterea mult mai rapidă a micobacteriilor și prin urmare se poate realiza și izolarea primară. Printre constituenții ce favorizează dezvoltarea bacililor se pot enumera: glicerolul, albumina și dextroza, sulfatul de amoniu (sursă de nitrogen) sau catalaza.

Tabelul 5.10/Table 5.10
Rezultatele examenului bacteriologic pentru probele prelevate de la păsări
Results of the bacteriological examination for chicken samples

Nr. Crt.	Identificare	Tipul probei	LJ	Middlebrook 7H9
1	Găină 1	Ficat	+	+
2		Splină	—	—
3	Găină 2	Ficat	*	+
4		Splină	—	—
5	Găină 3	Ficat	*	+
6		Splină	—	—
7	Găină 4	Ficat	+	+
8		Splină	—	-
9	Găină 5	Ficat	+	+
10		Splină	+	+
11		Pulmon	—	—

(— = negativ, +=pozitiv, * creștere necaracteristică)

Pe mediile solide, pozitivarea unei culturi necesită mai mult timp (minim 8-12 săptămâni, în funcție de specie) dar acestea prezintă avantajul că sunt mai puțin costisitoare decât mediile lichide și permit recunoașterea morfologiei coloniilor.

Se remarcă absența contaminanților în tuburile de mediu însămânțate, deopotrivă în culturile pozitive cât și în cele negative, pe întreaga perioadă de incubație. Tuburile de mediu solid în care nu s-a observat creștere treptată au fost menținute la 37°C pentru o perioadă de două luni.

Prelungirea perioadei de incubație până la două luni duce la o modificare a aspectului coloniilor dar și a mediului. Astfel, coloniile capătă treptat un aspect rugos iar mediul, din culoarea verde-albăstruie, capătă o nuanță gălbuie, în urma utilizării nutrienților din componența sa.

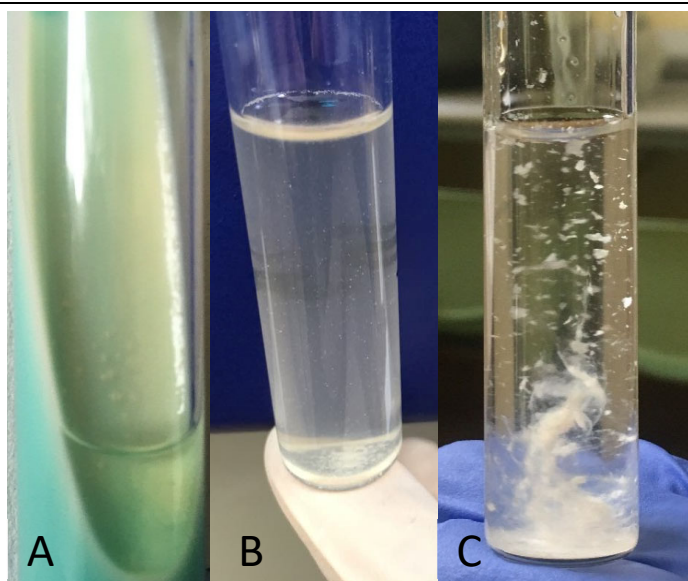


Figura 5.13 Aspectul cultural al coloniilor de *MAA*, A: pe mediul solid Löwenstein-Jensen (2 săptămâni), B, C: pe mediul lichid Middlebrook 7H9 (2 săptămâni) (original)

Figure 5.13 Cultural aspect of *MAA*, A: on solid Löwenstein-Jensen media (2 weeks), B,C: on liquid Middlebrook 7H9 media (2 weeks) (original)

Deshidratarea mediului nu a fost observată. Pe mediul lichid, creșterea coloniilor se realizează ca un depozit la nivelul suprafeței de contact a mediului cu tubul iar la agitare acesta se desprinde și apare ca o coloană de fum (Figura 5.13).

5.2.3. Rezultatele obținute în urma analizei probelor de la găini testate prin TaqMan PCR în timp real

Toate probele testate au putut fi identificate din punct de vedere molecular, fiind utilizate țintele *Hsp65* pentru identificarea micobacteriilor și *IS1245*, *IS901* pentru diferențierea în cadrul CMA a speciilor *M. avium* subsp. *avium* și *M. avium* subsp. *silvaticum*. Au fost incluse în acest studiu probe de extracte ADN din țesuturi și extracte obținute prin șoc termic și centrifugare a culturilor pe mediu lichid Middlebrook 7H9 (lizate). Valorile CT (pragul minim) sunt redată în tabelul 5.11.

Toate probele incluse în studiu au prezentat amplificare pentru țintele testate, cu excepția probelor I17-110 și I17-111, pentru care nu a fost obținut un răspuns la ținta *IS1245*. Pentru păsările de la care proveneau aceste probe au fost testate deopotrivă și extracte ADN direct din țesuturi, făcând astfel posibilă confirmarea moleculară a infecției cu specia *M. avium* subsp. *avium* pentru toate găinile investigate. Valorile CT tardive obținute pentru unele dintre probele testate se pot datora perioadei lungi de condiționare a acestora până la disponibilitatea testării moleculare.

Tabelul 5.11/Table 5.11

Rezultatele obținute la TaqMan PCR în timp real, pentru probele de la găini
CT values obtained for chicken samples

Cod	Specie	Tip probă	Hsp65	CT IS1245	CT IS901
I17-109	Găină 1	Lizat	22,48	23,24	21,23
I17-110	Găină 2	Lizat	34,4	Indet	38,73
I17-111	Găină 3	Lizat	39,3	indet	38,58
I17-112	Găină 4	Lizat	26,24	26,8	25,2
I17-113	Găină 5	Lizat	21,7	24,08	22,09
I17-117	Găină 1	Extract ADN ficat	38,53	37,04	36,8
I17-118	Găină 3	Extract ADN ficat	31,51	31,68	28,74
I17-119	Găină 2	Extract ADN ficat	38,59	37,94	36,28
I17-120	Găină 4	Extract ADN ficat	38,96	38,75	36,46
I17-121	Găină 6	Extract ADN splină	29,61	28,67	26,13
I17-122	Găină 6	Extract ADN ficat	32,66	32,04	30,23
I17-123	Găină 5	Extract ADN ficat	34,03	33,24	31,55
I17-124	Găină 5	Extract ADN pulmon	27,7	27,26	25,51
I17-136	Găină 7	Extract ADN splină	26,36	28,01	26,76
I17-137	Găină 7	Extract ADN intestin	24,36	25,69	23,55
I17-138	Găină 8	Extract ADN ficat	19,57	21,14	19,24

(indet= nedeterminat)

5.2.4. Rezultatele examinării morfopatologice și histopatologice a probelor de la rumegătoare

Examinarea leziunilor la rumegătoarele testate (două ovine, trei bovine și un cerb) nu a evidențiat prezența leziunilor macroscopice specifice paratuberculozei. Pentru examinarea histopatologică și bacteriologică, dar și pentru cea moleculară, au fost recoltate porțiuni de interes din organe (limfonoduri mezenterice și regiuni de intestin și ficat). Pe lângă acestea, de la două bovine au mai fost analizate probe de pulmon și limfonoduri traheo-bronșice.

Leziuni granulomatoase caracteristice infecției tuberculoase au putut fi observate în probele de pulmon la o singură bovină (Fig. 5.14 și 5.15). Recoltarea probelor a fost realizată la abatorizare. A fost remarcată prezența granuloamelor în întreaga masă pulmonară analizată, acestea modificând conturul organului și proeminând pe suprafața acestuia. La secționare, țesutul prezenta rezistență și s-a putut evidenția prezența leziunilor inflamatorii granulomatoase, circumscrise, cu dimensiuni variabile, de aproximativ 2-20 mm în diametru (uneori până la 40-50 mm diametru), adesea încapsulate și cu necroză multifocală, confluentă și cu mineralizare (Fig. 5.16 și 5.17).



Figura 5.14 Leziuni granulomatoase în pulmon: granuloame multiple, Vacă (original)

Figure 5.14 Multiple granulomatous lesions in cow lung (original)

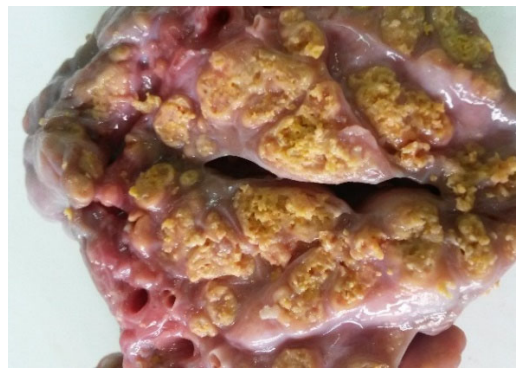


Figura 5.15 Leziuni granulomatoase în pulmon: granuloamele confluențe cu necroză cazoasă și mineralizare, Vacă (secțiune, original)

Figure 5.15 Granulomatous lesions in cow lung: confluent granulomatous lesions, mineralization and caseous necrosis and (section, original)

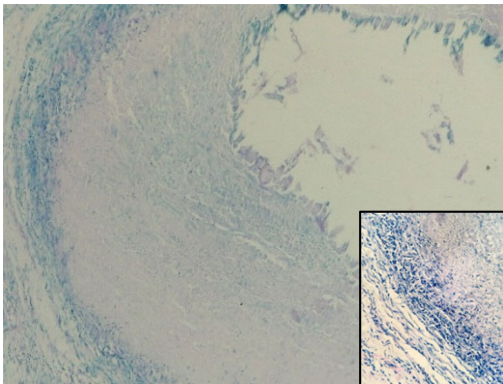


Figura 5.16 Secțiune pulmon de vacă, granulom tuberculos - organizare, zonă centrală de necroză și mineralizare, colorație ZN, 100x (detaliu ZN, 400x, original)

Figure 5.16 Granulomatous lesion - organization, central area of necrosis and mineralization, bovine lung, ZN staining, 100x (detail ZN, 400x, original)

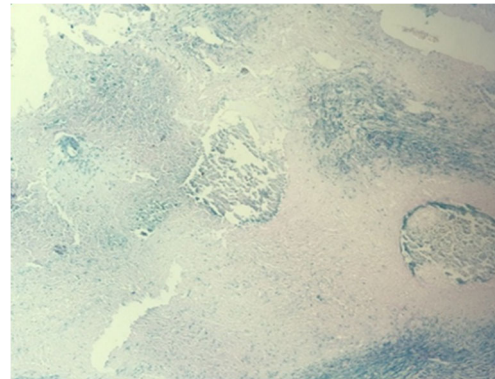


Figura 5.17 Leziuni multiple de tip granulomatos: necroză și mineralizare, pulmon vacă, colorație ZN, 100x (original)

Figure 5.17 Granulomatous lesion: central necrosis and mineralization, ZN staining, 100x (original)

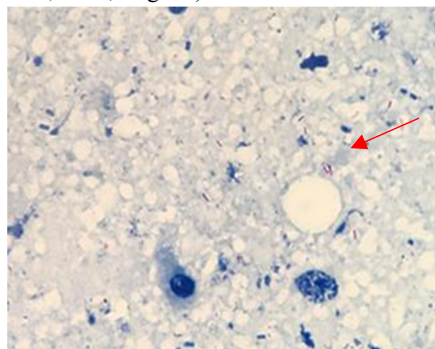


Figura 5.18 BAAR, Frotiu pulmon vacă, colorație ZN, 100x (original)

Figure 5.18 Acid fast bacilli, ZN staining, cow lung, 100x (original)

Extinderea procesului infecțios s-a realizat pe cale intracanaliculară, fiind afectate grupurile alveolare învecinate, cu ramificații comune ale căilor respiratorii. A fost observată și proliferarea țesutului fibros, care apare ca niște striatii albicioase intercalate între granuloame (Fig. 5.14 și 5.15), conferind astfel rezistență la secționare. La examinarea secțiunilor colorate ZN nu s-a putut evidenția prezența BAAR, aspect datorat caracterului paucibacilar al leziunilor în tuberculoza bovină.

Localizarea și aspectul leziunilor, cât și evidențierea prezenței BAAR la examenul bacterioscopic direct (Fig. 5.18), a condus în mod evident către suspiciunea tuberculozei bovine, aspectele legate de diagnosticul molecular și caracterizarea micobacteriei identificate fiind prezentate în capitolul 8.

Leziuni microscopice specifice infecției cu *M. avium* subsp. *paratuberculosis* au fost evidențiate în secțiunile histologice din intestin (ileon) și limfonoduri mezenterice de la o oaie. La nivelul limfonodurilor s-au observat atât granuloame mature, caracterizate prin prezența unei zone centrale de necroză și mineralizare, delimitată de un aflux celular de macrofage, limfocite și celule epitelioid, cât și granuloame în formare, cu aglomerare de macrofage, limfocite, plasmocite (fig. 5.19 - 5.21).

La nivel intestinal, s-a remarcat prezența unui infiltrat inflamator, cu macrofage și limfocite (fig. 5.22). Leziunile observate sunt paucibacilare. Colorația ZNM utilizată a permis evidențierea BAAR (fig.5.23 A și B). La bovine, progresia către leziunile multibacilare la nivel intestinal, în zona terminală a ileonului, apare în stadiile finale, leziunile fiind asociate cu eliminarea constantă a bacililor. Ovinele pot prezenta fenomene clinice necorelate cu abundența bacililor la nivel lezional (Perez ș.a., 1996). Evoluția leziunilor este etapizată: de la nivelul plăcilor Peyer și al regiunilor adiacente acestora se extind treptat către submucoasă. Diseminarea către alte țesuturi (extra-intestinale) este frecvent asociată cu leziunile intestinale de tip multibacilar (Perez ș.a., 1996).

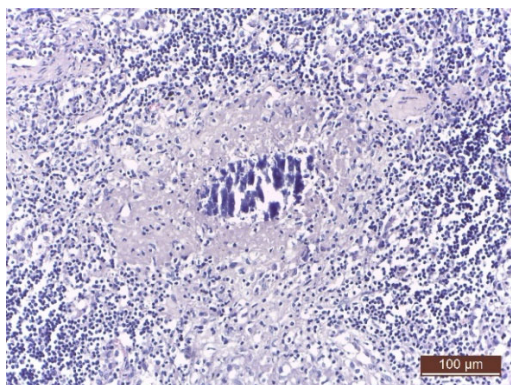


Figura 5.19 Granulom matur cu zonă centrală de necroză, calcificare, aflux periferic de macrofage, limfocite; Limfonod mezenteric, oaie, colorație HE, 100x (original)

Figure 5.19 Mature granuloma with central necrosis, calcification, peripheral influx of macrophages, lymphocytes, epithelioid cells; Mesenteric lymph node, sheep, HE staining, 100x (original)

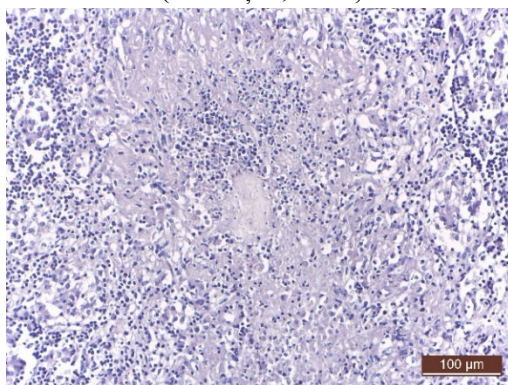


Figura 5.20 Granulom, zonă centrală cu detritus celular cazeos, împrejmuită de celule epitelioid, celule gigant și limfocite; Limfonod mezenteric, oaie, colorație HE, 100x (original)

Figure 5.20 Granuloma with central debris area and macrophage, epithelioid cells, lymphocytes in the surrounding region; Mesenteric lymph node, sheep, HE staining, 100x (original)

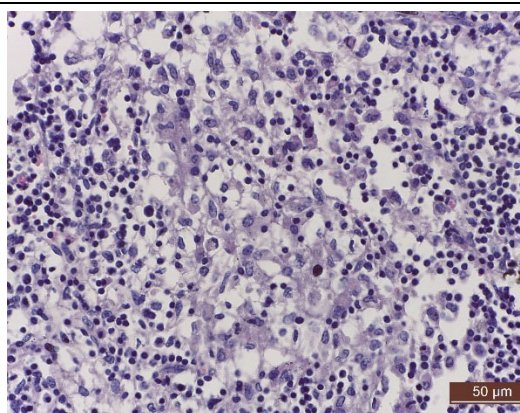


Figura 5.21 Pre-granulom, influx de macrofage, limfocite, plasmocite și celule epitelioid; Limfonod mezenteric, oaie, colorație HE, 400x (original)

Figure 5.21 Pregranuloma, macrophages, lymphocytes, plasmocytes and epithelioid cells, Mesenteric lymph node, sheep, HE staining, 400x (original)

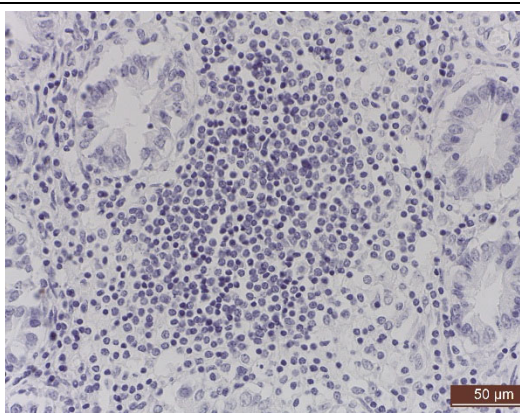


Figura 5.22 Infiltrat inflamator cu macrofage și limfocite la nivelul ileonului, Oaie, colorație HE, 400x (original)

Figure 5.22 Inflammatory infiltrate in ileum, with macrophages and lymphocytes, sheep, HE staining, 400x (original)

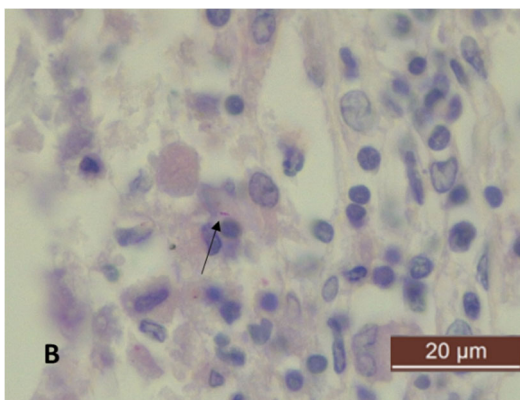
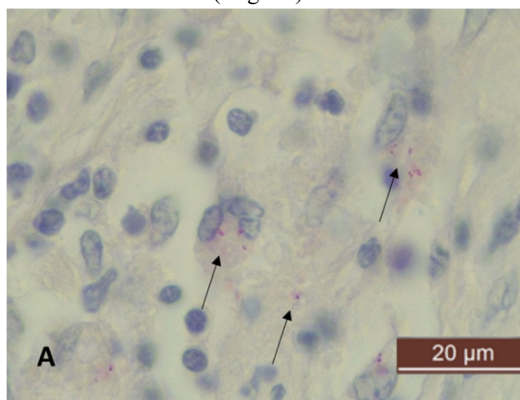


Figura 5.23 BAAR la nivel intracelular în limfonodurile mezenterice (A, B), oaie, colorație ZNM, 1000x (original)

Figure 5.23 Intracellular AFB in mesenteric lymph nodes (A, B), sheep, MZN staining, 1000x (original)

5.2.5. Rezultatele diagnosticului bacteriologic efectuat pe probele recoltate de la bovine, ovine și cerb

Metodele utilizate în stabilirea unui diagnostic în paratuberculoza rumegătoarelor se bazează, în linii mari, pe cultivarea micobacteriilor cu creștere lentă din probele clinice, precedată de decontaminare, pentru a distruge alte microorganisme cu creștere rapidă (bacterii și fungi). Se recomandă de asemenea prelungirea incubării în mediu adecvat, care conține agenți antimicrobieni pentru suprimarea contaminanților și apoi identificarea izolatelor prin metode fenotipice și genotipice.

Utilizarea mediilor lichide prezintă avantajul de a oferi rezultate într-un timp mult mai rapid, în comparație cu mediile solide, însă prezintă și dezavantaje, fiind necesară

confirmarea prezenței micobacteriei prin teste adiționale moleculare. Dezvoltarea altor microorganisme irelevante reduce capacitatea de detecție prin PCR a elementului IS900.

Tabelul 5.12/Table 5.12

Rezultatele examenului bacteriologic pentru probele recoltate de la rumegătoare
Culture results for ruminant samples tested

Nr. Crt.	Identificare	Tipul probei	LJ	Middlebrook 7H9
1	Vacă 1	Intestin	—	-
2		Limfonod mezenteric	—	—
3		Fecale	—	—
4	Vacă 2	Intestin	—	—
5		Limfonod mezenteric	—	—
6		Fecale	—	—
7	Vacă 5	Limfonod mezenteric	—	+
8		Jejun	*	*
9		Rect	*	*
10		Intestin-regiune ileo-cecală	—	+
11		Fecale	—	—
12	Oaie 1	Intestin	—	+
13		Limfonod mezenteric	—	+
14		Fecale	—	—
15	Oaie 2	Intestin	—	—
16		Limfonod mezenteric	—	—
17		Fecale	—	—
18	Cerb	Ficat	*	*
19		Splină	*	*
20		Intestin	—	+

(* neefectuat, - negativ, + pozitiv)

Examenul bacterioscopic din fecale și porțiuni din organele recoltate nu a putut evidenția prezența bacililor acido-alcool-rezistenți. În paratuberculoză, eliminarea bacililor se realizează în mod intermitent și astfel, un rezultat negativ în acest context, asociat cu lipsa unor leziuni vizibile macroscopic, nu semnifică un diagnostic negativ.

Creșterea lentă *in vitro* a speciei *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, uneori chiar lipsa creșterii, în special a sușelor de la ovine, face ca izolarea acestei micobacterii să se realizeze dificil, fiind necesară o perioadă lungă de timp, cuprinsă între 2 și 4 luni până la pozitivarea culturilor (Gao ș.a., 2009).

Evidențierea creșterii a putut fi realizată doar pe mediul lichid Middlebrook 7H9 cu micobactină și Supliment ADC, pentru probele recoltate de la o bovină, o ovină și pentru proba de intestin recoltată de la cerb (Tabelul 5.12). Investigații suplimentare, de ordin molecular, au fost necesare pentru confirmarea MAP.

5.2.6. Rezultatele obținute în urma analizei moleculare a probelor recoltate de la bovine, ovine și cerb prin TaqMan PCR în timp real

Secvența de inserție IS900 este una din cei 20 de membri ai familiei IS110 și este considerată a fi specifică pentru *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, deși secvențe asemănătoare IS900 au fost identificate rar și în genomul altor MNT (Englund ș.a., 2002). Acest element este considerat o țintă ideală pentru identificarea și discriminarea lui *M. avium* subsp. *paratuberculosis* față de alte subspecii ale lui *M. avium*. Eterogenitatea izolatelor în baza numărului de exemplare IS900 (14-20 copii) și a pozițiilor lor în cadrul genomului a fost exploatată în numeroase studii epidemiologice (Castellanos ș.a., 2009).

Au fost evaluate, prin TaqMan PCR în timp real, extracte ADN din probe de intestin și limfonoduri mezenterice de la trei bovine, două ovine și un cerb și două probe de lizate din culturile obținute pe mediul lichid Middlebrook 7H9. Testarea a urmărit prezența sau absența amplificării pentru elementele Hsp65, IS1245, IS901 și IS900, valorile CT obținute fiind prezentate în tabelul 5.13.

Tabelul 5.13/Table 5.13

Rezultatele obținute prin TaqMan PCR în timp real, pentru probele de la bovine, ovine și cerb
CT values obtained for bovine, ovine and deer samples

Cod	Specie	Tipul probei	Hsp65	IS1245	IS901	IS900
I17-115	Cerb	lizat	36,82	38,09	indet	indet
I17-130	Cerb 1	Extract ADN intestin	37,49	36,76	35,94	indet
I17-116	Oaie 1	lizat	38,49	indet	indet	indet
I17-135	Oaie 1	Extract ADN intestin	32	indet	indet	27,38
I17-133	Oaie 2	Extract ADN limfonod	37,39	indet	38,3	indet
I17-134	Oaie 2	Extract ADN intestin	37,53	indet	38,8	indet
I17-128	Vacă 2	Extract ADN intestin	37,92	37,61	38,9	indet
I17-129	Vacă 2	Extract ADN limfonod	indet	-	-	-
I17-139	Vacă 5	Extract ADN Limfonod	41,77	indet	-	40,96
I17-140	Vacă 5	Extract ADN jejun	34,31	indet	-	34,48
I17-141	Vacă 5	Extract ADN rect	33,19	indet	-	36,04
I17-142	Vacă 5	Extract ADN intestin- regiune ileo-cecală	30,33	indet	-	27,21

(indet = nedeterminat, - = neefectuat)

IS1245 este un element de 1.313pb, delimitat de două repetiții inversate imperfecte, cu un cadru deschis de citire. El codifică o transpozază putativă, cu similitudine a secvenței de aminoacizi de 64% cu IS1081, un element de inserție prezent la membrii CMTB (Guerrero ș.a., 1995). În urma coroborării rezultatelor obținute pentru diversele probe testate de la fiecare animal, prezența lui *M. avium* subsp. *paratuberculosis* a putut fi confirmată din

punct de vedere molecular la o ovină (oaie 1: CT IS900 = 27,38) și la o bovină (vacă 5: CT IS900 = 27,21). Pentru probele de la cerb și cele de la vaca 2, a fost dovedită prezența unei micobacterii din complexul CMA (IS1245 +, IS901+).

5.2.7. Rezultatele examinării bacterioscopice a probelor recoltate de la câine

Afecțiunile cutanate determinate de micobacterii sunt rar întâlnite la animalele de companie și, în general, pot fi încadrate în patru categorii: infecții cutanate determinate de micobacterii atipice, granulomul leproid canin, lepră felină și tuberculoză cutanată (Conceição ș.a., 2011). Granulomul leproid canin (CLG), cunoscut și sub denumirea de *lepră canină*, se caracterizează prin prezența unor leziuni nodulare la nivelul pielii și țesuturilor subcutanate. Agentul etiologic este o micobacterie apropiată din punct de vedere genetic de *M. simiae*, care a fost parțial secvențializată în 2000.

Câinii afectați nu prezintă alte semne clinice iar în majoritatea cazurilor leziunile tind să se vindece spontan, după o perioadă de câteva săptămâni până la câteva luni (Malik ș.a., 1998). Primele cazuri au fost raportate în Africa (Zimbabwe) în 1973. Ulterior, au mai fost semnalate cazuri în Australia, Noua Zeelandă, Brazilia sau Statele Unite ale Americii (Malik ș.a., 1998, Conceição ș.a., 2011, Smits ș.a., 2012) dar și în Europa (Dedola ș.a., 2014).

În studiul nostru au fost observate leziuni nodulare la nivel cutanat și subcutanat, în regiunea capului, gâtului, abdomenului și pe membre la doi câini, femelă și mascul, din rasa Brac german. În cazul femelei, leziunile au fost observate în regiunea capului, pe membre și ventral, la nivel abdominal, având aspect nodular, ne-ulcerativ și depilate, de dimensiuni aproximative de 1-2 cm (Figurile 5.24, 5.25, și 5.27). Acestea erau dure la palpate. La mascul, a fost observată o singură leziune, în regiunea capului, cu aspect ulcerativ, depilată (Figura 5.26). Spre deosebire de alte cazuri semnalate în literatura de specialitate (Conceição ș.a., 2011, Dedola ș.a., 2014), în acest studiu nu au fost remarcate leziuni la nivelul urechilor.



Figura 5.24 Nodul subcutanat la câine, regiunea cervicală (original)

Figure 5.24 Nodule in the skin and subcutis, dog, cervical region (original)

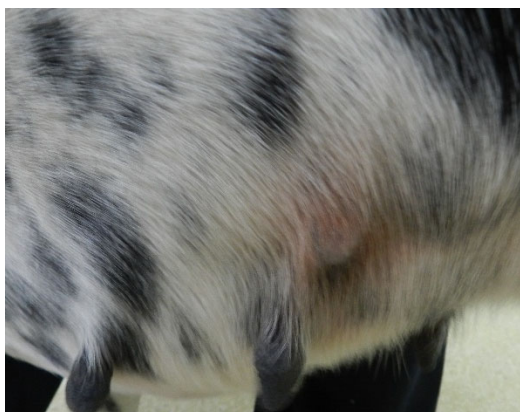


Figura 5.25 Nodul subcutanat la câine, regiunea abdominală ventrală (original)

Figure 5.25 Nodule in the skin and subcutis, dog, ventral abdominal region (original)

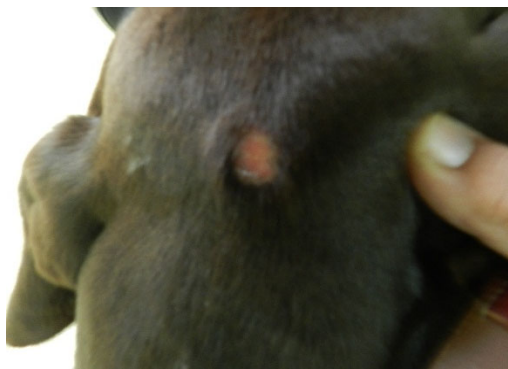


Figura 5.26 Leziune cutanată ulcerativă, câine, regiunea cefalică (original)

Figure 5.26 Ulcerated skin lesion, dog, cephalic region (original)



Figura 5.27 Regiuni depilate localizate la nivelul membrelor la câine (original)

Figure 5.27 Skin lesions with depilation on the limbs (original)

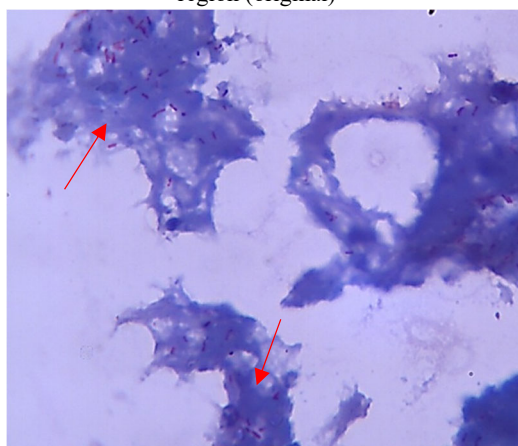


Figura 5.28 BAAR, conținut nodul subcutanat, Câine 1, colorație ZN, 1000x (original)

Figure 5.28 Acid fast bacilli in needle aspirate from nodule, Dog 1, ZN staining, 1000x (original)

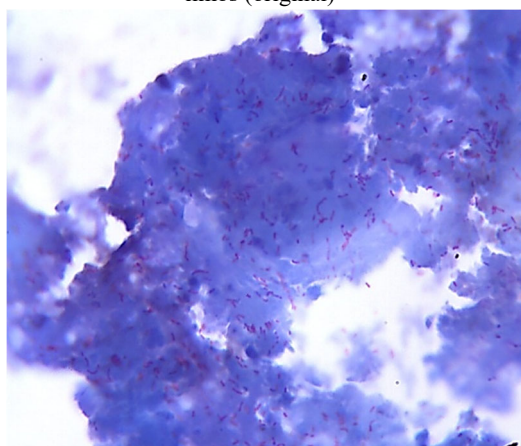


Figura 5.29 BAAR, conținut nodul subcutanat, Câine 1, colorație ZN, 1000x (original)

Figure 5.29 Acid fast bacilli in needle aspirate from nodule, Dog 2, ZN staining, 1000x (original)

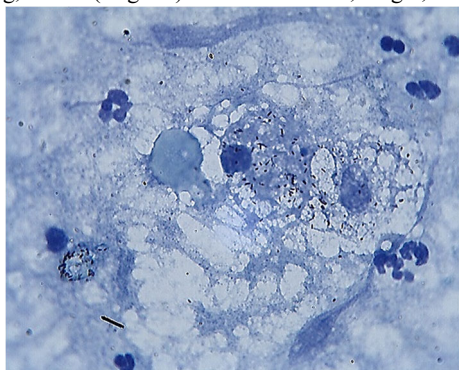


Figura 5.30 BAAR, neutrofile prezente, conținut nodul subcutanat, câine 1, colorație ZN, 1000x (original)

Figure 5.30 Acid fast bacilli, neutrophils in needle aspirate from nodule, Dog 1, ZN staining, 1000x (original)

Au fost recoltate probe din conținutul nodulilor din regiunea capului și gâtului de la ambii câini iar examenul bacterioscopic a reliefat prezența BAAR în frotiurile realizate din aspirat (Fig. 5.28 - 5.30)

În cazurile evaluate nu a fost instituit un tratament medicamentos sau chirurgical. Cantitatea redusă de conținut nodular ce a putut fi recoltată nu a permis însă cultivarea bacteriologică. Valorile CT obținute pentru ținta generală de identificare a micobacteriilor Hsp65 au fost tardive (CT = 34,8), nefiind astfel posibilă încadrarea la nivel de specie.

Investigațiile realizate au putut evidenția implicarea micobacteriană, fără însă a putea stabili cu certitudine diagnosticul de granulom leproid canin. Nu poate fi exclusă o micobacterioză cutanată atipică, având în vedere faptul că cei doi câini erau utilizați la vânătoare și existând astfel posibilitatea unor inoculări accidentale cu micobacterii din mediu, prin înțepare.

5.3. Discuții generale

Tuberculoza aviară a fost diagnosticată la toate păsările examinate. Cahexia, diareea cronică și leziunile observate la examinarea morfopatologică au condus la suspiciunea acestei infecții. Examenul histopatologic a evidențiat prezența leziunilor de tip granulomatos și a BAAR în diferite organe afectate. Persistența tuberculozei în efectivele de păsări de curte este favorizată de lipsa măsurilor de biosecuritate și de introducerea în efective a păsărilor cu origine și cu status sanitar necunoscute.

Cinci dintre păsările examinate au provenit din gospodării de pe raza comunelor Tomești și Bârnova, județul Iași. În cercetările efectuate de Macovei I. au fost evaluate și găini din Vișani (Macovei, 2014), în această zonă fiind des întâlnită creșterea păsărilor în sistem gospodăresc. Evoluția extinsă a bolii, durata de viață mult mai mare a păsărilor de curte comparativ cu cele crescute în sistem intensiv și schimbul de păsări între gospodării, introducerea de efective noi în aceleași spații de creștere ar putea constitui factori implicați în menținerea infecției în acest areal.

Tulpinile CMA care pot induce tuberculoza generalizată la păsări sunt considerate de importanță majoră în domeniul epidemiologiei veterinare. Răspunsul pozitiv pentru IS901 este asociat cu tulpini virulente pentru păsări, serotipurile 1, 2 și 3 (Pavlik ș.a., 2000 A). Toate probele testate pentru păsările de curte au fost pozitive pentru IS901.

Tehnica TaqManPCR în timp real este un instrument de diagnosticare cu eficiență și sensibilitate ridicate. Cu toate acestea, calitatea slabă a ADN-ului poate determina apariția unor răspunsuri false (Agdestein ș.a., 2011). Elementul IS1245 este considerat o țintă de încredere pentru identificarea lui *M. avium* și este, de asemenea, utilizat în mod obișnuit pentru genotiparea RFLP (polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție). Pentru două dintre lizatele de la găinile testate (Găină 2 și 3) s-a observat un răspuns IS1245 negativ și IS901 pozitiv. Rezultatele contradictorii pentru *M. avium*, IS1245 negative, au fost raportate anterior, atât pentru izolate de la oameni cât și de la animale (Beggs ș.a., 2000; Higgins ș.a., 2011). Două sușe belgiene izolate de la oameni, identificate ca *M. avium* subsp. *hominissuis*, au fost IS1245 și IS901 + iar analiza ulterioară a arătat că răspunsul pozitiv IS901 se

datorează prezenței ISMav6 (Vluggen ș.a., 2016). O identitate de 96% a fost descoperită între proteinele codificate de ISMav6 și IS901 (Ichikawa ș.a., 2009).

Creșterea extrem de lentă a lui *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (timp de generație de peste 20 de ore) și eliminarea intermitentă din organismele infectate au îngreunat izolarea sa pe mediile de cultură utilizate. A fost astfel utilizată testarea complementară rapidă, bazată pe PCR, pentru depistarea elementului IS900 din probele clinice.

În România, supravegherea activă a paratuberculozei se realizează prin testare serologică (iELISA cu fază de absorbție), la solicitarea și pe cheltuiala proprietarului iar de la animalele pozitive sunt testate probe de fecale prin examen bacterioscopic și/sau molecular (PCR). Confirmarea, în cazul unui răspuns pozitiv la aceste teste, implică sacrificarea animalelor și realizarea examenului histopatologic (metodele Ziehl Neelsen modificată, HEA sau HEV) și bacterioscopic, utilizând probe de intestin și limfonoduri aferente. Totodată, testarea animalelor prin examen cultural și PCR se repetă (de două ori la șase luni), în cazul unui prim răspuns negativ (Ordinul ANSVSA 35/2016 - Normele metodologice de aplicare a H.G. 1156/2013).

Numărul redus de cazuri întâlnite în perioada de studiu poate fi explicat printr-o evoluție sporadică a paratuberculozei în România, aspect confirmat și de alți autori (Perianu, 2005). Adesea, în efectivele de rumegătoare în care boala a evoluat în trecut, la o nouă suspiciune, animalele sunt sacrificate și nu sunt realizate investigații suplimentare, mai ales din considerente financiare. Paratuberculoza a fost semnalată în majoritatea statelor membre din UE (EFSA AHAW Panel, 2017). În baza de date WAHIS a Organizației Mondiale pentru Sănătatea Animalelor, datele privind evoluția acestei boli pe teritoriul țării noastre nu sunt complete (WAHIS; Macovei, 2014). O evaluare de ansamblu a prevalenței la nivelul României este necesară, ținând cont de impactul economic puternic și potențialul risc zoonotic.

Investigațiile realizate pe două cazuri clinice la câini de vânătoare, au putut evidenția implicarea micobacteriană, fără însă a putea stabili cu certitudine diagnosticul de *granulom leproid canin*. Nu poate fi exclusă o micobacterioză cutanată atipică, având în vedere faptul că cei doi câini erau utilizați la vânătoare și existând astfel posibilitatea unor inoculări accidentale cu micobacterii din mediu, prin înțepare.

5.4. Concluzii parțiale

1. Cu scopul de identifica cu certitudine MNT implicate în **infecții la păsări și rumegătoare**, au fost utilizate metode de diagnostic anatomopatologice, bacteriologice, bacterioscopice și moleculare.
2. Cașexia și leziunile observate la examinarea morfopatologică au condus la suspiciunea acestei infecții iar examenul **histopatologic** a evidențiat prezența leziunilor de tip granulomatos și a **BAAR** în organele afectate **la toate păsările** suspecte examinate.
3. Utilizarea **Hsp65** și a secvențelor de inserție **IS1245** și **IS901** ca ținte în cadrul **TaqManPCR în timp real** facilitează identificarea și discriminarea subspeciilor *M.*

avium, prin **tehnici moleculare**, furnizând astfel un diagnostic rapid și precis, chiar și în cazul testării directe a **extractelor de ADN din țesuturi**.

4. Investigațiile bacteriologice și moleculare efectuate au condus la confirmarea infecției cu specia *M. avium* subsp. *avium* pentru toate găinile investigate.
5. **Leziuni granulomatoase** caracteristice infecției tuberculoase au putut fi observate în probele de pulmon de la o singură bovină. Localizarea și aspectul leziunilor, cât și evidențierea prezenței **BAAR** la examenul bacterioscopic direct, au condus, în mod evident, către **suspicionarea tuberculozei bovine**.
6. **Leziuni microscopice specifice** infecției cu *M. avium* subsp. *paratuberculosis* au fost evidențiate în secțiunile histologice din intestin (ileon) și limfonoduri mezenterice de la o oaie.
7. **Creșterea** extrem de **lentă** a lui *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (timp de generație de peste 20 de ore) și **eliminarea intermitentă** din macroorganismele infectate **au îngreunat izolarea** sa pe mediile de cultură utilizate.
8. Au fost evaluate, prin **testarea complementară rapidă TaqMan PCR în timp real**, extracte ADN din probe de intestin și limfonoduri mezenterice de la trei bovine, două ovine și un cerb și două probe de lizate din culturile obținute pe mediul lichid Middlebrook 7H9. Testarea a urmărit prezența sau absența amplificării pentru **elementele Hsp65, IS1245, IS901 și IS900**, elemente de diagnostic cu o mult mai mare **certitudine**.
9. În urma **coroborării** rezultatelor obținute pentru diversele probe testate de la fiecare animal, prezența lui *M. avium* subsp. *paratuberculosis* a putut fi confirmată molecular la o ovină (**oaie 1**: CT IS900 = 27,38) și la o bovină (**vacă 5**: CT IS900 = 27,21). Pentru probele de la **cerb** și cele de la **vacă 2**, a fost dovedită prezența unei micobacterii din **complexul CMA (IS1245 +, IS901+)**.
10. Cu ocazia examinării clinice și bacterioscopice a doi **câini de vânătoare**, a fost dovedită implicarea micobacteriilor în **infecții cutanate**, fără însă a putea stabili cu certitudine diagnosticul de *granulom leproïd canin*. În acest caz, nu poate fi exclusă o **micobacterioză cutanată atipică**, având în vedere faptul că cei doi câini erau utilizați la vânătoare, existând astfel posibilitatea unor inoculări accidentale cu micobacterii din mediu.

CAPITOLUL 6.

IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA TULPINILOR DE MICOBACTERII NONTUBERCULOASE DE LA OAMENI

CHAPTER 6.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA FROM HUMAN SAMPLES

Micobacteriile au fost implicate în patologia infecțioasă întâlnită la animale și oameni, din cele mai vechi timpuri. Cel mai elocvent exemplu este tuberculoza (TBC), care continuă să provoace morbiditate și mortalitate semnificativă la nivel mondial. Definirea caracterului infecțios al bolii, prin descoperirea bacilului tuberculos uman de către Robert Koch, în 1881, a constituit un pas extrem de important.

În urma colaborării dintre medicul veterinar Camille Guérin și doctorul Albert Calmette, a rezultat tulpina atenuată de *M. bovis*, baza vaccinului BCG (Bacilul Calmette-Guérin) care, în 1928, a fost adoptat de către Liga Națiunilor ca vaccin standard împotriva tuberculozei și este în continuare utilizat în majoritatea țărilor dezvoltate (Sizemore, Lacourciere și Parker, 2015). Această descoperire este o dovadă a faptului că realizarea colaborărilor științifice între profesii influențează în mod pozitiv și contribuie la dezvoltarea strategiilor de control și combatere a bolilor infecțioase.

În ciuda faptului că NTM-urile sunt caracterizate de o patogenitate moderată, incidența infecțiilor cauzate de acestea a înregistrat o creștere, în special în țările dezvoltate (Rindi și Garzelli, 2016). Dintre speciile de MNT, membrii CMA sunt cel mai frecvent izolați la nivel mondial și cel mai adesea asociați cu infecții respiratorii la pacienții umani, în Europa, America de Nord și Australia.

O creștere a ratelor de izolare a MNT de la pacienții cu fibroză chistică a fost înregistrată în ultimii ani în Europa (Qvist ș.a., 2015). Alături de CMA, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. abscessus* și *M. kansasii* sunt printre cele mai des izolate specii de MNT, cu implicații în patologia umană (van der Werf ș.a., 2014, Hoefsloot ș.a., 2013). Având în vedere faptul că transmiterea de la o persoană la alta este considerată extrem de rară, infecțiile determinate de aceste bacterii nu sunt raportate în majoritatea țărilor (Griffith ș.a., 2007). Frecvența cea mai scăzută este observată în America de Sud, dar acest lucru se poate datora faptului că există un număr limitat de studii disponibile din această regiune (Hoefsloot ș.a., 2013, Halstrom ș.a., 2015, Stout ș.a., 2016).

Conform Ghidului Metodologic de Implementare a Programului Național de Prevenire, Supraveghere și Control al Tuberculozei, termenul de *micobacterioze* face referire la bolile determinate de anumite specii de micobacterii - altele decât cele din CMTB.

Referirea la acest grup se face utilizând termenii MOTT: (*Mycobacterium other than Tuberculosis*), MNT sau oportuniste.

După cum a fost menționat în capitolul II, în țara noastră, aspecte privind diversitatea și incidența principalelor specii MNT implicate în patologia umană nu au fost abordate în prea multe studii. În acest context, obiectivul cercetărilor noastre a fost caracterizarea diversității tulpinilor de MNT izolate din probe patologice respiratorii de la oameni, înregistrate în perioada mai 2015 - martie 2017 în cadrul laboratorului BK-IS.

6.1. Material și metodă

Diagnosticul de laborator al MNT izolate de la pacienți umani în România are la bază examenul bacteriologic. Testarea sensibilității acestor tulpini de micobacterii nu este standardizată, deci nu se efectuează în condiții de rutină. Identificarea tulpinilor nontuberculoase de la pacienți umani se realizează prin examen bacterioscopic, (ZN, Auramină-Rodamină), examen bacteriologic pe mediul de cultură solid Löwenstein-Jensen și în sistemele automate și prin utilizarea unui test imunocromatografic rapid, de detecție a antigenului MPT64. Noi am realizat identificarea la nivel de specie prin TaqMan PCR în timp real și prin secvențiere.

6.1.1. Colectarea și condiționarea probelor

În perioada evaluată, un total de 66 de tulpini micobacteriene au fost izolate și identificate ca MOTT în cadrul Laboratorului de Bacteriologie al Spitalului Clinic de Pneumoftiziologie din Iași.

Tabelul 6.1/Table 6.1

Date privind proveniența izolatelor MNT de la oameni

Data regarding human NTM isolates

		Produsul patologic din care a fost izolată MNT		Date despre pacient			
Nr. crt	Cod atribuit	Material patologic	Calitatea produsului patologic	Sex	Vârsta	Localitate	Caz nou/ Tratament
1.	I17-076	spută	sero-mucos	M	58	Iași	Nou
2.	I17-072	spută	purulent	F	80	Iași	MT
3.	I17-095	spută	sero-mucos	F	47	Vaslui	Nou
4.	I17-085	spută	sero-mucos	F	61	Iași	Nou
5.	I17-071	spută	sero-mucos	F	31	Iași	MT
6.	I17-101	spută	sero-mucos	M	81	Iași	Nou
7.	I17-100	spălături bronșice		M	61	Bacău	Nou
8.	I17-104	spută	sero-mucos	F	66	Iași	MT
9.	I17-081	spută	sero-mucos	F	61	Iași	Nou
10.	I17-075	spălături bronșice		M	47	Iași	Nou

		Produsul patologic din care a fost izolată MNT		Date despre pacient			
Nr. crt	Cod atribuit	Material patologic	Calitatea produsului patologic	Sex	Vârsta	Localitate	Caz nou/ Tratament
<i>Tabelul 6.1 Continuare</i>							
11.	I17-080	spută	sero-mucos	F	81	iași	Nou
12.	I17-089	spută	sero-mucos	F	92	Iași	Nou
13.	I17-108	spută	sero-mucos	F	65	Iași	Nou
14.	I17-099	spută	sero-mucos	F	71	Iași	Nou
15.	I17-102	spută	purulent	M	60	Iași	Nou
16.	I17-093	spută	sero-mucos	M	64	Iași	Nou
17.	I17-090	spută	sero-mucos	F	82	Iași	Nou
18.	I17-105	spută	sero-mucos	M	54	Iași	Nou
19.	I17-086	spută	sero-mucos	F	49	Iași	Recidivă
20.	I17-107	spută	purulent	M	58	Iași	Nou
21.	I17-106	spută	purulent	F	72	Iași	Nou
22.	I17-045	spută	sero-mucos	M	80	Iași	Nou
23.	I17-055	spută	sero-mucos	M	55	Iași	Nou
24.	I17-061	aspirat bronșic		M	44	Neamt	Nou
25.	I17-065	spălături bronșice		F	53	Iași	Nou
26.	I17-060	aspirat bronșic		F	60	Iași	Nou
27.	I17-070	aspirat bronșic		M	50	Iași	Nou
28.	I17-052	spută	sero-mucos	F	37	Vaslui	Nou
29.	I17-049	fibrină		M	44	Suceava	Nou
30.	I17-050	lichid pleural		M	73	Neamț	Nou
31.	I17-048	lichid pleural		M	78	Iași	Nou
32.	I17-067	spută	sero-mucos	F	75	Iași	Nou
33.	I17-057	aspirat bronșic		F	63	Iași	Nou
34.	I17-042	pleură parietală		M	61	Iași	Nou
35.	I17-040	aspirat bronșic		F	59	Suceava	Nou
36.	I17-030	spălături bronșice		F	86	Iași	Nou
37.	I17-041	spută	purulent	M	63	Iași	Recidivă
38.	I17-034	spută	purulent	F	81	Iași	Nou
39.	I17-068	spută	purulent	M	63	Iași	Recidivă
40.	I17-056	spută	sero-mucos	M	32	Iași	Nou
41.	I17-036	Formațiune nodulară		M	72	Botoșani	Nou
42.	I17-039	fibrină		M	68	Iași	Nou

		Produsul patologic din care a fost izolată MNT		Date despre pacient			
Nr. crt	Cod atribuit	Material patologic	Calitatea produsului patologic	Sex	Vârsta	Localitate	Caz nou/ Tratament
<i>Tabelul 6.1 Continuare</i>							
43.	I17-023	puroi		M	79	Iași	Nou
44.	I17-013	aspirat bronșic		M	44	Neamț	Nou
45.	I17-033	spută	sero-mucos	F	70	Iași	Nou
46.	I17-020	spută	sero-mucos	F	70	Iași	Nou
47.	I17-037	spută	sero-mucos	M	65	Iași	Nou
48.	I17-006	spută	sero-mucos	M	69	Iași	Nou
49.	I17-011	spută	sero-mucos	F	79	Iași	Nou
50.	I17-003	spută	sero-mucos	M	44	Neamț	Nou
51.	I17-029	spută	sero-mucos	M	33	Iași	Nou
52.	I17-024	spută	sero-mucos	M	82	Iași	Nou
53.	I17-002	spută	sero-mucos	M	67	Iași	Nou
54.	I17-097	spută	sero-mucos	M	22	Iași	Nou
55.	I17-017	spută	sero-mucos	F	49	Iași	Nou
56.	I17-007	spută	sero-mucos	M	64	Iași	Nou
57.	I17-014	spută	sero-mucos	M	54	Iași	Recidivă
58.	I17-021	spută	sero-mucos	M	58	Iași	MT
59.	I17-028	spută	sero-mucos	M	64	Iași	Nou
60.	I17-092	spută	sero-mucos	F	80	Iași	Nou
61.	I17-064	lichid pleural		M	48	Iași	Nou
62.	I17-051	spută	purulent	F	77	Iași	Nou
63.	I17-n	Pleură parietală		M	66	Bacău	Nou

(MT=monitorizare tratament)

MNT au fost izolate din produsele patologice de rutină, evaluate în cazul suspiciunii de tuberculoză: spută, aspirat bronșic, spălături bronșice, lavaj bronho-alveolar, lichid pleural, probe biopsice de la nivelul unor formațiuni nodulare, pleură parietală și fibrină. Tabelul 6.1 sistematizează totalitatea probelor luate în studiu și pentru care au fost disponibile date privind tipul materialului patologic și câteva informații despre pacient (vârstă, sex, localitate de proveniență). Pentru trei dintre probele evaluate molecular (I17-001, I17-035, I17-064) nu au fost disponibile aceste date.

Majoritatea probelor au provenit de la pacienți cu vârstă de peste 60 de ani, 30% cu vârsta cuprinsă între 60 și 70 de ani, vârsta medie fiind de 62,3 ani. De la pacienții de sex feminin au fost izolate 43% din NTM (57% fiind izolate de la bărbați). Majoritatea probelor

(aproximativ 97%) au fost izolate din specimene respiratorii, în principal spută -70% (Anton ș.a., 2018).

Aproximativ 83% din probe proveneau de la pacienți din județul Iași, iar celelalte 17% din regiunile învecinate: Bacău (n = 2), Vaslui (n = 2), Neamț (n = 4) și Botoșani (n = 2). Majoritatea înregistrărilor au fost cazuri noi (87%), 4 fiind înregistrate în monitorizarea tratamentului și alte 4 ca recidive. În aceste cercetări nu au fost folosite date cu caracter personal ale pacienților și nici aspecte privitoare la evoluția infecției, investigații realizate sau tratament.

Micobacteriile au fost identificate ca MOTT sau MNT după izolarea primară și conservate apoi în soluție de glicerină 10%, la -20°C, conform protocolului din laborator. Pentru identificarea lor, au fost realizate reînsămânțări din fiecare probă, pe câte două tuburi de mediu Löwenstein-Jensen.

Ulterior, după pozitivarea culturilor, coloniile au fost conservate în soluție de glicerină 10%, fiind astfel constituită o bancă de probe, pentru ca ulterior să se realizeze identificarea moleculară a fiecărei sușe izolate.

6.1.2. Examenul bacterioscopic direct

Urmărește evidențierea BAAR în frotiurile efectuate din materialul patologic. Un frotiu pozitiv reprezintă singurul rezultat obiectiv până la confirmarea prin examen cultural. În practica curentă, se efectuează frotiuri subțiri, din regiunile opace, purulente din spută. Materialul patologic este depus în zona centrală a lamei de sticlă, acoperind o arie de 1x2 cm. Se utilizează colorația de referință Ziehl-Neelsen și colorația auramină-rhodamină.

Numărul de bacili din frotiu corespunde concentrației de bacili din spută. Atunci când numărul de bacili depășește 1×10^5 BAAR/ ml de spută, probabilitatea de a identifica bacili în frotiu se apropie de 96% (Bodal ș.a., 2015).

Tehnica de lucru și reactivii utilizați pentru colorarea frotiurilor Ziehl-Neelsen sunt descrise în subcapitolul 5.1.3 - Examenul bacterioscopic direct.

Microscopia de fluorescență permite examinarea mult mai rapidă a frotiurilor, comparativ cu tehnica clasică ZN. De asemenea, este mai sensibilă în cazul materialelor patologice paucibacilare, deoarece permite examinarea mai multor câmpuri, cu mai puțin efort. Este indicată în special pentru laboratoarele în care se examinează un volum mare de probe. Cu toate acestea, metoda necesită o sursă de alimentare stabilă și o mai mare experiență în citirea și ajustarea microscopului.

Procedura de lucru implică colorarea primară a frotiurilor cu soluția de auramină (0,1%) - rhodamină (0,01%), pentru 5 minute. Spre deosebire de colorarea cu fucsină, nu se folosește încălzirea frotiurilor pentru a facilita pătrunderea colorantului primar. Spălarea se realizează cu apă distilată și nu cu apă de la robinet, deoarece clorul poate să interfereze cu semnalul fluorescent. Pentru decolorare, soluția de acid-alcool în concentrație de 3% se lasă în contact cu lama timp de 2 minute. Recolorarea se realizează pentru eliminarea fluorescenței nespecifice din fondul frotiului. În acest scop, se utilizează soluție de permanganat de potasiu 0,5%. După două minute, frotiul este spălat cu apă distilată și este lăsat la uscat. Examinarea trebuie să fie realizată în cel mai scurt timp (până în 24 de ore),

datorită scăderii fluorescenței bacililor, cu microscopul UV, ocular 10x și obiectiv 25/45x. BAAR sunt observați cu ușurință, fiind galben- strălucitori pe un fond întunecat (Homorodean ș.a., 2005).

Pentru o evaluare corectă a rezultatelor, trebuie examinate minim 100 de câmpuri. Sunt observate caracteristicile morfologice ale BAAR prezenți și se realizează o exprimare semicantitativă a rezultatelor, în funcție de numărul de bacili observați per 100 de câmpuri (Homorodean ș.a., 2005).

6.1.3. Examenul bacteriologic

Cultivarea micobacteriilor reprezintă tehnica de diagnostic standard utilizată în laboratoarele din întreaga lume. Aceasta permite evidențierea viabilității microorganismelor în probele testate. În acest studiu, izolarea primară a MNT a fost realizată atât pe mediul solid Löwenstein–Jensen cât și pe mediile lichide utilizate de sistemele automate BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson) și VersaTRECK (TREK Diagnostics).

Pentru izolarea primară este necesară o etapă de decontaminare a produselor patologice. În cazul sputei, această etapă are rolul de a elimina flora de asociație dar și de a fluidifica și descompune structurile organice (fibrina, mucusul). A fost utilizată metoda de decontaminare cu hidroxid de sodiu 4%, fără centrifugare, numită și *metoda cu picătura*, conform recomandărilor OMS. Decontaminarea nu este selectivă, însă această tehnică conferă un echilibru între numărul de bacili distruși (aproximativ jumătate) și rata ulterioară de contaminare a mediilor însămânțate, cuprinsă între 2 și 5%.

Tehnica de lucru cuprinde un prim pas de omogenizare a probelor, la care se adaugă soluția de NaOH 4% cu indicator de pH (albastru de bromtimol). Probele sunt lăsate în contact cu substanța decontaminantă timp de 15 minute, la temperatura camerei, timp în care se efectuează una-două agitări și apoi sunt neutralizate cu HCl 8% până se obține un pH neutru, marcat de apariția culorii galben-verzui. Din preparatul astfel obținut au fost inoculate câte trei tuburi de mediu Löwenstein-Jensen comercial (Sanimed și Institutul Cantacuzino), cu o cantitate de 0,2 ml. S-a realizat însămânțarea și pe mediile lichide utilizate de sistemele automate prezente în laborator: BACTEC MGIT 960 și Versa TREK.

Tuburile de mediu solid au fost menținute în poziție înclinată și cu capacul ușor deschis pentru 2-5 zile, ulterior capacele fiind închise și tuburile menținute în continuare în camera termostatăată, la 36,5-37°C, până la două luni.

Sistemul automat BACTEC MGIT 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube) utilizează tuburi cu mediu Middlebrook 7H9 modificat, care conține un indicator de creștere fluorescent (Figura 6.1). Astfel, pozitivarea unei culturi este marcată de apariția unui precipitat în zona inferioară a tubului și prin intermediul emițătorului portabil integrat (Moisoiu, 2014). Pentru scurtarea timpului de creștere și eliminarea contaminanților se adaugă în mediu suplimentul OADC și cel de antibiotice PANTA F. Fiecare tub este însămânțat cu 0,5ml din proba prelucrată.

Sistemul Versa TREK utilizează flacoane de mediu Middlebrook 7H9 cu bureței cu structură alveolară, pentru mărirea suprafeței de creștere și cu substanțe antibacteriene. Sistemul monitorizează consumul de O₂ și presiunea din flacon prin intermediul unui

manometru (Figura 6.2). Astfel, creșterea micobacteriilor este însoțită de scăderea presiunii de O_2 din flacoane, aspect semnalat vizual și acustic (Moisoiu, 2014).



Figura 6.1 A - Sistemul automat BACTEC MGIT960 (original);
B - tuburile cu mediu (sursă: www.bd.com)

Figure 6.1 A - BACTEC MGIT960 system (original), B-Growth indicator tubes (source: www.bd.com)



Figura 6.2 A - Sistemul automat VersaTRECK; B - tuburile de mediu (original)

Figure 6.2 A - VersaTRECK system; B - medium tube (original)

6.1.4. Diferențierea MNT de membrii CMTB prin detecția antigenului MPT64

Diferențierea MNT de membrii CMTB s-a realizat utilizând un test rapid imunocromatografic: SD Bioline TB Ag MPT64 RAPID® (Standard Diagnostics, Inc. Yongin, Coreea). MPT64 este o proteină (24 kDa) codificată de genele regiunii RD2, secretată de micobacterii în faza de creștere și care s-a dovedit a fi un antigen specific care diferențiază CMTB de micobacteriile nontuberculoase (Arora ș.a., 2015).

Din culturile pozitive pe mediul Löwenstein-Jensen se prelevează 3-4 colonii ce sunt apoi suspendate în 100μl tampon de extracție și vortexate. Se depune în test 100μl de probă astfel prelucrată (sau 100μl din lichidul de condensare din tub) și se urmărește apariția benzii de control, pentru validarea testului și apoi apariția benzii T, care marchează prezența unei micobacterii din CMTB. Durata testului este de 15 minute.

6.1.5. Identificarea moleculară a MNT izolate de la pacienți umani

Pentru identificarea varietății MNT izolate s-a recurs la identificarea prin TaqMan PCR în timp real a secvențelor de interes *Hsp65*, *IS6110*, *IS1081*, *IS1245*, *IS901* și secvențierea unor regiuni înalt conservate: *Hsp65*, *rpoB* și 16S ARNr. Studiile au fost efectuate în Laboratorul de Biologie Moleculară al FMV Iași dar și în cadrul Laboratorului pentru sănătatea animalelor ANSES FR.

6.1.5.1. Extracția acidului nucleic (ADN)

Pentru a se obține o cantitate de ADN cât mai mare, coloniile de MNT izolate și stocate în soluție de glicerol 10% au fost repasate pe mediu solid Lowenstein Jensen și apoi pe mediul lichid Middlebrook 7H9 pentru îmbogățirea culturilor. Mediile utilizate au fost LJ comercial (Sanimed) și LJ și Middlebrook 7H9 preparate în cadrul Laboratorului de Bacteriologie al Facultății de Medicină Veterinară Iași, conform protocolului de lucru descris în subcapitolul 5.1.4. Extracția ADN-ului a fost efectuată urmând protocolul utilizat în cadrul Laboratorului de Zoonoze Bacteriene ANSES FR., descris în subcapitolul 5.1.5.1. **Extracția acidului nucleic (ADN).**

Pentru probele care au prezentat o creștere bogată la repicajul efectuat pe mediul LJ, au fost obținute și extracte ADN prin șoc termic, prin suspendarea coloniilor într-un ml de apă ultrapură, inactivarea lor pe baie de apă timp de 20 minute la 94°C și treceri repetate de pe baia de apă (100°C) pe pat de gheață, timp de 2 minute, conform protocolului descris de Bostănar A., 2014 .

6.1.5.2. Identificarea MNT prin tehnica TaqMan PCR în timp real

Testările prin tehnica TaqMan PCR în timp real a extractelor ADN micobacterian de origine umană au fost efectuate conform protocolului descris în subcapitolul 5.1.5.2 **Identificarea MNT prin tehnica TaqMan PCR în timp real.**

Pentru probele evaluate, au fost testate atât extracte ADN direct din coloniile obținute pe mediul solid LJ (obținute prin șoc termic) cât și lizate din culturile de îmbogățire pe mediul lichid Middlebrook 7H9. De primă intenție a fost analiza *Hsp65*, pentru testările ulterioare fiind selectate extractele care au exprimat valoarea CT cea mai mică (câte un extract pentru fiecare probă inclusă în studiu).

6.1.5.3. Amplificarea genică

Izolatele de micobacterii nontuberculoase identificate în probele clinice de la oameni au fost ulterior supuse testării prin PCR clasic pentru elementele înalt conservate *Hsp65*, 16S ARNr și *rpoB*, ampliconii obținuți fiind secvențiați. În acest scop s-a realizat amplificarea ADN-ului din probele selectate pentru secvențele țintă cu ajutorul protocolului de lucru detaliat în tabelul 6.2.

Programul de amplificare utilizat
PCR amplification program

Numărul de cicluri	Etapă	Temperatura	Timpul
5 cicluri	I. Activarea Taq polimerazei	95°C	15 minute
	II. Denaturare	94°C	1 minut
	III. Hibridizare	65°C	30 secunde
	IV. Elongare	72°C	2 minute
50 de cicluri	V. Denaturare	94°C	1 minut
	VI. Hibridizare	60°C	1 minut
	VII. Elongare	72°C	2 minute
	VIII. Elongare finală	72°C	10 minute
	IX. Menținere	12°C	∞

Tabelul 6.3/Table 6.3

Componența amestecului reacțional utilizat în PCR clasic
PCR classic reaction mix

Reactivi	Cantitate/ reacție
Apă ultrapură	11,7 μl
Tampon de amplificare	2,5 μl
Tampon Q	5 μl
dNTP	0,2 μl
Hot Star Taq DNA Polymerase	0,1 μl
Primer Sens	1,5 μl
Primer Antisens	1,5 μl
Volum total	22 μl

Componența amestecului reacțional este prezentată în tabelul 6.3 iar secvențele amorsoare în tabelul 6.4. Desfășurarea reacțiilor s-a realizat într-un volum final de 25 μl, din care 3 μl au fost reprezentați de ADN-ul de testat.

Aproape toate speciile bacteriene au o singură copie a genei *hsp65* în genomul lor, ceea ce înseamnă că această genă nu este ușor transferată de la o bacterie la alta și că o abordare filogenetică ce vizează această genă este adecvată pentru studiile filogenetice ale speciilor sau tulpinilor strâns relaționate.

Gena *hsp65* codează proteina de șoc termic de 65 KDa și a fost utilizată cu succes pentru identificarea izolatelor clinice micobacteriene (Kim ș.a., 2005). Identificarea are la bază analiza fragmentului de 441 pb, amplificat cu ajutorul primerilor descriși de Telenti (Telenti ș.a., 1993).

Secvențierea genei *rpoB*, care codifică subunitatea β a ARN polimerazei, și-a dovedit utilitatea în caracterizarea filogenetică a MNT, exprimând un nivel promițător de discriminare între micobacteriile cu creștere rapidă și cele cu creștere lentă, inclusiv membrii CMA (Zwaan ș.a., 2014).

De la începutul anilor 1990, analiza secvenței genei 16S ARNr a servit ca *standard de aur* (*gold standard*) în identificarea micobacteriilor. Capacitatea de discriminare este însă limitată pentru unele grupuri de MNT, în special în rândul micobacteriilor cu creștere rapidă din complexe *M. fortuitum* și *M. chelonae-abscessus* (Tortoli, 2012).

Tabelul 6.4/Table 6.4

Secvențele primerilor utilizați pentru amplificarea secvențelor *Hsp65*, *rpoB* și *16S ARNr*
 Primers sequence for *Hsp65*, *rpoB* și *16S rRNA* genes amplification

Țintă	Primeri	Secvență	Referință	Talie amplicon
<i>Hsp65</i>	Primer sens Tb11	5' ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT 3'	Telenti ș. a., 1993	439 pb
	Primer antisens Tb12	5' CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT 3'		
<i>rpoB</i>	Primer sens Myco F	5' GGC AAG GTC ACC CCG AAG GG 3'	Adekambi ș.a., 2003	764 pb
	Primer antisens Myco R	5' AGC GGC TGC TGG GTG ATC ATC 3'		
16S ARNr	Primer sens	5' ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C3'	Huard ș.a., 2003	543 pb
	Primer antisens	5' TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A3'		

Analiza produșilor de amplificare

Analiza produșilor de amplificare a fost realizată prin electroforeză în gel de agaroză 2% (8 g agaroză: 400 ml soluție TAE 1X și Gel Red pentru vizualizare). Pentru estimarea taliei produșilor PCR s-a utilizat marker-ul de masă moleculară DNA Ladder Plus (100 bp ladder) (Euromedex 0,5μg/μl, 50μl). Pentru migrare s-a setat un voltaj constant, de 90V, pentru 60 minute. Vizualizarea ampliconilor s-a realizat cu transiluminatorului ChemiDoc XRS (BioRad) cu lumină ultravioletă, imaginile fotografiate ale gelului fiind înregistrate în format electronic.

6.1.5.4. Secvențierea nucleotidelor

Secvențierea a fost realizată prin metoda Sanger, fiind externalizată către MWG Biotech AG (Eurofins MWG, Ebersberg, Germany), care are la bază tehnica de electroforeză capilară de înaltă rezoluție. Secvențierea s-a realizat într-o singură direcție, cu ajutorul primerului-sens specific fiecărei ținte (tabelul 6.4).

6.1.5.5. Analiza filogenetică

Secvențele nucleotidice obținute au fost analizate individual, bioinformatic cu ajutorul programului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de pe portalul NCBI (National Center for Biotechnology Information). Alinierea secvențelor a fost realizată prin utilizarea metodei Muscle, din programul Mega 7, arborele filogenetic fiind generat cu ajutorul aceluiași program prin metoda Maximum Likelihood (probabilitatea maximă) și cu valoarea „bootstrap” (estimarea fiabilității generării ramurilor arborelui) pentru 1000 de replicări.

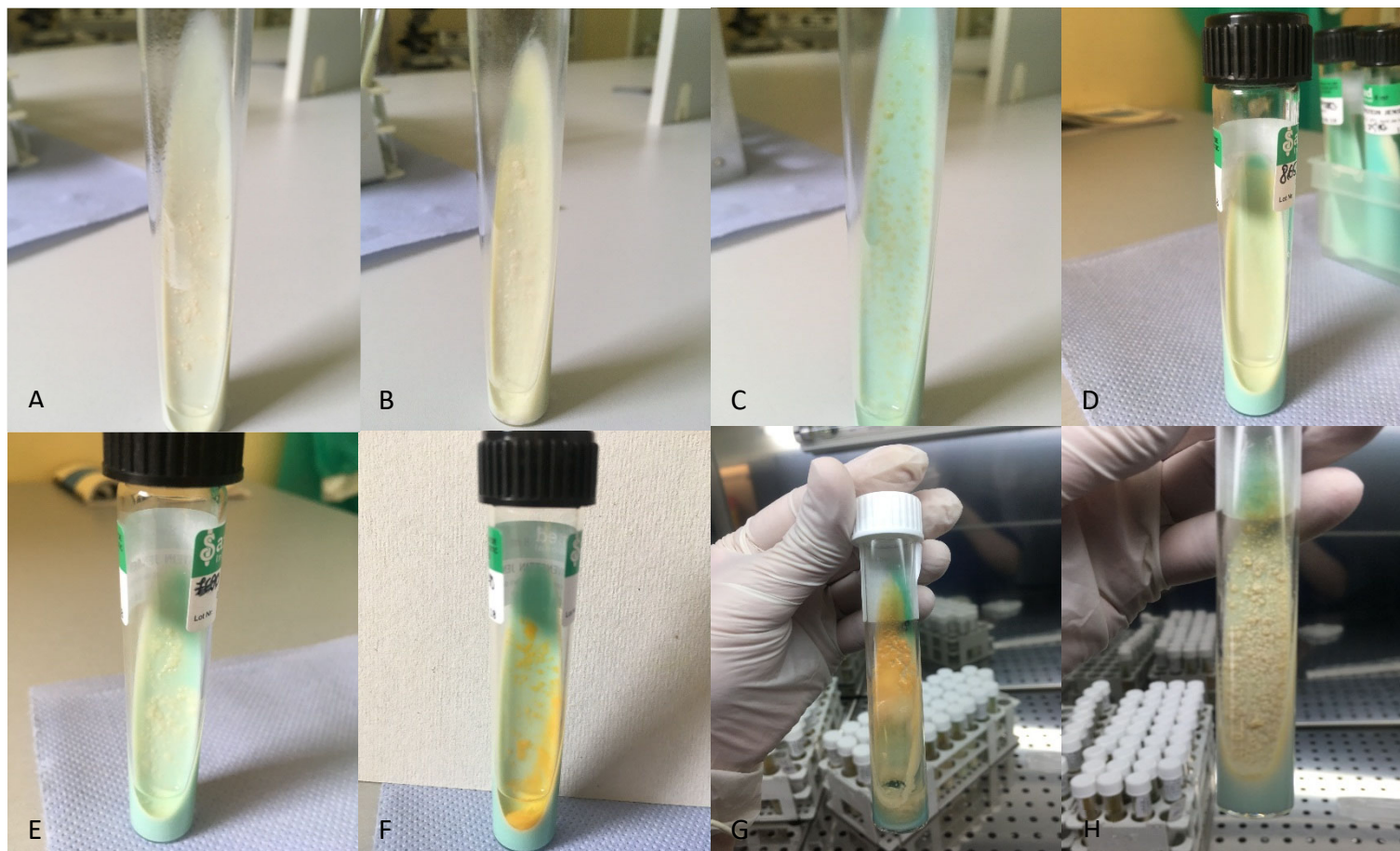


Figura 6.3 Aspectele morfologice ale coloniilor de MNT obținute la repicaje pe mediul Lowenstein Jensen: A - *M. avium* subsp. *hominissuis*, B - *M. peregrinum*, C - *M. mucogenicum*, D. *M. fortuitum*, E - *M. chelonae*, F. *M. gordonae*, G - *M.setense*, H - *M. mageritense* (conform identificării moleculare, Original)

Figure 6.3 NTM colony morphology on Lowenstein Jensen: A - *M. avium* subsp. *hominissuis*, B - *M. peregrinum*, C - *M. mucogenicum*, D. *M. fortuitum*, E - *M. chelonae*, F. *M. gordonae*, G - *M.setense*, H - *M. mageritense* (according to molecular identification, original)

6.2. Rezultate

6.2.1. Rezultatele examenului bacteriologic

Pentru perioada analizată, rata globală de izolare a MNT din totalul probelor înregistrate ($n = 25271$) în laborator pentru diagnostic a fost de aproximativ 0,25%. Au fost 14 izolate MNT (0,18%) în 2015, 48 (0,34%) în 2016 și doar unul în primele trei luni ale anului 2017 (Anton ș.a., 2018 A). Valorile corespund constatărilor menționate în literatură (van der Werf et al., 2014). Ratele lunare de izolare variază de la 0 la 1,33%, cea mai ridicată în mai 2016.

Analizând tulpinile pentru care au fost evaluate datele privind izolarea primară, acestea au înregistrat creștere deopotrivă pe mediul lichid utilizat de sistemul automat BACTEC MGIT 960 (26) cât și pe mediul solid Lowenstein Jensen (42). Pe mediul solid, coloniile au fost observate cel mai frecvent la 45-60 zile de la inoculare. Aspectul morfologic al coloniilor obținute a fost divers, acestea fiind atât netede cât și rugoase, galben-portocalii sau gălbui (Figura 6.3). La examenul bacterioscopic direct, toate probele examinate din care au fost izolate MNT, au fost negative. Cu toate acestea, un rezultat negativ la examinarea frotiurilor nu înseamnă neapărat că MNT, mai ales cele cu creștere rapidă, nu sunt prezente într-o probă clinică, acestea fiind considerate mai sensibile la decolorare sau nu se pot colora prin metode fluorescente.

În studiul efectuat de Bostănuș și colaboratorii (Bostănuș ș.a., 2014) au fost evaluate izolatele MNT din cadrul aceluiași laborator, pentru o perioadă de 5 ani. S-au observat trendul ascendent al ratei de izolare și ponderea ridicată a izolării din probe respiratorii, aspecte confirmate și în studiul nostru. La examenul bacterioscopic, au fost decelați BAAR într-un procent de 21,31% dintre frotiuri, spre deosebire de studiul prezent.

6.2.2. Rezultatele identificării MNT prin TaqMan PCR în timp real

Analiza rezultatelor obținute prin TaqMan PCR în timp real pentru elementul Hsp65 a pus în evidență prezența speciilor aparținând genului *Mycobacterium* în toate probele. În funcție de valorile CT pentru țintele IS6110, IS1245, IS901 și IS1081 s-a realizat încadrarea izolatelor în următoarele categorii: CMA ($N = 7$) - specie din complexul CMA (IS1245++, $CT_{IS1245} < CT_{Hsp65}$), *M. avium* sau *Mycobacterium* sp. ($N = 2$, I17-030 și I17-097, IS1245 +, $CT_{IS1245} > CT_{Hsp65}$), *Mycobacterium* sp. - alte specii de MNT ($N = 39$, Hsp65+). Subspecia *M. avium* subsp. *hominissuis* ($N = 12$) a fost identificată în probe în baza unui răspuns IS1245+, IS901-. Pentru 11 dintre probele încadrate în această categorie s-a observat un răspuns la IS6110 tardiv (Tabelul 6.5). Două extracte (I17-040, I17-078) au putut fi identificate cu certitudine ca fiind *M. avium* subsp. *avium* (IS1245 +, $CT_{IS901} < 20$), acestea provenind din probe de la același pacient. Un răspuns pozitiv la IS1081 a fost înregistrat pentru două extracte testate (I17-034 și I17-064), identificarea și caracterizarea acestora fiind detaliată în Capitolul VIII.

Rezultatele obținute la TaqMan PCR în timp real
TaqMan real time PCR results

Cod	TaqMan PCR în timp real					
	Identificare moleculară prin PCR	Țintă IS 6110	Țintă IS 1245	Țintă IS 901	Țintă IS 1081	Țintă Hsp65
	Rezultat	Valoare CT	Valoare CT	Valoare CT	Valoare Ct	Valoare CT
I17-001	CMA	36,59	17,53	39,63	indet	22,36
I17-002	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	36,02	indet	indet	31,32
I17-003	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	36,82	17,62	indet	indet	21,18
I17-006	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	34,52	38,62	indet	27,24
I17-007	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	32,47	indet	indet	31,73
I17-011	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	30,85	indet	indet	21,96
I17-013	CMA	36,03	16,91	32,56	indet	19,79
I17-014	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	29,71	39,3	indet	23,33
I17-017	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	36,63	indet	indet	15,37
I17-020	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	28,53	indet	indet	18,09
I17-021	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	35,58	indet	indet	32,71
I17-023	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	31,54	indet	indet	20,41
I17-024	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	34,6	indet	indet	30,38
I17-028	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	37,63	indet	indet	22,64
I17-029	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	29,66	indet	indet	25,89
I17-030	<i>M. avium</i> / <i>Mycobacterium</i> sp.	indet	26,01	34,13	indet	21,45
I17-033	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	36,16	indet	indet	18,57
I17-035	CMA	35,9	16,86	35,8	indet	19,55
I17-036	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	indet	24,11	indet	indet	24,16
I17-037	CMA	indet	28,44	39,23	indet	31,44
I17-039	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	27,44	29,84	indet	22,96
I17-040	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	indet	20,99	19,17	indet	18,73
I17-041	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	35,73	16,89	indet	indet	20,79
I17-042	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	31,12	indet	indet	21,61
I17-045	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	37,22	18,51	indet	indet	19,3
I17-048	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	35,14	16,92	indet	indet	20,76
I17-049	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	35,27	16,72	indet	indet	21,33
I17-050	CMA	33,85	16,3	36,44	indet	20,17
I17-051	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	32,17	indet	indet	25,39
I17-052	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	35,97	17,16	indet	indet	22,72
I17-055	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	34,97	indet	indet	22,88
I17-056	CMA	indet	24,39	38,23	indet	34,57
I17-057	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	34,83	16,17	indet	indet	21,07
I17-060	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	33,73	16,07	indet	indet	19,92
I17-061	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	34,97	15,91	indet	indet	21,03
I17-065	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	26,9	38,68	indet	23,68
I17-067	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	35,43	17,53	indet	indet	20,27
I17-068	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	33,92	15,91	indet	indet	19,95
I17-070	CMA	35,06	16,11	39,43	indet	21,03
I17-071	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	30,61
I17-072	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	36,28	indet	indet	21,7
I17-074	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	34,64	indet	indet	26,2
I17-075	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	32,33	39,79	indet	24,82
I17-076	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	29,17	indet	indet	21,57
I17-078	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	indet	21,54	19,55	indet	20,65
I17-080	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	31,41	indet	indet	24,05
I17-085	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	36,93	indet	indet	25,36

Cod	TaqMan PCR în timp real					
	Identificare moleculară prin PCR	Țintă IS 6110	Țintă IS 1245	Țintă IS 901	Țintă IS 1081	Țintă Hsp65
	Rezultat	Valoare CT	Valoare CT	Valoare CT	Valoare Ct	Valoare CT
Tabelul 6.5 Continuare						
I17-086	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	31,82	indet	indet	21,71
I17-089	<i>Mycobacterium</i> sp.	31,73	38,42	indet	indet	18,36
I17-090	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	34,37	indet	indet	26,9
I17-092	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	38,11	indet	indet	15,39
I17-093	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	30,7
I17-095	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	19,36
I17-097	<i>M. avium</i> / <i>Mycobacterium</i> sp.	39,01	20,81	indet	indet	18,7
I17-099	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	21,69
I17-100	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	37
I17-101	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	26,91
I17-102	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	26,34
I17-104	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	19,61
I17-106	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	26,78
I17-107	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	22,97
I17-108	<i>Mycobacterium</i> sp.	indet	indet	indet	indet	28,29

(Msp=specie din genul *Mycobacterium*, indet=nedeterminat)

6.2.3. Caracterizarea și analiza filogenetică a tulpinilor de MNT izolate din probe de origine umană

Secvențierea probelor a fost realizată în scopul identificării speciilor de MNT izolate. În urma valorilor CT obținute la analiza prin PCR în timp real, s-a luat decizia secvențierii etapizate. În urma analizei prin PCR clasic, toate probele au prezentat amplificare pentru elementele *Hsp65*, *rpoB* și 16S ARNr. Într-o primă etapă, au fost realizate secvențieri pentru regiunile *Hsp65* (54 probe) și *rpoB* (24 probe), urmând ca apoi să fie realizată și secvențierea ampliconilor obținuți pentru 16S ARNr (16 probe).

Au fost obținute secvențe cu lungimi variate, de la 341 la 413 pentru *Hsp65*, de la 648 la 720 pentru *rpoB* și de la 395 la 497 pentru 16S ARNr. Au mai fost obținute și secvențe cu talie mai redusă pentru patru dintre izolate: I17-090 (*Hsp65*-151 nucleotide), I17-080 (*Hsp65*-154 nucleotide), I17-100 (*Hsp65*-88 nucleotide) și I17-068 (*rpoB*-403 nucleotide), însă în urma analizei BLAST toate aceste probe au putut fi identificate fără impedimente.

Analiza *rpoB* a putut realiza discriminarea la nivel de specie pentru 14 dintre izolatele testate, celelalte fiind identificate doar la nivel de complex, toate aparținând CMA, iar pentru două izolate nu s-a putut face diferența între speciile *M. alvei* și *M. peregrinum* (Tabelul 6.6).

Membrii complexului CMA s-au dovedit a fi greu de diferențiat chiar și în urma analizei secvenței *Hsp65*. În acest context, 14 probe nu au putut fi identificate la nivel de specie, fiind încadrate doar la nivel de complex (Tabelul 6.6).

Sistematizarea rezultatelor obținute la secvențiere
Sequencing results

Cod probă	Rezultat secvențiere			Rezultat final
	<i>rpoB</i>	<i>Hsp 65</i>	16S ARNr	
	Rezultat parțial	Rezultat parțial	Rezultat parțial	
I17-001	CMA	NT	NT	CMA
I17-002	<i>M. alvei</i> 99%/ <i>M. peregrinum</i>	CMA 100%	<i>M. arcuulense</i> / <i>M. peregrinum</i> 99%	<i>M. peregrinum</i>
I17-003	CMA	CMA (MAH)	MAH 100%	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
I17-006	<i>M. setense</i> 99%	<i>M. setense</i>	NT	<i>M. setense</i>
I17-007	<i>M. alvei</i> / <i>M. peregrinum</i> 100%	CMA 100%	<i>M. arcuulense</i> / <i>M. peregrinum</i> 99%	<i>M. peregrinum</i>
I17-011	NT	<i>M. chelonae</i> 99%	NT	<i>M. chelonae</i>
I17-013	CMA	NT	NT	CMA
I17-014	<i>M. gordonae</i> 99%	<i>M. gordonae</i> 99%	NT	<i>M. gordonae</i>
I17-017	NT	<i>M. gordonae</i> 100%	NT	<i>M. gordonae</i>
I17-020	NT	<i>M. fortuitum</i> 99%	NT	<i>M. fortuitum</i>
I17-021	NT	<i>M. peregrinum</i> 100%	NT	<i>M. peregrinum</i>
I17-023	NT	<i>M. lentiflavum</i> 100%	NT	<i>M. lentiflavum</i>
I17-024	<i>Cutibacterium acnes</i>	CMA 100%	<i>Bacterium OX</i>	neidentificat
I17-028	NT	<i>M. peregrinum</i> / <i>M. porcinum</i>	NT	<i>M. peregrinum</i> / <i>M. porcinum</i>
I17-029	NT	<i>Mycobacterium</i> sp. 99% (terrae/engbaekii)	NT	<i>Mycobacterium</i> sp.
I17-030	<i>M. intracellulare</i> 100%	<i>M. intracellulare</i>	NT	<i>M. intracellulare</i>
I17-033	NT	<i>M. fortuitum</i> 99%	NT	<i>M. fortuitum</i>
I17-035	CMA	NT	NT	CMA
I17-036	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 100%	NT	<i>M. lentiflavum</i>
I17-037	<i>M. chelonae</i> 100%	CMA (MAH)	<i>Mycobacterium</i> sp/ <i>M. chelonae</i> / <i>M. saopaulense</i> 99%	<i>Mycobacterium</i> sp.
I17-039	<i>M. lentiflavum</i> 99%	<i>M. lentiflavum</i>	NT	<i>M. lentiflavum</i>
I17-040	CMA	NT	NT	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
I17-041	NT	CMA (MAH)	MAH 99%	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
I17-042	NT	<i>M. lentiflavum</i> 100%	NT	<i>M. lentiflavum</i>
I17-045	<i>M. chelonae</i>	CMA (MAH)	<i>Mycobacterium</i> sp/ <i>M. chelonae</i> / <i>M. saopaulense</i> 99%	<i>Mycobacterium</i> . sp.
I17-048	NT	CMA (MAH)	<i>Mycobacterium</i> sp/ <i>M. chelonae</i> / <i>M. saopaulense</i> 99%	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
I17-049	NT	CMA (MAH)	<i>Mycobacterium</i> sp/ <i>M. chelonae</i> / <i>M. saopaulense</i> 99%	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
I17-050	CMA	NT	NT	CMA
I17-051	NT	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>M. mucogenicum</i> 99%	NT	<i>M. mucogenicum</i>

Cod probă	Rezultat secvențiere			Rezultat final
	<i>rpoB</i>	<i>Hsp 65</i>	16S ARNr	
	Rezultat parțial	Rezultat parțial	Rezultat parțial	
Tabelul 6.6 Continuare				
I17-052	NT	CMA (MAH)	MAH 99%	<i>M. avium subsp. hominissuis</i>
I17-055	NT	<i>Mycobacterium sp.</i> , <i>M. peregrinum</i> 99%	NT	<i>M. peregrinum</i>
I17-056	CMA	NT	NT	CMA
I17-057	NT	CMA (MAH)	MAH 99%	<i>M. avium subsp. hominissuis</i>
I17-060	<i>M. chelonae</i>	CMA (MAH)	<i>M. chelonae</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
I17-061	NT	CMA (MAH)	MAH 99%	<i>M. avium subsp. hominissuis</i>
I17-065	<i>M. chelonae</i> 100%	<i>M. chelonae</i>	NT	<i>M. chelonae</i>
I17-067	NT	CMA (MAH)	MAH 99%	<i>M. avium subsp. hominissuis</i>
I17-068	<i>M. chelonae</i>	CMA (MAH)	<i>M. chelonae</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
I17-070	CMA	NT	NT	CMA
I17-071	NT	<i>M. mageritense</i> . 96%	NT	<i>M. mageritense</i>
I17-072	NT	<i>M. chelonae</i> 100%	NT	<i>M. chelonae</i>
I17-074	NT	<i>M. peregrinum</i> / <i>M. porcinum</i>) 100%	NT	<i>M. peregrinum</i>
I17-075	<i>M. chelonae</i> 99%	<i>M. chelonae</i>	NT	<i>M. chelonae</i>
I17-076	NT	<i>M. chelonae</i> 99%	NT	<i>M. chelonae</i>
I17-078	CMA	NT	NT	<i>M. avium subsp. avium</i>
I17-080	NT	<i>M. insubricum</i> 99%	NT	<i>M. insubricum</i>
I17-085	NT	<i>M. peregrinum</i> 99%	NT	<i>M. peregrinum</i>
I17-086	NT	<i>M. chelonae</i> 99%	NT	<i>M. chelonae</i>
I17-089	NT	<i>M. fortuitum</i> 100%	NT	<i>M. fortuitum</i>
I17-090	NT	<i>M. insubricum</i> 99%	NT	<i>M. insubricum</i>
I17-092	NT	<i>M. gordonae</i> 100%	NT	<i>M. gordonae</i>
I17-093	NT	<i>M. peregrinum</i> 99%	NT	<i>M. peregrinum</i>
I17-095	NT	<i>M. septicum</i> / <i>M. porcinum</i> 99%	NT	<i>M. septicum</i> / <i>M. porcinum</i>
I17-097	CMA	<i>M. intracellulare</i> 100%	CMA(<i>M. chimaera</i> / <i>M. intracellulare</i> / <i>M. yongonense</i>)	<i>M. intracellulare</i>
I17-099	NT	<i>M. chelonae</i> 99%	NT	<i>M. chelonae</i>
I17-100	NT	<i>M. fortuitum</i> 97%	NT	<i>M. fortuitum</i>
I17-101	NT	<i>M. chelonae</i> 100%	NT	<i>M. chelonae</i>
I17-102	NT	<i>M. septicum</i> / <i>porcinum</i> 99%	NT	<i>M. septicum</i> / <i>M. porcinum</i>
I17-104	NT	<i>M. peregrinum</i> 99%	NT	<i>M. peregrinum</i>
I17-106	NT	<i>M. peregrinum</i> 99%	NT	<i>M. peregrinum</i>
I17-107	NT	<i>M. setense</i> 99%	NT	<i>M. setense</i>
I17-108	NT	<i>M. terrae</i> 100%	NT	<i>M. terrae</i>

(NT=neefectuat, MAH= *M. avium subsp. hominissuis*)

Pentru patru dintre izolate nu a fost posibilă identificarea la nivel de specie sau de complex, acestea fiind încadrate în categoria *Mycobacterium* spp. Secvențierea *rpoB* și 16S ARNr a relevat și prezența unei specii diferite, *Cutibacterium acnes* (*rpoB*) pentru proba

I17-024, pentru care a fost înregistrată o valoare CT *hsp65* tardivă. Aceasta este o bacterie comensală cu rol în reglarea homeostaziei la nivelul pielii.

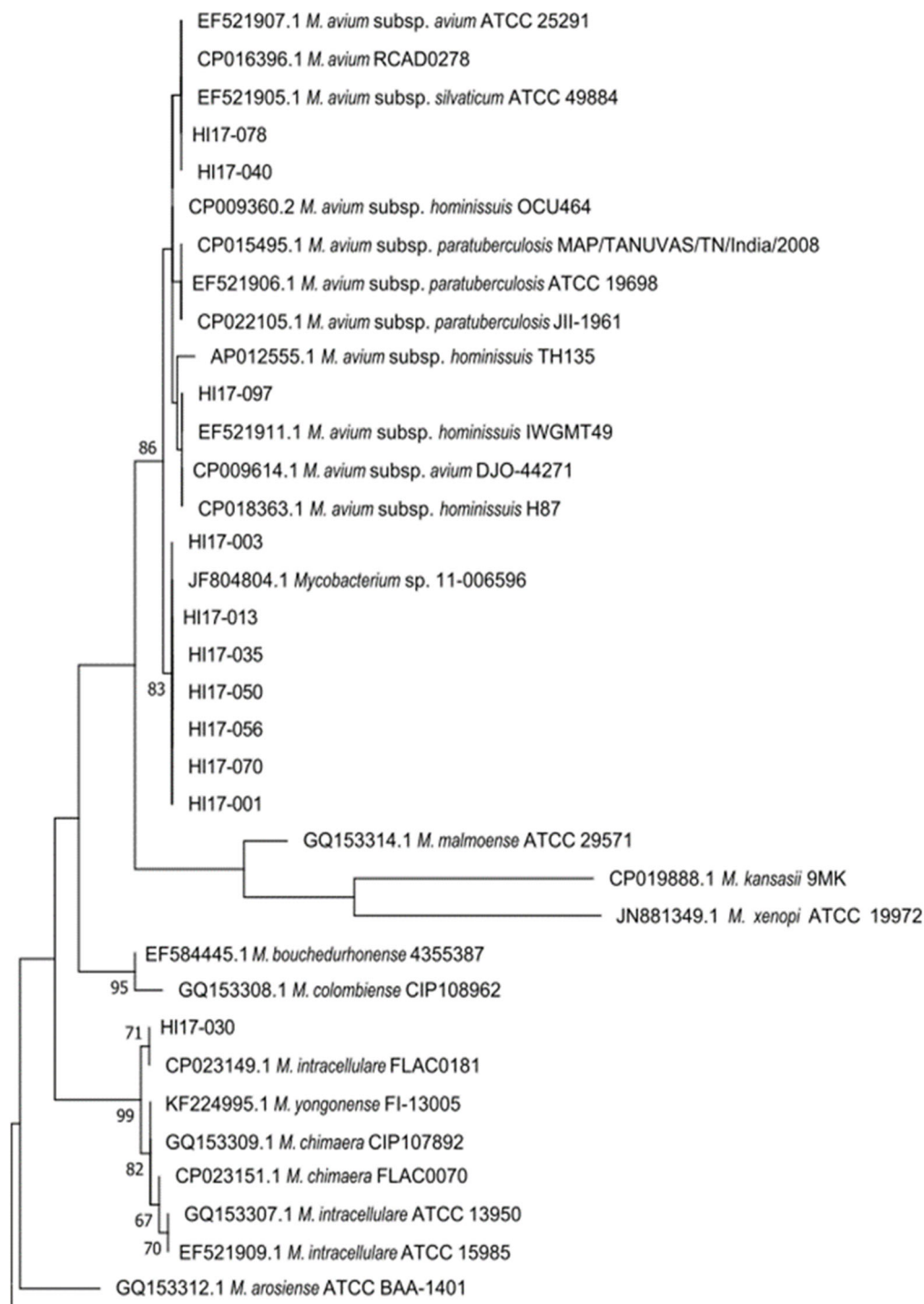


Figura 6.4 (partea I) - Arbore filogenetic realizat prin metoda Maximum Likelihood (probabilitate maximă) structurat prin alinierea secvențelor generate pentru gena *rpoB* cu secvențe omoloage și tulpini de referință din GenBank. Tulpinile din acest studiu sunt marcate de codul de identificare HI17-xxx

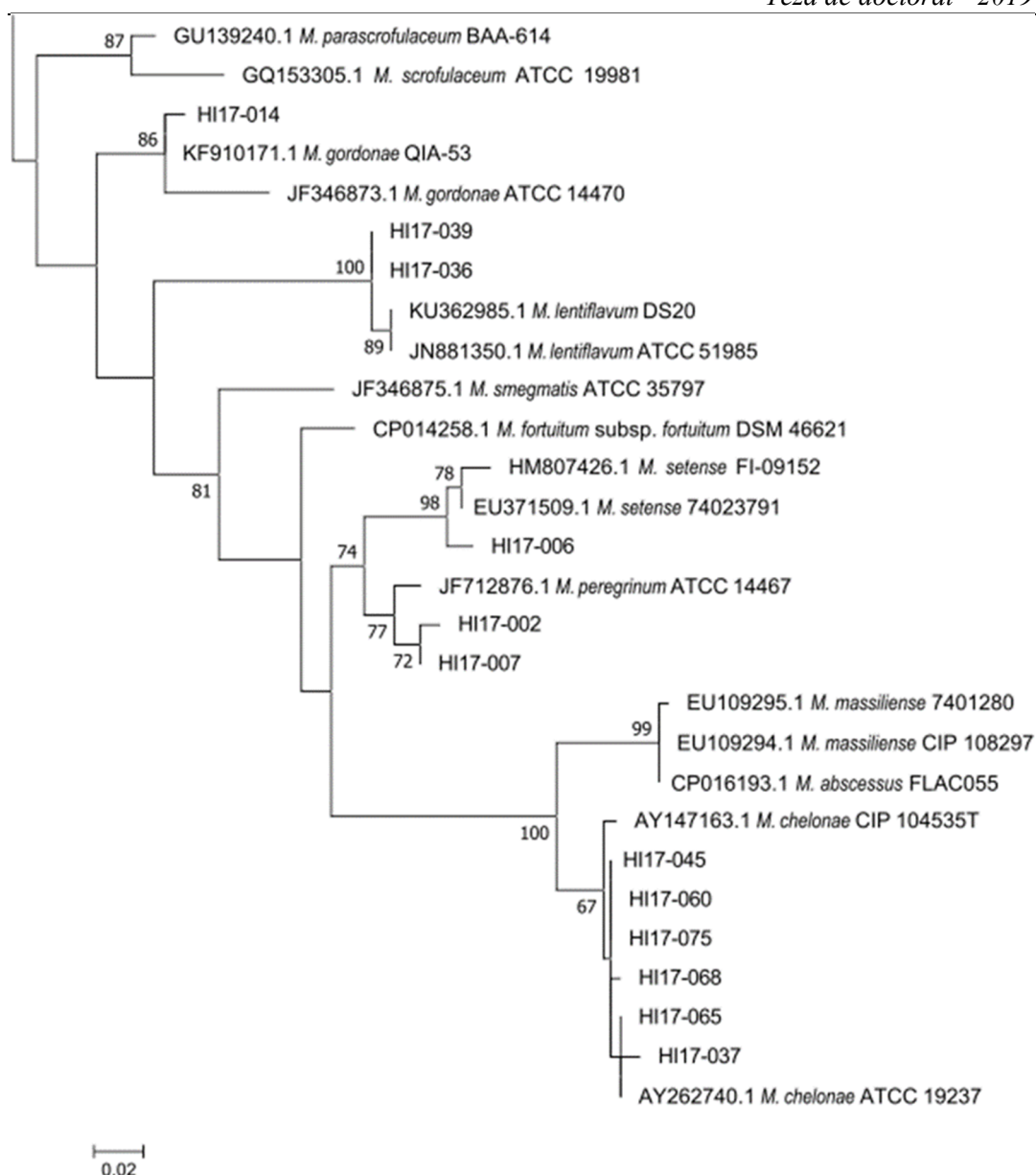


Figura 6.4 parte II Arbore filogenetic realizat prin metoda Maximum Likelihood (probabilitate maximă) structurat prin alinierea secvențelor generate pentru gena *rpoB* cu secvențe omoloage și tulpini de referință din GenBank. Tulpinile din acest studiu sunt marcate de codul de identificare HI17-xxx (original)

Figure 6.4 Maximum Likelihood phylogenetic tree based on the alignment of our generated sequences for *rpoB* gene with the best hits and reference strains in GenBank;

The strains from this study are marked by the code HI17-xxx (original)

Secvențierea 16S ARNr este o metodă rapidă și frecvent utilizată în studii filogenetice, însă are anumite limitări. Prin urmare, secvențierea regiunilor hipervariabile ale unor gene conservate precum *rpoB* și *Hsp65*, alături de 16S ARNr, constituie un sistem eficient pentru identificarea speciilor din genul *Mycobacterium*. În cazul 16S ARNr, a fost considerată validă o similaritate de 99%. Variații ale acestei gene pentru unele specii

precum *M. gordonae* sau *M. cookii* au fost identificate în studii precedente (Kim și Shin, 2017). Speciile incluse în complexul *M. fortuitum* sau *M. abscessus* –*M. chelonae* necesită pentru diferențiere secvențierea întregii gene sau a unor ținte alternative.

Tabelul 6.7/Table 6.7

Varietatea speciilor de MNT identificate Variety of the identified NTM		
Creștere	Specie	Izolate
Creștere lentă	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	8 (13%)
	CMA	6 (10%)
	<i>M. lentiflavum</i>	4 (7%)
	<i>M. gordonae</i>	3 (5%)
	<i>M. terrae</i>	1 (2%)
	<i>M. intracellulare</i>	2 (3%)
	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	2 (3%)
Creștere rapidă	<i>M. peregrinum</i>	9 (15%)
	<i>M. chelonae</i>	8 (13%)
	<i>M. fortuitum</i>	4 (7%)
	<i>M. septicum/ M. porcinum</i>	2 (3%)
	<i>M. setense</i>	2 (3%)
	<i>M. insubricum</i>	2 (3%)
	<i>M. peregrinum/ M. porcinum</i>	1 (2%)
	<i>M. mageritense</i>	1 (2%)
	<i>M. mucogenicum</i>	1 (2%)
	<i>Mycobacterium</i> spp.	5 (8%)

Evaluarea finală a fost realizată în urma coroborării rezultatelor obținute la secvențiere pentru cele trei ținte urmărite cu cele obținute la TaqMan PCR în timp real. Rezultatele finale sunt sistematizate în tabelul 6.7.

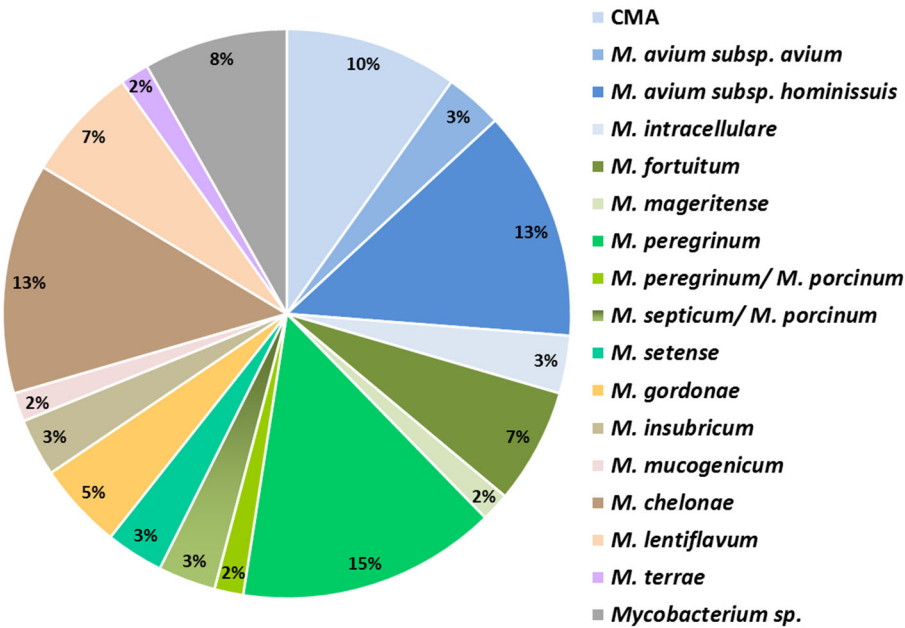


Figura 6.5 Diversitatea MNT de origine umană identificate (original)
Figure 6.5 Diversity of the identified NTM of human origin (original)

Cele mai frecvent izolate specii au fost: *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. avium* subsp. *hominissuis*. După cum a fost evidențiat și de alți cercetători, ponderea cea mai ridicată este observată pentru speciile cu creștere lentă aparținând CMA și rapidă din complexul *M. fortuitum*. În rândul micobacteriilor cu creștere rapidă, metodele utilizate nu au putut diferenția o serie de izolate între *M. septicum* și *M. porcinum* și între *M. peregrinum* și *M. porcinum* (Figura 6.5).

Cele două izolate încadrate în categoria *M. avium*/*Mycobacterium* sp. în urma evaluării rezultatelor la PCR în timp real (I17-030 și I17-097) au fost identificate ca fiind *M. intracellulare*. Dintre cele 7 izolate identificate ca specii din CMA la PCR, unul nu a putut fi identificat cu certitudine în urma secvențierii (I17-037 – *Mycobacterium* sp.) iar celelalte au rămas încadrate doar la nivel de complex. Pentru trei dintre sușele identificate ca *M. avium* subsp. *hominissuis* (I17-045, I17-060, I17-068), secvențierea ampliconilor obținuți pentru *Hsp65* a dus la același rezultat, însă pentru *rpoB* și 16S ARNr au fost obținute rezultate diferite (*M. chelonae*), în final fiind încadrate în categoria *Mycobacterium* spp.

6.3. Discuții

Disponibilitatea diverselor tehnici de diagnostic molecular a făcut ca pentru micobacterii caracterizarea genetică să constituie un element-cheie în diagnostic. Astfel, studiul polimorfismului genelor „de menaj”, precum 16S-23S, *hsp65*, *rpoB*, *gyrB* a înlocuit metodele de caracterizare fenotipică. Aceste gene codifică proteine funcționale comune tuturor micobacteriilor. Noile abordări filogenetice, bazate pe genele 16S ARNr sau *rpoB*, au făcut posibilă diferențierea și detecția de noi specii ale CMA (de Cruz ș.a., 2018). Cu toate acestea, există unele limitări ale acestor tehnici, mai ales pentru membrii CMTB, pentru care metode precum MIRU-VNTR sau spoligotiparea au o sensibilitate mult mai ridicată.

Unele ținte moleculare, cum ar fi elementele de inserție (IS) sunt identificate și descrise ca fiind specifice anumitor specii sau complexe. Prezente în genomul unor specii bacteriene, uneori în copii multiple, aceste secvențe permit integrarea de ADN străin în genom.

Actualul studiu a urmărit identificarea MNT izolate din probele umane și aprecierea diversității acestora cât și compararea rezultatelor obținute cu date prezentate de literatura de specialitate consultată. În ciuda limitărilor date de perioada scurtă (sub 2 ani), originea probelor - dintr-un singur laborator de pe raza județului Iași și numărul relativ redus de izolate analizate, acesta este primul studiu realizat în România cu privire la diversitatea MNT din probe respiratorii umane.

Evaluarea prin TaqMan PCR în timp real a probelor a direcționat analiza ulterioară prin secvențiere. A fost remarcat răspunsul pozitiv, în limite largi pentru valorile CT obținute, la analiza elementului de inserție IS1245 pentru majoritatea extractelor analizate. În urma analizei rezultatelor secvențierii, s-a observat faptul că un răspuns tardiv pentru această țintă a fost cel mai adesea corelat cu o micobacterie diferită de *M. avium*. Analiza

rezultatelor de specificitate pentru această țintă a reliefat posibilitatea unui răspuns tardiv pentru diverse specii de MNT (Anexa 2).

Beggs și colaboratorii au identificat secvența de inserție IS1245 în tulpini de *M. intracellulare*, demonstrând astfel faptul că elementul nu este restricționat doar la specia *M. avium*, ci poate fi prezent și la alte specii ale CMA (Beggs ș.a., 2000). Utilizând analiza fragmentelor de restricție, Keller și colaboratorii identifică fragmente caracteristice IS1245 pentru o serie de tulpini de *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. nonchromogenicum* și *M. intracellulare*, fapt ce ar putea indica că elementele de inserție s-ar putea răspândi prin transfer orizontal la alte MNT (Keller ș.a., 2002). Au fost documentate unele tulpini *M. avium* IS1245 negative, dar numai câteva astfel de rapoarte au prezentat o identificare bazată pe secvențiere (Coelho ș.a., 2013). De asemenea, au fost descrise în literatură și tulpini IS1245 negative care conțin o secvență *hsp65* identică cu aceea a *M. avium* dar care diferă în alte elemente, precum 16S ARNr (Turenne ș.a., 2007).

Secvența de inserție IS901 este utilizată pentru diferențierea lui *M. avium* subsp. *hominissuis* de subspeciile *avium* și *silvaticum*. Un răspuns pozitiv pentru această țintă pentru izolatele identificate ca *M. avium* subsp. *hominissuis* se poate explica prin prezența elementului ISMav6, identificat de Ichikawa și colaboratorii în 2009 (Ichikawa ș.a., 2009). Acest element codifică o proteină putativă de 403 aminoacizi, care prezintă o identitate de 96% cu cea codificată de IS901 și a fost identificat în izolate de origine umană, porcină dar și din mediu (Iwamoto ș.a., 2012; Vluggen ș.a., 2016).

Prezența izolatelor IS1245 pozitive și IS6110 pozitive a mai fost raportată în literatură de către Agdestein și colaboratorii, pentru extracte din secțiuni histologice de limfonoduri de la porcine (Agdestein ș.a., 2011), autorii subliniind posibilitatea unei co-infecții.

În urma analizei filogenetice (Figura 6.4), s-a remarcat faptul că 7 dintre izolate, identificate la nivel de complex (CMA) în urma secvențierii genei *rpoB*, sunt strâns relaționate cu un izolat de origine animală (*Rhesus macaque*) dintr-un studiu efectuat de Higgins și colaboratorii în 2011 (Higgins ș.a., 2011).

Tulpina I17-097, identificată ca *M. intracellulare* apare mai apropiată de două izolate *M. avium* subsp. *hominissuis* (CP01863-1-Zhao ș.a., 2017 și EF521911.1-Salah ș.a., 2008).

În ceea ce privește varietatea speciilor izolate, rezultatele noastre se aliniază cu cele raportate de alți autori. Infecția cu MNT la om nu se notifică, prin urmare, situația epidemiologică la nivelul Uniunii Europene (UE) este în mare parte necunoscută (van der Werf ș.a., 2014). Mai multe țări au publicat rapoarte cu privire la creșterea frecvenței izolării acestor bacterii de la pacienți umani sau au fost incluse în studii colaborative (NTM-NET). Date din țara noastră nu sunt prezentate însă. Cele mai frecvent izolate specii la nivel european sunt *M. avium*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. intracellulare* și *M. fortuitum*, cu variații teritoriale (van der Werf ș.a., 2014).

În prezent, este general acceptat faptul că speciile MNT diferă în capacitatea lor de a provoca infecții pulmonare la om și că relevanța clinică a unei anumite specii poate să difere în diferite părți ale lumii. *M. xenopi* este specia predominantă în Ungaria iar *M.*

kansasii în Polonia și Slovacia, dar nici una dintre acestea nu a fost identificată în studiul nostru (Hoefsloot ș.a., 2013).

Ca și evaluările anterior menționate, în probele analizate speciile cu creștere lentă cel mai frecvent izolate sunt incluse în CMA, cu precădere *M. avium* și *M. intracellulare*. *M. peregrinum*, de asemenea frecvent izolat în studiul nostru, este o specie cu creștere rapidă aparținând grupului *M. fortuitum*, capabil de a provoca infecții oportuniste la oameni. Infecțiile cutanate, ale oaselor și țesuturilor moi sunt cele mai importante manifestări clinice ale infecției cu *M. chelonae*. Infecția diseminată poate apărea, de asemenea, la pacienții imunocompromiși însă infecția pulmonară este mai rar determinată comparativ cu *M. abscessus* (Griffith ș.a., 2007).

Pentru speciile incluse în complexul *M. terrae*, sursele de mediu sunt considerate sistemele naturale de apă, solul sau sistemele de distribuție a apei. Membrii acestui complex sunt patogeni slabi și adesea considerați contaminanți la izolare în laboratoarele clinice. Cu toate acestea, pot provoca infecții ale pielii, sistemului genito-urinar, tractului gastro-intestinal, la nivelul limfonodurilor dar și infecții diseminate la nivelul țesuturilor moi și/sau oaselor (Marras și Brode, 2019)

Diagnosticul clinic și de laborator al MNT este o provocare și nu în toate laboratoarele este realizată identificarea speciilor. Acest aspect ar putea duce la o subestimare a prevalenței reale a MNT. Probele de origine respiratorie reflectă cel mai bine distribuția speciilor în medii locale (Hoefsloot ș.a., 2013).

Multe aspecte ale afecțiunilor determinate de MNT necesită uneori informații detaliate și construirea unui context adecvat pentru interpretare și înțelegere. În studiul nostru, doar trei dintre pacienții de la care au fost izolate MNT au prezentat afecțiuni care au determinat scăderea imunității (date neprezentate), însă în lipsa altor informații nu putem spune cu certitudine care dintre speciile izolate se datorează colonizării sau contaminării și care reprezintă agentul cauzal.

6.4. Concluzii parțiale

1. La ora actuală, în România, diagnosticul de laborator al TBC și discriminarea față de MNT izolate de la pacienți umani se realizează prin examen bacterioscopic, bacteriologic și prin test imunocromatografic rapid de detecție a antigenului MPT64.
2. Aspectele privind diversitatea și incidența principalelor **specii de MNT** implicate în patologia umană sunt **insuficient abordate** în țara noastră. Cercetările noastre au urmărit identificarea MNT izolate din probele umane și aprecierea diversității acestora precum și compararea rezultatelor obținute cu date prezentate de literatura de specialitate consultată.
3. **Evaluarea moleculară finală** a fost realizată în urma coroborării rezultatelor obținute la secvențiere pentru cele trei ținte urmărite cu cele obținute la TaqMan PCR în timp real, identificându-se atât **MNT cu creștere lentă**: *M. avium* subsp. *hominissuis*, CMA, *M. lentiflavum*, *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. intracellulare*, *M. avium* subsp. *avium* cât și **MNT cu creștere rapidă**: *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. septicum*/

M. porcinum, *M. setense*, *M. insubricum*, *M. peregrinum*/*M. porcinum*, *M. mageritense*, *M. mucogenicum*, *Mycobacterium spp.*, rezultate care întăresc **originalitatea** acestei teze.

4. În pofida limitărilor impuse de perioada scurtă a studiului (2 ani), de originea probelor dintr-un singur laborator și de numărul relativ redus de izolate analizate (66), acesta este **primul studiu** realizat în România cu privire la **diversitatea MNT** izolate din probe respiratorii de **la oameni**.
5. Studiul nostru a concluzionat că procedurile de diagnostic de laborator pentru MNT sunt variate și insuficiente în același timp, fiind necesare **investigații suplimentare** pentru caracterizarea și identificarea fiecărei probe până la nivel de specie și subspecie, cu precădere în cazul membrilor CMA.
6. Mai mult decât atât, **compararea rezultatelor** noastre cu contextul epidemiologic furnizat de literatura de specialitate s-a dovedit greoaie, datorită informațiilor limitate privind prevalența speciilor de MNT în România, absenței unui sistem de raportare în majoritatea țărilor precum și metodelor de diagnostic folosite în diferite laboratoare.
7. Diagnosticul clinic și de laborator al MNT rămâne în continuare o provocare deoarece identificarea speciilor nu este realizată în toate laboratoarele, aspect care ar putea duce la o **subestimare a prevalenței reale** a MNT.
8. Deoarece speciile de MNT izolate sunt prezente în diverse nișe din mediul înconjurător, cum ar fi rețelele de apă, identificarea lor în specimene nesterile se poate datora contaminării circumstanțiale sau colonizării. Astfel, **relevanța clinică** a speciilor izolate trebuie evaluată cu meticulozitate și cu circumspecție de către medici.

CAPITOLUL 7.

INVESTIGAȚII PRIVIND DIVERSITATEA MOLECULARĂ A TULPINILOR DE MICOBACTERII ÎNCADRATE ÎN COMPLEXUL *MYCOBACTERIUM AVIUM*

CHAPTER 7.

INVESTIGATIONS REGARDING MOLECULAR DIVERSITY OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX STRAINS

Tipizarea moleculară este un proces care permite identificarea diferitelor tipuri de organisme din cadrul aceleiași specii. Modelele fenotipice au fost, pentru mult timp, singurele abordări disponibile în acest scop. Deși încă utilizate pe scară largă și considerate esențiale în practica de laborator, acestea au fost înlocuite treptat cu metode moleculare care au capacitatea de a examina înrudirea microorganismelor la nivel genomic. Genotiparea este un instrument epidemiologic foarte important, utilizat adesea în programele de supraveghere și care poate servi la identificarea sursei de infecție în cazul apariției unui focar de boală. Una dintre metodele simple, bazate pe PCR, care are o putere înaltă de discriminare, este tehnica MIRU-VNTR („Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats”).

În genomul bacterian sunt prezente numeroase secvențe repetitive, un exemplu în acest sens fiind familia repetițiilor în tandem (TR). Unele TR sunt polimorfe datorită prezenței variațiilor numărului de copii ale repetițiilor, astfel de loci fiind numiți VNTR - repetiții în tandem cu număr variabil. Numărul unităților repetate adiacente variază de la individ la individ. VNTR-urile sunt unități care suferă frecvent variații ale numărului de copii, ce se pot observa cu ușurință atunci când bacteriile conțin TR de diferite lungimi în același locus (Chang ș.a., 2007). Diferențele de mărime într-un locus VNTR pot apărea în urma inserțiilor, delețiilor sau duplicărilor din regiunea amplificată, care pot provoca variații ale dimensiunii locusului (Figuerola, Tang și Taur, 2015).

Datorită polimorfismului lor, VNTR-urile au fost utilizate ca markeri ADN pentru identificarea moleculară sau caracterizarea diversității a numeroase specii bacteriene, precum *Staphylococcus aureus* (Bergonier ș.a., 2014), *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* (Vogler ș.a. 2016), *Francisella tularensis* (Farlow ș.a., 2001), *Legionella pneumophila* (Pourcel ș.a., 2003), *Salmonella typhimurium* și *Salmonella enteritidis* (Jensen ș.a., 2017), *Clostridium difficile* (Schneeberg ș.a., 2013), *Haemophilus influenzae* (Nejati ș.a., 2018), *Neisseria meningitidis* (Yazdankhah ș.a., 2005) *Mycobacterium tuberculosis* (Frothingham, Meeker-O’Connell, 1998, Jagielski ș.a., 2014).

Primele VNTR-uri au fost descrise de Frothingham și Meeker-O’Connell la *M. tuberculosis* (Frothingham, Meeker-O’Connell, 1998). Pentru a vedea utilitatea acestora în

tipizarea tulpinilor, 11 loci de repetiții în tandem, diferiți, au fost evaluați de autori privind variabilitatea numărului de repetiții. Două tipuri distincte de secvențe repetitive au fost analizate: cinci repetiții în tandem polimorfe majore - MPTR A, B, C, D și E și șase repetiții în tandem exacte - ETR A, B, C, D, E, F (Jagielski ș.a., 2016).

MPTR-urile conțin repetiții de 10 pb, separate prin secvențe unice de 5 pb. Acestea sunt distribuite pe scară largă printre speciile genului *Mycobacterium*, precum cele incluse în CMTB, cât și *M. gordonae*, *M. kansasii* și *M. szulgai* (Jagielski ș.a., 2014, 2016). Secvențele MPTR se regăsesc în capetele 3' ale genelor care codifică proteinele PPE (numite astfel după regiunile conservate Pro-Pro-Glu (PPE) în apropierea terminalului N al moleculei). Este speculat faptul că polimorfismul prezent în domeniile C-terminale ale proteinelor PPE, corelat cu prezența motivelor MPTR, constituie sursa variabilității antigenice pentru *M. tuberculosis*. ETR-urile reprezintă repetiții în tandem cu dimensiuni mai mari față de cele descrise anterior, de la 53 la 79 pb. În urma analizei polimorfismului acestor elemente, numai cinci loci ETR (de la ETR-A la ETR-E) sunt utilizați pentru genotiparea tulpinilor de *M. tuberculosis* (Jagielski ș.a., 2016; Moström ș.a., 2002).

Tehnica de lucru, în cea mai simplă formă, utilizează un PCR multiplex pentru a amplifica diferite localizări VNTR selectate, urmat de analiza standard a ampliconilor în gelul de agaroză. Avantajele acestei metode sunt simplitatea și costul relativ redus, fiind o tehnică discriminatoare și reproductibilă (Figueroa, Tang și Taur, 2015).

Elementele repetitive specifice micobacteriilor (MIRU - unități repetitive micobacteriene intercalate) au fost descrise de Supply și colaboratorii pentru *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG și *M. leprae* (Supply ș.a., 1997). În genomul tulpinii *M. tuberculosis* H37Rv, au fost identificate 41 de zone cu astfel de secvențe repetitive în tandem. Doisprezece dintre acești loci au demonstrat o variabilitate suficientă pentru a fi utilizați ca markeri de diferențiere a tulpinilor, MIRU-4 și MIRU-31 fiind identici cu ETR-D, respectiv ETR-E (Frothingham ș.a., 1998).

MIRU-urile au fost inițial caracterizate ca fiind repetiții în tandem, cu dimensiuni ce variază între 46 și 101 pb, dispersate în 41 de loci în genomul *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CDC155 și *Mycobacterium bovis* AF2122 / 97 (Supply ș.a., 2000)

Unitățile MIRU au fost inițial identificate în regiunea inter-cistronică a unui operon care codifică un sistem cu două componente, numit senX3 – regX3. Aceste secvențe se disting de alte tipuri de repetiții prin faptul că nu conțin simetrii *dyad* (palindroame), dar conțin mici cadre de citire deschise - ORF (Supply ș.a., 1997). Majoritatea MIRU se suprapun cu codonii finali și cu cei de inițiere a genelor flancante. MIRU se caracterizează, comparativ cu alte tipuri de secvențe repetitive în tandem, prin prezența elementelor regulatorii, prin codonii de inițiere și de stop și consensul față de locul de legare a ribozomului 5-TGA GGA GGA GC-3. În cadrul acestor loci, polimorfismul se poate datora fie schimbărilor secvenței nucleotidice în rândul unităților repetitive individuale, fie variației numărului acestora (Romano ș.a., 2005) prin inserții sau deleții. MIRU-VNTR sunt prezente în diferite sisteme metabolice sau de reglare, cu rol în transducția semnalelor, în producția de energie și în sinteza sau degradarea lipidelor, proteinelor sau acizilor nucleici (Romano ș.a., 2005).

Comparativ cu alte tehnici, precum spoligotiparea sau IS6110-RFLP (polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție pentru elementul de inserție IS6110), utilizarea elementelor MIRU-VNTR oferă o putere mai mare de discriminare, în special pentru izolatele ce aparțin CMTB, cu un număr mic de copii ale IS6110. Acest aspect le face potrivite pentru studii epidemiologice pe termen lung (Pan ș.a., 2017, Mears ș.a., 2015).

MIRU au fost utilizate în studii de tipizare și de variabilitate genetică pentru numeroase specii de micobacterii, precum *M. tuberculosis* (Supply, 2006), *M. bovis* (Hauer ș.a., 2016; Rodriguez-Campos ș.a., 2013), *M. marinum* (Broutin ș.a., 2012) și *M. ulcerans* (Stragier, 2005; Ablordey ș.a., 2005), *M. kansasii* (Bakula ș.a., 2018), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Thibault ș.a., 2007;), *M. avium* subsp. *hominissuis* (Pate, 2011), *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *avium* (Ronai ș.a., 2016; Radomski ș.a., 2010).

Studiul realizat de Bull T. și colaboratorii evidențiază patru loci MIRU care pot fi utilizați ca unealtă de diagnostic molecular diferențial între *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium* și *M. intracellulare*. În funcție de acești loci, autorul încadrează tulpinile de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* testate în 4 profile și pe cele de *M. avium* subsp. *avium* în 5 profile, subliniind astfel utilitatea metodei pentru identificarea și tipizarea subspeciilor *M. avium* (Bull ș.a., 2003).

Overduin și colaboratorii au identificat patru tipuri diferite de VNTR și două mutații punctiforme în regiunile flancante VNTR la 24 de tulpini de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* aparținând aceluiași profil RFLP, R01. Identificarea acestor elemente s-a realizat pornind de la genomul tulpinii 104 (număr de acces în GenBank: NC_002943), comparat cu secvența nucleotidică completă disponibilă pentru *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, tulpina K10 - NC_002944 (Overduin ș.a., 2004).

Cercetările efectuate de Thibault și colaboratorii au urmărit examinarea exhaustivă a potențialilor loci VNTR, în baza identificării *in silico* a repetițiilor în tandem prezente în genomul tulpinii K10 și a testării unui set de tulpini de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* și *M. avium*. Un lot inițial de 33 de loci TR, selectați pentru a corespunde dimensiunilor optime, de 20-60 pb și numărului de repetiții - minim două dar și procentului de omologie dintre acestea - minim 85%, au fost testați alături de doi loci MIRU identificați prin utilizarea primerilor specifici pentru două locații polimorfe MIRU-VNTR specifice lui *M. tuberculosis*. Opt regiuni cu repetiții în tandem au fost identificate ca fiind markeri utili în identificarea și diferențierea moleculară (Thibault ș.a., 2007).

Cei 8 loci identificați: 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10, 32 au fost utilizați și în numeroase alte studii la nivel mondial pentru tipizarea tulpinilor de *M. avium* subsp. *hominissuis* izolate din așternut, fecale și limfonoduri de la suine în Norvegia (Agdestein ș.a., 2014), pentru observarea înrudirii genetice a tulpinilor de *M. avium* subsp. *hominissuis* izolate de la oameni și porcine în Finlanda (Tirkkonen ș.a., 2010), pentru elucidarea diversității genetice a acestei specii izolate de la bovine în Elveția (Scherrer ș.a., 2018), pentru caracterizarea diversității geografice a izolatelor umane clinice și din mediu de *M. avium* (Dirac ș.a., 2013) cât și într-un studiu epidemiologic privind transmiterea lui *M. avium* subsp. *paratuberculosis* între cerbul sălbatic și bovinele de crescătorie, într-o zonă cu restricții geografice din Germania (Fritsch ș.a., 2012).

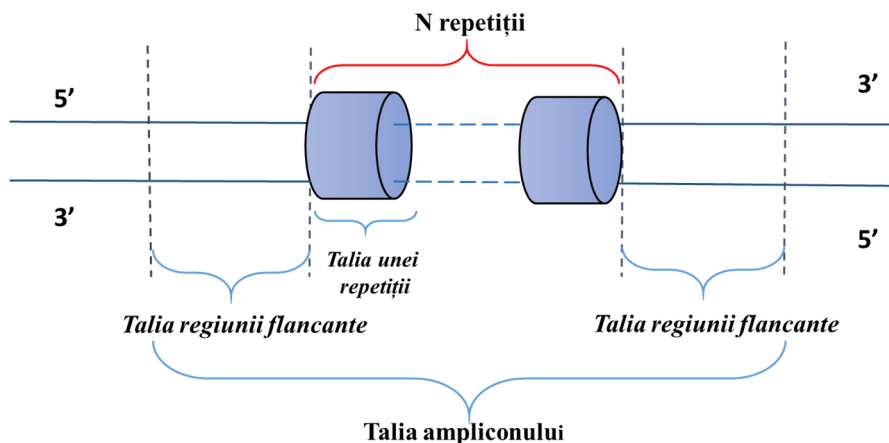


Figura 7.1 Structura unui amplicon MIRU-VNTR. Talía ampliconului (în perechi de baze) obținut reprezintă suma taliilor regiunilor flancante și a raportului dintre talía unei secvențe repetitive și N - numărul de repetiții (după Radomski, 2007)

Figure 7.1 MIRU-VNTR amplicon. The size of the obtained amplicon (in base pairs) is the sum of the lengths of the the flanking regions and the product between the length of a repetitive sequence and N - the number of repeats (after Radomski, 2007)

Studiul realizat de Radomski și colaboratorii a urmărit analiza capacității de tipizare a tehnicii MIRU-VNTR pentru diferențierea izolatelor de *M. avium* și identificarea eventualelor profile specifice subspeciilor, pentru o mai bună caracterizare și detecție a modelelor de transmitere între specii (Radomski ș.a., 2010). Autorii utilizează același set de loci, anterior menționat, pe un eșantion de tulpini izolate de la diverse specii de animale și păsări domestice și sălbatice dar și de la oameni.

Metoda MIRU-VNTR constituie un sistem de tipizare a micobacteriilor cu o putere discriminatorie similară sau mai ridicată comparativ cu tehnica RFLP, tipizare ce poate fi utilizată atât singură cât și acompaniată de spoligotipare sau RFLP pentru elementele de inserție specifice sușelor urmărite. În general, protocolul de lucru MIRU-VNTR cuprinde o etapă inițială de amplificare a regiunilor țintă, folosind primeri specifici regiunilor flancante, unice, urmată de o etapă secundară, de stabilire a dimensiunii ampliconilor obținuți, etapă realizată prin electroforeză. Odată identificată lungimea ampliconului și fiind cunoscute dimensiunile unităților repetitive, se poate determina numărul de repetiții, în perechi de baze specifice fiecărui locus testat (Fig. 7.1). Rezultatul obținut este un cod numeric care facilitează compararea rezultatelor între testări dar și între laboratoare.

Obiectivul prezentului studiu a fost investigarea diversității moleculare și tipizarea tulpinilor de micobacterii nontuberculoase identificate în probele provenite de la pacienți umani dar și de la rumegătoare domestice și de la găinile luate în studiu, tulpini incluse în cadrul CMA în urma evaluării rezultatelor obținute prin TaqMan real-time PCR și prin secvențierea acestora. Analiza MIRU-VNTR a fost aleasă ca metodă de tipaj datorită capacității înalte de discriminare, reproductibilității și fiabilității acesteia.

7.1. Identificarea profilelor MIRU-VNTR pentru tulpinile de MNT de origine umană aparținând Complexului *Mycobacterium avium*

7.1.1. Material și metodă

7.1.1.1. Probe

În realizarea acestui studiu au fost utilizate sușe de MNT izolate de la pacienți umani, în perioada mai 2015-martie 2017, în Laboratorul de Bacteriologie din cadrul Spitalului Clinic de Pneumoftiziologie din Iași. În urma identificării acestora până la nivel de specie bacteriană, prin secvențiere conform tehnicilor descrise în **Capitolul 6**, un număr de 23 de tulpini au fost încadrate în Complexul *M. avium*. Dintre acestea au fost selectate doar cele care au exprimat o valoare a Ct pentru ținta *Hsp65* situată sub 30 de cicluri (Tabelul 7.1), fiind eliminate trei izolate pentru care valoarea Ct înregistrată a fost tardivă (peste 30 cicluri).

Tabelul 7.1/ Table 7.1

Tulpinile de MNT, izolate de la pacienți umani, selectate pentru MIRU - VNTR
Human NTM isolates selected for MIRU - VNTR

Nr. Crt	Cod de identificare	Rezultat secvențiere	Identificare prin PCR în timp real	Real-time PCR <i>Hsp65</i>
1	I17-001	CMA	CMA.	22,36
2	I17-003	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	21,18
3	I17-013	CMA	CMA	19,79
4	I17-030	<i>M. intracellulare</i>	CMA / <i>Mycobacterium</i> sp.	21,45
5	I17-035	CMA	CMA	19,55
6	I17-040	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	18,73
7	I17-041	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	20,79
8	I17-045	NI	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	19,3
9	I17-048	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	20,76
10	I17-049	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	21,33
11	I17-050	CMA	CMA	20,17
12	I17-052	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	22,72
13	I17-057	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	21,07
14	I17-060	NI	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	19,92
15	I17-061	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	21,03
16	I17-067	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	20,27
17	I17-068	NI	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	19,95
18	I17-070	CMA	CMA	21,03
19	I17-078	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	20,65
20	I17-097	<i>M. intracellulare</i>	CMA / <i>Mycobacterium</i> sp.	18,7

*NI = neindentificat;

Pentru diferențierea și caracterizarea acestora a fost utilizată tehnica MIRU-VNTR, conform protocolului descris de Thibault și colaboratorii (Thibault ș.a., 2007), cu adaptări ale reactivilor și în concordanță cu mențiunile specificate de Radomski N., 2007.

7.1.1.2. Amplificarea genică prin tehnica PCR clasic

Tipizarea sușelor selectate prin tehnica MIRU-VNTR a fost efectuată utilizând panelul de 8 loci TR: MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 și 32, în această ordine, pentru obținerea profilelor numerice și utilizând amorsele specifice fiecărui locus în parte. Secvențele nucleotidice ale primerilor sunt descrise în tabelul 7.3.

O cantitate de 2 μ l din fiecare lizat obținut conform metodei descrise anterior, în subcapitolul 5.1.5.1 Extracția acidului nucleic (ADN), a fost utilizată în efectuarea PCR-ului clasic. Desfășurarea reacțiilor s-a realizat într-un volum total final de 25 μ l, pentru amplificarea ADN-ului fiind utilizat termociclorul BIO RAD MyCycler™ Thermal Cycler System. Pentru fiecare locus a fost constituit un amestec de reacție (*master-mix*) diferit, utilizând primerii specifici și kitul GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Statele Unite ale Americii), conform datelor prezentate în Tabelul 7.2.

Amestecul reacțional pentru locusul X3 prezintă o particularitate, volumul de soluție tampon Q fiind înlocuit cu apă ultrapură. Parametrii de temperatură și de timp ai programului de amplificare utilizat sunt prezentați în tabelul 7.3. Conform specificațiilor producătorului, soluția Q (Qiagen) facilitează amplificarea secvențelor dificile, bogate în GC, aspect ce poate fi întâlnit în cazul micobacteriilor.

Spre deosebire de alți aditivi PCR folosiți în mod obișnuit, cum ar fi DMSO (dimetilsulfoxid), soluția Q se utilizează la o singură concentrație de lucru și nu este toxică.

Tabelul 7.2/Table 7.2

Reactivi utilizați pentru amplificarea MIRU 292, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 și 32
(după Radomski N., 2007)

Reactives used for the amplification of loci MIRU 292, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 and 32
(after Radomski N., 2007)

Reactivi	Cantitate/reacție
<i>Apă ultrapură</i>	10,7 μ L
<i>Tampon Green 5X</i>	5 μ L
<i>DNTP 25mM</i>	0,2 μ L
<i>Primer sens 20μM</i>	1 μ L
<i>Primer antisens 20μM</i>	1 μ L
<i>Tampon Q 5X</i>	5 μ L
<i>Taq polimerază GoTaq 5U/μL</i>	0,1 μ L

Utilizarea tamponul Green GoTaq™ 5X (Promega) elimină necesitatea de a adăuga soluții de încărcare înainte de electroforeză. Reactivul conține doi coloranți, unul albastru și unul galben, care se separă și migrează diferit, aspect extrem de util în monitorizarea progresului fragmentelor de ADN amplificate.

Programul de amplificare utilizat
Amplification programme

Etapă	Temperatură	Durată	Numărul de cicluri
<i>Denaturare inițială</i>	94°C	5 min	40 cicluri
<i>Denaturare</i>	94°C	30 s	
<i>Hibridizare</i>	58°C	30 s	
<i>Elongare</i>	72°C	30 s	
<i>Elongare finală</i>	72°C	7 min	
<i>Menținere</i>	12°C	∞	

Electroforeza și analiza ampliconilor obținuți

Analiza produșilor de amplificare obținuți s-a realizat prin electroforeză, la un voltaj de 45V, peste noapte, cu o etapă inițială de 3 minute la un voltaj de 130V, utilizând un gel de agaroză de concentrație 3%. În acest scop, au fost utilizate două tipuri de agaroză: MetaPhor® Agarose și SeaKem® GTG® Agarose (Lonza, Elveția) și tampon TAE 0,5X (Tris-acetate-EDTA) și GelRed (Biotium). Produsul MetaPhor conferă o rezoluție înaltă pentru fragmentele mici (20 pb - 800 pb) iar GTG permite diferențierea produșilor de dimensiuni ce variază de la 100 pb până la 23 kb. Au fost utilizați markeri de talie moleculară de 20pb (EZ Load™ 20 bp Molecular Ruler, Bio-Rad) și de 100 pb (100bp DNA Ladder Plus, EUROMEDEX).

Vizualizarea gelului a fost realizată cu sistemul ChemiDoc XRS (BioRad), în lumină ultravioletă iar pentru prelucrarea și înregistrarea imaginii obținute a fost utilizat soft-ul Quantity One 1-D.

Ulterior, a fost determinată dimensiunea ampliconilor obținuți pentru fiecare probă testată, prin compararea cu markerul de talie. Utilizând datele din tabelul de conversie (Tabelul 7.4 și Tabelul 7.6), a fost identificat numărul de repetiții prezente pentru fiecare locus în parte. S-a obținut astfel un cod din 8 cifre care a fost comparat cu datele prezente pe platforma on-line “Mac INMV database” - <http://mac-inmv.tours.inra.fr> (INMV = INRA Nouzilly MIRU-VNTR).

Tabelul 7.4/ Table 7.4

Talia secvențelor repetitive în tandem (TR) și a regiunilor flancante specifice fiecărui locus
(Tours INRA, Biet ș.a., 2005, Thibault ș.a., 2007)
Size of the TRs and the flanking regions, specific for each locus
(Tours INRA, Biet et al., 2005, Thibault et al., 2007)

<i>LOCUS</i>	292	X3	25	47	3	7	10	32
TR bp	53	53	58	35	27	22	55	18
Regiuni flancante pb	141	94	176	112	154	159	193	154

În scopul validării metodei folosite și pentru compararea rezultatelor au fost utilizați trei martori pozitivi - sușe aflate în banca de probe a Unității de Zoonoze Bacteriene ANSES-FR și un martor negativ (apă ultrapură). Profilele MIRU-VNTR ale martorilor pozitivi utilizați pentru locii luați în studiu au fost determinate într-un studiu anterior de

către Radomski N. (2007). Astfel, au fost incluse în reacții o tulpină de *M. avium subsp. hominissuis* - INMV 86: 05321128, o tulpină de *M. avium subsp. Avium* INMV 88: 21131117 și o tulpină de *M. avium silvaticum* INMV 99: 24131117.

Tabelul 7.5/Table 7.5

Tabelul de conversie a mărimii ampliconului obținut (pb) în număr de repetiții în tandem (TR), conform metodei MIRU-VNTR dezvoltată pentru tulpina de referință *M. avium subsp. paratuberculosis* K10 (Tours INRA, Biet ș.a., 2005, Thibault ș.a., 2007)

Conversion table of obtained amplicon size (pb) in number of tandem repeats (TR) according to the MIRU—VNTR method developed for *M. avium subsp. paratuberculosis*K10 reference strain (INRA Tours, Biet et al., 2005, Thibault et al., 2007)

Locus								
TR	292	X3	25	47	3	7	10	32
0	141	94	176	112	154	159	193	154
1	194	147	234	147	181	181	248	172
2	247	200	292	182	208	203	303	190
3	300	253	350	217	235	225	358	208
4	353	306	408	252	262	247	413	226
5	406	359	466	287	289	269	468	244
6	459	412	524	322	316	291	523	262
7	512	465	582	357	343	313	578	280
8	565	518	640	392	370	335	633	298
9	618	571	698	427	397	357	688	316
10	671	624	756	462	424	379	743	334
11	724	677	814	497	451	401	798	352
12	777	730	872	532	478	423	853	370

Determinarea puterii de discriminare

Puterea discriminatorie a unei metode de tipaj constă în abilitatea acesteia de a distinge între două sușe diferite. Aceasta este determinată de numărul de tipuri distincte definite de metoda de testare și de frecvențele relative ale acestor tipuri (Hunter și Gaston, 1988). Indicele de discriminare (DI), descris de Hunter și Gaston, a fost folosit ca un indice numeric pentru puterea discriminatorie a metodei de tipaj MIRU VNTR dar și pentru stabilirea capacității de discriminare a fiecărui locus.

Indicele de discriminare (DI) a fost calculat utilizând software-ul disponibil on-line: http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/, cu următoarea formulă:

$$DI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

unde:

DI = indice de discriminare

N = numărul total de sușe supuse testării

n_j = numărul de sușe ce aparțin aparținând fiecărui tip

s = numărul total de tipuri differentiate

Tabelul 7.6/Table 7.6

Secvențele nucleotidice ale amorselor utilizate pentru amplificarea fiecărui locus (Thibault V. ș.a., 2007)

Nucleotide sequences of the primers used to amplify each locus (Thibault V. ș.a., 2007)

Locus TR	Poziția primerilor în genomul MAP K10		Primeri sens (5'-3')	Primeri antisens (5'-3')	Talia ampliconului obținut (pb)
292	3253590	3253889	CTTGAGCAGCTCGTAAAGCGT	GCTGTATGAGGAAGTCTATTCATGG	300
X3	4441875	4442070	AACGAGAGGAAGAATAAGCCG	TTACGGAGCAGGAAGGCCAGCGGG	196
25	3665598	3665947	GTCAAGGGATCGGCGAGG	TGGACTTGAGCACGGTCAT	350
47	4128604	4128821	CGTTGCGATTTCTGCGTAGC	GGTGATGGTCGTGGTCATCC	217
3	131320	131527	CATATCTGGCATGGCTCCAG	ATCGTGTTGACCCCAAAGAAAT	208
7	3711417	3711619	GACAACGAAACCTACCTCGTC	GTGAGCTGGCGGCCTAAC	203
10	4279553	4279855	GACGAGCAGCTGTCCGAG	GAGAGCGTGGCCATCGAG	303
32	1125707	1126004	CCACAGGGTTTTTGGTGAAG	GGAAATCCAACAGCAAGGAC	298

7.1.2. Rezultate și discuții

În prezentul studiu, 20 de tulpini identificate ca aparținând complexului *M. avium* au fost tipizate prin tehnica MIRU-VNTR. În urma amplificării specifice pentru fiecare locus selectat, au fost evaluate dimensiunile ampliconilor obținuți pentru fiecare probă, fiind identificat numărul de repetiții în tandem, conform tabelului de conversie. Cu excepția sușei I17-030, care nu a prezentat amplificare pentru locusul VNTR 10, toate tulpinile selectate au putut fi tipizate prin această tehnică. Coroborarea datelor obținute prin genotipare cu cele furnizate de identificarea moleculară prin secvențiere a făcut posibilă identificarea definitivă a fiecărei probe.

Analiza diversității genetice a izolatelor a condus la identificarea a trei populații, cu profile diferite: 03331158, 02331128 și 24131127. Un profil parțial, 033311-8, a fost obținut pentru proba I17-030 (identificată ca *M. intracellulare*), pentru care lipsește numărul de repetiții corespunzătoare locusului 10, toate celelalte fiind identice cu profilul majoritar.

Utilizând numărul repetițiilor corespunzătoare fiecărui locus în baza de date “Mac INMV database” - <http://mac-inmv.tours.inra.fr>, au fost identificate profilele INMV (INMV = INRA Nouzilly MIRU-VNTR). Astfel, majoritatea tulpinilor testate se încadrează în profilul INMV 209 - 03331158, așa cum se observă și din Fig. 7.2. Profilul 0231128 corespunde INMV 165 iar 24131127 corespunde cu INMV 100.

În ansamblu, locii 3, 7 și 47 nu au prezentat diversitate alelică ($DI = 0$, Fig. 7.7), diminuând astfel din puterea discriminatorie a acestui instrument de tipizare moleculară. Restul locilor analizați au contribuit la diferențierea probelor testate.

Tabelul 7.7/ Table 7.7

Puterea de discriminare (DI) a fiecărui locus, pentru probele umane
Discriminatory power of each locus, for human samples

TR	LOCUS								
	292	X3	25	47	3	7	10	32	
-	0	0	0	0	0	0	1	0	Numărul probelor cu profil identic
0	18	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	2	0	20	20	0	0	
2	2	1	0	0	0	0	3	0	
3	0	17	18	20	0	0	0	0	
4	0	2	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	16	0	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	2	
8	0	0	0	0	0	0	0	18	
DI	0.189	0.278	0.189	0	0	0	0.352	0.189	

A fost obținut un $DI = 0.3632$, considerând raportarea la 20 de probe și 4 profile. Valoarea indicelui de discriminare este mult scăzută comparativ cu valorile menționate în literatura de specialitate pentru același set de loci utilizați pentru genotipare. Aceste valori pot fi atribuite atât unei rate de mutații mai scăzute, cât și unei rate mai mari de homoplazie (Thibault ș.a., 2008). Fenomenul este inevitabil în cazul analizei VNTR sau spoligotipării, când se utilizează markeri moleculari care se bazează pe secvențe ce pot fi traduse printr-un număr finit de caractere (Reyes ș.a., 2012).

Utilizarea mai multor regiuni TR în analiza genotipică conduce la reducerea nivelului de homoplazie, aspect observat și în studiul efectuat asupra diversității genotipice a tulpinilor de *M. avium* subsp. *hominissuis* izolate de la oameni, bovine și porcine de către Muwonge și colaboratorii, în Uganda (Muwonge ș.a., 2014).

Profilul INMV 165, identificat în studiul nostru pentru un singur extract, I17-097, este descris pentru o tulpină izolată de la suine, autorii folosind, alături de loci TR descriși de Thibault ș.a., alți 4 loci utilizați anterior de Inagaki ș.a., 2009: MATR1, MATR7, MATR13, MATR14, izolatul descris prezentând polimorfism la MATR7 (Muwonge ș.a., 2014). Același profil este descris și de către Tirkkonen și colaboratorii, pentru o tulpină de origine umană (Tirkkonen ș.a., 2010).

Este important de remarcat apariția unui profil majoritar: 03331158, cu toate că numărul total de probe este redus iar acestea provin de la pacienți din zone diferite de pe teritoriul județului Iași dar și din județe învecinate: Vaslui, Suceava, Neamț. Absența corelației între profilul alelic și originea geografică ar putea fi explicată printr-o transmitere indirectă la animale sau oameni, prin intermediul unei surse comune din mediu.

Rezultatele unor studii epidemiologice la nivel european întăresc ipoteza conform căreia poate exista o sursă comună de infecție cu *M. avium* pentru porci și oameni sau, alternativ, suinele ar putea constitui o sursă pentru infecțiile umane și invers (Tirkkonen ș.a., 2010; Bjordal Johansen ș.a., 2007, Argueta C. ș.a., 2000).

Cercetările efectuate de Iwamoto și colaboratorii denotă însă o contribuție limitată a porcilor, fiind observat faptul că izolatele clinice din Japonia au prezentat un grad redus de similitudine cu cele porcine, spre deosebire de cele provenite de la pacienți și porci din Europa (Franța și Finlanda), care apar mai apropiate genetic (Iwamoto ș.a., 2012).

Întărind ideea existenței divergențelor evolutive sau a diferențelor de sursă de infecție, studiile recente au identificat un grad de similitudine genetică scăzut între izolatele de *M. avium* subsp. *hominissuis* din Asia și cele din Europa sau America (Ichikawa ș.a., 2015, Uchiya ș.a., 2017).

Pornind de la analiza unei serii de markeri diferiți, independenți și cu o bună putere de discriminare, tipizarea MIRU-VNTR este potrivită în special pentru analiza complexilor clonali și a grupărilor filogenetice, mai ales atunci când este utilizată abordarea modelelor matematice prin arbori filogenetici.

Pentru 18 din cele 20 de probe testate se poate observa încadrarea clară a tulpinilor de *M. avium* subsp. *hominissuis* într-un complex, marcate în figura 7.2 de culoarea roz și prin profilele INMV corespunzătoare. Astfel, între populația caracterizată de profilul INMV 209 și cea cu profilul INMV 165 apar două diferențe, conform numărului distinct de repetiții

pentru locii X3 și 10 (Fig. 7.3). Existența unei singure diferențe față de profilul majoritar și anume absența amplificării pentru locusul 10, în cazul tulpinii I17-030, face ca aceasta să se încadreze în același complex, însă separat de populațiile anterior menționate, neputând fi descris profilul INMV. Lipsa unui rezultat la acest nivel se poate datora polimorfismului secvenței țintă sau absenței acestui locus în respectiva tulpină. A patra populație, corespunde profilului INMV 100, descris pentru *M. avium* subsp. *avium* și se diferențiază de INMV 165 prin numărul de TR pentru 4 din cei 8 loci și, comparativ cu INMV 209, printr-un număr diferit de repetiții pentru 5 loci.

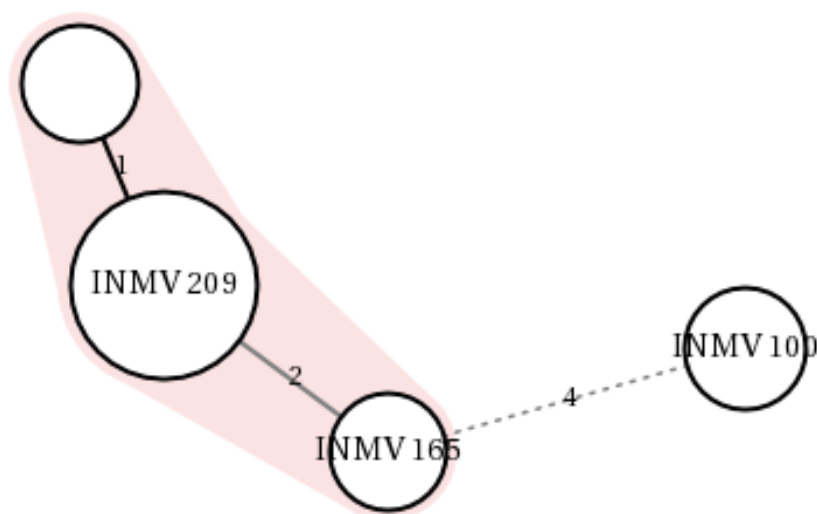


Figura 7.2 Arbore filogenetic realizat utilizând profilele MIRU-VNTR obținute pentru probele testate și folosind instrumente disponibile în aplicația web MIRU-VNTRplus (original)

Figure 7.2 Minimum Spanning Tree obtained with the MIRU-VNTR profiles, using the application available on MIRU-VNTRplus database (original)

*Dimensiunea fiecărui cerc este corelată cu numărul de izolate al fiecărui profil identificat; *Numărul corespunzător fiecărei linii ce unește diferitele clone este reprezentativ pentru distanța genetică dintre acestea, echivalent diferenței în numărul de repetiții ale fiecărui locus; *INMV = INRA Nouzilly MIRU-VNTR

* The circle's size is correlated with the number of isolates of each profile. * The number on each joining line is representative for the genetic distance between the different clones, equivalent to the difference in the number of tandem repeats for each locus; *INMV = INRA Nouzilly MIRU-VNTR

Profilul majoritar în studiul prezent, INMV 209, a fost descris de către Scherrer și colaboratorii într-un studiu efectuat în Elveția, utilizând sușe izolate de la bovinele din abator, pentru o tulpină de *M. avium* subsp. *hominissuis* izolată din limfonoduri fără modificări patologice de la o bovină sănătoasă (Scherrer ș.a., 2018).

Profilul INMV 100 este corelat cu *M. avium* subsp. *avium*, izolat de la păsări domestice sau sălbatice dar și de la diverse specii de mamifere, sugerând posibilitatea infecției între specii sau dintr-o sursă comună, o formă de adaptare la noi gazde. Două dintre probele testate, izolate de la același pacient, corespund profilului INMV 100, identificat de Radomski și colaboratorii pentru mai multe probe izolate de la diverse specii de mamifere: suine, bovine, caprine, de la păsări sălbatice, precum ibisul roșu (*Eudocimus ruber*) sau de

la păsări de curte (Radomski N., 2007, Radomski N. ș.a. 2010). Același profil a fost identificat în România de către Macovei I., într-un izolat de la o găină de curte (Macovei ș.a., 2013) iar în studiul prezent în două dintre probele testate, de la găini de curte (Subcapitolul 7.2).

Corelând rezultatele obținute la TaqMan PCR în timp real pentru ținta IS901 (subcapitolul 6.2.2) cu profilele identificate pentru aceleași probe, se remarcă faptul că, pentru tulpinile încadrate în profilul majoritar 03331158 apar atât răspunsuri negative pentru elementul de inserție anterior menționat, cât și valori de CT tardive (>32,56). Această secvență este utilizată pentru diferențierea între subspeciile *M. avium*, fiind specifică izolatelor de *M. avium* subsp. *avium* și *M. avium* subsp. *silvaticum* de la păsări. Pavlik și colaboratorii (2000) identifică secvența în doar 8% din izolatele clinice și în 3,6 % din cele de mediu iar în studiul efectuat de Alvarez și colaboratorii, toate izolatele testate au fost IS901-negative (Pavlik ș.a., 2000 A, Alvarez ș.a., 2008).

Radomski N. observă modul în care pentru același profil MIRU-VNTR au fost obținute răspunsuri diferite, identificând șușe IS901-slab pozitive în cazul profilelor asociate cu *M. avium* subsp. *hominissuis* (Radomski, 2007). Secvența de inserție ISMav6, omologă IS901, pentru care a fost observată reactivitate încrucișată în izolatele clinice japoneze (Ichikawa ș.a., 2009), ar putea explica rezultatele pozitive sau valorile CT tardive.

În scopul observării directe a relațiilor filogenetice dintre izolatele testate, pe baza profilurilor alelice obținute pentru cele opt poziții VNTR, a fost construită o dendrogramă (Figura 7.3), utilizând metoda *Neighbor Joining* (NJ) și aplicațiile disponibile pe site-ul www.miru-vntrplus.org. Izolatele de *M. avium* subsp. *hominissuis* ce au exprimat profilul alelic 03331158 se grupează separat de celelalte izolate. În structura complexului clonal evidențiat în figura 7.2, se remarcă izolarea față de profilul majoritar a profilului INMV165-02331128, specific *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Cu toate acestea, izolatele cu profile VNTR identice nu reflectă perfect o relație filogenetică, deoarece pot exista diferențe în alte elemente genetice (Scherrer ș.a., 2018). În general, loci VNTR ce prezintă o variabilitate mai mare sunt considerați markeri utili pentru diferențierea izolatele strâns înrudite iar cei cu o variabilitate mai mică sunt adecvați pentru clarificarea unor relații filogenetice între tulpini sau clone care au evoluat într-un interval de timp mai îndelungat.

Pentru asigurarea bunei discriminări dar și a reproductibilității tehnicii, este necesar să se respecte etapele de lucru, având în vedere faptul că factorii care influențează denaturarea produșilor PCR și, prin urmare, liniaritatea lor înainte de dimensionarea fragmentului prin electroforeză, pot influența dimensiunile ampliconilor și implicit numărului de copii corespunzător repetițiilor.

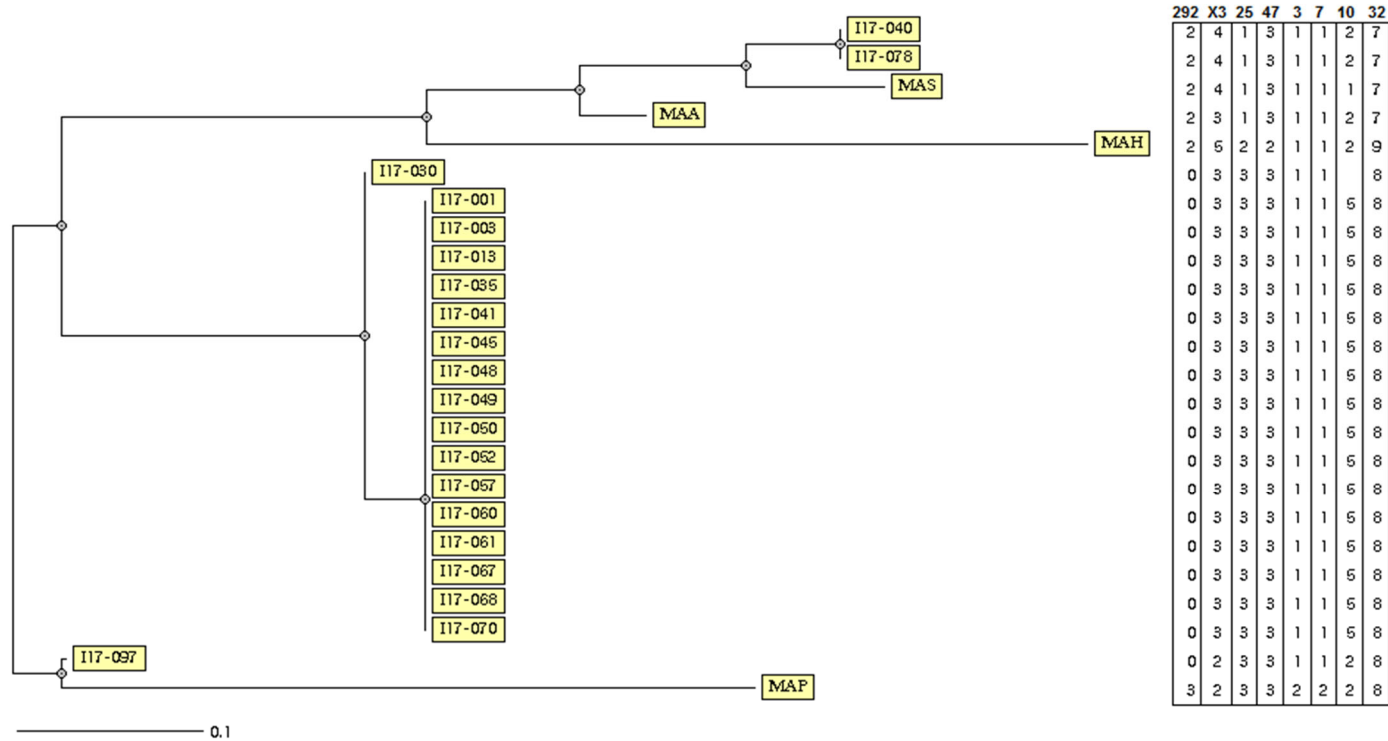


Figura 7.3 Dendrograma realizată prin metoda *neighbor joining* (NJ), utilizând profilele MIRU-VNTR obținute pentru probele testate și datele anterior publicate pentru patru tulpini de referință, folosind instrumente disponibile în baza de date MIRU-VNTRplus (original)

Figure 7.3 Neighbor joining (NJ) dendrogram constructed with the obtained MIRU-VNTR profiles, for each sample, and the the previously published profiles of four reference strains, using the application on MIRU-VNTRplus database (original)

*Tulpini de referință: MAA-*M. avium* subsp. *avium* tulpina ATCC 25291, MAP-*M. avium* subsp. *paratuberculosis* tulpina K10, MAH-*M. avium* subsp. *hominissuis* tulpina ATCC898, MAS-*M. avium* subsp. *silvaticum* tulpina ATCC 49884 (Scherrer S. ș.a., 2018)

*Reference strains: MAA-*M. avium* subsp. *avium* strain ATCC 25291, MAP-*M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain K10, MAH-*M. avium* subsp. *hominissuis* strain ATCC898, MAS-*M. avium* subsp. *silvaticum* strain ATCC 49884 (Scherrer S. ș.a., 2018)

7.2. Identificarea profilelor MIRU-VNTR a tulpinilor de MNT de origine animală aparținând Complexului *Mycobacterium avium*

7.2.1. Material și metodă

În realizarea acestui studiu au fost utilizate sușe de MNT izolate de la păsări și rumegătoare, examinate în perioada ianuarie 2015 - martie 2018 în Laboratorul de Bacteriologie al Facultății de Medicină Veterinară din Iași. Din totalitatea probelor identificate la nivel de specie prin TaqMan PCR în timp real, au fost selectate pentru genotipare prin tehnica MIRU-VNTR un număr de **șase extracte** încadrate anterior prin tehnicile de biologie moleculară în Complexul *M. avium* și cu o valoare a Ct pentru țintele IS1245 respectiv IS900 de sub 30 de cicluri (Tabelul 7.8).

Tabelul 7.8/ Table 7.8

Tulpinile de MNT, izolate de la animale, selectate pentru MIRU-VNTR
Animal NTM isolates selected for MIRU-VNTR

Nr. Crt	Cod de identificare	Specie	Identificare TaqMan Real time PCR	PCR IS1245	PCR IS900
1	I17-121	Găină	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	28,67	-
2	I17-124	Găină	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	27,26	-
3	I17-135	Oaie	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	-	27,38
4	I17-137	Găină	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	25,69	-
5	I17-138	Găină	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	21,14	-
6	I17-142	Vacă	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	-	27,21

*ND- nedeterminat

Protocolul de lucru pentru genotipare a urmărit tehnica descrisă de Thibault și colaboratorii (Thibault ș.a., 2007), cu adaptările realizate de Radomski N. în 2007. Metoda de lucru, descrisă anterior în **subcapitolul 7.1**, a fost utilizată pentru identificarea profilelor și compararea cu cele existente în baza de date “Mac INMV database” – <http://mac-inmv.tours.inra.fr>.

Amplificarea genică prin tehnica PCR clasic

Reacțiile au fost desfășurate într-un volum final de 25 μl, fiind utilizat setul de 8 loci TR: MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 și 32. Particularitățile amestecurilor de reacție și cele utilizate în programul de amplificare, temperaturile și timpii de menținere au fost descrise în subcapitolul 7.2 (Tabelul 7.2 și Tabelul 7.3), cu adaptare la numărul de probe testat.

Electroforeza și analiza ampliconilor obținuți

Procedurile pentru constituirea gelului de agaroză, pentru migrarea și stabilirea dimensiunii ampliconilor obținuți au fost descrise anterior, la testarea probelor izolate de la pacienți umani (**7.1.1.2. Amplificarea genică prin tehnica PCR clasic**).

7.2.2. Rezultate și discuții

Toate cele 6 izolate au putut fi genotipate prin tehnica MIRU-VNTR, pentru fiecare probă testată fiind obținuți produși de amplificare (Figura 7.4 și 7.5). În funcție de dimensiunile acestora s-a putut stabili numărul de repetiții corespunzător fiecărui locus în parte, utilizând, ca și în cazul izolatelor umane, tabelul de conversie (Tabelul 7.5). Migrarea a putut fi realizată concomitent pentru 5, respectiv 3 loci, evaluarea profilului electroforetic fiind astfel ușurată.

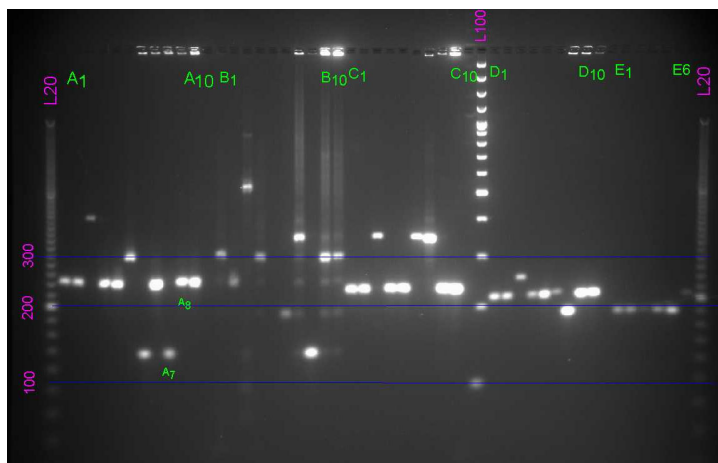


Figura 7.4 Profilul electroforetic al produșilor obținuți în urma amplificării pentru locii 292, X3, 25, 47, 3

*L20 - marker de talie moleculară de 20pb; L100 - marker de talie moleculară de 100pb; A_i, B_i, C_i, D_i, E_i - probele testate, martorii pozitivi și negativi conform așezării în placa PCR (original)

Figure 7.4 Electrophoretic profile of the products obtained by amplification for loci 292, X3, 25, 47, 3

*L20 - 20bp ladder; L100 - 100bp ladder; A_i, B_i, C_i, D_i, E_i - samples, negative and positive controls, according to their place in the PCR plate (original)

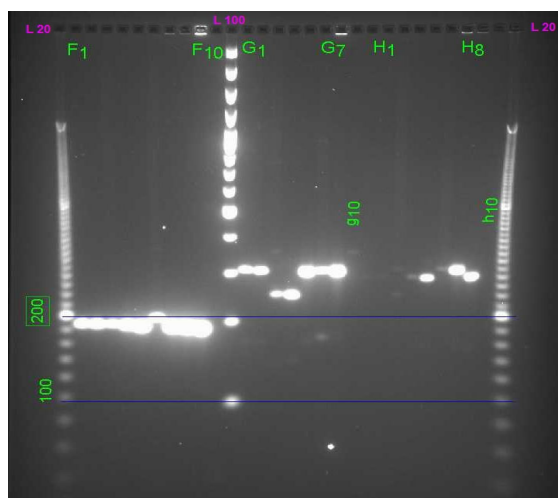


Figura 7.5 Profilul electroforetic al produșilor obținuți în urma amplificării pentru locii 7, 10, 32 (original)

Figure 7.5 Electrophoretic profile of the products obtained by amplification for loci 7, 10, 32 (original)

*L20 - marker de talie moleculară de 20pb; L100 - marker de talie moleculară de 100pb; F_i, G_i, H_i - probele testate, martorii pozitivi și negativi conform așezării în placa PCR

*L20 - 20bp ladder; L100 - 100bp ladder; A_i, B_i, C_i, D_i, E_i - samples, negative and positive controls, according to their place in the PCR plate

Pentru fiecare probă au fost obținute profile alelice complete și cele INMV corespondente, cu excepția probei I17-135, pentru care a fost obținut un profil alelic cu dublă repetiție la locusul 32. Acest rezultat ar putea indica o posibilă infecție cu tulpini diferite.

Puterea de discriminare a acestei metode se caracterizează printr-un indice DI de 0,933, fiind obținute cinci profile diferite, valoare aflată în concordanță cu alte rezultate descrise în literatura de specialitate. În funcție de numărul de probe, diversitatea originii lor, numărul de loci testați și bineînțeles numărul de profile diferite obținute, valorile DI raportate variază în limite destul de largi. Astfel, Radomski N. obține în studiul său un index de 0,885, în urma testării unui eșantion larg de probe, atât de origine animală cât și umană (Radomski, 2010). Thibault și colaboratorii obțin o valoare de 0,751 (Thibault, 2007) iar Scherrer și colaboratorii, caracterizând diversitatea unor tulpini de *M. avium subsp. hominissuis* izolate de la bovine, obține un indice de 0,972 (Scherrer ș.a., 2018). Valori mai scăzute au fost descrise în studiile realizate de Stevenson ș.a, 2009 și Gioffré ș.a., 2015, respectiv 0,64 și 0,63.

Capacitatea discriminatorie a metodei de tipizare se concentrează, în mod clar, în jurul celor trei markeri variabili: X3, 292 și 32. Spre deosebire de izolatele umane, locusul X3 se caracterizează printr-o capacitate de discriminare mult mai ridicată (ID=0,8), diversitatea alelică fiind identificată pentru toți markerii utilizați (Tabelul 7.9). Alături de X3, pentru locii 292 și 32 au fost obținute valori DI individuale ridicate (DI=0,6).

Tabelul 7.9/ Table 7.9

Puterea de discriminare (DI) a fiecărui locus, pentru probele de origine animală
Discriminatory power of each locus, for animal samples

TR	LOCUS								
	292	X3	25	47	3	7	10	32	
-	0	0	0	0	0	0	0	0	Numărul probelor cu profil identic
0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	4	0	5	5	2	0	
2	4	1	0	0	1	1	4	0	
3	1	1	2	5	0	0	0	0	
4	0	3	0	1	0	0	0	0	
5	1	0	0	0	0	0	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	4	
8	0	1	0	0	0	0	0	1	
(5,8)	0	0	0	0	0	0	0	1	
DI	0.6	0.8	0.533	0.333	0.333	0.333	0.533	0.6	

Importanța locusului X3 în tipizarea MIRU-VNTR a fost menționată și de alți autori (Radomski, 2007, Imperiale, 2017). Unitățile repetitive specifice lui MIRU-X3 au o lungime de 53 bp iar în genomul lui *M. avium subsp. paratuberculosis* K10 (număr de acces

în GenBank: NC_002944) sunt prezente în regiunea SenX3-RegX3, în două copii (Biet, 2005). În baza de date CMA-INMV-PLUS nu sunt înscrise profile de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cu mai mult de trei repetiții pentru acest locus, însă în literatură sunt descrise izolate cu 13, 15, 17, 21, 23 sau chiar 27 de TR (Macovei, 2014; Möbius ș.a, 2009; Castellanos ș.a., 2010). Variabilitatea TR pentru locii X3 și 10, descrisă de Macovei I. pentru probele provenite de la păsări, a fost observată și în studiul prezent (Fig. 7.6 și 7.7)

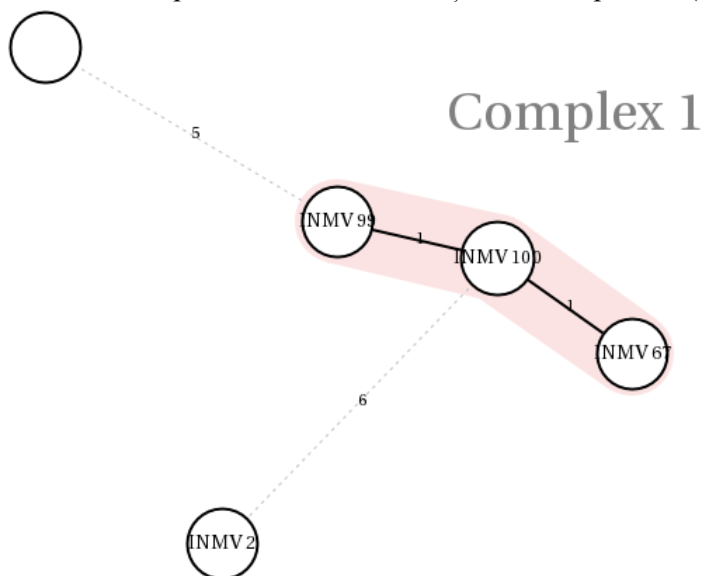


Figura 7.6 Arbore filogenetic realizat utilizând profilele MIRU-VNTR obținute pentru probele testate și folosind instrumente disponibile în aplicația web MIRU-VNTR plus (original)

Figure 7.6 Minimum Spanning Tree obtained with the MIRU-VNTR profiles, using the application available on MIRU-VNTRplus database (original)

*Dimensiunea fiecărui cerc este corelată cu numărul de izolate ale fiecărui profil identificat.

*Numărul corespunzător fiecărei linii ce unește diferitele clone este reprezentativ pentru distanța genetică dintre acestea, echivalent diferenței în numărul de repetiții ale fiecărui locus. *INMV = INRA Nouzilly MIRU-VNTR

* The circle's size is correlated with the number of isolates of each profile. * The number on each joining line is representative for the genetic distance between the different clones, equivalent to the difference in the number of tandem repeats for each locus. *INMV = INRA Nouzilly MIRU-VNTR

Profilele alelice obținute în urma analizei celor opt loci sunt: 23131127, 24131127, 24121117, caracteristice pentru *M. avium* subsp. *avium* și 32332228, 5834111(5,8) pentru probele de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Prin compararea acestor rezultate cu datele înscrise în platforma MAC-INMV-PLUS, s-au obținut profilele INMV corespunzătoare: INMV 67, INMV 100, INMV 99 și INMV 2. Primele trei formează un complex clonal - *Complex 1*, delimitat în figura 7.2 printr-un halou roz. Profilele INMV 99 și INMV 100 sunt diferențiate de o singură repetiție la nivelul locusului 10 iar între INMV 100 și INMV 67 apare o diferență între numărul de repetiții determinate pentru locusul X3. Făță de clona centrală INMV 100, profilul INMV 2 (32332228) se distinge printr-un număr diferit de repetiții la nivelul a 6 din cei 8 loci (Anton ș.a., 2018 B).

În România, tehnica de genotipare MIRU-VNTR a fost utilizată de Macovei I. în scopul identificării diversității genetice a izolatelor *M. avium* de origine animală, fiind identificate profilele INMV 100 și INMV 99 în prelevatele de la găini de curte și INMV1 în cele de la rumegătoare (Macovei, 2014; Macovei ș.a., 2013). Profilele INMV 1, INMV 2 și INMV 3 sunt frecvent identificate atât la nivel european (de Kruijf ș.a., 2017) dar și în izolate provenite din alte țări, precum Argentina sau Canada (Gioffrè ș.a., 2015, Ahlstrom ș.a., 2015). Corelat cu agentul etiologic al paratuberculozei, INMV 2 a fost descris deopotrivă pentru tulpini izolate de la rumegătoare domestice și sălbatice sau la extracte ADN din amibe (Samba-Louaka ș.a., 2018).

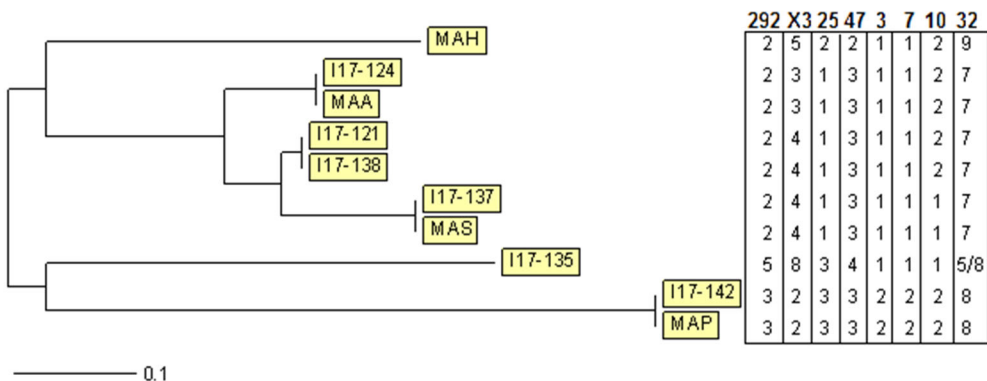


Figura 7.7 Dendrogramă realizată prin metoda neighbor joining (NJ), folosind profilele MIRU-VNTR obținute pentru extractele testate și patru tulpini de referință, utilizând instrumente disponibile în baza de date MIRU-VNTR plus (original).

Figure 7.7 Neighbor joining (NJ) dendrogram constructed with the obtained MIRU-VNTR profiles, for the tested samples, and four reference strains, using the instruments available on MIRU-VNTRplus database (original)

*Tulpini de referință: MAA-*M. avium* subsp. *avium* tulpina ATCC 25291, MAP-*M. avium* subsp. *paratuberculosis* tulpina K10, MAH-*M. avium* subsp. *hominissuis* tulpina ATCC898, MAS-*M. avium* subsp. *silvaticum* tulpina ATCC 49884 (Scherrer ș.a., 2018)

*Reference strains: MAA-*M. avium* subsp. *avium* strain ATCC 25291, MAP-*M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain K10, MAH-*M. avium* subsp. *hominissuis* strain ATCC898, MAS-*M. avium* subsp. *silvaticum* strain ATCC 49884 (Scherrer ș.a., 2018)

Profilul INMV 100, identificat în studiul nostru în două din probele de găină de curte dar și în izolatele clinice umane (subcapitolul 7.1), a fost descris în literatură și pentru alte specii, precum suine, bovine, caprine, păsări sălbatice - ibisul roșu (*Eudocimus ruber*) sau păsări domestice (Radomski, 2007). În același studiu, în probe provenite de la diverse specii de păsări și mamifere sunt identificate profilele INMV 99 și INMV 67.

Panelul MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 și 32 permite caracterizarea probelor și compararea rezultatelor cu cele obținute de alți autori și cu cele existente în bazele de date internaționale iar analiza bazată pe metoda NJ facilitează vizualizarea relațiilor filogenetice presupuse între profilurile MIRU-VNTR (Fig. 7.7).

7.3. Concluzii parțiale

1. Obiectivul acestui studiu a fost **investigarea diversității moleculare și tipizarea** tulpinilor de micobacterii nontuberculoase identificate la pacienți umani, la rumegătoare domestice și la găini, tulpini incluse în cadrul CMA în urma evaluării rezultatelor obținute prin TaqMan real-time PCR și prin secvențierea acestora. Analiza **MIRU-VNTR** a fost aleasă ca metodă de tipaj, datorită capacității înalte de discriminare, reproductibilității și fiabilității acesteia.
2. Toate cele șase izolate de la **animale** au putut fi genotipate prin tehnica MIRU-VNTR, pentru fiecare probă testată fiind obținuți produși de amplificare. **Puterea de discriminare** a acestei metode s-a caracterizat printr-un indice de discriminare de 0,933, în concordanță cu alte rezultate descrise în literatura de specialitate.
3. Cele 20 de tulpini izolate de la **om** și identificate ca aparținând CMA (secvențiere și PCR în timp real) au fost tipizate și ele prin tehnica MIRU-VNTR, **coroborarea datelor** obținute prin genotipare cu cele furnizate de identificarea moleculară prin secvențiere făcând posibilă **identificarea definitivă a fiecărei probe**. Analiza diversității genetice a izolatelor a condus la identificarea a trei populații, cu profile diferite: 03331158, 02331128 și 24131127.
4. Panelul MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 și 32 a permis caracterizarea probelor și **compararea rezultatelor** cu cele obținute de alți autori și cu cele existente în bazele de date internaționale iar analiza bazată pe metoda Neighbor joining (NJ) facilitează vizualizarea **relațiilor filogenetice** dintre profilurile MIRU-VNTR.
5. În ansamblu, metoda a exprimat un **DI = 0,612**, locii TR cu puterea cea mai mare de discriminare fiind VNTR 10, MIRU X3 și MIRU 292.
6. Profilul alelic 24131127, corespunzător INMV 100, a fost identificat atât în izolatele de la oameni cât și în cele de la păsări, subliniind astfel **potențialul patogen oportunist și riscul zoonotic** al MNT.
7. Varietatea genetică relativ scăzută obținută pentru *M. avium* subsp. *hominissuis* ar putea semnifica o distribuție limitată a infecției în regiunea studiată. Absența corelației între profilul alelic și originea geografică ar putea fi explicată printr-o **transmitere indirectă la animale sau la oameni**, prin intermediul unei surse comune din mediu, așa cum indică și rezultatele unor studii epidemiologice la nivel european. Se susține astfel ipoteza conform căreia poate exista o **sursă comună de infecție** cu *M. avium* subsp. *hominissuis* pentru porci și oameni sau, alternativ, **suinele ar putea constitui o sursă** pentru infecțiile umane și invers.
8. Au fost determinate și descrise, pentru **prima dată în România**, profilele MIRU-VNTR pentru izolate clinice respiratorii de *M. avium* subsp. *hominissuis* și *M. avium* subsp. *avium*, rezultate ce pot contribui la eficientizarea diagnosticului infecțiilor micobacteriene la om.
9. **Extinderea cercetărilor**, atât din punct de vedere al numărului de probe evaluate cât și al complexității originii geografice și de specie, constituie o necesitate în perspectiva conturării unei imagini ample, de ansamblu a diversității principalelor specii de MNT.

CAPITOLUL 8. IDENTIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA TULPINILOR DE MICOBACTERII DIN CMTB DE LA ANIMALE

CHAPTER 8. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE MTBC MYCOBACTERIA FROM ANIMAL SAMPLES

Genotiparea tulpinilor de micobacterii tuberculoase înlesnește studiul dinamicii tuberculozei bovine și umane furnizând date importante ce vin în sprijinul epidemiologilor, în scopul identificării originii focarelor. *Mycobacterium bovis* și *M. caprae* se pretează pentru efectuarea studiilor de epidemiologie moleculară pe baza caracteristicilor lor genotipice. Absența schimburilor de material genetic și reproducerea de tip asexuat face ca aceste microorganisme să mențină caractere identice cu ale predecesorilor. În urma pasajului de la o gazdă la alta, micobacteria își menține totalitatea caracterelor genotipice.

Mutațiile care apar în regiunea vizată de genotipare constituie parametri de diferențiere față de strămoși. Se poate deduce astfel că izolarea micobacteriilor cu genotipuri diferite de la două animale aflate în contact semnifică o lipsă a transmiterii între cele două gazde. Tehnica de genotipare utilizată trebuie să fie corelată cu rata de variație genetică a bacteriilor.

Speciile *M. bovis* și *M. caprae* fac parte din complexul *M. tuberculosis* (CMTB), alături de *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. canetti*, *M. orygis*, *M. mungi* și *Dassie Bacillus* (Rodriguez-Campos ș.a., 2014). *M. canettii* este considerată specia cea mai apropiată din punct de vedere genetic de strămoșul comun al membrilor CMTB (Blouin ș.a., 2012). Recent, a fost propusă încadrarea unei specii noi în cadrul complexului, *M. decipiens* sp. nov. (Brown-Elliott ș.a., 2018).

În diagnosticul tuberculozei bovine se utilizează două metode de genotipare: spoligotiparea și tehnica VNTR (numărul variabil de repetiții în tandem), care fac posibilă diferențierea între tulpini. Utilizarea ambelor tehnici conduce la o diferențiere extrem de precisă a tulpinilor (Hauer ș.a., 2015).

Descoperirea regiunii CRISPR (Clustered Regularly Intersperced Short Palindromic Repeats - Repetiții palindromice scurte grupate, regulat intercalate) a fost realizată în 1987 de către o echipă de japonezi la *E. coli*, în timpul unei analize a genei *iap* (inhibitori ai proteinelor de apoptoză), însă funcția acestei regiuni nu era cunoscută (Ishino ș.a., 1987). Analiza a fost utilizată în studiile genetice de diferențiere de la începutul anilor 1990, pentru *M. tuberculosis* și o archaee *Haloferax vulcanii* (Ishino ș.a., 2018).

La începutul anilor 2000, asemănările observate între regiunile de distanțiere (spacer) ale CRISPR și secvențele bacteriofagilor sau plasmidelor au evidențiat funcția de

„sistem imunitar” al regiunii (Mojica ș.a., 2005). În paralel, mai multe gene au fost identificate ca fiind strict asociate cu CRISPR și au fost desemnate genele *Cas* - CRISPR - asociate (Jansen ș.a., 2002). CRISPR - Cas 9 (gene asociate) sunt răspândite în rândul microorganismelor *Archaea* și bacteriilor.

Analizele genomice au sugerat astfel că proteinele sistemului CRISPR-Cas 9 funcționează împreună și constituie un sistem de imunitate dobândit cu scopul de a proteja celula procariotă împotriva virusurilor și plasmidelor invadatoare, analog sistemului eucariot de ARN-interferență (ARNi) (Makarova ș.a., 2006).

În timpul primei infecții cu un fag, bacteria integrează în genomul său o porțiune de 24-47 bp a ADN-ului infectant (spacer) și copie o regiune (motiv) de 24-47 bp (repetiție directă) în amonte de locus, zonă numită "lider". Astfel, bacteria își întipărește în „memorie” fagul, cu scopul de recunoaștere și distrugere la al doilea contact (Louwen ș.a., 2014).

Regiunea CRISPR cuprinde o alternanță de distanțieri (*spacer*), cu secvență variabilă, unică și secvențe invariabile repetitive (repetiții directe = DR). Evoluția regiunii DR este unidirecțională, prin pierderea *spacer*-ilor.

Spoligotiparea este o metodă care permite atât identificarea cât și diferențierea bacteriilor din CMTB dar și a sușelor diferite din aceeași specie. Principiul metodei are la bază polimorfismul regiunii conservate CRISPR. Tehnica implică amplificarea prin PCR a regiunii DR, care în cazul micobacteriilor tuberculoase cuprinde 43 de regiuni *spacer* (spacer), cu poziție înalt conservată. Caracterizarea tulpinii se bazează pe prezența sau absența spacerilor, fiind obținut un profil tradus printr-un cod binar (0 = absent, 1 = prezent) de 43 de elemente. Acestui cod binar îi este asociat un cod internațional, înregistrat în baza de date <http://www.Mbovis.org>, tip SBNNNN.

Tulpinile de origine animală se caracterizează prin lipsa spacerilor 39-43, și, în funcție de specie, prezintă variabilitate între 3 și 16. Profilul *M. bovis* SB0120 este cel mai complet, fiind considerat tipul original. Lui *M. caprae* îi lipsește spacer-ul 1 și cele de la 3 la 16 iar *M. microti* este specia cu profilul cel mai redus.

Se utilizează trei tehnici de spoligotipare, toate având la bază identificarea spacerilor prin amplificarea regiunilor DR cu ajutorul primerilor *Dra-biotinilat-Drb*. Spoligotiparea se realizează pe membrane, în fază solidă și în fază lichidă, cea din urmă fiind tehnica folosită în prezenta cercetare, cu ajutorul sistemului Bio-Plex.

Această tehnică implică utilizarea a 100 de seturi de microbile (microsfere) distinct colorate, create prin utilizarea a doi coloranți fluorescenți, în proporții diferite. Microbilele pot fi conjugate cu antigeni, anticorpi sau oligonucleotide. Utilizarea bilelor colorate diferit permite detectarea simultană a mai multor ținte din același eșantion (Houser, 2012). Acest sistem este echipat cu două lasere care traversează același punct, realizând astfel două tipuri de măsurători pe aceeași microbilă (Fig. 8.1).

Laserul roșu excită coloranții din fiecare microbilă (la 633 nm), identificându-i „adresa spectrală”. Laserul verde (reporter) excită molecula asociată microbilei (la 532 nm), ceea ce permite cuantificarea țintei capturate pe aceasta. Sistemul procesează și înregistrează simultan semnalele fluorescente pentru fiecare bilă, traducând semnalele în date (Houser, 2012).

După hibridizare (sau formarea *complexului imun*), spălările succesive elimină particulele nelegate. Un rezultat pozitiv este corelat cu un nivel ridicat de fluorescență iar unul negativ printr-un nivel scăzut. Determinarea pragului de pozitivitate pentru fiecare metodă și/sau sesiune de analiză este esențială pentru interpretarea rezultatelor. Astfel, pentru spoligotiparea micobacteriilor din CMTB, sunt fixate oligonucleotidele corespunzătoare celor 43 de spaceri pe 43 de tipuri de bile (de Cruz ș.a., 2018).

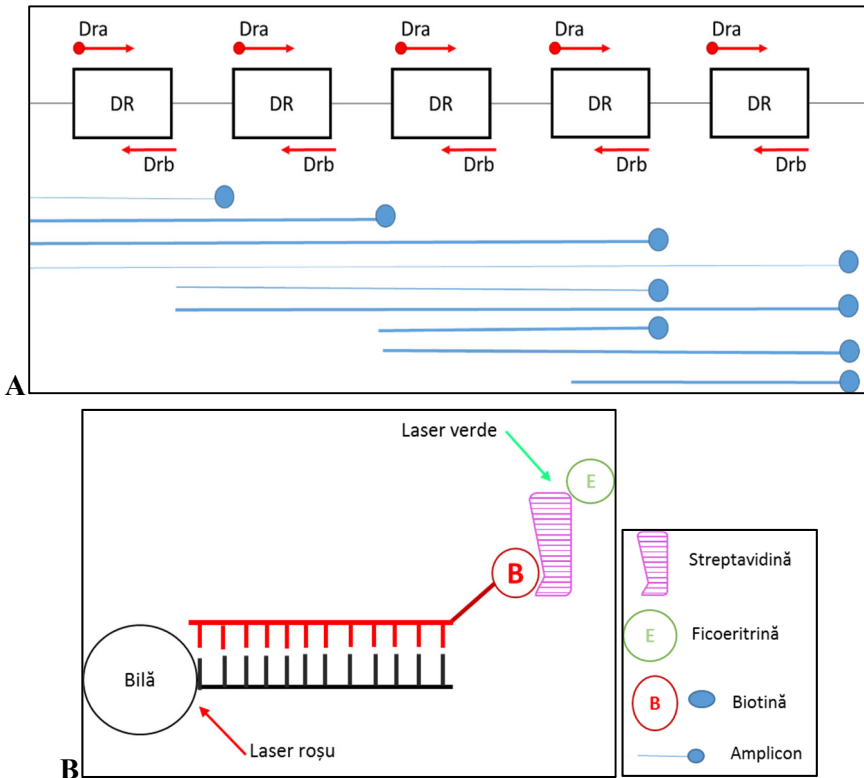


Figura 8.1 Amplificarea (A), hibridizarea și revelarea (B) în tehnica de spoligotipare cu microbile magnetice - reprezentare schematică (A - după Spoligotyping User's Manual)

Figure 8.1 Amplification (A), hybridization and revelation (B) in microbead-based spoligotyping technique - Schematic representation (A - after Spoligotyping User's Manual)

După amplificarea regiunii de interes, ampliconii obținuți se cuplează la bilele magnetice cu secvențele complementare spacerilor, în urma denaturării și hibridizării rezultând complexe bilă-spacer biotilinat. SAPE (streptavidin-ficoeritrin) se fixează la biotină. Aparatul dirijează printr-un sistem fluidic cele 43 de tipuri de bile magnetice către laserul roșu care le identifică și către laserul verde care excită SAPE. Aparatul transcrie rezultatele ca unități de fluorescență (UF), fiind obținut în final profilul genetic (Zhang ș.a., 2010).

Scopul acestui studiu a fost identificarea și caracterizarea tulpinilor de micobacterii tuberculoase din probele provenite de la bovine și din cele de la nurele analizate pentru discriminarea lor de cele nontuberculoase, fiind astfel îndeplinite următoarele obiective:

identificarea prin Taq man PCR în timp real, caracterizarea prin spoligotipare în fază lichidă și compararea profilelor obținute cu cele din bazele de date <http://www.Mbovis.org>, SPOLDB4 și SITVIT2. Testările au fost realizate în cadrul Laboratorului Național de Referință pentru Tuberculoza Bovină, ANSES, Maisons-Alfort, Franța iar extracția ADN-ului din țesuturile de origine bovină în cadrul laboratorului de biologie Moleculară al Facultății de Medicină Veterinară Iași.

8.1. Material și metodă

8.1.1. Colectarea și condiționarea probelor

În scopul îndeplinirii obiectivelor propuse, în acest studiu au fost utilizate extracte ADN din țesuturi provenite de la o bovină și de la două nuri (*Mustela lutreola*), care prezentau leziuni de tip granulomatos, fiind suspicinate de infecții determinate de germeni aparținând genului *Mycobacterium* (Tabelul 8.1). Alături de acestea au mai fost obținute două profile corespunzătoare speciei *M. tuberculosis*, probele provenind din cadrul laboratorului BK-IS.

Tabelul 8.1/Table 8.1

Tipul probelor testate Type of the tested samples			
Specie	Cod identificare	Tip probă	Tip țesut
Vacă 4	I17-126	Extract ADN (kit Macherey Nagel)	Limfonod traheo-bronșic
Vacă 4	I17-127	Extract ADN (kit Macherey Nagel)	Pulmon
Nurcă 1	I17-143	Extract ADN (kit Roche)	Pulmon
Nurcă 1	I17-144	Extract ADN (kit Roche)	Splină
Nurcă 1	I17-145	Extract ADN (kit Roche)	Ficat
Nurcă 2	I17-146	Extract ADN (kit Roche)	Pulmon
Nurcă 2	I17-147	Extract ADN (kit Roche)	Limfonod mezenteric
Nurcă 2	I17-148	Extract ADN (kit Roche)	Ficat
Nurcă 2	I17-149	Extract ADN (kit Roche)	Rinichi
Nurcă 2	I17-150	Extract ADN (kit Roche)	Cord

Probele de țesuturi de la animale au fost stocate în condiții de refrigerare, în cadrul laboratorului FMV Iași. Probele de la nuri au fost evaluate într-un studiu anterior efectuat de Bostănanu A. (Bostănanu, 2014), prin diagnostic bacteriologic, histopatologic, molecular (PCR clasic - *IS6110*, secvențiere) și detecția antigenului MPT64. Aceste cercetări au identificat ca agent etiologic al infecției la nurcă o bacterie aparținând CMTB. Au fost selectate pentru spoligotipare diverse tipuri de țesut de la două nuri ce proveneau din efectivul evaluat în studiul precedent, în scopul identificării și caracterizării speciei implicate.

Natura leziunilor și localizarea lor, în cazul bovinei, au condus spre suspiciunea de tuberculoză bovină, fiind astfel justificat motivul includerii în acest studiu.

8.1.2. Extracția acidului nucleic (ADN)

Extracția ADN-ului micobacterian a fost realizată conform procedurii descrise în subcapitolul 5.1.5.1., cu ajutorul kiturilor comerciale NucleoSpin® Tissue (Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Germania) și High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Germania).

8.1.3. Amplificarea genică prin TaqMan PCR în timp real

Pentru identificarea probelor a fost folosită tehnica TaqMan PCR în timp real, conform protocolului de lucru prezentat în subcapitolul 5.1.5.2, utilizând programul de amplificare și compoziția mix-ului de reacție descrise în tabelele 5.5 și 5.6. Țintele vizate, alături de secvențele amorsoare și sondelor utilizate, sunt prezentate în tabelele 8.2 și 8.3. Reacțiile au fost realizate cu ajutorul termociclorului Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR Systems.

Tabelul 8.2/Table 8.2

Secvențele primerilor și sondelor utilizate pentru detecția tulpinilor de micobacterii aparținând CMTB
Primers and probes used for MTBC members detection

Secvența țintă	Primeri și sonde	Secvențele nucleotidice 5'-3'
Hsp65 (Msp) (ANSES-FR)	Msp F	GCC AAG GAG GTC GAG ACC AA
	Msp R	CTC CTC GAC GGT GAT GAC
	Msp P	(FAM)-ACC TTG TCC ATC GCC TCG GCG AT-(BHQ1)
IS 6110 (ANSES-FR)	IS6110 F	GGT AGC AGA CCT CAC CTA TGT GT
	IS6110 R	AGG CGT CGG TGA CAA AGG
	IS6110 P	(FAM)-CAC GTA GGC GAA CCC-(MGB-NFQ)
IS 1081 (ANSES-FR)	IS1081 F	CCG CCA CCG TGA TTT CGA
	IS1081 R	GCC AGT CCG GGA AAT AGC T
	IS1081 P	(FAM)-CCG CAA CCA TCG ACG TC -(MGB-NFQ)
IS 1561 (ANSES-FR)	IS1561 F	GAT CCA GGC CGA GAG AAT CTG
	IS1561 R	GGA CAA AAG CTT CGC CAA AA
	IS1561 P	(FAM)- ACG GCG TTG ATC CGA TTC CGC-(BHQ1)
RD4 (ANSES-FR)	RD4 F	CCA CGA CTA TGA CTA GGA CAG CAA
	RD4 R	AAG AAC TAT CAA TCG GGC AAG ATC
	RD4 P	(FAM)- ACC AGT GAG GAA ACC-(MGB-NFQ)
RD4 bov (Barbier ș.a., 2016)	RD4 bov F	5'-GCA GAA GCG CAA CAC TCT TG-3'
	RD4 bov R	5'-ATC TTA GCT GGT CAA TAG CCA TTT TT-3'
	RD4 bov P	(FAM)- AGT GGC CTA CAA CGG CGC TCT CC-(BHQ1)
Lep A (Reddington ș.a., 2011)	Lep A F	5' AGA CCG TGC GGA TCT TG 3'
	Lep A R	5' CAT GGA GAT CAC CCG TGA 3'
	Lep A P	FAM TAT CGG GTA CAC AAA GAC GA-BHQ1

*F= primer sens, *R= primer antisens, *P=sondă

Tabelul 8.3/Table 8.3

Specie	Msp (Hsp65)	IS6110	IS1081	IS1561	RD4
<i>M. tuberculosis</i>	+	++	++	++	++
<i>M. africanum</i>	+	++	++	++	++
<i>M. microti</i>	+	++	++	-	++
<i>M. pinnipedii</i>	+	++	++	-	++
<i>M. caprae</i>	+	++	++	+	++
<i>M. bovis</i>	+	++	++	++	-
<i>M. bovis</i> BCG	+	++	++	++	-

8.1.4. Spoligotiparea cu microbile magnetice în fază lichidă (tehnologia Luminex)

Prima etapă constă în amplificarea regiunii DR din probele analizate. Compoziția amestecului de reacție este prezentată în tabelul 8.4. Reacția se desfășoară într-un volum total de 50 μ l, după următorul protocol:

95°C – 10 minute	40 de repetiții
95°C – 40 secunde	
55°C – 40 secunde	
72°C – 40 secunde	
72°C – 10 minute	

Secvențele amorselor utilizate sunt: amorsă sens DRA - 5' biotin GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3' și amorsă antisens DRB - 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC3' (Zhang ș.a. 2010; de Cruz, 2018). Pentru realizarea amestecului de hibridizare primul pas este prepararea mix-ului de microbile magnetice 1/20, utilizând 50 μ l soluție mamă microbile și 950 μ l TE (cantități pentru aproximativ 50 de probe) iar apoi vortexare și sonicare pentru câte 20 de secunde.

Tabelul 8.4/Table 8.4

Reactivi - PCR clasic / Master mix for Classical PCR

REACTIVI	CANTITATE
apă ultrapură	23,5 μ l
BSA 15 μ M	5 μ l
Tampon 5X GoTaq colorless	10 μ l
DNTP	0,4 μ l
MgCl ₂ 0.25mM	0,5 μ l
Go Taq G2 DNA	0,2 μ l
Primer (amorsă) sens DRA 0,4 μ M	0,2 μ l
Primer (amorsă) antisens DRB 0,4 μ M	0,2 μ l
Total	40 μ l
ADN-probă	10 μ l (AND extras din colonii/din țesut)

Preparare mix de hibridizare:

- 15 μ l TMAC 1X;
- 20 μ l mix microbile (60 bile/ μ l TMAC sarkosyl 1X per spacer);
- 5 μ l produs PCR (2 μ l pentru suşe).

Soluția TMAC 1X (clorură de tetrametilamoniu) conține TMAC 5M (150 μ l), Sarkosyl 20% (1,25 ml), Tris – HCl 1M, pH 8.0, 12,5 ml, EDTA 0.5M, pH 8.0, 2 ml, apă 84,25 ml, la un volum total de 250 ml. Prepararea soluției de streptavidină- ficoeritrină (SAPE 4 μ g/ml): 5.825 μ l SAPE la 1250 μ l TMAC (0,1165 μ l SAPE per probă), pentru 50 de reacții.

Placa (FrameStar 96-Non stricked, 4titude®) în care a fost depus amestecul de hibridizare este omogenizată și depusă la incubare, în două etape, la 95°C pentru 10 minute și 52°C pentru 20 de minute, într-un termociclor (Eppendorf AG, Germania). Odată ce incubarea este completă, placa este centrifugată și așezată pe un suport magnetic.

Se elimină supernatantul din placă, ținând mereu în contact cu suportul magnetic pentru a nu fi eliminate și microbilele, apoi acestea se resuspendă în 50 μ l de apă sterilă ultrapură. Se adaugă în toate godeurile 25 μ l soluție SAPE preparată anterior și se omogenizează ușor placa acoperită cu o folie de protecție.

Placa se introduce în aparat, după curățarea și sonicarea acului și umplerea recipientului special cu soluțiile de spălare: clor 10%, isopropanolol 70% și apă. Citirea se face la 100 bile pe regiune/45 secunde, ținta Hight RP1,15 minute la 52°C .



Figura 8.2 Sistemul Bio-Plex 200 BIO RAD, tehnologia Luminex (original, ANSES - FR)

Figure 8.2 Bio-Plex 200 System BIO RAD, Luminex technology (original, ANSES - FR)

8.2. Rezultate

8.2.1. Detecția elementelor de interes în probele testate prin tehnica TaqMan PCR în timp real

În acest studiu au fost testate 10 probe de origine animală (extracte ADN din țesuturi) cu ajutorul tehnicii TaqMan PCR în timp real, pentru identificarea unei serii de elemente de inserție *IS6110*, *IS1081*, *IS1561*, a unei secvențe specifice tuturor micobacteriilor - *Hsp65* și a regiunii RD4 (Tabelul 8.3).

IS6110 este un element de inserție care se găsește exclusiv la membrii CMTB, ca rezultat al lipsei schimbului genetic cu alte specii micobacteriene, devenind astfel un instrument important de diagnostic în diferențierea speciilor MTBC de alte micobacterii. Elementul este prezent în mai multe copii și în diferite locații din genom. *IS1081* este prezent la toate speciile CMTB într-un număr mai stabil de copii, 5-7 repetări per genom. *IS1561* și RD4 asigură discriminarea a speciilor *M. bovis* și *M. microti* în cadrul complexului (Tabelul 8.3).

Polimorfismul unei singure nucleotide (substituția nucleotidică C⇒T la poziția 690) în gena *lepA* indică prezența lui *M. caprae* (Reddington ș.a., 2011). Primerii utilizați pentru RD4 ținesc regiunile flancante ale secvenței deletate RD4 la *M. bovis* (Barbier ș.a., 2016).

Tabelul 8.5/Table 8.5

Rezultatele obținute la analiza elementelor de interes prin TaqMan PCR în timp real pentru probele de origine animală

TaqMan PCR results for animal samples

Cod	animal	Valorile CT obținute							
		IPC	Msp	<i>IS6110</i>	<i>IS1081</i>	<i>IS1561</i>	RD 4	RD4 bov	<i>Lep A</i>
I17-126	Vacă 4	28,73	27,07	23,06	24,22	27,45	ND	ND	32,76
I17-127	Vacă 4	28,59	27,13	23,74	24,49	-	ND	ND	33,07
I17-143	Nurcă 1	30,07	16,98	14,65	16	18,35	ND	ND	21,94
I17-144	Nurcă 1	29,88	21,42	18,98	20,37	22,12	ND	ND	27,36
I17-145	Nurcă 1	30,77	25,42	21,52	23,18	24,64	ND	ND	31,94
I17-146	Nurcă 2	29,37	18,99	15,45	14,13	18,26	ND	ND	21,43
I17-147	Nurcă 2	30,09	21,53	17,3	16,04	20,22	ND	ND	23,87
I17-148	Nurcă 2	29,73	21,94	17,81	16,11	20,3	ND	ND	24,58
I17-149	Nurcă 2	30,11	29,71	24,51	23,78	27,4	ND	ND	34,42
I17-150	Nurcă 2	29,41	30,8	26,84	26,14	29,98	ND	ND	34,03

(- netestat, ND-nedeterminat)

În probele de ADN extrase din țesuturile animale evaluate s-a evidențiat prezența elementelor specifice micobacteriilor ce aparțin CMTB, conform valorilor CT (pragul limită de ciclu) obținute pentru IS6110, IS1081, Msp-Hsp65 (Tabelul 8.5). Răspunsul pozitiv la IS1561 sugerează prezența uneia dintre speciile *M. tuberculosis*, *M. bovis* sau *M. caprae*, fiind excluse speciile *M. microti* și *M. pinnipedii* = IS1561 negativ (prezența altor specii incluse în CMTB fiind improbabilă). Prezența substituției din gena *lepA* (Fig. 8.3) indică prezența speciei *M. caprae* în proba testată. Răspunsul negativ obținut pentru RD4 sugerează deleția regiunii flancate de primeri din genomul speciei identificate în probe. Se remarcă faptul că toate probele testate au generat un răspuns negativ pentru ținta RD4 cât și pentru RD4bov.

Tabelul 8.6/Table 8.6

Rezultatele obținute la analiza elementelor de interes prin TaqMan PCR în timp real, pentru cele două probe umane testate

TaqMan PCR results for the two human samples

Cod probă	Msp Hsp65	IS6110	IS1245	IS901	IS1081
I17-034	20,87	17,33	16,78	indet	20,77
I17-064	22,94	27,12	34,54	indet	30,69

Testarea probelor de origine umană s-a realizat utilizând țintele Hsp65, IS6110, IS1081, IS1245, IS901 (Tabelul 8.6). Un răspuns ferm (valoare CT 16,78) a fost obținut pentru ținta IS1245 în cazul probei I17-034. Valorile CT observate pentru IS1245 la probele I17-064 și I17-034 se pot datora unei contaminări cu o micobacterie din CMA (exceptând *M. avium* subsp. *avium* și *M. avium* subsp. *silvaticum* - IS901 negativ) sau unei coinfecții.

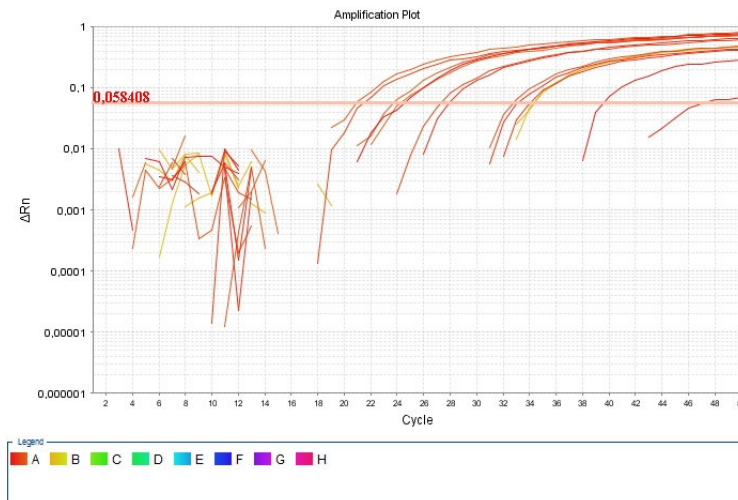


Figura 8.3 Reprezentarea grafică, în modul logaritm, a curbelor de amplificare obținute pentru analiza ținte *lepA* (original)

Figure 8.3 Graphic representation, in logarithmic mode, of the amplification curves obtained for the *lepA* target amplification (original)

Pentru probele de la animale se remarcă absența spacerilor 39-43, în comparație cu profilele obținute la probele de la oameni. Totodată, absența primului spacer dar și a celor de la 3-16 este specifică speciei *M. caprae*, această identificare fiind în concordanță cu rezultatele obținute prin TaqMan PCR în timp real. Toate probele de la nurci cât și cele de la vacă au prezentat același profil, corespunzător BOV_4-CAPRAE, SIT (shared-type number) 467.

În cazul celor două izolate de *M. tuberculosis* testate, au fost obținute două profile diferite, cel corespunzător probei I 17-034 fiind caracterizat de absența spacerilor 4, 33, 34, 35 și 36 iar celui corespunzător probei I 17-064 îi lipsesc spacerii 24, 26-31 și 33-36. Au fost obținute profile în cod octal corespunzătoare speciei *M. caprae* la animale și profile pentru sușele de *M. tuberculosis* la om.

Profilele obținute pentru probele testate
Obtained spoligotypes

[illegible]

8.3. Discuții

Alături de *M. bovis*, specia *M. caprae* reprezintă unul dintre cei mai importanți patogeni pentru rumegătoarele domestice dar și sălbatice. A fost identificată pentru prima dată la capre, în Spania și a fost recunoscută ca specie a CMTB în 2003, în baza caracteristicilor genomice: prezența sau absența regiunilor de diferențiere (RDs) și SNP-polimorfismului unei singure nucleotide (Aranaz ș.a., 2003). Această micobacterie a fost izolată de la numeroase specii de animale domestice și sălbatice, bovine, caprine, cerbi sau porci mistreți (Rodriguez ș.a., 2011, Erler ș.a., 2004, Schoepf ș.a., 2012) dar și de la om (Kubica ș.a., 2003).

Izolatele de *M. caprae* prezintă aceleași deleții de RD ca *M. bovis*, cu excepția regiunii RD4, care are o mărime de 12,7 kb și este absentă la *M. bovis* dar prezentă în genomul lui *M. caprae* (Brosch ș.a., 2002), constituind astfel un criteriu important de diferențiere moleculară. Regiunea cuprinde 11 gene (Rv1506c-1516c) în genomul lui *M. tuberculosis* H37Rv și este implicată în biosinteza glicolipidelor care conțin trehaloză (Brodin ș.a., 2010). Rodriguez și colaboratorii au confirmat existența unei secvențe RD4 specifice, de 545pb, în 62 din 63 de izolate de *M. caprae* testate (Rodriguez ș.a., 2011).

Rezultatele studiului nostru demonstrează o inconstanță a regiunii RD4 în genomul lui *M. caprae*. Astfel, primul set de primeri utilizați - RD4F, RD4R (Halse ș.a., 2011, Rettinger ș.a., 2015) amplifică un fragment de 88 pb din partea stângă a regiunii RD4, fiind observată absența acestui element din toate probele de ADN analizate prin TaqMan PCR în timp real. Primerii RD4-bov vizează secvențele flancante ale regiunii deletate RD4, fiind utilizați de către Barbier și colaboratorii pentru detecția specifică a lui *M. bovis*, la care regiunea RD4 este absentă (Barbier ș.a., 2016). Talia așteptată a produsul amplificat este de 116 pb.

Absența unui răspuns pentru țintele RD4 și RD4bov în probele testate sugerează faptul că din genomul tulpinii de *M. caprae*, implicat în infecția la nurci și la bovină, este deletat un fragment din regiunea internă stângă a RD4. Această observație este extrem de importantă având în vedere faptul că discriminarea între *M. bovis* și alte specii din CMTB în baza RD4 este frecvent utilizată. Eterogenitatea acestui element îl face nerecomandat pentru utilizarea sa ca marker de diferențiere.

Variații ale acestei regiuni de interes la izolatele de *M. caprae* au fost observate și de Domogalla și colaboratorii, în Germania (Domogalla ș.a., 2013). Analiza efectuată de aceștia pe 12 tulpini izolate de la rumegătoare domestice și sălbatice a reliefat existența a trei tipuri distincte din punct de vedere a delețiilor în RD4: tipul Allgäu (fără deleții), tipul Karwendel, cu o deleție de 5 Kb în porțiunea internă stângă și tipul Lechtal, cu o deleție de 38 Kb (regiunea internă stângă și centrală). Astfel, autorii sugerează utilizarea SNP și a analizei de genom întreg pentru diferențierea lui *M. bovis* de *M. caprae*.

Studiul prezent a confirmat conservarea substituției specifice (C $\Rightarrow$ T) în poziția 690 din secvența *lepA* pentru toate extractele de ADN testate. Acest SNP constituie astfel un marker relevant și sigur pentru discriminarea speciei *M. caprae* direct din țesuturi. Aceleași observații au fost realizate și în studiul anterior menționat (Domogalla ș.a., 2013),

testarea fiind realizată pe izolate bacteriene. Rezultatele noastre confirmă eficacitatea metodei utilizate pentru identificarea acestui SNP direct din probele de țesut.

Spoligotiparea a fost prima metodă de genotipare bazată pe PCR, aplicată pentru caracterizarea și diferențierea micobacteriilor incluse în CMTB, cu precădere *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* sau *M. caprae*, agenți etiologici ai tuberculozei la oameni și animale, fiind utilizată în prezent la scară largă pentru diagnostic și studii epidemiologice. Tehnica are la bază detecția prezenței sau absenței celor 43 de secvențe de ADN specifice (spacer) din regiunea DR. Profilul obținut (spoligotip) este caracteristic unei linii evolutive specifice. Pentru a digitaliza datele obținute în urma hibridizării, a fost introdusă conversia semnalelor fluorescente într-un cod numeric, binar sau octal.

Profilul obținut în urma spoligotipării extractelor din probele de animale a fost identificat în baza de date *mbovis.org*, cu numărul SB0418, corespunzător unui izolat belgian. Pentru tulpini din România, în baza de date *mbovis.org* sunt incluse două profile diferite față de cel identificat în studiul nostru, SB2542 și SB2543.

SB0418 a fost identificat pentru tulpinile de tip Allgäu (fără deleții) și Lechtal (deleție de 38 kb) în studiile efectuate de Rettinger (Rettinger ș.a., 2015) și Domogalla (Domogalla ș.a., 2013) pe izolate de *M. caprae* de la bovine din Germania și Austria. Rodríguez și colaboratorii identifică SB0418 la bovine de import din regiunea de Sud-Est a Europei (Rodríguez ș.a., 2011). Același spoligotip a fost identificat în izolatele de la bovine în estul Elveției (Ghielmetti ș.a., 2017) iar în diverse țări din Europa centrală și de sud, în izolate de origine bovină, umană sau de la animale sălbatice (Erler ș.a., 2004, Schoepf ș.a., 2012, Chiari ș.a. 2014).

Sunt 164 de tulpini cu spoligotipul 200003777377600 incluse în baza de date SITVIT2 a Institutului Pasteur Guadelupe (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SpolSimilaritySearch/spol.jsp>), cele mai multe dintre acestea (N=80) fiind din Germania (Fig.8.4). Alte țări în care acest profil a fost identificat sunt: Italia (N=17), Ungaria (N=16), Franța (N=12), Croația (N=11), Austria (N=8), Spania (N=6), Cehia (N=4), Olanda, Ucraina, Honduras (câte două izolate) și Marea Britanie, Albania și Belgia (câte un izolat).

De asemenea, acest profil a mai fost identificat și de alți autori în alte regiuni față de cele menționate, pentru izolate micobacteriene de la diverse specii. Orłowska și colaboratorii descriu spoligotipul pentru sușele de *M. caprae* izolate de la doi lupi (*Canis lupus*) și doi porci mistreți, într-un studiu realizat în Polonia privind transmiterea acestei micobacterii la carnivorele sălbatice. Autorii au mai identificat încă un profil, pentru o sușă izolată de la un al treilea lup, ce diferă de primul prin absența spacer-ului 38 însă prezintă același profil MIRU-VNTR (Orłowska ș.a., 2017). Interesant de remarcat din acest studiu este absența leziunilor caracteristice infecțiilor micobacteriene în probele analizate de la lupi.

Tot în Polonia, profilul 200003777377600 a fost identificat în urma spoligotipării sușelor de *M. caprae* izolate din probe testate de la bovine (Krajewska-Wędzina ș.a, 2018, Augustynowicz-Kopeć ș.a., 2011) dar și pentru cele identificate în probele de pulmon și limfonoduri de la doi tapiri - *Tapirus terrestris* (Augustynowicz-Kopeć ș.a., 2011).

Spoligotipul 200003777377600 a mai fost relatat în literatura de specialitate evaluată și de către Bhembé și colaboratorii în provincia Eastern Cape, din Africa de Sud, la tulpini izolate din limfonoduri de la bovine abatorizate (Bhembé ș.a., 2017 și 2018).

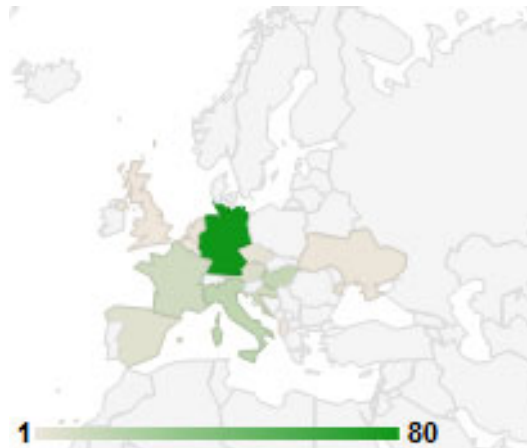


Figura 8.4 Distribuția spoligotipului identificat (200003777377600) la nivel european.

Figure 8.4 Global distribution of the 200003777377600 profile

(sursă: SpolSimilaritySearch tool, SITVIT2)

Același profil a fost descris de către Ruettger și colaboratorii (Ruettger ș.a., 2012) în probe de origine bovină și suină testate în Ucraina. Toate tulpinile de *M. caprae* izolate de la porcinele din acest studiu au prezentat același spoligotip, în ciuda faptului că animalele au provenit de la trei ferme diferite, situate la sute de kilometri distanță, aspect ce indică o largă diseminare a acestui tip în Ucraina.

Aceste date sunt de un real interes pentru noi, mai ales datorită învecinării țării noastre cu Ucraina. Identificarea tulpinilor cu același profil, atât de la animale domestice cât și de la cele sălbatice în mai multe regiuni din Europa sugerează o distribuție extinsă a acestui spoligotip. În studiul nostru, *M. caprae* a fost identificat deopotrivă în probe de la bovină și de la nuri, însă numărul limitat de probe nu permite extinderea concluziilor. Subliniem astfel necesitatea evaluării unui număr mare de probe de la animale din diverse specii, atât domestice cât și sălbatice, rumegătoare și carnivore, pentru a putea stabili prevalența reală a speciei *M. caprae* în România.

Caracterizarea distribuției și variabilității izolatelor contribuie la identificarea traseelor epidemiologice și potențialului risc de transmitere de la fauna sălbatică la animalele de rentă, crescute în sistem extensiv. În cazul nurilor testate, acestea proveneau dintr-o crescătorie, *M. caprae* fiind probabil transmis prin intermediul hranei - carcase sau organe de la animale infectate. O descriere mai aprofundată a caracteristicilor genomice ale speciei identificate ar putea fi realizată prin identificarea exactă a delețiilor din regiunea RD4 dar și prin MIRU-VNTR.

Conform profilului identificat pentru cele două izolate de *M. tuberculosis* testate și conform analizei bazei de date SITVIT2, acestea se încadrează în grupurile cele mai prevalente în țara noastră, H1 (I 17-064) și T1(I 17-034). Aspecte privind distribuția la nivel

global, în funcție de numărul de tulpini raportate, pentru spoligotipurile identificate în tulpinile umane din studiul nostru sunt redată în figurile 8.5 și 8.6.

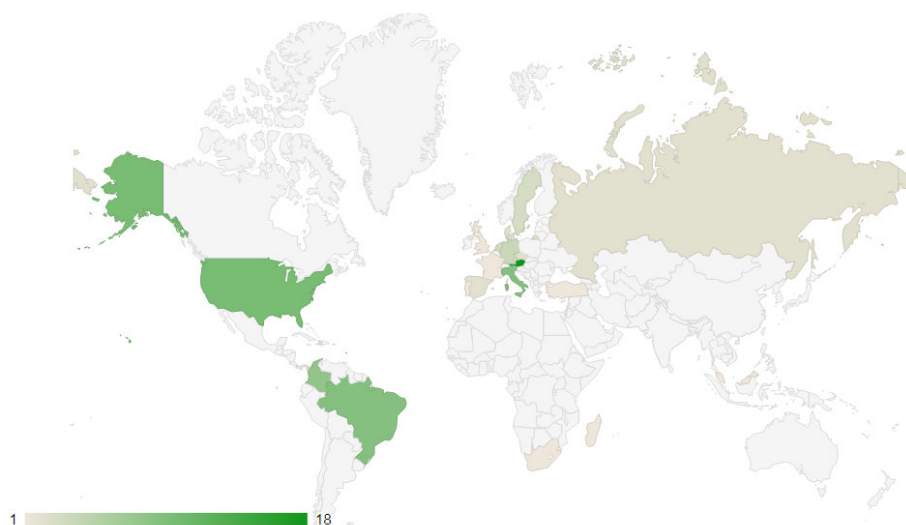


Figura 8.5 Distribuția spoligotipului identificat (777777764020771) la nivel global

Figure 8.5 Global distribution of the 777777764020771 profile

(sursă: SpolSimilaritySearch tool, SITVIT2)

Spoligotipul obținut pentru izolatul I17-064 (777777764020771- SIT 45, H1) este caracterizat în SITVIT2 pentru 104 sușe, cele mai multe fiind identificate în Austria (18), SUA (10), Italia (9), Brazilia (9), Columbia (8) și departamentele franceze Martinica (12) și Guadelupe (8).

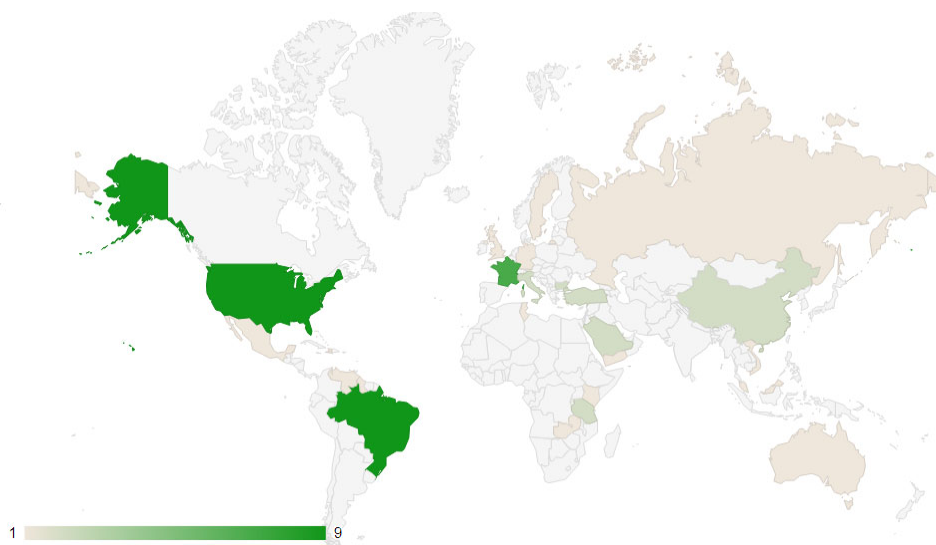


Figura 8.6 Distribuția spoligotipului identificat (73777777760771) la nivel global

Figure 8.6 Global distribution of the 73777777760771 profile

(sursă: SpolSimilaritySearch tool, SITVIT2)

În baza de date SITVIT2, pentru profilul 73777777760771, identificat în proba I17-034, (SIT 205, T1) sunt incluse 52 de tulpini, cu origine geografică diversă, cele mai multe provenind din Brazilia (N=9), SUA (9) și Franța (N=7). Nu sunt incluse tulpini din România.

În cadrul proiectului TB-ARC-România, care a urmărit caracterizarea genetică și estimarea diversității tulpinilor de *M. tuberculosis* circulante pe teritoriul țării noastre și rezistente la medicație, s-a realizat o analiză comparativă a 197 de izolate clinice, din 14 județe din zona centrală și nord-vestică. Tulpinile identificate au fost încadrate în următoarele familii: H1 (56), T1 (30), T2 (23), S (16), H3 (15), H4 (15), T3 (13) și alte 18 (9,1%) izolate neidentificate în baza de date SpolDB4 (TB-ARC – România).

8.4. Concluzii parțiale

1. Având în vedere importanța globală a tuberculozei, **disponibilitatea instrumentelor de diagnosticare** eficiente și îmbunătățirea lor constantă sunt elemente esențiale ale progresului în domeniu.
2. **Genotiparea** tulpinilor de micobacterii înlesnește studiul dinamicii tuberculozei bovine și a celei umane, furnizând date importante pentru epidemiologi în vederea identificării originii focarelor.
3. Spoligotiparea este o metodă care permite atât identificarea cât și diferențierea bacteriilor din CMTB dar și a sușelor diferite din aceeași specie. **Spoligotiparea cu ajutorul microbilelor magnetice** (tehnologia Luminex) reprezintă o metodă fiabilă (high-throughput) de tipizare moleculară, care este adecvată pentru studierea diversității tulpinilor micobacteriene circulante în cadrul populațiilor de animale domestice și sălbatice și permite identificarea traseelor epidemiologice la nivelul unor zone geografice relevante.
4. În cadrul investigațiilor noastre, s-a realizat **caracterizarea micobacteriilor din CMTB** identificate în probe provenite de la animale (o bovină și două nurci) care prezentau leziuni de tip granulomatos, suspecte de infecții cu germeni din genul *Mycobacterium*. Alături de acestea, au mai fost obținute profilele a două sușe de *M. tuberculosis* de origine umană.
5. Cele 10 probe de origine animală (extracte ADN din țesuturi) au fost testate cu ajutorul tehnicii TaqMan PCR în timp real, pentru identificarea elementelor de inserție IS6110, IS1081, IS1561, a secvenței specifice proteinei de șoc termic *-Hsp65* și a regiunii RD4, specia *M. caprae* fiind identificată deopotrivă la rumegătoare (**bovină**) și la carnivore (**nurci**).
6. În urma testării probelor prin **TaqMan PCR** în timp real au fost identificate răspunsuri pozitive la țintele IS6110, IS1081 pentru toate probele evaluate. Pentru identificarea și caracterizarea micobacteriilor tuberculoase din aceste probe a fost realizată **spoligotiparea**, profilele obținute în cod binar fiind introduse în **bazele de date** Mbovis.org-The Mycobacterium bovis Spoligotype Database, pentru probele de origine animală și SITVIT2-Pasteur Guadalupe, pentru cele de la oameni.

7. Toate probele de la nurci cât și cele de la vacă au prezentat același profil, corespunzător BOV_4-CAPRAE (SIT -shared-type number 467).
8. Aceasta este **prima raportare** cu privire la identificarea speciei *M. caprae* **la nurci** dintr-o crescătorie, bacteria fiind probabil transmisă prin intermediul hranei - resturi de abator, carcase sau organe de la animale infectate.
9. Conform profilelor identificate pentru cele două izolate de *M. tuberculosis* testate și conform analizei bazei de date SITVIT2 și consultării literaturii, acestea se încadrează în **grupurile cele mai prevalente** în țara noastră, H1 (I 17-064) și T1(I 17-034).
10. Întrucât numărul limitat de probe testate nu permite generalizarea concluziilor, considerăm că **este esențială o evaluare amplă** a diversității în cadrul speciilor *M. bovis* și *M. caprae* răspândite pe teritoriul țării noastre, atât la rumegătoarele domestice cât și în populațiile de animale sălbatice.

CAPITOLUL 9. CONCLUZII FINALE

Prezenta teză de doctorat abordează o **temă** de actualitate atât pentru medicina veterinară cât și pentru medicina omului, cea a **micobacteriilor nontuberculoase** (MNT). Rolul acestora în patologie este adesea privit dintr-o perspectivă limitată doar la membrii **CMA**: *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, care poate determina pierderi economice importante în efectivele de rumegătoare, *M. avium* subsp. *avium* - agentul etiologic al tuberculozei aviare și *M. avium* subsp. *hominissuis*, care poate determina infecții la suine, dar și la oameni. Însă, MNT nu se rezumă doar la aceste aspecte deoarece, prin capacitatea lor de **agenți oportuniști**, pot determina infecții la numeroase specii de animale și la om și pot interfera cu diagnosticul tuberculozei bovine.

În urma **analizei de ansamblu** a rezultatelor obținute în prezenta teză de doctorat, se pot formula următoarele **concluzii generale**:

1. Considerând rolul pe care **animalele sălbatice** îl pot avea în menținerea și răspândirea MNT, cercetările de natură **serologică** întreprinse în regiunea de N-E a României au urmărit evaluarea prezenței anticorpilor anti-CMA la mistreți și vulpi.
2. Rezultatele obținute în acest studiu preliminar sugerează faptul că, în regiunea evaluată, **mistreții** nu au o contribuție importantă în diseminarea și menținerea MNT în mediul silvatic. Semnalul pozitiv obținut la o singură **vulpe** din cele 92 testate nu este suficient pentru a estima seroprevalența CMA la această specie.
3. Aceste rezultate susțin premisele unor **cercetări ulterioare**, prin mărirea numărului de probe testate de la mistreți și vulpi dar mai ales prin extinderea investigațiilor asupra mai multor specii de animale.
4. Cercetările efectuate privind izolarea și identificarea MNT implicate în infecții la rumegătoare și păsări au condus la un diagnostic de **certitudine**, în urma **coroborării rezultatelor** examenelor: histopatologice, bacteriologice, bacterioscopice și moleculare.
5. MNT cel mai **frecvent** implicate în infecții la animalele domestice (rumegătoare și păsări) au fost speciile incluse în **CMA**.
6. Investigațiile histopatologice, bacteriologice și moleculare realizate au putut evidenția și confirma **infecția cu *M. avium* subsp. *avium*** la toate **găinile** testate.
7. În probele provenite de la **cerb**, evaluate prin tehnici moleculare și în absența leziunilor vizibile, a fost identificată o micobacterie încadrată în **CMA**, membrii acestui complex fiind cel mai frecvent implicați în micobacteriozele rumegătoarelor sălbatice.
8. În cazul celor doi **câini de vânătoare** cu leziuni cutanate nodulare, investigațiile au evidențiat implicarea micobacteriană, fără a putea însă stabili cu certitudine diagnosticul de **granulom leproid canin**.
9. Această categorie a carnivorelor domestice este supusă unui risc privind **micobacteriozele cutanate atipice**, având în vedere utilizarea lor în activitățile de

- vânătoare și potențialul de contact cu animale sălbatice infectate. Nu este exclusă nici posibilitatea unor inoculări accidentale a micobacteriilor din mediu.
10. În absența unui rezultat pozitiv la examenul bacteriologic, testarea probelor prin **TaqMan PCR** în timp real a constituit o metodă **fiabilă și rapidă** de identificare a MNT din speciunile analizate.
 11. Genotiparea prin **MIRU-VNTR** a șase dintre probele de la animale, identificate ca subspecii ale *M. avium*, a dovedit o **putere de discriminare ridicată** (ID=0,933), valoare care este similară cu cele semnalate de alți autori
 12. În urma utilizării tehnicii **TaqMan PCR** în timp real, a **secvențierii** unor regiuni conservate de interes (*rpoB*, *Hsp65* și 16S ARNr) și a **analizei bioinformatică** a secvențelor obținute, a fost posibilă **identificarea până la nivel de specie** a majorității izolatelor evaluate (91,8%).
 13. Rezultatele obținute se aliniază celor prezentate de alți autori, **speciile cu creștere lentă cel mai frecvent izolate** aparținând CMA: *M. avium* (*M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *avium*) și *M. intracellulare*.
 14. Din rândul speciilor cu **creștere rapidă**, *M. peregrinum* (14%) și *M. chelonae* (13%) au deținut ponderea cea mai ridicată.
 15. **Relevanța clinică** a micobacteriilor izolate din specimene clinice nesterile de la nivelul tractului respirator trebuie **evaluată cu atenție** de către medicii umani clinicieni, fiind necesară excluderea contaminării circumstanțiale sau colonizării și corelarea cu aspectele clinice și cu statusul imunitar al pacienților.
 16. Analiza diversității populaționale a izolatelor umane identificate ca aparținând CMA, utilizând tehnica **MIRU-VNTR**, a condus la identificarea a trei populații, cu profile diferite: 03331158, 02331128 și 24131127 și un profil parțial 033311-8.
 17. Genotiparea prin **MIRU-VNTR** a **izolatelor de origine umană** constituie un aspect de **originalitate** al tezei, fiind realizată pentru **prima dată în țara noastră**.
 18. Identificarea unui profil alelic identic (24131127) atât în probele umane cât și în cele de la păsări este o dovadă clară a capacității patogene **oportuniste** și al **riscului zoonotic** al MNT din CMA.
 19. Complementar subiectului propus, în urma cercetărilor comparative privind valoarea de diagnostic a diferitelor metode moleculare disponibile, s-a reușit, **pentru prima dată**, identificarea și tipizarea speciei *M. caprae* la **nurci** de crescătorie. Cercetările efectuate sunt o continuare și o completare a unor investigații întreprinse anterior.
 20. Aducând un **plus de originalitate** prezentei lucrări, a fost utilizată (pentru prima dată) tehnica de **spoligotipare** cu ajutorul microbilor magnetice (tehnologia Luminex) pentru caracterizarea izolatelor de *M. caprae*, identificate în probele de la nurci și de la o bovină dar și pentru două izolate de *M. tuberculosis* de la om.
 21. Prezenta lucrare aduce o **contribuție importantă** la studiul diversității și a implicațiilor patologice ale MNT la animale dar și la oameni în România, abordare **alinată cu principiul „One Health”** și constituie un punct de repornire pentru cercetări ulterioare mult mai aprofundate.

CHAPTER 9.

FINAL CONCLUSIONS

This doctoral thesis addresses a **subject** of interest for both veterinary medicine and human medicine, that of **nontuberculous mycobacteria** (NTM). Their role in pathology is often viewed from a limited perspective only to **MAC** members: *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, which can cause significant economic losses in ruminant flocks, *M. avium* subsp. *avium* - the etiological agent of avian tuberculosis and *M. avium* subsp. *hominissuis*, which can cause infections in swine, but also in humans. However, NTM is not limited to the abovementioned aspects because, by their capacity as **opportunistic pathogens**, they can cause infections in many animal species and may interfere with the diagnosis of bovine tuberculosis.

Following the **overall analysis** of the results obtained in this PhD thesis on the isolation, identification and characterization of NTMs identified in animals but also in human respiratory samples, the following **general conclusions** can be drawn:

1. Considering the role that **wild animals** can play in the maintenance and spread of nontuberculous mycobacterial pathogens, the **serological** screening carried out in the N-E region of Romania aimed at assessing the presence of anti-CMA antibodies in wild boars and foxes.
2. The results obtained in this preliminary study suggest that, in the evaluated region, **wild boars** did not make an important contribution to the dissemination and maintenance of NTM in the silvatic environment. The positive signal obtained for a single **fox** of the 92 tested is not sufficient to estimate the CMA seroprevalence for this species, being necessary to evaluate a much larger number of samples from different geographic areas.
3. These results support the premises of **further research**, by increasing the number of tested samples from wild boar and foxes, and especially by extending investigations into several animal species.
4. Research on the isolation and identification of NTMs involved in infections in ruminants and hens has led to a certainty of diagnosis following corroboration of the **results** obtained in the histopathological, bacteriological, bacterioscopic and molecular examinations.
5. NTMs most frequently involved in infections in domestic animals (ruminants and hens) were the species included in **MAC**.
6. The histopathological, bacteriological and molecular investigations performed were able to reveal and confirm infection with *M. avium* subsp. *avium* for all tested hens.
7. In **deer** samples, evaluated by molecular techniques and in the absence of visible lesions, a mycobacterium classified in **MAC** was identified, the members of this complex being the most frequently involved in wild ruminants mycobacterioses.
8. In the case of the two **hunting dogs** with nodular cutaneous lesions, the investigations were able to reveal mycobacterial involvement, but without establishing with certainty the diagnosis of **canine leproid granuloma**.

9. This category of domestic carnivores is subject to a risk of **atypical cutaneous mycobacteriosis**, given their use in hunting activities and the potential for contact with infected wild animals. There is also the possibility of accidental inoculations of mycobacteria from the environment.
10. In the absence of a positive bacteriological test, TaqMan **real-time PCR** testing was a **reliable and rapid** method of identifying NTM in the analyzed specimens.
11. **MIRU-VNTR** genotyping of six of the animal samples identified as *M. avium* subspecies showed a **high discriminatory power** (DI = 0.933), a value that is similar to that reported by other authors, despite the reduced number of samples included in this assessment.
12. Using TaqMan **real-time PCR, sequencing** of conserved regions of interest (*rpoB*, *Hsp65* and 16S rRNA) and bioinformatic analysis of the sequences obtained, it was possible to identify up to the **species level** most of the human NTM isolates.
13. The results obtained are in line with those presented by other authors in the literature, the **slow growing** species most frequently isolated are those belonging to MAC: *M. avium* (*M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *avium*) and *M. intracellulare*.
14. Among the **rapidly growing** species, *M. peregrinum* (14%) and *M. chelonae* (13%) held the highest share.
15. The **clinical relevance** of the isolated mycobacteria in non-sterile clinical specimens from the respiratory tract should be carefully evaluated by **clinicians**, with the need to exclude circumstantial contamination or colonization and correlation with clinical aspects and patient status.
16. Analysis of the population diversity of human isolates identified as belonging to MAC using the **MIRU-VNTR** genotyping led to the identification of three populations with different profiles: 03331158, 02331128 and 24131127 and a partial profile 033311-8.
17. Genotyping by **MIRU-VNTR** of the isolates of human origin is an aspect of originality of the thesis, being carried out for the first time in our country.
18. Identifying an identical allele profile (**24131127**) in both human and bird samples is a clear evidence of the opportunistic pathogenic potential and zoonotic risk of NTM in MAC.
19. Complementary to the proposed subject, following comparative research on diagnostic value of the various molecular methods available, for the first time, the identification and typing of *M. caprae* species in **farm minks** was performed. The research on this matter is a continuation and completion of previous investigations in the outbreak.
20. In addition to the originality of the present work, the **microbead-based spoligotyping technique** (Luminex technology) was used (for the first time) to characterize the *M. caprae* strains identified in minks and bovine samples, but also for two isolates of *M. tuberculosis* from humans.
21. This work makes an **important contribution** to the study of the diversity and pathological implications of NTM in animals and humans in Romania, an approach aligned with the “**One Health**” principle and is a starting point for further in-depth research.

BIBLIOGRAFIE

1. Ablordey A., Swings J., Hubans C., Chemlal K., Locht C., Portaels F., Supply P., 2005 - *Multilocus variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium ulcerans*, J. Clin. Microbiol. 43:1546–1551.
2. Adékambi T., Sassi M., van Ingen J., Drancourt M., 2017 – *Reinstating Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii as species of the Mycobacterium abscessus complex*. Int J Syst Evol Microbiol 67:2726–2730
3. Adékambi T., Stein A., Carvajal J., Raoult D., Drancourt M., 2006 - *Description of Mycobacterium conceptionense sp. nov., a Mycobacterium fortuitum group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation*. J Clin Microbiol 44:1268–1273.
4. Agdestein A., Johansen T.B., Kolbjørnsen O., Jørgensen A., Djonne B., Olsen I., 2012 - *A comparative study of Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. hominissuis in experimentally infected pigs*. BMC Vet Res 8:11.10.1186/1746-6148-8-11
5. Agdestein A., Johansen T.B., Polaček V., Lium B., Holstad G., Vidanović D., Aleksić-Kovačević S., Jørgensen A., Žultauskas J., Nilsen S. F., Djonne B., 2011 - *Investigation of an outbreak of mycobacteriosis in pigs*. BMC Veterinary Research;7:63
6. Ahlstrom C., Barkema H.W., Stevenson K., Zadoks R.N., Biek R., Kao R., Trewby H., Hauptstein D., Kelton D.F., Fecteau G., Labrecque O., Keefe GP., McKenna S.L., De Buck J., 2015 - *Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis on a national and herd level*. BMC Genomics 16:161.10.1186/s12864-015-1387-6
7. Alderwick L.J., Harrison J., Lloyd G.S., Birch H.L., 2015 - *The mycobacterial cell wall--peptidoglycan and arabinogalactan*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.5:a021113
8. Alexandru N., 1995 - *Morfopatologia. Investigația etiologică în diagnostic*, (LCSVD), București;
9. Alvarez J., de Juan L., Briones V., Romero B., Aranaz A., Fernandez-Garayzabak J.F., Mateos, A., 2005 - *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in fallow deer and wild boar in Spain*. Veterinary Record 156, 212–213.
10. Álvarez J., García I.G., Aranaz A., Bezos J., Romero B., de Juan L., Mateos A., Gómez- Mampaso E., Domínguez L., 2008 - *Genetic Diversity of Mycobacterium avium Isolates Recovered from Clinical Samples and from the Environment: Molecular Characterization for Diagnostic Purposes* , Journal of Clinical Microbiology ,46(4) 1246-1251.
11. Anderson J.L., Meece J.K., Koziczkowski J.J., Clark D.L., Jr., Radcliffe R.P., Nolden C.A., Samuel M.D., Ellingson J.L.E., 2007 - *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in scavenging mammals in Wisconsin*. Journal of Wildlife Diseases 43, 302–308.
12. Andrei N., 1979 - *Paratuberculoza (boala lui Johne) la ovine* , Sinteză în “Culegere de Medicină Veterinară”, nr.5, 177 – 186
13. Anton (Rățoi) I.A., Crivei L.A., Oșlobanu L.E., Diculencu D., Savuța G., 2018 - *Preliminary data regarding the nontuberculous mycobacteria isolation from clinical specimens, from human patients, in Iași County*, Vol. 75(1), Veterinary Medicine, Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. A
14. Anton (Rățoi) I.A., Michelet L., Crivei L.A., Oșlobanu L.E., Aniță A.E., Boschirolu M.L., Savuța G., 2018 - *Diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from animal samples*, Lucrări Științifice, Vol. 61, Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași. B
15. Anton I.A., Aniță A.E., Aniță D.C., Oșlobanu L.E., Savuța G., 2015 - *Aspects of nontuberculous mycobacteria zoonotic risk*, Lucrări Științifice, Vol. 58, Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași.
16. Aranaz A., Cousins D., Mateos A., Dominiguez I., 2003 - *Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae (Aranaz et al. 1999) to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol 53:1785–9.10.1099/ijs.0.02532-0
17. Aranaz A., De Juan L., Montero N., Sánchez C., Galka M., Delso C., Alvarez J., Romero B., Bezos J., Vela A.I., Briones V., Mateos A., Domínguez L., 2004 - *Bovine tuberculosis (Mycobacterium bovis) in wildlife in Spain*. Journal of clinical microbiology, 42(6), 2602-8.
18. Argueta C., Yoder S., Holtzman A.E., Aronson T.W., Glover N., Berlin O.G., Stelma G.N., Froman S., Tomasek P., 2000 - *Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from foods as possible exposure sources*, J Food Prot., 63: 930-933.
19. Arora J., Kumar G., Verma A.K., Bhalla M., Sarin M., Myneedu V. P., 2015 - *Utility of MPT64 Antigen Detection for Rapid Confirmation of Mycobacterium tuberculosis Complex*, J Glob Infect Dis. Apr-Jun;

20. Attili A.R., Ngu-Ngwa V., Preziuso S., Pacifici L., Domesi A., Cuteri V., 2011 - *Ovine paratuberculosis: a seroprevalence study in dairy flocks reared in the marche region, Italy*, *Vet Med Int.* 2011:782875.
21. Augustynowicz-Kopeć E., Krajewska M., Zabost A., Napiórkowska A., Zwolska Z., 2011 - *Characterisation of Mycobacterium bovis strains isolated from farm and wild animals in Poland*, *Bull Vet Inst Pulawy* 55, 385-389
22. Bakula Z., Brzostek A., Borówka P., Żaczek A., Szulc-Kielbik I., Podpora A., Parniewski P., Strapagiel D., Dziadek J., Proboszcz M., Bielecki J., van Ingen J., Jagielski T., 2018 - *Molecular typing of Mycobacterium kansasii using pulsed-field gel electrophoresis and a newly designed variable-number tandem repeat analysis*, *Sci Rep.* 8: 4462.
23. Barbier E., Boschirolu M.L., Gueneau E., Rochelet M., Payne A., de Cruz K., Blieux A.L., Fossot C., Hartmann A., 2016 - *First molecular detection Mycobacterium bovis in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis*, *J. Appl. Microbiol.* 120(5):1193–207.10.1111/jam.13090
24. Barbosa P., Leão C., Usié A., Amaro A., Botelho A., Pinto C., Inácio J., Stevenson K., Ramos A.M., 2017 - *Draft genome sequence of a rare pigmented Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis type C strain*. *Genome Announc* 5:e01066-17.
25. Barkema H.W., Hesselink, J.W., McKenna S.L.B., Benedictus G., Groenendaal H., 2010- *Global prevalence and economics of infection with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in ruminants*, in *Paratuberculosis: organism, disease, control*, ed. Behr M.A. și Collins D.M., (p. 10–21). Wallingford, Oxfordshire
26. Barry C., Corbett D., Bakker D., Andersen P., McNair J., Strain S., 2011 - *The effect of Mycobacterium avium complex infections on routine Mycobacterium bovis diagnostic tests*. *Veterinary Medicine International* 2011, 145092.
27. Battaglioli T. , Soto A. , Agapito J. , Acurio V. and Stuyft P., 2014 - *Manual liquid culture on simple Middlebrook 7H9 or MGIT for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis*, *Trop Med Int Health*, 19: 1500-1503.
28. Beard P.M., Daniels M.J., Henderson D., Pirie A., Rudge K., Buxton D., Rhind S., Greig A., Hutchings M.R., McKendrick I., Stevenson K., Sharp J.M., 2001 - *Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland*. *J Clin Microbiol* 39, 1517-1521
29. Beggs M., Stevanova R., Eisenach K.D., 2000 - *Species identification of Mycobacterium avium complex isolates by a variety of molecular techniques*. *J. Clin. Microbiol.* 38:508–512
30. Ben Salah I., Adékambi T., Raoult D., Drancourt M., 2008 - *rpoB sequence-based identification of Mycobacterium avium complex species*. *Microbiology.*, 154:3715–23
31. Ben Salah I., Cayrou C., Raoult D., Drancourt M., 2009 - *Mycobacterium marseillense sp. nov., Mycobacterium timonense sp. nov. and Mycobacterium bouchedurhonense sp. nov., novel species in the Mycobacterium avium complex*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:2803–2808. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.010637-0>
32. Benjak A., Honap T.P., Avanzi C., Becerril Villanueva E., Estrada-García I., Rojas-Espinosa O., Stone A.C., Cole S.T., 2017 - *Insights from the genome sequence of Mycobacterium lepraemurium: massive gene decay and reductive evolution*. *mBio* 8:e01283-17
33. Beran V., Havelkova M., Kaustova J., Dvorska L. and Pavlik I., 2006 - *Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review*. *Veterinarni Medicina*, 51, (7): 365–389
34. Bercovier H., Kafri O și Sela S., 1986 - *Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136:1136–1141.
35. Bercovier H., Vincent V., 2001 - *Mycobacterial infections in domestic and wild animals due to Mycobacterium marinum, M. fortuitum, M. chelonae, M. porcinum, M. farcinogenes, M. smegmatis, M. scrofulaceum, M. xenopi, M. kansasii, M. simiae and M. Genavense*, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20 (1), 265-290
36. Bergonier D., Sobral D., Feßler A.T., Jacquet E., Gilbert F.B., Schwarz S., Treilles M., Boulou P., Pourcel C., Vergnaud G., 2014 - *Staphylococcus aureus from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA)*, *BMC Veterinary Research*. 45:97
37. Bhalla G. S., Sarao M. S., Kalra D., Bandyopadhyay K., John A. R., 2018. *Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria*. *Practical laboratory medicine*, 12, e00107.
38. Bhembe N.L., Jaja I.F., Nwodo U., Okoh A.I., Green E., 2017 - *Prevalence of tuberculous lymphadenitis in slaughtered cattle in Eastern Cape, South Africa*. *Int. J. Infect. Dis.* 61, 27–37
39. Bhembe N.L., Tanih G.N., Caine L., Pekana A., Govender P., Nwodo U., Okoh A., Mabinya L., Green E., 2018 - *Diversity of Mycobacterium tuberculosis Complex from Cattle Lymph Nodes in Eastern Cape Province*, *BioMed Research International*, ID 3683801.

40. Biet F., Boschirolu M.L., 2014 - *Non-Tuberculous Mycobacterial infections of veterinary relevance*, Research in Veterinary Science 97:S69-S77..
41. Biet F., Boschirolu M.L., Thorel M.F., Guilloteau L.A., 2005 - *Zoonotic Aspects of Mycobacterium bovis and Mycobacterium avium-intracellulare Complex (MAC)*, Veterinary research ,36(3) 411-436.
42. Bittner M. J., Preheim L. C., 2011 - *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*, 6th ed., capitolul 42: Other Nontuberculous Mycobacteria, pg. 618-626, Ed. Schlossberg D., ASM Press, Washington, DC
43. Bjordal J.T., Olsen I., Rusa J.M., Dahle U.R., Holstad G., Djonne B., 2007 - *New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. hominissuis isolates of human and animal origin in Norway*. BMC Microbiology
44. Blouin, Y., Hauck, Y., Soler, C., Fabre, M., Vong, R., Dehan, C., Cazajous, G., Massoure, P.L., Kraemer, P., Jenkins, A., Garnotel, E., Pourcel, C., Vergnaud, G., 2012 - *Significance of the Identification in the Horn of Africa of an Exceptionally Deep Branching Mycobacterium tuberculosis Clade*. PLoS ONE 7, e52841.
45. Boadella M., Acevedo P., Vicente J., Mentaberre G., Balseiro A., Arnal M., 2011 - *Spatio-temporal trends of Iberian wild boar contact with Mycobacterium tuberculosis complex detected by ELISA*. EcoHealth. 8:478–84
46. Bodal V.K., Bal M.S., Bhagat S., Kishan J., Deepika, Brar R.K., 2015 - *Fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen staining of bronchoalveolar lavage, bronchial washings, bronchoscopic brushing and post bronchoscopic sputum along with cytological examination in cases of suspected tuberculosis*. Indian J. Pathol. Microbiol. 58(4):443–7
47. Bostănaru A., 2014 - „Cercetări privind modificările fenotipice și genotipice induse de agenți fizici și chimici la micobacteriile izolate de la om și animale”, Teză de doctorat, Facultatea de Medicină Veterinară Iași
48. Bostănaru A-C., Diculencu D., Mareș M., Savuța Gh., 2014 - *MPT64 Antigen Simple and Rapid Test for Identification and Discrimination of Mycobacterium tuberculosis Complex from Nontuberculous Mycobacteria*. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine 71(2)
49. Bostănaru A-C., Diculencu D., Savuța G., 2014 – *Prevalence of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in Iasi county*, Lucrări Științifice seria Medicină Veterinară, Vol. 57 (1-2), pp. 211-216.
50. Bostănaru A-C., Mareș M., Pașca S., Savuța G., 2014 - *Rapid Identification of Mycobacterium avium subsp. avium from MB/BacT Bottles Using PCR*. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine.
51. Brodin P., Demangel C., Cole S.T., 2005 - *Introduction to functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex*. în: Tuberculosis and the tubercle bacillus, Ed. Cole S.T., Davies Eisenach K., McMurray D.N. ș.a., Washington, DC: ASM Press; 2005:143-153
52. Brodin P., Poquet Y., Levillain F., Peguillet I., Larrouy-Maumus G., Gilleron M., ș.a., 2010 - *High content phenotypic cell-based visual screen identifies Mycobacterium tuberculosis acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosomal remodeling*. PLoS Pathogens. 6(9):e1001100
53. Brosch R., Gordon S.V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons L.M., Pym A.S., Samper S., van Soolingen D., Cole S.T., 2002 - *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex*. Proc Natl Acad Sci U S A., 99:3684–9;
54. Broutin V., Bañuls A.L., Aubry A., Keck N., Choisy M., Bernardet J.F., 2012 - *Genetic diversity and population structure of Mycobacterium marinum: new insights into host and environmental specificities*, J. Clin. Microbiol. 50:3627–3634
55. Brown-Elliott B. A., Springer B., Steingrube V. A., Wilson R. W., Pfyffer G. E., Garcia M. J., Menendez M. C., Rodriguez-Salgado B., Jost K. C., Chiu S. H., Onyi G. O., Böttger E. C. and Wallace R. J., Jr., 1999 - *Description of Mycobacterium wolinskyi and Mycobacterium goodii, two new rapidly growing species related to Mycobacterium smegmatis and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:1493-1511.
56. Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. Jr., 2005 - *Infections caused by nontuberculous mycobacteria*. In: Mandell GL, Bennett JC, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett's: Principles and Practice of Infectious Disease. Vol 2. 6th ed. Philadelphia, Elsevier; 2909–2916.
57. Brown-Elliott BA, Simmer PJ, Trovato A, Hyle EP, Droz S, Buckwalter SP, Borroni E, Branda JA, Iana E, Mariottini A, Nelson J, Matteelli A, Toney NC, Scarparo C, de Man TJB, Vasireddy R, Gandhi RT, Wengenack NL, Cirillo DM, Wallace RJ, Tortoli E., 2018 - *Mycobacterium decipiens sp. nov., a new*

- species closely related to the Mycobacterium tuberculosis complex*, Int J Syst Evol Microbiol.68(11):3557-3562.
58. Bull T. J., Sidi-Boumedine K., McMinn E. J., Stevenson K., Pickup R., and Hermon-Taylor J., 2003 - *Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from other species of the Mycobacterium avium complex*. Mol. Cell. Probes 17:157–164
59. Carp Cărare C. 2014 – *Microbiologie Generală*, Ed. Ion Ionescu de la Brad Iasi,
60. Carp-Cărare M, Guguianu E., Timofte D., 1997 - *Lucrări practice de microbiologie veterinară*, Editura USAMV Iași
61. Carta T., Álvarez J., Pérez de la Lastra J.M., Gortázar C., 2013 - *Wildlife and paratuberculosis: a review*. Res Vet Sci 94:191–197
62. Carter G.R., Wise D. J., 2004 - *Mycobacterium în Essentials of veterinary bacteriology and mycology*, 6th edition, Ames, IA: Iowa State Press, 2004, pagina 208,
63. Castellanos E., Aranaz, A., Gould K.A., Linedale R., Stevenson K., Álvarez J., Domínguez L., de Juan L., Hinds J., Bull, T.J., 2009 – *Discovery of stable and variable differences in the Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Types I, II and III genomes by pan-genome microarray analysis*. Applied and Environmental Microbiology 75, 676–686.
64. Castellanos E., Romero B., Rodriguez S., Juan de L., Bezos J., Mateos A., Dominguez L., Aranaz A., 2010 - *Molecular characterization of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis Types II and III isolates by a combination of MIRU–VNTR loci*, Vet Microbiol, 144:118–126.
65. Castillo-Rodal A.I., Mazari-Hiriart M., Lloret-Sanchez L.T., Sachman-Ruiz B., Vinuesa P., Lopez-Vidal Y., 2012 - *Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 31, 683–694.
66. Cayrou C., Turenne C., Behr M. A., Drancourt M., 2010 - *Genotyping of Mycobacterium avium complex organisms using multispacer sequence typing*. Microbiology 156, 687–694.
67. Chang C.-H., Chang Y.-C., Underwood A., Chiou C.-S., Kao C.-Y., 2007 - *VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database* Nucleic Acids Res 35(Database issue): D416–21
68. Chapman J.S., Bernard J.S., 1962 - *The tolerances of unclassified mycobacteria. I. Limits of pH tolerance*, Am Rev Respir Dis, 86:582-3.
69. Chiaradia L., Lefebvre C., Parra, J., Marcoux J., Burlet-Schiltz O., Etienne G., Tropis M., Daffe M., 2017 - *Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane*. Sci. Rep. 7:12807.
70. Chiari M., Zanoni M., Alborali LG, Zanardi G, Avisani D, Tagliabue S., 2014 - *Isolation of Mycobacterium caprae (Lechtal Genotype) from Red Deer (Cervus elaphus) in Italy*. J. Wildlife Dis. 50:330–3.
71. Claeys T.A., Robinson R.T., 2018 - *The many lives of nontuberculous mycobacteria*. J Bacteriol 200: 1–10.
72. Coelho A.C., Pinto M.L., Matos A.C., Matos M., Pires M.A., 2013 - *Mycobacterium avium complex in domestic and wild animals*, In: Payan-Carreira R (ed.). Insights from veterinary medicine. InTech
73. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E.3rd, Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., K. Devlin R., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S. and Barrell B.G., 1998 - *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature 393: 537–544.
74. Cole S.T., Eiglmeier K., Parkhill J., James K.D., Thomson N.R., Wheeler P.R., Honore N., Garnier T., Churcher C., Harris D., Mungall K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R.M., Devlin K., Duthoy S., Feltwell T., Fraser A., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Lacroix C., Maclean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Rutter S., Seeger K., Simon S., Simmons M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Taylor K., Whitehead S., Woodward J.R. and Barrell B.G., 2001 - *Massive gene decay in the leprosy bacillus*. Nature 409:1007–1011.
75. Conceição I.G., Acha I.M., Borges A.S., Assis F.G., Ioures F.H., Fonseca E Silva F., 2011 - *Epidemiology, clinical signs histopathology and molecular characterization of canine leproid granuloma: a retrospective study of cases from Brazil*. Veterinary Dermatology 22, 249–256
76. Coulon C., Collignon A., McDonnell G., Thomas V., 2010 - *Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings*, Journal of Clinical Microbiology 48, 2689–2697.
77. Cousins D.V., Williams S.N., Hope A., Eamens G.J., 2000 - *DNA Fingerprinting of Australian Isolates of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis using IS900 RFLP*, Australian Veterinary Journal. 78(3) 184-190.

78. Crago B., Ferrato C., Drews S.J., Louie T., Ceri H., Turner R.J., Roles A., Louie M., 2014 - *Surveillance and molecular characterization of non-tuberculous mycobacteria in a hospital water distribution system over a three year period*, J Hosp Infect. 87:59–62.
79. De Cruz K., Boschirolu M.L., Neildez T.M.A., 2018 - *Développement et mise en place d'un système de détection moléculaire pour la tuberculose*. Veterinary medicine and animal Health
80. de Kruijf M., Lesniak O.N., Yearsley D., Ramovic E., Coffey A., O'Mahony J., 2017 - *Low genetic diversity of bovine Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis isolates detected by MIRU-VNTR genotyping*. Vet. Microbiol. 203:280–285
81. de Zwaan R., van Ingen J., van Soolingen D., 2014 - *Utility of rpoB gene sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria in the Netherlands*. Journal of clinical microbiology, 52(7), 2544-51.
82. Dedola C., Zobba R., Pinna Pargaglia M. L., Chessa B., Antuofermo E., Polinas M., Pittau M., Alberti A., 2014 - *First report of canine leprosy in Europe: molecular and clinical traits*, Veterinary Record 174: 120
83. Dhama K., Mahendran M., Tiwari R., Dayal Singh S., Kumar D., Singh S., and Sawant P. M., 2011 - *Tuberculosis in birds: insights into the Mycobacterium avium infections*. Vet. Med. Int. 712369
84. Dirac A. M., Weigel K. M., Yakus M. A., Becker A. L., Chen H.-L., Fridley G., Sikora A., Speake C., Hilborn E. D., Pfäller S., Cangelosia G. A., 2013 - *Shared mycobacterium avium genotypes observed among unlinked clinical and environmental isolates*. Applied and Environmental Microbiology. 79(18):5601–5607.
85. Domogalla J., Prodinger W. M., Blum H., Krebs S., Gellert S., Müller M., Neuendorf E., Sedlmaier F., Büttner M., 2013 - *Region of difference 4 in alpine Mycobacterium caprae isolates indicates three variants*. Journal of clinical microbiology, 51(5), 1381-8.
86. Dvorska L., Matlova L., Bartos M., Parmova I., Bartl J., Svastova P., Bull T.J., Pavlik I., 2004-*Study of Mycobacterium avium complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000*, Vet Microbiol, 99:239-250.
87. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare): More S., Bøtner A., Butterworth A., Calistri P., Depner K., Edwards S., Garin-Bastuji B., Good M., Gortazar Schmidt C., Michel V., Miranda M.A., Nielsen S.S., Raj M., Sihvonen L., Spooler H., Stegeman J.A., Thulke H.-H., Velarde A., Willeberg P., Winckler C., Baldinelli F., Broglia A., Zancanaro G., Beltran-Beck B., Kohnle L., Morgado J. and Bicout D., 2017 - *Scientific Opinion on the assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): paratuberculosis*. EFSA Journal 2017; 15(7):4960, p. 47.
88. Eisenberg T., Volmer R., Eskens U, Moser I., Nessler A., Sauerwald C, Seeger H, Klewer-Fromentin K, Möbius P., 2012: *Outbreak of reproductive disorders and mycobacteriosis in swine associated with a single strain of Mycobacterium avium subspecies hominissuis*. J. Clin. Microbiol. 159:69-76.
89. Englund S., Bolske G., Johansson K.E., 2002 - *An IS900-like sequence found in a other Mycobacterium sp. other than Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*, FEMS Microbiol. Lett., 209:267-271.
90. Erler W., Martin G., Sachse K., Naumann L., Kahlau D., Beer J., Bartos M., Nagy G., Cvetnic Z., Zolnir-Dovic M., and Pavlik I., 2004 - *Molecular fingerprinting of Mycobacterium bovis subsp. caprae isolates from central Europe*, J. Clin. Microbiol. 42:2234-2238.
91. Euzéby JP., 1997- *List of bacterial names with standing in nomenclature*,. Int. J. Syst. Bacteriol.;47:590–592
92. Falkinham J.O. III, 2015 -*Nontuberculous Mycobacterial Infections*, Capitolul 29: p. 538- 548 în Tuberculosis, Leprosy and Mycobacterial Diseases of Man and Animals: The Many Hosts of Mycobacteria (ed. Mukundan H. ş.a), CAB International, Boston.
93. Falkinham J.O. III, George K.L., Parker B.C., Gruft H., 1984 - *In vitro susceptibility of human and environmental isolates of Mycobacterium avium, M. intracellulare, and M. scrofulaceum to heavy-metal salts and oxyanions*. Antimicrob Agents Chemother; 25:137–9
94. Farlow J., Smith K.L., Wong J., Abrams M., Lytle M., Keim P, 2001 - *Francisella tularensis strain typing using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis* J. Clin. Microbiol., 39, pp. 3186-3192
95. Faye S., Moyon J.L., Gares H., Benet J.J., Garin-Bastuji B., Boschirolu M.L., 2011 - *Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN-gamma assay (Bovigam(R)) in a low prevalence area in France*. Veterinary Microbiology 151, 60–67.
96. Figueroa C.J, Tang Y.W., Taur Y., 2015 - *Principles and Applications of Genomic Diagnostic Techniques*, în Molecular Medical Microbiology, Ediția II, Vol. I., Ed. Tang Y.W. ş.a., cap.22., p. 381-398, Editura Elsevier, 2015
97. Florou M., Leontides L., Kostoulas P., Billinis C., Sofia M, Kyriazakis I., Lykotrafitis F., 2008 - *Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from Non-Ruminant Wildlife Living in the Sheds and on the Pastures of Greek Sheep and Goats*, Epidemiology and Infection 136(5) 644-652.

98. Francis J., Seiler R.J., Wilkie I.W., O'Boyle D., Lumsden M.J., Frost A.J., 1978 - *The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins*. Vet Rec. 1978;44:420–425.
99. Fritsch I., Luyven G., Köhler H., Lutz W., Möbius P., 2012 - *Suspicion of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis transmission between cattle and wild-living red deer (Cervus elaphus) by multitarget genotyping*. Appl Environ Microbiol. 78(4):1132–1139.
100. Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A., 1998 - *Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats*, Microbiology 144(Part 5):1189–1196.
101. Gao A., Odumeru J., Raymond M., Hendrick S., Duffield T., Mutharia, L., 2009 - *Comparison of milk culture, direct and nested polymerase chain reaction (PCR) with fecal culture based on samples from dairy herds infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Canadian journal of veterinary research, 73(1), 58-64.
102. García-Agudo L., García-Martos P., 2011 - *Clinical significance and antimicrobial susceptibility of rapidly growing mycobacteria*, in Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances , A. Méndez-Vilas (Ed.), pg. 363- 367
103. Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., 2003 - *The complete genome sequence of Mycobacterium bovis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 7877–7882.
104. Garrido J.M., Vicente J., Carrasco-García R., 2010 - *Experimental infection of Eurasian wild boar with Mycobacterium avium subsp. avium*. Veterinary Microbiology. 144(1-2):240–245
105. Gauthier D.T., Rhodes M.W., 2009 - *Mycobacteriosis in fishes: A review*. Vet J.180:33–47;
106. Ghielmetti G., Scherrer S., Friedel U., Frei D., Suter D., Perler L., Wittenbrink M.M., 2017- *Epidemiological tracing of bovine tuberculosis in Switzerland, multilocus variable number of tandem repeat analysis of Mycobacterium bovis and Mycobacterium caprae*. PloS one, 12(2), e0172474.
107. Gioffré A., Correa Muñoz M., Alvarado Pinedo M. F., Vaca R., Morsella C., Fiorentino M. A., Paolicchi F., Ruybal P., Zumárraga M., Travería G. E., Roman, M. I., 2015 - *Molecular typing of Argentinian Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolates by multiple-locus variable number-tandem repeat analysis*. Brazilian journal of microbiology, 46(2), 557-64.
108. Gormley E., Doyle M., Duignan A., Good M., More S.J., Clegg T.A., 2013 - *Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN γ) assay*. Veterinary Research 44, 117
109. Goyal R., Rao N., Meena L.S., 2011 - *Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by Mycobacterium tuberculosis: LAM and cord factor: An overview*. Biotechnol Res Int.;2011:274693.
110. Greene C. E., 2011 - *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th Edition., Editura Elsevier
111. Griffith D.E. , Aksamit T. , Brown-Elliott B.A. , Catanzaro A. , Daley C. , Gordin F. , Holland S.M. , Horsburgh R. , Huitt G. , Iademarco M.F. , Iseman M. , Olivier K. , Ruoss S. , von Reyn C.F. , Wallace R.J. Jr., Winthrop K., 2007 - *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175:367-416
112. Gross T.L., Lee T., Ihrke P.J., Walder E.J., Affolter V.K., 2005 - *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis*, Blackwell Science Ltd, Second edition
113. Guerin-Fauble V., Flandrois J.P., Pichat C., Boschirolu M.L., Lamy B., 2013 - *Mycobacterium bourgelatii sp. nov., a rapidly growing, non-chromogenic species isolated from the lymph nodes of cattle*. Int J Syst Evol Microbiol. 63(Pt 12):4669–74.
114. Guerrero C., Bernasconi C., Burki D., Bodmer T., Telenti A., 1995 - *A novel insertion element from Mycobacterium avium, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness*, J Clin Microbiol. 33:304–307
115. Guillemin I., Cambau E. and Jarlier, V., 1995 - *Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus Mycobacterium: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones*. Antimicro. Agents Chemother. 39, 2145–2149.
116. Gupta R. S., Lo B., Son J., 2018 - *Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera*. Front. Microbiol. 9:67.
117. Halse, T. A., Escuyer V. E., and Musser K. A., 2011 - *Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the Mycobacterium tuberculosis complex in clinical specimens*, J. Clin. Microbiol. 49, 2562–2567
118. Halstrom S., Price P., Thomson R., 2015 - *Review: environmental mycobacteria as a cause of human infection*. Int J Mycobacteriol 4:81–91.
119. Hamieh A., Tayyar R., Tabaja H., E. L. Zein S., Bou Khalil P., Kara N., 2018 - *Emergence of Mycobacterium simiae: A retrospective study from a tertiary care center in Lebanon*. PLoS ONE 13(4): e0195390.

120. Hauer A., De Cruz K., Cochard T., Godreuil S., Karoui C., Henault S., Bulach T., Bañuls A.-L., Biet F., Boschirolu M.L., 2015 - *Genetic evolution of Mycobacterium bovis causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978*. PLOS ONE 10, e0117103.
121. Hauer A., Michelet L., De Cruz K., Cochard T., Branger M., Karoui C., Henault S., Biet F., Boschirolu M.L., 2016 - *MIRU-VNTR allelic variability depends on Mycobacterium bovis clonal group identity*. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 45, 165–169.
122. Higgins J., Camp P., Farrell D., Bravo D., Pate M., Robbe-Austerman S., 2011 - *Identification of Mycobacterium spp. of veterinary importance using rpoB gene sequencing*. BMC Vet. Res. 7, 77.
123. Hoefsloot W., van Ingen J., Andrejak C., Angeby K., Bauriaud R., ş.a., 2013 - *The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study*. Eur Respir J 42: 1604–1613
124. Homorodeanu D., Moldovan O., Diculencu D., Chirica G., Muntean I., 2005 - *Îndrumar de tehnici de laborator de bacteriologie BK*, Bucureşti
125. Houben D., Demangel C., van Ingen J., Perez J., Baldeón L., Abdallah A.M., Caleechurn L., Bottai D., van Zon M., de Punder K., van der Laan T., Kant A., Bossers-de Vries R., Willemsen P., Bitter W., van Soolingen D., Brosch R., van den Wel N., Peters P.J., 2012 - *ESX-1- mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria*. Cell Microbiol ; 14:1287-1298.
126. Houser B., 2012 - *Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview*, Arch. Physiol. Biochem., 118, p. 192
127. Hruska K., Kaevska M., 2012- *Mycobacteria in water, soil, plants and air: a review*, Vet Med 57:623–679.
128. http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/ (accesat 5.08.2018)
129. <http://mac-inmv.tours.inra.fr> (accesat 5.08.2018)
130. <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>
131. <http://www.Mbovis.org> (accesat 5.11.2018)
132. <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SpolSimilaritySearch/spol.jsp> (accesat 5.11.2018)
133. <https://www.miru-vntrplus.org> (accesat 10.08.2018)
134. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/> (accesat 10.01.2019)
135. https://www.who.int/tb/publications/2017/zoonotic_TB/en/ (accesat 10.01.2019)
136. <https://www.who.int/tb/strategy/en/> (accesat 10.01.2019)
137. Hughes M.S., Ball M.W., Mccarroll J., Erskine M., Taylor M.J., Pollock J.M., Skuce R.A., Neill S.D., 2005 - *Molecular analysis of mycobacteria other than the M. tuberculosis complex isolated from Northern Ireland cattle*. Vet. Microbiol. 108, 101–112.
138. Hulten K., Karttunen T.J., El-Zimaity H.M., Naser S.A., Collins M.T., Graham D.Y., El-Zaatari F.A., 2000 - *Identification of cell wall deficient forms of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by in situ hybridization*. J Microbiol Methods 2000;42:185–95.
139. Hunter P.R., Gaston M.A., 1988 - *Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity*. Journal of clinical microbiology, 26(11), 2465-6.
140. Ichikawa K., van Ingen J., Koh W.J., Wagner D., Salfinger M., Inagaki T., Uchiya K.I., Nakagawa T., Ogawa K., Yamada K., Yagi T., 2015 - *Genetic diversity of clinical Mycobacterium avium subsp. hominissuis and Mycobacterium intracellulare isolates causing pulmonary diseases recovered from different geographical regions*. Infect Genet Evol 36:250–255.
141. Ichikawa K., Yagi T., Moriyama M., Inagaki T., Nakagawa T., Uchiya K., Nikai T., Ogawa K.J. 2009 - *Characterization of Mycobacterium avium clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, ISMav6*, Med. Microbiol. 58(7):945-950
142. Imperiale B.R., Moyano R.D., Di Giulio A.B., Romero M.A., Alvarado Pinedo M.F., Santangelo M.P., 2017 - *Genetic diversity of Mycobacterium avium complex strains isolated in Argentina by MIRU-VNTR*. Epidemiol Infect. 145(7):1382–1391
143. Inagaki T., Nishimori K., Yagi T., Ichikawa K., Moriyama M., Nakagawa T., Shibayama T., Uchiya K., Nikai T., Ogawa, K., 2009 - *Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing Mycobacterium avium with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing*. Journal of clinical microbiology, 47(7), 2156-64.
144. Ishikawa E., Ishikawa T., Morita Y.S., Toyonaga K., Yamada H., Takeuchi O., Kinoshita T., Akira S., Yoshikai Y., Yamasaki S., 2009 - *Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle*, Journal of Experimental Medicine, vol. 206, no. 13, pp. 2879–2888
145. Ishino Y., Krupovic M., Forterre P., 2018 - *History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology*. Journal of bacteriology, 200(7), e00580-17.

146. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A., 1987 - *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product.* J Bacteriol 169:5429–5433
147. Iwamoto T., Nakajima C., Nishiuchi Y., Kato T., Yoshida S., Nakanishi N., et al., 2012 - *Genetic diversity of Mycobacterium avium subsp. hominissuis strains isolated from humans, pigs, and human living environment.* Infect. Genet. Evol. 12 846–852
148. Jagielski T., Minias A., Van Ingen J., Rastogi N., Brzostek A., Żaczek A., 2016 - *Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria.* Clin Microbiol Rev. 29(2):239–290
149. Jagielski T., Van Ingen J., Rastogi N., Dziadek J., Mazur P.K., Bielecki J., 2014 - *Current methods in the molecular typing of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria,* BioMed Res Inter
150. Jansen R., Embden J.D., Gaastra W., Schouls L.M., 2002 - *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.* Mol. Microbiol. 43, 1565–1575.
151. Jarzembowski Jason A. and Young Michael B., 2008 - *Nontuberculous Mycobacterial Infections,* Archives of Pathology & Laboratory Medicine, Vol. 132, No. 8, pp. 1333-1341
152. Jenkins A.O., Gormley E., Gcebe N., Fosgate G.T., Conan A., Aagaard C., Michel A.L., Rutten V.P., 2018 - *Cross reactive immune responses in cattle arising from exposure to Mycobacterium bovis and non-tuberculous mycobacteria,* Prev. Vet. Med.,152:16-22.
153. Jensen M.B.F., Schjørring S., Björkman J. T., Torpdahl M., Litrup E., Nielsen E. M., Niskanen T., 2017 - *External quality assessment for molecular typing of Salmonella 2013–2015: performance of the European national public health reference laboratories,* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 36, 1923–1932.
154. Johansen T.B., Agdestein A., Lium B., Jørgensen A., Djonne B., 2014 - *Mycobacterium avium subsp. hominissuis infection in swine associated with peat used for bedding,* Biomed Res Int: 2014 189649;
155. Johansen T.B., Olsen I., Jensen M.R., Dahle U.R., Holstad G., Djonne B., 2007 - *New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. hominissuis isolates of human and animal origin in Norway.* BMC Microbiol, 7:14
156. John H.A., Frothingham L., 1895 - *A peculiar case of tuberculosis in a cow,* Deutsche
157. Joubert L., Ferney J., Oudar J., Van H., 1963 - *Thélite nodulaire tuberculoïde de la vache laitière à mycobactéries atypiques scotochromogènes.* Rev Med Vet 114:87–105
158. Judge J., Kyriazakis I., Greig A., Davidson R.S., Hutchings M.R., 2006 - *Routes of intraspecies transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in rabbits (Oryctolagus cuniculus): a field study.* Applied and environmental microbiology, 72(1), 398-403.
159. Kaboudi K., Amara A., Bouzouaia M., 2017 - *Avian tuberculosis in a backyard poultry flock in*
160. Kankya C., Muwonge A., Djonne B., Munyeme M., Opuda-Asibo J., Skjerve E., Oloya J., Edvardsen V., Johansen T.B., 2011 - *Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: public health significance,* BMC Public Health, 11:320.
161. Kasai H., Ezaki T., Harayama S., 2000 - *Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences.* J. Clin.Microbiol. 38, 301–308.
162. Katoch V. M, 2004 - *Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM),* Indian Journal of Medical Research.,120(4):290–304
163. Kazda J., Pavlik I., Falkinham J.O. III, Hruska K., 2009 - *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health,* Springer Science+Business Media B.V.
164. Keller A.P., Beggs M.L., Amthor B., Bruns F., Meissner P., Haas W.H., 2002 - *Evidence of the presence of IS1245 and IS1311 or closely related insertion elements in nontuberculous mycobacteria outside of the Mycobacterium avium complex,* Journal of clinical microbiology, 40(5), 1869-72.
165. Kim BJ, Kim BR, Jeong J, Lim JH, Park SH, Lee SH, Kim CK, Kook YH, Kim BJ, 2018 - *A description of Mycobacterium chelonae subsp. gwanakae subsp. nov., a rapidly growing mycobacterium with a smooth colony phenotype due to glycopeptidolipids.* Int J Syst Evol Microbiol. 68(12):3772-3780.
166. Kim H., Kim S.H., Shim T.S., Kim M.N., Bai G.H., Park Y.G., 2005 - *Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65),* Int J Syst Evol Microbiol. 55:1649–1656.
167. Kim S. H., Shin J. H., 2017 - *Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB.* J. Clin. Lab. Anal. 32:e22184.
168. Komatsu T., Inaba N., Kondo K., Nagata R., Kawaji S., Shibahara T., 2017 - *Systemic mycobacteriosis caused by 'Mycobacterium avium subspecies hominissuis' in a 14-month-old Japanese black beef steer,* The Journal of veterinary medical science, 79(8), 1384-1388.
169. Kopecky J., Kyselkova M., Omelka M., Cermak L., Novotna J., Grundmann G.L., 2011 - *Actinobacterial community dominated by a distinct clade in acidic soil of a waterlogged deciduous forest.* FEMS Microbiol Ecol, 78:386–394

170. Krajewska-Wędzina M., Kozińska M., Orłowska B., Weiner M., Szulowski K., Augustynowicz-Kopeć E., Anusz K., Smith NH., 2018 - *Molecular characterisation of Mycobacterium caprae strains isolated in Poland*, Veterinary Record 182, 292.
171. Kriz P., Jahn P., Bezdekova B., Blahutkova M., Mrlik V., Slana I. and Pavlik I., 2010 - *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 16, No. 8
172. Kubica T., Rüsch-Gerdes V. and Niemann S., 2003 - *Mycobacterium bovis subsp. caprae caused one-third of human M. bovis-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001*, J. Clin. Microbiol. 41:3070-3077
173. Lamy B., Marchandin H., Hamitouche K., Laurent F., 2008 - *Mycobacterium setense sp. nov., a Mycobacterium fortuitum-group organism isolated from a patient with soft tissue infection and osteitis*. Int J Syst Evol Microbiol 58:486–490.
174. Lara G.H.B., Ribeiro Mr.G., Leite C.Q.F., Paes A.C., Guazzelli A., Silva A.Vd., Santos A.C.B., Listoni F.J.P., 2011 - *Occurrence of Mycobacterium spp. and other Pathogens in Lymph nodes of Slaughtered Swine and Wild Boars (Sus scrofa)*, Research in Veterinary Science, 90(2) 185-188.
175. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G., 2001 - *A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of Yersinia pestis and Bacillus anthracis*, BMC Microbiol., 1, 2.
176. Leao S.C., Tortoli E., Euzeby J.P., Garcia M.J., 2011 - *Proposal that Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii be united and reclassified as Mycobacterium abscessus subsp. bolletii comb. nov., designation of Mycobacterium abscessus subsp. abscessus subsp. nov. and emended description of Mycobacterium abscessus*. Int J Syst Evol Microbiol 2011;61:2311–2313.
177. Lehman K.B., Neumann R., 1896 - *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik*. 1st Ed., J.F. Lehmann, Munchen
178. Lenaerts A., Barry C.E., Dartois V., 2015 - *Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses*. Immunol Rev ; 264:288-307.
179. Li L., Bannantine J.P., Zhang Q., Amonsin A., May B.J., Alt D., 2005 - *The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA. 102(35): 12344–12349
180. Liapi M., Leontides L., Kostoulas P., Botsaris G., Iacovou Y., Rees C., Georgiou K., Smith G., Naseby D., 2011 - *Bayesian estimation of the true prevalence of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis infection in Cypriot dairy sheep and goat flocks*. Small Ruminant Research, 95, 174–178
181. Liu R.Y., Yu Z.S., Zhang H.X., Yang M., Shi B.Y., Liu X.C., 2012 - *Diversity of bacteria and mycobacteria in biofilms of two urban drinking water distribution systems*, Canadian Journal of Microbiology 58, 261–270.
182. Louwen R., Staals R.H., Endtz H.P., van Baarlen P., van der Oost J., 2014 - *The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria*. Microbiology and molecular biology reviews, MMBR, 78(1), 74-88.
183. Machackova M., Matlova L., Lamka J., Smolik J., Melicharek I., Hanzlikova M., Docekal J., Cvetnic Z., Nagy G., Lipiec M., Ocepek M., Pavlik I., 2003 - *Wild boar (Sus scrofa) as a possible vector of mycobacterial infections: reviews of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001*, Vet. Med. 48 51–65
184. Macovei I., 2014 - *Epidemiologia și diagnosticul infecțiilor cu Mycobacterium avium*, Teză de doctorat, Facultatea de Medicină Veterinară Iași
185. Macovei I., Cochard T., Pavel I., Biet F., Savuța G., 2013 - *Molecular characterization of mycobacterium avium subsp. avium and mycobacterium avium subsp. paratuberculosis by miru-vnr typing*, Bulletin UASVM, Veterinary Medicine, 70(1).
186. Magee, J.G., Ward. A.C., 2012 - *Genus I. Mycobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Ediția a II-a, vol. 5, The Actinobacteria (edited by Goodfellow, Kämpfer, Busse, Trujillo, Suzuki, Ludwig and Whitman). Springer, New York, pp. 312–375
187. Mahairas G.G., Sabo P.J., Hickey M.J., Singh D.C., Stover C.K., 1996 - *Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis*. J Bacteriol 178: 1274–1282.
188. Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S. A., Wolf Y.I., Koonin E.V., 2006 - *A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action*, Biology direct, 1, 7.
189. Malik R., Love D.N., Wigney D.I., Martin P., 1998 - *Mycobacterial nodular granulomas affecting the subcutis and skin of dogs (canine leproid granuloma syndrome)*. Aust. Vet. J. 403–407
190. Malik R., Smits B., Reppas G., Laprie C., O'Brien C., Fyfe J., 2013 - *Ulcerated and nonulcerated nontuberculous cutaneous mycobacterial granulomas in cats and dogs*, Vet Dermatol, 146-53.e32-3

191. Marco I., Ruiz M., Juste R., Garrido J., Lavin S., 2002 - *Paratuberculosis in free-ranging fallow deer in Spain*. J Wildl Dis 38, 629-632.
192. Marrakchi H., Laneelle M. A., Daffe M., 2014-Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* 21 67–85. 10.1016
193. Marras T.K., Brode S.K., 2019 - *NTM Disease Caused by M. kansasii, M. xenopi, M. malmoense, and Other Slowly Growing NTM*, in *Nontuberculous Mycobacterial Disease*, Respiratory Medicine, Ed. Griffith D.E., p.325-368, Springer Nature Switzerland AG 2019
194. Matlova L., Dvorska L., Ayele W.Y.,Bartos M., Amemori T., Pavlik I., 2005 - *Distribution of Mycobacterium avium complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement*, Journal of Clinical Microbiology; 43: 1261–1268
195. Matos A., Figueira L., Martins M., Matos M., Álvares S., Pinto M., Coelho A., 2012 - *Disseminated Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Infection in Two Wild Eurasian Otters (Lutra lutra L.) from Portugal*, Journal of Zoo and Wildlife Medicine
196. Matos A., Figueira I., Matos M., Pinto M., Coelho A., 2015 - *Seroprevalence of Mycobacterium avium Complex in Wild Mammals in the Iberian Peninsula*. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 66(3), 177-184
197. Matos A.C., Figueira L., Martins M.H., Loureiro F., Pinto M.L., Matos M., Coelho A.C., 2014 - *Survey of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Road Killed Wild Carnivores in Portugal*. J Zoo Wildl Med 45, 775-781
198. Maurya A.K., Nag V.L., Kant S., Sharma A., Gadepalli R.S., Kushwaha R.A., 2017. *Recent methods for diagnosis of nontuberculous mycobacteria infections: Relevance in clinical practice*. Biomed. Biotechnol. Res. J. 1:14-8
199. McCorry T.P., McCormick C.M., Hughes M.S., Pollock J.M., Neill S.D., 2004 -*Mycobacterium nonchromogenicum in nasal mucus from cattle in a herd infected with bovine tuberculosis*. Vet Microbiol 99, 281–285.
200. Mears J., Abubakar I., Cohen T., McHugh T.D., Sonnenberg P., 2015 - *Effect of study design and setting on tuberculosis clustering estimates using mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeats (MIRU-VNTR): a systematic review*, BMJ Open, 5: e005636.
201. Mercier P., Baudry C., Beaudeau F., Seegers H., Malher X., 2010 - *Estimated prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in herds of dairy goats in France*. The Veterinary Record 167, 412–415
202. Michailova L., Kussovski V., Radoucheva I., Jordanova M., Berger W., Rinder H., Markova N., 2005 - *Morphological variability and cell-wall deficiency in Mycobacterium tuberculosis "heteroresistant" strains*. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 9, 907–914
203. Michel A.L., 2008 - *Mycobacterium fortuitum infection interference with Mycobacterium bovis diagnostics: natural infection cases and a pilot experimental infection*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 20, 501–503.
204. Minnikin DE., 1982 - Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In *The biology of the mycobacteria* (ed. Ratledge C., Stanford J.), pp. 95–184. Academic Press, London
205. Mobius P., Fritsch I., Luyven G., Hotzel H., Köhler H., 2009 - *Unique genotypes of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains of Type III*, Vet Microbiol, 139:398-404
206. Moisoiu A., 2014 - *Metode noi și vechi în diagnosticul de laborator al tuberculozei și în depistarea rezistențelor la medicația antituberculoasă*, Revista română de boli infecțioase – volumul x’XVII, nr. 1
207. Mojica F.J.M., Diez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E., 2005 - *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. J Mol Evol 60:174–182
208. Moström P., Gordon M., Sola C., Ridell M., Rastogi N., 2002 -*Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis*, Clin Microbiol Infect 8(11):694–704
209. Muwonge A., Oloya J., Kankya C., Nielsen S., Godfroid J., Skjerve E., Djønne B., Johansen T.B., 2014 - *Molecular characterization of Mycobacterium avium subspecies hominissuis isolated from humans, cattle and pigs in the Uganda cattle corridor using VNTR analysis*, Infect Genet Evol 21:184–91.
210. Nejati F., Fateh A., Nojoumi S.A., Rahbar M., Behrouzi A., Vaziri F., Siadat S.D., 2018 - *MLVA typing of Haemophilus influenzae isolated from two Iranian university hospitals*. Iranian journal of microbiology, 10(1), 30-36.
211. Nielsen S.S., Toft N., 2009 - *A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe*, Preventive Veterinary Medicine, 88, 1–14
212. Nogueira C. L., Simmon K. E., Chimara E., Cnockaert M., Palomino J. C., Martin A., Vandamme P., Brown-Elliott B. A., Wallace R. J., Jr, 2015 - *Mycobacterium franklinii sp. nov., a species closely related to members of the Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus group*, Int J Syst Evol Microbiol 65 2148–2153

213. Oneț E., Constantinescu V., 1978 - *Diagnosticul de laborator în medicina veterinară*. Ed. CERES, București
214. Ordinul ANSVSA 35/2016 – Normele metodologice de aplicare a H.G. 1156/2013
215. Orlowska B., Augustynowicz-Kopeć E., Krajewska M., Zabost A., Welz M. Kaczor S., Anusz K., 2017 - *Mycobacterium caprae* transmission to free-living grey wolves (*Canis lupus*) in the Bieszczady Mountains in Southern Poland, Eur J Wildl Res 63: 21
216. Overduin, P., Schouls L., Roholl P., van der Zanden A., Mahmmoud N., Herrewegh A., and van Soolingen D., 2004 - *Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, J. Clin. Microbiol. 42:5022–5028.
217. Ovrutsky A.R., Chan E.D., Kartalija M., Bai X., Jackson M., 2013 - *Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous Mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of Mycobacterium avium in Acanthamoeba lenticulate*, Appl Environ Microbiol 79: 3185–3192
218. Pan X.L., Zhang C.L., Nakajima C., Fu J., Shao C.X., Zhao L.N., Cui J.Y., Jiao N., Fan C.L., Suzuki Y., Hattori T., Li D., Ling H., 2017 - *A quantitative and efficient approach to select MIRU-VNTR loci based on accumulation of the percentage differences of strains for discriminating divergent Mycobacterium tuberculosis sublineages*, Emerg Microbes Infect. 6(7): e68
219. Papastergiou D., Răpuntean Gh., Oleleu Ana Maria, Răpuntean S., Pivaru N., 2009 - Aspecte epidemiologice privind paratuberculoza la ovine și caprine în arealul județului Cluj. Lucr. Stiințifice – vol 52, seria med. Vet, pp 1036-1042
220. Pate M., Kusar D., Zolnir-Dovc M., Ocepek M., 2011 - *MIRU-VNTR typing of Mycobacterium avium in animals and humans: heterogeneity of Mycobacterium avium subsp. hominissuis versus homogeneity of Mycobacterium avium subsp. avium strains*. Res Vet Sci 91(3):376-81.
221. Paul I., 1982 - *Diagnostic morfologic veterinar*, Ed. CERES, București.
222. Pavlik I. -2009 - *Feedstuffs*. p. 126–135. în The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health, Ed. Kazda J., Pavlik I., Falkinham III J.O., Hruska K., ed. I, Springer. XVIII.
223. Pavlik I., Svastova P., Bartl J., Dvorska L., Rychlik I., 2000 - *Relationship between IS901 in the Mycobacterium avium complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry*, Clin Diagn Lab Immunol, 7:212-217 (A)
224. Pavlik, I., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., Du Maine, R., Machackova, M., Yayo Ayele, W. & Horvathova, A., 2000 - *Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998* (B)
225. Pérez de Val B., Grau-Roma L., Segalés J., Domingo M., Vidal E., 2014 - *Mycobacteriosis outbreak caused by Mycobacterium avium subsp. avium detected through meat inspection in five porcine fattening farms*, Veterinary Record 174, 96.
226. Pérez V, García Marín JF, Badiola JJ., 1996 - *Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep*. J Comp Pathol. 114:107–122.
227. Perianu T. și coautorii, 2012 - *Tratat de Boli Infecțioase ale Animalelor*, Bacterioze, Vol I., Capitolul Micobacterioze, pg. 709-765. Editura Universitas XXI, Iași
228. Perianu T., 2005 - *Boli infecțioase ale animalelor*, Editura Universitas XXI, Iași.
229. Petriceanu G., Rădulescu A., Răgălie A., 2005 – *Studii comparative între ELISA și RFC aplicate în paratuberculoza bovinelor*, Colocviul Internațional de Paratuberculoză , Copenhaga
230. Petriceanu G., Rădulescu A., Răgălie A., Guțu E., Ionescu M., 2007 – *Testul imunoenzimatic utilizat în supravegherea serologică a paratuberculozei bovinelor și ovinelor*. Rev. Rom.Med. Vet., vol 17, nr. 2
231. Pidot, S.J., Asiedu, K., Kaser, M., Fyfe, J.A., Stinear, T.P., 2010 - *Mycobacterium ulcerans and other mycolactone-producing mycobacteria should be considered a single species*. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e663
232. Piersimoni C., Scarparo C., 2009 - *Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons*. Emerg Infect Dis. 2009 September;15(9):1351–8;
233. Pinner A., 1935 - *Atypical acid fast microorganisms*. Am Rev Tuberc 1935;32: 424-445
234. Pourcel C., Vidgop Y., Ramisse F., Vergnaud G., Tram C., 2003 - *Characterization of a tandem polymorphism in Legionella pneumophila and its use for genotyping* J. Clin. Microbiol., 41, pp. 1819-1826
235. Pourquier P., Lesceu S., 2011- *Preliminary validation of the ID Screen® Mycobacterium avium Multi-species Indirect ELISA*. Poster presented at the AHVLA International Conference 2011 - Animal Diseases and their Consequences, Royal Holloway, England.
236. Qvist T., Gilljam M., Jönsson B., Taylor-Robinson D., Jensen-Fangel S., Wang M., Svahn A., Kötz K., Hansson L., Hollsing A., Hansen C. R., Finstad P. L., Pressler T., Høiby N., Katzenstein T. L., Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium (SCFSC), 2015 - *Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia*. Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society, 14(1), 46-52.
237. Radomski N., 2007 - *Mémoire de Master en Santé Publique – Etude de la diversité génétique des souches*

- de Mycobacterium avium ssp. d'origine humaine et animale par typage moléculaire VNTR-MIRUs et RFLP1245-1311*
238. Radomski N., Thibault V. C., Karoui C., de Cruz K., Cochard T., Gutiérrez C., Supply P., Biet F., Boschirollo M. L., 2010 - *Determination of genotypic diversity of Mycobacterium avium subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing methods*, Journal of clinical microbiology, 48(4), 1026-34.
239. Rajni N.R., Laxman S.M., 2011 - *Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by Mycobacterium tuberculosis - LAM and Cord Factor: an overview*, Biotechnology Research International Volume, Article ID 274693, 7 p.;
240. Răducănescu H., Bica -Popii V., 1986 -*Bacteriologie veterinară. Ed. CERES, București*
241. Răpunțean S., Răpunțean G., 2017 – *Bacteriologie medicală veterinară și zoonoze bacteriene*, Ed. Academic Pres, Cluj-Napoca
242. Reddington K., O'Grady J., Dorai-Raj S., Niemann S., van Soolingen D., Barry T., 2011 - *A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis*. PloS one, 6(8), e23481.
243. Reich J.M., Johnson R.E., 1992 - *Mycobacterium avium complex pulmonary disease presenting as an isolated lingular or middle lobe pattern: the Lady Windermere syndrome*. Chest. 101:1605–1609.
244. Rettinger A., Broeckl S., Fink M., Prodinger W.M., Blum H., Krebs S., Domogalla J., Just F., Gellert S., Straubinger R.K., 2015 -*The Region of Difference Four is a Robust Genetic Marker for Subtyping Mycobacterium caprae Isolates and is Linked to Spatial Distribution of Three Subtypes*. Transbound Emerg Dis. Epub; (2017, 64(3):782-792)
245. Reyes J.F., Chan C.H.S., Tanaka M.M., 2012 - *Impact of homoplasmy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Genet. Evol. 12 811–818.
246. Reyes-Garcia R., Pérez-de-la-Lastra J.M., Vicente J., Ruiz-Fons F., Garrido J.M., Gortázar C., 2008 - *Large-Scale ELISA Testing of Spanish Red Deer for Paratuberculosis*, Veterinary Immunology and Immunopathology. 124(1-2) 75-81.
247. Rindi L., Garzelli C., 2016 - *Increase in non-tuberculous mycobacteria isolated from humans in Tuscany, Italy, from 2004 to 2014*. BMC Infectious Diseases, 16, article 44.
248. Rodríguez S., Bezos J., Romero B., de Juan L., Álvarez J., Castellanos E., Moya N., Lozano F., Javed M.T., Sáez-Llorente J.L., Liébana E., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A., 2011 - *Mycobacterium caprae infection in livestock and wildlife, Spain*, Emerg Infect Dis 17:532–535.
249. Rodríguez-Campos S., Navarro Y., Romero B., de Juan L., Bezos J., Mateos A. Golby P., Smith N.H., Hewinson G.R., Domínguez L., García-de-Viedma D., Aranaz A., 2013 - *Splitting of a Prevalent Mycobacterium bovis Spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group*, J. Clin. Microbiol. 51, 3658–3665.
250. Rodríguez-Campos S., Smith N.H., Boniotti M.B., Aranaz A., 2014 - *Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis*. Res. Vet. Sci. 97 Suppl, S5–S19.
251. Romano M.I., Amadio A., Bigi F., Klepp L., Etchehoury I., Noto Llana M., Morsella C., Paolicchi F., Pavlik I., Bartos M., Leao S.C., Cataldi A., 2005 - *Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of Mycobacterium avium complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America*, Vet Microbiol, 110:221-237.
252. Rónai Z., Csivincsik Á., Dán Á., 2015 - *Molecular identification of Mycobacterium avium subsp. silvaticum by duplex high-resolution melt analysis and subspecies-specific real-time PCR*. J Clin Microbiol 53:1582–1587.
253. Ronai Z., Csivincsik A., Dan A., Gyuranecz M., 2016 - *Molecular analysis and MIRU-VNTR typing of Mycobacterium avium subsp. avium, 'hominissuis' and silvaticum strains of veterinary origin*, Infect. Genet. Evol., 40:192–199;
254. Rosu V., Bandino E., Cossu A., 2013 - *Unraveling the transcriptional regulatory networks associated to mycobacterial cell wall defective form induction by glycine and lysozyme treatment*. Microbiol. Res.;168:153–164.
255. Ruetger A., Nieter J., Skrypnik A., Engelmann I., Ziegler A., Moser I., Monecke S., Ehrlich R., Sachse K., 2012 - *Rapid spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria by use of a microarray system with automatic data processing and assignment*. Journal of clinical microbiology, 50(7), 2492-5.
256. Runyon E.H., 1959 - *Anonymous mycobacteria in pulmonary disease*. Med. Clin. North Am. 43: 273–290.
257. Samba-Louaka A., Robino E., Cochard T., Branger M., Delafont V., Aucher W., Wambeke W., Bannantine J. P., Biet F., Hécharde Y., 2018 - *Environmental Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Hosted by Free-Living Amoebae*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 8, 28.

258. Savuța Gh., 2000 - *Cercetări privind valoarea de diagnostic a diferitelor metode utilizate în paratuberculoza oilor*, Teza de doctorat, USAMV, Iași
259. Scherrer S., Landolt P., Carroli N., Stephan R., 2018 - *Molecular Characterization of Mycobacterium avium subsp. hominissuis of Two Groups of Lymph Nodes, Being Intradermal Tuberculin or Interferon-Gamma Test Positive and Negative, Isolated from Swiss Cattle at Slaughter*. *Frontiers in veterinary science*, 5, 32.
260. Schinsky M. F., Morey R. E., Steigerwalt A. G., Douglas M. P., Wilson R. W., Floyd M. M., 2004 - Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1653–1667.
261. Schneeberg A., Neubauer H., Schmooch G., Baier S., Harlizius J., Nienhoff H., Zimmermann S., Seyboldt C., 2013 - *Clostridium difficile* Genotypes in Piglet Populations in Germany, *J Clin Microbiol.* 51(11):3796–803
262. Schoepf K., Prodinger W. M., Glawischnig W., Hofer E., Revilla-Fernandez S., Hofrichter J., Fritz J., Köfer J., Schmoll, F., 2012 - *A Two-Years' Survey on the Prevalence of Tuberculosis Caused by Mycobacterium caprae in Red Deer (Cervus elaphus) in the Tyrol, Austria*. *ISRN Veterinary Science*, 245138.
263. Seiler P., Ulrichs T., Bandermann S., Pradl L., Jorg S., Krenn V., Morawietz L., Kaufmann S.H.E., Aichele P., 2003 - *Cell-wall alterations as an attribute of Mycobacterium tuberculosis in latent infection*. *Journal of Infectious Diseases*, 188, 1326–1331.
264. Shimizu K., Hirose T., Sato M., Tsukamura M., 1977 - *Isolation of acid-fast organisms resembling Mycobacterium vaccae from a lesion of bovine nodular thelitis*. *Microbiol Immunol.* 1977;21:469–472
265. Shin J.H., Lee H.K., Cho E.J., Yu J.Y., Kang Y.H., 2008 - *Targeting the rpoB gene using nested PCR-restriction fragment length polymorphism for identification of nontuberculous mycobacteria in hospital tap water*, *Journal of Microbiology* 46, 608–614.
266. Sizemore C., Lacourciere K., Parker T. 2015 - *Introduction – The Many Hosts of Mycobacteria: An Interdisciplinary Approach to Understanding Mycobacterial Diseases*, în *Tuberculosis, Leprosy and Mycobacterial Diseases of Man and Animals: The Many Hosts of Mycobacteria* (ed. Mukundan H. ș.a), CAB International, Boston
267. Slany M., Pavlik I., 2012 - *Molecular detection of nontuberculous mycobacteria: advantages and limits of a broad-range sequencing approach*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 22(4):268–276
268. Smits B., Willis R., Malik R., Studdert V., Collins D., Kawakami P., Fyfe J. A., 2012 - *Clusters of leroid granulomas in Foxhounds in New Zealand and Australia*. *Veterinary Dermatology*, 23, 465–e88.
269. Stackebrandt, E., F.A. Rainey and N.L. Ward-Rainey, 1997 - *Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479–491.
270. Stahl C., Kubetzko S., Kaps I., Seeber S., Engelhardt H., Niederweis M., 2001 - *MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 40, 451–464.
271. Stavri H., Brănuș-Gheorghiu M., Moldovan O., Raileanu M., Popa M.I., Popa L., Ene L., 2005 - *Rapid immunochromatographic serum assay of nontuberculous mycobacterial infections*, *Roum Arch Microbiol Immunol.* 64(1-4):42-9.
272. Stavri H., Ulea I., Radu D.L., Brănuș M.G., Moldovan O., Bogdan M.A., Tudose C., Raileanu M., Duiculescu D., Ene .L, Olar V., Ionita C., Popa G.L., Popa M.I., Brennan P.J., 2011 - *Serodiagnosis of environmental mycobacterial infections*. *J Microbiol Methods* 86:283–90
273. Stevenson K., 2015 - *Genetic diversity of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review*. *Vet Res.* 2015;46:64. doi: 10.1186/s13567-015-0203-2.
274. Stevenson K., Álvarez J., Bakker D., Biet F., de Juan L., Denham S., Dimareli Z., Dohmann K., Gerlach G.F., Heron I., Kopečna M., May L., Pavlik I., Sharp J.M., Thibault V.C., Willemsen P., Zadoks R., Greig A., 2009 - *Occurrence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants*. *BMC Microbiol* 9:212
275. Stewart L. D., Tort N., Meakin P., Argudo J. M., Nzuma R., Reid N., Delahay R. J., Ashford R., Montgomery W. I., Grant I. R., 2017 - *Development of a novel immunochromatographic lateral flow assay specific for Mycobacterium bovis cells and its application in combination with immunomagnetic separation to test badger faeces*. *BMC veterinary research*, 13(1), 131.
276. Stout J.E., Koh W.J., Yew W.W., 2016 - *Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria*. *Int. J. Infect. Dis.* 45 123–134;

277. Stragier P., Ablordey A., Meyers W. M., Portaels F., 2005 - *Genotyping Mycobacterium ulcerans and Mycobacterium marinum by using mycobacterial interspersed repetitive units*, J. Bacteriol, 187:1639-1647.
278. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rusch-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Loch C., van Soolingen D., 2006 - *Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis*, J. Clin. Microbiol. 44, 4498–4510.
279. Supply P., Magdalena J., Himpens S., Loch C., 1997 - *Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon*, Molecular Microbiology. 26(5):991–1003
280. Supply P., Mazars E., Lesjean S., Vincent V., Gicquel B., Loch C., 2000 - *Variable human minisatellite-like regions in the mycobacterium tuberculosis genome*. Mol Microbiol. 36:762–771
281. TB-ARC – Romania - Accession: PRJNA233385 ID: 233385
282. Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Bottger E.C., Bodmer T., 1993 - *Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis*. J Clin Microbiol. 31:175–178;
283. Tell L.A., Woods L., Cromie R.L., 2001 - *Mycobacteriosis in birds*, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 20 (1), 180-203
284. Terrestrial Manual – A:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.06_AVIAN_TB.pdf
285. Terrestrial Manual – B:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.15_PARATB.pdf
286. Terrestrial Manual – C:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.06_BOVINE_TB.pdf
287. Thibault V.C., Grayon M., Boschirol M.L., Hubbans C., Overduin P., Stevenson K., Gutierrez M.C., Supply P., Biet F., 2007- *New variable-number tandem-repeat markers for typing Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and M. avium strains: Comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing*, Journal of Clinical Microbiology, vol. 45, no. 8, pp. 2404–2410
288. Thibault V.C., Grayon M., Boschirol M.L., Willery E., Allix-Béguec C., Stevenson K., Biet F., Supply P., 2008 - *Combined Multilocus Short-Sequence-Repeat and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Isolates*, J Clin Microbiol, 46(12): 4091-4094.
289. Thomas J.M., Ashbolt N.J., 2011 - *Do Free-living Amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk?*, Environmental Science and Technology 45, 860–869.
290. Thomson R., Tolson C., Carter R., Coulter C., Huygens F., Hargreaves M., 2013 - *Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM*. J Clin Microbiol 51:3006–11.
291. Thomson R., Tolson C., Sidjabat H., Huygens F., Hargreaves M., 2013 - *Mycobacterium abscessus isolated from municipal water-a potential source of human infection*, BMC Infect Dis, 13:241.
292. Thorel M.F., Huchzermeyer H.F., Michel A.L., 2001 - *Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare Infection in Mammals*, Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics). 20(1) 204-218.
293. Tirkkonen T., Pakarinen J., Rintala E., Ali-Vehmas T., Marttila H., Peltoniemi O.A., Mäkinen J., 2010 - *Comparison of variable-number tandem-repeat markers typing and IS1245 restriction fragment length polymorphism fingerprinting of Mycobacterium avium subsp. hominissuis from human and porcine origins*. Acta veterinaria Scandinavica, 52(1), 21.
294. Toma F., 1998 - *Nontuberculous mycobacteria in the hospital environment*, Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol. 43:229–235
295. Tortoli E., Fedrizzi T., Pecorari M., Giacobazzi E., De Sanctis V., Bertorelli, R., 2015 - *The new phylogenesis of the genus Mycobacterium*. Int. J. Mycobacteriol. 4, 77.
296. Tortoli, E., 2012 - *Phylogeny of the genus Mycobacterium: many doubts, few certainties*. Infect. Genet. Evol. 12, 827–831.
297. Torvinen E., Torkko P., Nevalainen A., Rintala H., 2010 - *Real-time PCR detection of environmental mycobacteria in house dust*, Journal of Microbiological Methods 82, 78–84
298. Trcka I., Lamka J., Suchy R., Kopečna M., Beran V., Moravkova M., Horvathova A., Bartos M., Parmova I., Pavlik I., 2006 - *Mycobacterial infections in European wild boar (Sus scrofa) in the Czech Republic during the years 2002 to 2005*. Veterinarni Medicina 51, 320–332.
299. Truffot-Pernot C., Véziris N., Sougakoff W., 2006 - *Modern diagnosis of tuberculosis*. Presse Med. 35:1739–1746

300. Tryland M., Olsen I, Vikøren T., Handeland K., Arnemo J.M., Tharaldsen J., Dønne B., Josefsen T.D., Reitan L.J., 2004 - *Serologic survey for antibodies against Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in free-ranging cervids from Norway*, Journal of Wildlife Diseases 40:1, 32-41
301. Tu H.Z, Chang S.H., Huaug T. S., Huaug W.K, Liu Y. C, Lee S. S., 2003 - *Microscopic Morphology in Smears Prepared from MGIT Broth Medium for Rapid Presumptive Identification of Mycobacterium tuberculosis complex, Mycobacterium avium complex and Mycobacterium kansasii*. Annals of Clinical & Laboratory Science, vol. 33, no. 2;
302. *Tunisia: Case report*, International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry, 2(6): 34-37
303. Turenne C.Y., 2019 – *Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution*, Infection, Genetics and Evolution – *in press*
304. Turenne C.Y., Collins D.M., Alexander D.C. and Behr M.A., 2008 - *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and M. avium subsp. avium Are Independently Evolved Pathogenic Clones of a Much Broader Group of M. avium Organisms*. Journal of Bacteriology, Vol. 190, No. 7, p. 2479–2487;
305. Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A., 2007 - *Mycobacterium avium in the Postgenomic Era*, Clinical Microbiology Reviews. 20(2) 205-229.
306. Uchiya K. I., Tomida S., Nakagawa T., Asahi S., Nikai T., Ogawa K., 2017 - *Comparative genome analyses of Mycobacterium avium reveal genomic features of its subspecies and strains that cause progression of pulmonary disease*. Scientific reports, 7, 39750.
307. van der Werf M.J., Ködmön C., Katalinić-Janković, V., Kummik, T., Soini, H., Richter, E., Papaventsis, D., Tortoli, E., Perrin M., van Soolingen D., Zolnir-Dovč M., Ostergaard Thomsen V., 2014 - *Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union*. BMC infectious diseases, 14, 62.
308. van Ingen J., 2017 - *Infectious Diseases*, 4th Edition, capitoulul 138 Mycobacteria, pg.1645-1659 si capitoulul 32 Nontuberculous Mycobacterial Diseases, pg.285-291 , Ed. Elsevier Limited
309. van Ingen J., Boeree M. J., Kusters K., Wieland A., Tortoli E., Dekhuijzen P. N., van Soolingen D., 2009 - *Proposal to elevate Mycobacterium avium complex ITS sequevar MAC-Q to Mycobacterium vulneris sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 2277–2282
310. van Ingen J., Kohl T.A., Böttger E.C., Niemann S., Wagner D., Sax H., 2017. *Global outbreak of severe Mycobacterium chimaera disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study*. Lancet Infect Dis. Oct;17(10):1033-1041.
311. VanLeeuwen J.A., Keefe G.P., Tremblay R., Power C., Wichtel J.J., 2001 - *Seroprevalence of infection with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canada dairy cattle*. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne, 42(3), 193-8.
312. Velayati A.A., Farnia P., 2011 - *Shape variation in Mycobacterium tuberculosis*, Iran J Clin Infect Dis 2011 Vol. 6 No. 2
313. Velayati A.A., Farnia P., 2012 - *Morphological Characterization of Mycobacterium tuberculosis, Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli*. Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.)
314. Velayati A.A., Farnia P., 2016 –*The Species Concept*, Cap. 1, p. 1-16, *Diversity in cell shape of Mycobacterium tuberculosis*, Cap. 3, p. 71-99, în *Atlas of Mycobacterium tuberculosis*. Editura Elsevier, Academic Press, Londra
315. Velayati A, Farnia P, Mozafari M, Malekshahian D, Seif S, Rahideh S., Mirsaedi M., 2014 - *Molecular Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria Isolates from Clinical and Environmental Sources of a Metropolitan City*. PLOS ONE 9(12): e114428
316. Vincent A. T., Nyongesa S., Morneau I., Reed M. B., Tocheva E. I., Veyrier F. J., 2018 - *The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution?*, Front Microbiol. 9: 2341.
317. Vluggen C., Soetaert K., Duytschaever L., Denoël J., Fauville-Dufaux M., Smeets F., Bruffaerts N., Huygen K., Fretin D., Rigouts L., Saegerman C., Mathys V., 2016 - *Genotyping and strain distribution of Mycobacterium avium subspecies hominissuis isolated from humans and pigs in Belgium, 2011–2013*. Euro Surveill. 21(3):pii=30111
318. Vogler A.J., Nottingham R., Busch J.D., Sahl J.W., Shuey M.M., Foster J.T., Schupp J.M., Smith S.R., Rocke T.E., Keima P., Wagner D.M., 2016 - *VNTR diversity in Yersinia pestis isolates from an animal challenge study reveals the potential for in vitro mutations during laboratory cultivation*, Infect Genet Evol., Nov;45:297-302
319. Vordermeier H. M., Huygen K., Singh M., Hewinson R. G., Xing Z., 2006 - *Immune response induced in cattle by vaccination with recombinant adenovirus expressing mycobacterial antigen 85A and Mycobacterium bovis BCG*. Infect. Immun. 74, 1416–1418.
320. WAHIS -World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface (http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/indexcontent/newlang/en)

321. Waters W.R., Palmer M.V., Thacker T.C., Payeur J.B., Harris N.B., Minion F.C., 2006 - *Immune responses to defined antigens of Mycobacterium bovis in cattle experimentally infected with Mycobacterium kansasii*. Clinical and Vaccine Immunology 13, 611–619.
322. Waters W.R., Whelan A.O., Lyashchenko K.P., Greenwald R., Palmer M.V., Harris B.N., 2010 - *Immune responses in cattle inoculated with Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis, or Mycobacterium kansasii*. Clinical and Vaccine Immunology 17, 247–252.
323. Wayne, L.G. and G.P. Kubica., 1986 - *Genus Mycobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2 (edited by Sneath, Mair, Sharpe and Holt). Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1436–1457.
324. Wayne, L.G., 1967 - *Selection of characters for an Adansonian analysis of mycobacterial taxonomy*. J. Bacteriol. 93: 1382–1391
325. Wells S.J., Wagner B.A., 2000 - *Herd-level risk factors for infection with Mycobacterium paratuberculosis in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures*. J Am Vet Med Assoc. 2000;216:1450–7.
326. WHO- Buruli ulcer fact sheet: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/buruli-ulcer-\(mycobacterium-ulcerans-infection\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/buruli-ulcer-(mycobacterium-ulcerans-infection)) (accesat 4.10.2018)
327. Yazdankhah S.P., Lindstedt B.A., Caugant D.A., 2005 - *Use of variable-number tandem repeats to examine genetic diversity of Neisseria meningitidis*, J Clin Microbiol. 43:1699–705
328. Zeitschrift für Tiermedizin und vergleichende Pathologie 21, 438–455.
329. Zhang J., Abadia E., Refregier G., Tafaj S., Boschiroli M.L., Guillard B., Andremont A., Ruimy R., Sola C., 2010 - *Mycobacterium tuberculosis complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of "spoligotyping" with new spacers and a microbead-based hybridization assay*. J. Med. Microbiol. 59, 285–294.
330. Zhang Y.Y., Li Y.B., Huang M.X., Zhao X.Q., Zhang L.S., Liu W.E., Wan K.L. 2013 - *Novel species including Mycobacterium fukienense sp. is found from tuberculosis patients in Fujian Province, China, using phylogenetic analysis of Mycobacterium chelonae/abscessus complex*, Biomed Environ Sci 26 894–901
331. Zhao X., Epperson L.E., Hasan N.A., Honda J.R., Chan E.D., Strong M., Walter N.D., Davidson R.M., 2017 - *Complete Genome Sequence of Mycobacterium avium subsp. hominissuis Strain H87 Isolated from an Indoor Water Sample*. Genome announcements, 5(16), e00189-17.
332. Zhi X.-Y., Li W.-J., Stackebrandt E., 2009 - *An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 589–608.
333. Zhu D.K., Song X.H., Wang J.B., Zhou W.S., Ou X.M., s.a., 2016 - *Outbreak of Avian Tuberculosis in Commercial Domestic Pekin Ducks (Anas platyrhynchos domestica)*. Avian Diseases: Vol. 60, Nr. 3, p. 677-680
334. Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., and Daffe, M.- 2008 - *Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state*. J. Bacteriol. 190, 5672–5680
335. Zuber, B., Haenni, M., Ribeiro, T., Minnig, K., Lopes, F., Moreillon, P., Dubochet J., 2006 - *Granular layer in the periplasmic space of gram-positive bacteria and fine structures of Enterococcus gallinarum and Streptococcus gordonii septa revealed by cryo-electron microscopy of vitreous sections*. J. Bacteriol. 188, 6652–6660.

Anexa 1./ Annex 1.

Proprietăți diferențiale ale unor specii de MNT (sursă: Magee și Ward, 2012)
Differential properties of selected NTM species (source: Magee and Ward, 2012)

Specie	Creștere				Pigmentare	Creștere pe medii cu 5%NaCl	Nitrat- reductază	Creștere stimulată de piruvat	Catalază (68 °C)	Hidroliza Tween80
	22°C	25°C	42°C	45°C						
<i>M. kansasii</i>	+	+	v	-	P	-	+	nd	+	+
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	v	v	+	v	N	d	-	d	d	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	-	-	+	nd	N	-	-	+	d	v
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	-	-	+	nd	N	-	-	-	+	-
<i>M. intracellulare</i>	+	+	v	v	N	-	-	nd	+	-
<i>M. chimaera</i>	-	+	-	-	N	-	-	nd	+	-
<i>M. colombiense</i>	+	+	-	-	N	-	v	nd	+	-
<i>M. ulcerans</i>	nd	w	-	-	-/S	-	-	nd	+	-
<i>M. marinum</i>	nd	+	-	-	P	nd	-	nd	-	+
<i>M. gordonae</i>	+	+	-	-	S	-	-	nd	+	+
<i>M. parascrofulaceum</i>	nd	+	-	-	S	-	-	nd	nd	+
<i>M. simiae</i>	+	+	d	-	P	-	-	nd	+	-
<i>M. genavense</i>	nd	w	+	nd	N	nd	-	nd	+	-
<i>M. lentiflavum</i>	+	+	-	-	S	nd	-	nd	+	-
<i>M. terrae</i>	+	+	-	-	N	-	d	nd	+	+
<i>M. hiberniae</i>	+	+	-	-	S	nd	+	nd	nd	d
<i>M. lepraemurium</i>	nd	nd	-	-	N	-	-	nd	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	+	+	+	-	S	-	-	nd	+	-
<i>M. smegmatis</i>			+	+	N	+	+		nd	nd
<i>M. phlei</i>			+	+	S	+	+		nd	nd
<i>M. peregrinum</i>			-	-	N	+	+		+	v
<i>M. mageritense</i>			+	d	N	+	d		-	-
<i>M. parafortuitum</i>			V	v	P		d		nd	nd
<i>M. fortuitum</i>			V	-	N		+		nd	nd
<i>M. septicum</i>			-	-	N		+			nd
<i>M. alvei</i>			nd	-	-		+		+	+
<i>M. porcinum</i>			+	-	N		-		nd	-
<i>M. mucogenicum</i>			-	-	N		d		-	+
<i>M. chelonae</i>			-	-	N		-		nd	-
<i>M. bolletii</i>			-	-	N		-		nd	nd

+ peste 90% dintre tulpini sunt pozitive; – peste 90% dintre tulpini sunt negative; d= 11–89% dintre tulpini sunt pozitive; v= variabilitate în răspuns; w=reacție slabă; N= noncromogenic; S= scotocromogene; P=fotocromogene; nd=nu sunt date

REZULTATELE SPECIFICITĂȚII INCLUZIVE (SURSĂ: ANSES FR.)
RESULTS OF INCLUSIVE SPECIFICITY (SOURCE: ANSES FR.)

Specie	Hsp65	IS1245	IS6110	IS1081	IS1561	RD4
<i>M. caprae</i>	22	Neg	17	19	21	20
<i>M. avium</i>	22	21	neg	Neg	Neg	Neg
<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	20	41	38	Neg	Neg	Neg
<i>M. avium subsp. hominissuis</i>	20	13	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>M. chelonae</i>	24	33	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>M. flavescens</i>	20	39	Neg	Neg	Neg	39
<i>M. fortuitum</i>	23	32	Neg	Neg	26	Neg
<i>M. gordonae</i>	21	33	35	Neg	37	Neg
<i>M. intermedium</i>	23	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>M. intracellulare</i>	17	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>M. kansasii</i>	18	35	48	Neg	Neg	Neg
<i>M. marinum</i>	19	34	Neg	Neg	Neg	39
<i>M. paraffinicum</i>	23	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>M. smegmatis</i>	26	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>M. phlei</i>	23	38	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>M. terrae complex</i>	20	39	37	39	Neg	Neg
<i>M. triviale</i>	21	39	Neg	48	Neg	Neg
<i>M. xenopi</i>	20	37	Neg	32	Neg	Neg
<i>M. nonchromogenicum</i>	22	Neg	39	Neg	Neg	Neg
<i>M. bovis</i>	37	Neg	12	16	17	Neg
<i>M. microti</i>	19	Neg	15	18	Neg	19
<i>M. pinnipedi</i>	21	39	15	17	Neg	18
<i>M. africanum</i>	21	Neg	16	17	19	17
<i>BCG</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT

*Neg= Negativ, NT= netestat

Anexa 3./ Annex 3.

LISTA TABELELOR

LIST OF TABLES

Tabelul 1.1 Clasificarea MNT conform Runyon/ Table 1.1 Runyon classification of the MNT	42
Tabelul 1.2 Clasificarea MNT cu creștere rapidă în funcție de producția de pigment și patogenitate/ Table 1.2 MNT rapid growers classification according to pigment production and pathogenicity	43
Tabelul 2.1 Micobacterioze la păsări: semne clinice și tulpini izolate/ Table 2.1 Mycobacteriosis in birds: clinical signs and isolated species	53
Tabelul 2.2 Cele mai frecvente 10 specii de MNT izolate de la pacienți umani/ Table 2.2 The ten most frequent NTM species, isolated from human patients	58
Tabelul 4.1 Date privind distribuția și originea probelor din Județul Iași/ Table 4.1 Data regarding the distribution and origin of the samples from Iași County	70
Tabelul 5.1 Date privind probele evaluate de la găini/ Table 5.1 Data regarding the evaluated chicken samples	76
Tabelul 5.2 Date privind probele evaluate de la rumegătoare și câine/ Table 5.2 Data regarding the ruminant and dog samples evaluated	77
Tabelul 5.3 Etapele colorației Ziehl- Neelsen modificată – ZNM/ Table 5.3 Modified Ziehl Neelsen staining steps – MZN	79
Tabelul 5.4 Etapele colorației Hematoxilină-Eozină-HE (sursă: Alexandru, 1995)/ Table 5.4 Hematoxylin -Eosin procedure-HE (source: Alexandru, 1995)	79
Tabelul 5.5 Etapele colorației Ziehl-Neelsen din examenul bacterioscopic direct/ Table 5.5 Ziehl-Neelsen staining steps in direct bacterioscopy	80
Tabelul 5.6 Componenta amestecului de reacție pentru TaqMan PCR în timp real/ Table 5.6 TaqMan real time PCR Master mix	87
Tabelul 5.7 Programul de amplificare utilizat/ Table 5.7 PCR amplification protocol	88
Tabelul 5.8 Secvențele primerilor și sondelor utilizate/ Table 5.8 Primers and probes	88
Tabelul 5.9 Diferențierea CMA în baza țintelor utilizate/ Table 5.9 MAC differentiation based on used targets	89
Tabelul 5.10 Rezultatele examenului bacteriologic pentru probele prelevate de la păsări/ Table 5.10 Results of the bacteriological examination for chicken samples	93
Tabelul 5.11 Rezultatele obținute la TaqMan PCR în timp real, pentru probele de la găini/ Table 5.11 CT values obtained for chicken samples	95
Tabelul 5.12 Rezultatele examenului bacteriologic pentru probele recoltate de la rumegătoare/ Table 5.12 Culture results for ruminant samples tested	99
Tabelul 5.13 Rezultatele obținute prin TaqMan PCR în timp real, pentru probele de la bovine, ovine și cerb/ Table 5.13 CT values obtained for bovine, ovine and deer samples	100
Tabelul 6.1 Date privind proveniența izolatelor MNT de la oameni/ Table 6.1 Data regarding human NTM isolates	107
Tabelul 6.2 Programul de amplificare utilizat/ Table 6.2 PCR amplification program	114
Tabelul 6.3 Componenta amestecului reacțional utilizat în PCR clasic/ Table 6.3 PCR classic reaction mix	114
Tabelul 6.4 Secvențele primerilor utilizați pentru amplificarea secvențelor Hsp65, rpoB și 16S rRNA/ Table 6.4 Primers sequence for Hsp65, rpoB și 16S rRNA genes amplification	115
Tabelul 6.5 Rezultatele obținute la TaqMan PCR în timp real/ Table 6.5 TaqMan real time PCR results	118
Tabelul 6.6 Sistematizarea rezultatelor obținute la secvențiere/ Table 6.6 Sequencing results	120
Tabelul 6.7 Varietatea speciilor de MNT identificate/ Table 6.7 Variety of the identified NTM	124
Tabelul 7.1 Tulpinile de MNT, izolate de la pacienți umani, selectate pentru MIRU – VNTR/ Table 7.1 Human NTM isolates selected for MIRU – VNTR	133
Tabelul 7.2 Reactivi utilizați pentru amplificarea MIRU 292, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 și 32/ Table 7.2 Reactives used for the amplification of loci MIRU 292, VNTR 25, 47, 3, 7, 10 and 32	134

Tabelul 7.3 Programul de amplificare utilizat/ Table 7.3 Amplification programme	135
Tabelul 7.4 Talia secvențelor repetitive în tandem (TR) și a regiunilor flancante specifice fiecărui locus/ Table 7.4 Size of the TRs and the flanking regions, specific for each locus	135
Tabelul 7.5 Tabelul de conversie a mărimii ampliconului obținut (pb) în număr de repetiții în tandem (TR), conform metodei MIRU-VNTR dezvoltată pentru tulpina de referință <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> K10/ Table 7.5 Conversion table of obtained amplicon size (pb) in number of tandem repeats (TR) according to the MIRU—VNTR method developed for <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> K10 reference strain	136
Tabelul 7.6 Secvențele nucleotidice ale amorselor utilizate pentru amplificarea fiecărui locus/ Table 7.6 Nucleotide sequences of the primers used to amplify each locus	137
Tabelul 7.7 Puterea de discriminare (DI) a fiecărui locus, pentru probele umane/ Table 7.7 Discriminatory power of each locus, for human samples	138
Tabelul 7.8 Tulpinile de MNT, izolate de la animale, selectate pentru MIRU-VNTR/ Table 7.8 Animal NTM isolates selected for MIRU-VNTR	143
Tabelul 7.9 Puterea de discriminare (DI) a fiecărui locus, pentru probele de origine animală/ Table 7.9 Discriminatory power of each locus, for animal samples	145
Tabelul 8.1 Tipul probelor testate/ Table 8.1 Type of the tested samples	152
Tabelul 8.2 Secvențele primerilor și sondelor utilizate pentru detecția tulpinilor de micobacterii aparținând CMTB/ Table 8.2 Primers and probes used for MTBC members detection	153
Tabelul 8.3 Discriminarea membrilor CMTB prin identificarea elementelor de interes/ Table 8.3 MTBC members differentiation by real time PCR	154
Tabelul 8.4 Reactivi - PCR clasic/ Table 8.4 Master mix for Classical PCR	154
Tabelul 8.5 Rezultatele obținute la analiza elementelor de interes prin TaqMan PCR în timp real pentru probele de origine animală/ Table 8.5 TaqMan PCR results for animal samples	156
Tabelul 8.6 Rezultatele obținute la analiza elementelor de interes prin TaqMan PCR în timp real, pentru cele două probe umane testate/ Table 8.6 TaqMan PCR results for the two human samples	157
Tabelul 8.7 Profilele obținute pentru probele testate/ Table 8.7 Obtained spoligotypes	158

Anexa 4./ Annex 4.

LISTA FIGURILOR

LIST OF FIGURES

Figura 1.1 Variabilitatea morfologică a lui <i>M. tuberculosis</i> : A-formă Y (TEM), B-formă rotundă, C-formă de bastonaș (fază exponențială, AFM), D-formă de bacil (TEM)/ Figure 1.1 The morphological variability of <i>M. tuberculosis</i> : A-Y shape (TEM), B-round shape, C-rod shape (exponential phase, AFM), D-rod shape (TEM)	30
Figura 1.2 Diversitatea morfologică a coloniilor de micobacterii A- <i>M. avium</i> , colonii bej-opace și translucide, mici (Middlebrook 7H10), B- <i>M. fortuitum</i> , colonii nepigmentate, netede (Middlebrook 7H10), C- <i>M. kansasii</i> , colonii fotocromogene (Middlebrook 7H10), după expunerea la lumină), D- <i>M. scrofulaceum</i> , colonii scotocromogene (Middlebrook 7H10), E- <i>M. bovis</i> (Löwenstein Jensen), F- <i>M. caprae</i> (Coletsos)/ Figure 1.2 Morphological diversity of mycobacterial colonies: A - <i>M. avium</i> , beige opaque and small, translucent colonies, (Middlebrook 7H10); B - <i>M. fortuitum</i> , unpigmented, smooth colonies (Middlebrook 7H10); C - <i>M. kansasii</i> , photochromogenic after exposure to light (Middlebrook 7H10); D- <i>M. scrofulaceum</i> , scotochromogenic (Middlebrook 7H10); E- <i>M. bovis</i> (Löwenstein Jensen), F- <i>M. caprae</i> (Coletsos)	32
Figura 1.3 Reprezentare schematică a peretelui celular micobacterian/ Figure 1.3 A schematic representation proposed for the mycobacterial cell wall	34
Figura 1.4 Arbore filogenetic care include membrii CMA, bazat pe analiza secvenței 16S ARNr/ Figure 1.4 Phylogenetic tree including MAC members, based on the analysis of 16S rRNA gene	44
Figura 1.5 Distribuția diverselor specii de MNT în Europa/ Figure 1.5 NTM distribution in Europe	48
Figura 4.1 Distribuția geografică a fondurilor de vânătoare din județul Iași, din care au provenit probele analizate (numărul marcatorului corespunde cu numărul fondului de vânătoare din tabelul 4.1)/ Figure 4.1 Geographical distribution of the Iași County hunting funds, from which originated the analyzed samples (the number on the marker corresponds to the hunting regions described in table 4.1)	69
Figura 4.2 Originea geografică a probelor de la vulpi/ Figure 4.2 Geographic origin of the fox samples	71
Figura 4.3 Placa de testare ELISA: A - după adăugarea substratului, B - după adăugarea soluției STOP/ Figure 4.3 ELISA testing plate: A - after adding the conjugate, B - after adding the STOP solution	72
Figura 5.1 Diseminarea nodulilor tuberculoși în ficat, găină/ Figure 5.1 Dissemination of granuloma, chicken liver	90
Figura 5.2 Leziune de tip tuberculos la nivelul duodenului, găină/ Figure 5.2 Nodule in duodenum, chicken	90
Figura 5.3 Ficat de găină cu leziuni de tip granulomatos/ Figure 5.3 Chicken liver with granulomatous lesions	90
Figura 5.4 Splină de găină cu leziuni de tip granulomatos/ Figure 5.4 Chicken spleen with granulomatous lesions	90
Figura 5.5 Granulom matur (tip 3) cu zonă de necroză centrală oxifilă, macrofage, celule epitelioide, limfocite și celule gigant prezente în apropierea zonei centrale, Ficat găină, colorație ZNM 100x/ Figure 5.5 Mature granuloma, central oxiphilic necrotic area, macrophages, epithelioid cells, lymphocytes and giant cells near the central area, hen liver, MZN staining, 100x	91
Figura 5.6 BAAR liberi, prezenți în zona centrală (detaliu), Ficat găină, colorație ZNM 1000x/ Figure 5.6 AFB free in the central area (detail), hen liver, MZN staining, 1000x	91
Figura 5.7 Granulom tânăr, BAAR prezenți în macrofage, zonă centrală difuză, Ficat găină, colorație ZNM, 400x/ Figure 5.7 Young granuloma, AFB present in epithelioid macrophages, central diffuse area, hen liver, MZN staining, 400x	91
Figura 5.8 Detaliu – periferie, zonă de necroză, BAAR grupați, celule gigant (marcat), macrofage epitelioide, Ficat găină, colorație ZNM, 1000x/ Figure 5.8 Detail - the periphery of the central necrosis area, grouped AFB, giant cell (marked), epithelioid macrophages, hen liver, MZN staining 1000x	91
Figura 5.9 Granulom tânăr, în formare, BAAR prezenți (detaliu), celule epitelioide aplatizate, ficat găină, colorație ZNM/ Figure 5.9 Young granuloma, AFB present (detail), flattened epithelioid macrophages, hen liver, MZN staining	92

Figura 5.10 Granuloame multiple aflate în diferite stadii evolutive, Ficat găină, colorație ZNM, 100x/ Figure 5.10 Multiple granulomas in different evolution stages, hen liver, MZN staining, 100x	92
Figura 5.11 BAAR, Frotiu din ovar, găină, colorație ZN, 1000x / Figure 5.11 AFB, chicken ovary, ZN staining, 1000x	92
Figura 5.12 BAAR, Frotiu din splină, găină, colorație ZN, 1000x / Figure 5.12 AFB, chicken spleen, ZN staining, 1000x	92
Figura 5.13 Aspectul cultural al coloniilor de <i>MAA</i> , A: pe mediul solid Löwenstein-Jensen (2 săptămâni), B, C: pe mediul lichid Middlebrook 7H9 (2 săptămâni)/ Figure 5.13 Cultural aspect of <i>MAA</i> , A: on solid Löwenstein-Jensen media (2 weeks), B,C: on liquid Middlebrook 7H9 media (2 weeks)	94
Figura 5.14 Leziuni granulomatoase în pulmon: granuloame multiple, Vacă / Figure 5.14 Multiple granulomatous lesions in cow lung	96
Figura 5.15 Leziuni granulomatoase în pulmon: granuloamele confluențe cu necroză cazoasă și mineralizare, vacă (secțiune)/ Figure 5.15 Granulomatous lesions in cow lung: confluent granulomatous lesions, mineralization and caseous necrosis and (section)	96
Figura 5.16 Secțiune pulmon vacă, granulom tuberculos - organizare, zonă centrală de necroză și mineralizare, colorație ZN, 100x (detaliu ZN, 400x)/ Figure 5.16 Granulomatous lesion - organization, central area of necrosis and mineralization, bovine lung, ZN staining, 100x (detail ZN, 400x)	96
Figura 5.17 Leziuni multiple de tip granulomatos: necroză și mineralizare, pulmon vacă, colorație ZN, x100/ Figure 5.17 Granulomatous lesion: central necrosis and mineralization, cow lung, ZN staining, 100x	96
Figura 5.18 BAAR, Frotiu pulmon vacă, colorație ZN, 100x / Figure 5.18 Acid fast bacilli, ZN staining, cow lung, 100x	96
Figura 5.19 Granulom matur cu zonă centrală de necroză, calcificare, aflux periferic de macrofage, limfocite; Limfonod mezenteric, oaie, colorație HE, 100x/ Figure 5.19 Mature granuloma with central necrosis, calcification, peripheral influx of macrophages, lymphocytes; Mesenteric lymph node, sheep, HE staining, 100x	97
Figura 5.20 Granulom, zonă centrală cu detritus celular cazeos, împrejmuită de celule epitelioide, celule gigant și limfocite; Limfonod mezenteric, oaie, colorație HE, 100x/ Figure 5.20 Granuloma with central debris area and epithelioid cells, lymphocytes in the surrounding region; Mesenteric lymph node, sheep, HE staining, 100x	97
Figura 5.21 Pregranulom, influx de macrofage, limfocite, plasmocite și celule epitelioide; Limfonod mezenteric, oaie, colorație HE, 400x/ Figure 5.21 Pregranuloma, macrophages, lymphocytes, plasmocytes, and epithelioid cells, Mesenteric lymph node, sheep, HE staining, 400x	98
Figura 5.22 Infiltrat inflamator cu macrofage și limfocite la nivelul ileonului, Oaie, colorație HE, 400x/ Figure 5.22 Inflammatory infiltrate in ileum, with macrophages and lymphocytes, sheep, HE staining, 400x	98
Figura 5.23 BAAR la nivel intracelular, Limfonod mezenteric, oaie, colorație ZNM, 1000x/ Figure 5.23 Intracellular AFB, Mesenteric lymph node, sheep, MZN staining, 1000x	98
Figura 5.24 Nodul subcutanat câine, regiunea cervicală/ Figure 5.24 Nodule in the skin and subcutis, dog, cervical region	101
Figura 5.25 Nodul subcutanat câine, regiunea abdominală ventrală/ Figure 5.25 Nodule in the skin and subcutis, dog, ventral abdominal region	101
Figura 5.26 Leziune cutanată ulcerativă, câine, regiunea cefalică/ Figure 5.26 Ulcerated skin lesion, dog, cephalic region	102
Figura 5.27 Regiuni depilate localizate la nivelul membrelor, la câine/ Figure 5.27 Skin lesions with depilation on the limbs	102
Figura 5.28 BAAR, conținut nodul subcutanat, Câine 1, colorație ZN, 1000x / Figure 5.28 Acid fast bacilli in needle aspirate from nodule, Dog 1, ZN staining, 1000x	102
Figura 5.29 BAAR, conținut nodul subcutanat, Câine 1, colorație ZN, 1000 x / Figure 5.29 Acid fast bacilli in needle aspirate from nodule, Dog 2, ZN staining, 1000 x	102
Figura 5.30 BAAR, neutrofile prezente, conținut nodul subcutanat, Câine 1, colorație ZN, 1000x / Figure 5.30 Acid fast bacilli, neutrophils in needle aspirate from nodule, Dog 1, ZN staining, 1000x	102
Figura 6.1 A-Sistemul automat BACTEC MGIT960; B- tuburile cu mediu/ Figure 6.1 A - BACTEC MGIT960 system, B-Growth indicator tubes	112
Figura 6.2 A -Sistemul automat VersaTRECK; B-tuburile de mediu/ Figure 6.2 A - VersaTRECK system; B - medium tube	112

- Figura 6.3** Aspectele morfologice ale coloniilor de MNT obținute la repicaje pe mediul Lowenstein Jensen: A - *M. avium* subsp. *hominissuis*, B - *M. peregrinum*, C - *M. mucogenicum*, D. *M. fortuitum*, E - *M. chelonae*, F. *M. gordonae*, G - *M.setense*, H - *M. mageritense*/ Figure 6.3 NTM colony morphology on Lowenstein Jensen: A - *M. avium* subsp. *hominissuis*, B - *M. peregrinum*, C - *M. mucogenicum*, D. *M. fortuitum*, E - *M. chelonae*, F. *M. gordonae*, G - *M.setense*, H - *M. mageritense* 116
- Figura 6.4** Arbore filogenetic realizat prin metoda Maximum Likelihood (probabilitate maximă) structurat prin alinierea secvențelor generate pentru gena *rpoB* cu secvențe omoloage și tulpini de referință din GenBank. Tulpinile din acest studiu sunt marcate de codul de identificare HI17-xxx/ Figure 6.4 Maximum Likelihood phylogenetic tree based on the alignment of our generated sequences for *rpoB* gene with the best hits and reference strains in GenBank;The strains from this study are marked by the code HI17-xxx 123
- Figura 6.5** Diversitatea MNT de origine umană identificate/ Figure 6.5 Diversity of the identified NTM of human origin 124
- Figura 7.1** Structura unui amplicon MIRU-VNTR. Talia ampliconului (în perechi de baze) obținut reprezintă suma taliei regiunilor flancante și a raportului dintre talia unei secvențe repetitive și N - numărul de repetiții/ Figure 7.1 MIRU-VNTR amplicon. The size of the obtained amplicon (in base paires) is the sum of the lengths of the the flanking regions and the product between the length of a repetitive sequence and N - the number of repeats 132
- Figura 7.2** Arbore filogenetic realizat utilizând profilele MIRU-VNTR obținute pentru probele testate și folosind instrumente disponibile în aplicația web MIRU-VNTRplus/ Fig. 7.2 Minimum Spanning Tree based on MIRU-VNTR profiles of the tested samples, using the instruments available on MIRU-VNTRplus web application 140
- Figura 7.3** Dendrograma realizată prin metoda *neighbor joining* (NJ), utilizând profilele MIRU-VNTR obținute pentru probele testate și datele anterior publicate pentru patru tulpini de referință, folosind instrumente disponibile în baza de date MIRU-VNTRplus/ Fig. 7.3 Neighbor joining (NJ) dendrogram based on the obtained MIRU-VNTR profiles, for the tested samples, and the the previously published profiles of four reference strains, using the tools available in the MIRU-VNTRplus database 142
- Figura 7.4** Profilul electroforetic al produșilor obținuți în urma amplificării pentru locii 292, X3, 25, 47, 3/ Figure 7.4 Electrophoretic profile of the products obtained by amplification for loci 292, X3, 25, 47, 3 144
- Figura 7.5** Profilul electroforetic al produșilor obținuți în urma amplificării pentru locii 7, 10, 32 / Figure 7.5 Electrophoretic profile of the products obtained by amplification for loci 7, 10, 32 144
- Figura 7.6** Arbore filogenetic realizat utilizând profilele MIRU-VNTR obținute pentru probele testate și folosind instrumente disponibile în aplicația web MIRU-VNTRplus/ Fig. 7.6 Minimum Spanning Tree based on MIRU-VNTR profiles of the tested samples, using the instruments available on MIRU-VNTRplus web application 146
- Figura 7.7** Dendrogramă realizată prin metoda *neighbor joining* (NJ), folosind profilele MIRU-VNTR obținute pentru extractele testate și patru tulpini de referință, utilizând instrumente disponibile în baza de date MIRU-VNTRplus/ Fig. 7.7 Neighbor joining (NJ) dendrogram based on the obtained MIRU-VNTR profiles for the tested samples and four reference strains, using the tools available in the MIRU-VNTRplus database 147
- Figura 8.1** Amplificarea (A), hibridizarea și revelarea (B) în tehnica de spoligotipare cu micro-bile magnetice - reprezentare schematică (A)/ Figure 8.1 Amplification (A), hybridization and revelation (B) in microbead-based spoligotyping technique - Schematic representation (A) 151
- Figura 8.2** Sistemul Bio-Plex 200 BIO RAD, tehnologia Luminex/ Figure 8.2 Bio-Plex 200 System BIO RAD, Luminex technology 155
- Figura 8.3** Reprezentarea grafică, în modul logaritmic, a curbelor de amplificare obținute pentru analiza țintei *lepA*/ Figure 8.3 Graphic representation, in logarithmic mode, of the amplification curves obtained for the *lepA* target amplification 157
- Figura 8.4** Distribuția spoligotipului identificat (200003777377600) la nivel European/ Figure 8.4 Global distribution of the 200003777377600 profile 161
- Figura 8.5** Distribuția spoligotipului identificat (77777764020771) la nivel global/ Figure 8.5 Global distribution of the 77777764020771 profile 162
- Figura 8.6** Distribuția spoligotipului identificat (73777777760771) la nivel global/ Figure 8.6 Global distribution of the 73777777760771 profile 162

ABREVIERI ABBREVIATIONS

ADN = acid dezoxiribonucleic	PG= peptidoglican
AG= arabinogalactan	PIM = fosfatidilinozitol – manozide
AM = acid micolic	PMN= granulocite polimorfonucleare
ATS= American Thoracic Society	RD = regiunea de diferențiere
BAAR /AFB = Bacili acido-alcoolo-rezistenți (acid-fast bacilli)	RFLP = polimorfismul lungimiir fragmentelor de restricție
BCG = Bacilul Calmette-Guérin	SAPE = streptavidin-ficoeritrin
BLAST = Basic Local Alignment Search Tool	SIT= shared-type number
CMA = Complexul <i>Mycobacterium avium</i>	SNP = polimorfismul unei singure nucleotide
CMH = complexului major de histocompatibilitate	TB = Tuberculoza
CMTB = Complexul <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WGS = Whole genome sequencing
CRISPR = Repetiții palindromice scurte grupate, regulat intercalate (Clustered Regularly Intersperced Short Palindromic Repeats)	XDR = tulpini cu chimiorezistență extinsă
CWD = Cell wall deficient	ZN= Ziehl-Neelsen
DI = Indicele de discriminare	
DNTP = deoxyribonucleotide triphosphate	
DR = repetiții directe	
ETR = repetiții în tandem exacte	
FNT = factorul de necroză tumorală	
HEYM = <i>Herrold Egg Yolk and mycobactine</i>	
HIV= Virusul Imunodeficienței Umane (Human immunodeficiency virus)	
INMV = INRA Nouzilly MIRU-VNTR	
LAM = lipoarabinomanan	
LJ = mediul de cultură Löwenstein-Jensen	
LM =lipomanani	
MAA = <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	
MAH = <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	
MAP = <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	
MAS = <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	
MDR = tulpini multidrog rezistente	
MGIT= Mycobacteria Growth Indicator Tube	
MIRU-VNTR = Mycobacterial Intersperced Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat	
MNT= Micobacterii nontuberculoase	
MOTT= Mycobacterium other than tuberculosis	
MPTR= repetiții în tandem polimorfe majore	
NCBI = National Center for Biotechnology Information	
NK = Natural killer	
OMS/WHO = Organizația Mondială a Sănătății	
pb = perechi de baze	
PCR = Reacția de polimerizare în lanț (Polymerase Chain Reaction)	

Anexa 6./ Annex 6.

LISTA LUCRĂRILOR

Prim-autor - Comunicări în cadrul congreselor internaționale

- **Ioana Alexandra RĂȚOI**, Luanda Elena OȘLOBANU, Adriana Elena ANIȚĂ, Daniela DICULENCU, Lorraine MICHELET, Maria Laura BOSCHIROLI, Gheorghe SAVUȚA - *Identification of nontuberculous mycobacteria isolated from human specimens in Iași County Romania*, 2nd NTM European Conference ,25-27 Iunie 2018, Versailles Medical Faculty, Montigny-le-Bretonneux (Poster).

Prim-autor – Lucrări științifice indexate BDI

- **Ioana Alexandra ANTON**, Adriana Elena ANIȚĂ, Dragoș Constrantin ANIȚĂ, Luanda Elena OȘLOBANU (LUDU), Gheorghe SAVUȚA, 2015 - *Aspects of nontuberculous mycobacteria zoonotic risk*, Lucrări Științifice, Vol. 58, Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași.
- **Ioana Alexandra RĂȚOI (ANTON)**, Luciana Alexandra CRIVEI, Luanda Elena OȘLOBANU, Daniela DICULENCU, Gheorghe SAVUȚA, 2018, *Preliminary data regarding the nontuberculous mycobacteria isolation from clinical specimens, from human patients, in Iași County*, Vol. 75(1), Veterinary Medicine, Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca.
- **Ioana Alexandra ANTON (RĂȚOI)**, Lorraine MICHELET, Luciana Alexandra CRIVEI, Luanda Elena OȘLOBANU, Adriana Elena ANIȚĂ, Maria Laura BOSCHIROLI, Gheorghe SAVUȚA, *Diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from animal samples*, Lucrări Științifice, Vol. 61, Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași.

Co-autor - Lucrări științifice indexate ISI

- Ana VASIĆ, Nemanja ZDRAVKOVIĆ, Dragoș ANIȚĂ, Jovan BOJKOVSKI, Mihai MARINOV, Alexander MATHIS, Marius NICULAU, Elena Luanda OȘLOBANU, Ivan PAVLOVIĆ, Dušan PETRIĆ, Valentin PFLÜGER, Dubravka PUDAR, Gheorghe SAVUȚA, Predrag SIMEUNOVIĆ, Eva VERONESI, Cornelia SILAGHI, SCOPES AMSAR training group: Adriana ANIȚĂ, **Ioana Alexandra ANTON** ș.a., 2019 - *Species diversity, host preference and arbovirus detection of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Serbia*. Parasites & vectors, 12(1), 61. IF = 3,408.

Co-autor – Lucrări științifice indexate BDI

- Luanda Elena OȘLOBANU (Ludu), Anca PÂSLARU, **Ioana Alexandra ANTON**, Dana CORNEANU, Gheorghe SAVUȚA, 2015 - *Assesment of West-Nile virus seroconversion in horses from Iasi and Suceava Counties*, Lucrări Științifice, Vol. 58, Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași.
- Adriana ANIȚĂ, Dragoș ANIȚĂ, Daniela POREA, **Ioana RĂȚOI (ANTON)**, Gheorghe SAVUȚA, 2017 - *Molecular detection of hepatitis E virus in wild boars from Botoșani County*, Vol. 60, Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași.
- Luciana CRIVEI, **Ioana Alexandra RĂȚOI (ANTON)**, Adriana Elena ANIȚĂ, Gheorghe SAVUȚA, Luanda Elena OȘLOBANU, 2017 - *West Nile virus infections in Romania after the 2010 outbreak- a retrospective study in human and animal population*, Vol. 60, Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași.
- Alexandra Luciana CRIVEI, **Ioana RĂȚOI (ANTON)**, Cristian RĂILEANU, Daniela POREA, Dragoș ANIȚĂ, Gheorghe SAVUȚA, Luanda OȘLOBANU, 2018 - *First record of West Nile virus specific seroconversion in dogs from eastern Romania*, Bulletin UASVM Veterinary Medicine 75(2), Cluj-Napoca.

Prim-autor - Comunicări în cadrul simpozioanelor de profil

- **Ioana Alexandra ANTON (RĂȚOI)**, Gheorghe SAVUȚA, 2018 - *Nontuberculous mycobacteria isolation and identification, from clinical human specimens, in Iași County*, Simpozion științific studențesc, 19-20 aprilie 2018, Secțiunea Scoli doctorale, USAMV Iași, România.