

Streszczenie

Mykobakterie to Gram - dodatnie, tlenowe, niewykazujące zdolności do ruchu oraz niewytwarzające otoczek mikroorganizmy. Zgodnie z aktualnie obowiązującą klasyfikacją prątki kwasooporne należą do klasy *Schizomycetes*, rzędu *Actinomycetales*, rodziny *Mycobacteriaceae* oraz rodzaju *Mycobacterium*. Posiadają bogatą w lipidy hydrofobową ścianę komórkową, znacznie grubszą niż u większość innych bakterii oraz dodatkową warstwę arabinogalaktanu. Lipidy otoczki komórkowej stanowią ok. 40% suchej masy ściany komórkowej z odsetkiem wosków na poziomie 4 - 25 %. Rozmiary komórki *Mycobacterium* są zależne od gatunku i wahają się od 1 - 6 μm długości oraz 0,3 - 0,6 μm szerokości. Zwykle bakterie te mają kształt prostych lub lekko zagiętych pałeczek o zaokrąglonych końcach i szorstkiej powierzchni komórki. Dzieli się one na grupę tzw. prątków typowych (MTBC) oraz atypowych (NTM). Prątki z grupy MTBC, do których należy *M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. africanum* oraz *M. pinnipedi*, odpowiedzialne są za wywoływanie choroby jaką jest gruźlica. Choroba ta u bydła zwalczana jest z urzędu, a Polska od 2009 roku posiada status kraju urzędowo wolnego od gruźlicy bydłowej. Grupa prątków niegruźliczych reprezentowana jest natomiast przez ponad 140 gatunków. Wiele z tych bakterii, podobnie jak MTBC, posiada zdolność infekowania zarówno człowieka, jak i wielu gatunków zwierząt. Diagnostyka chorób wywołanych przez prątki skoncentrowana jest jednak głównie na identyfikacji zakażeń u bydła domowego. Zwierzęta te regularnie poddawane są tuberkulinizacji, która ma na celu wytypowanie osobników podejrzanych o infekcję prątkami. Badanie to w odniesieniu do zwierząt towarzyszących i wolno żyjących wykonywane jest zaś jedynie w przypadku ich eksportu za granicę oraz podejrzenia gruźlicy w stadzie (żubry). Testy śródskórnej tuberkulinizacji przeprowadzane są również w sytuacji, gdy w gospodarstwie, w którym stwierdzono chorobę u bydła, przebywają zwierzęta innych gatunków. Ocenę sytuacji epidemiologicznej wśród zwierząt wolno żyjących i towarzyszących można zatem opierać jedynie na pojedynczych doniesieniach naukowych opisujących poszczególne przypadki zakażeń. Rola tych organizmów w rozprzestrzenianiu się chorób wywołanych przez prątki może być znaczna ze względu na wysokie ryzyko bliskiego kontaktu osobnika chorego z człowiekiem lub w przypadku zwierząt wolno żyjących ze zwierzętami gospodarskimi poprzez dzielenie obszarów żeru.

W niniejszej pracy badaniu poddano próbki narządów wewnętrznych zwierząt towarzyszących i wolno żyjących w celu potwierdzenia tezy, że zwierzęta te mogą być

rezerwuarem bakterii z rodzaju *Mycobacterium*. Wolne tempo wzrostu w połączeniu z trudnościami identyfikacji gatunkowej wynikającymi z dużego podobieństwa między wieloma gatunkami prątków sprawia, że diagnostyka chorób odprątkowych, opierająca się wyłącznie na klasycznych metodach (Testy Hain) charakteryzuje się wysokim poziomem trudności interpretacji wyników. Nowoczesne techniki biologii molekularnej oraz oparte na analizie białek komórkowych są narzędziem diagnostycznym pozwalającym zarówno na szybkie wykrycie, jak również skuteczną identyfikację gatunkową patogenu. W badaniach oprócz standardowych metod wykrywania i identyfikacji zastosowano nowe rozwiązania metodyczne, które wprowadzone zostały celem usprawnienia obecnej diagnostyki chorób wywołanych przez bakterie z rodzaju *Mycobacterium* w KLR Gruźlicy PIWet - PIB.

Badaniom poddanych zostało 519 zwierząt wolno żyjących i towarzyszących. Zakażenia prątkami stwierdzono w przypadku 94 zwierząt należących do 18 gatunków: dzik euroazjatycki, żubr, antylopa sitatunga, alpaka, jeleń szlachetny, osioł domowy, koń, tchórzofretka, wilk pospolity, gundia, żółw żółtobruchy, żółw czerwonolicy, żółw żółtolicy, danio pręgowany, piżmówka malajska, papużka nierozłączka, paw zielony, bocian biały. Korzystając ze standardowych metod posiewu materiału biologicznego na podłoża stałe i płynne wyizolowano 94 szczepy. Aż 40 z nich stanowiły prątki należące do grupy MTBC, co stwierdzono poprzez analizę morfologii kolonii, wykonanie testu immunochromatograficznego MGIT Tbc Identification test firmy Becton Dickinson oraz dodatkowo poprzez badanie multiplex PCR. Tożsame wyniki otrzymano stosując real - time PCR do wykrywania obecności materiału genetycznego prątków gruźliczych w próbkach tkankowych, co świadczy o wysokim potencjale badawczym tej metody. Gatunki poszczególnych izolatów bakteryjnych z grupy prątków gruźliczych zidentyfikowano poprzez zastosowanie testu Hain Lifescience MTBC oraz sekwencjonowanie całego genomu - NGS. Wśród szczepów prątków typowych znajdowały się *M. bovis* - 29 szczepów oraz *M. caprae* - 11 szczepów. Pozostałe gatunki prątków atypowych poddano identyfikacji stosując standardowy test Hain Lifescience CM oraz nowe rozwiązanie, jakim jest spektrometria mas MALDI - TOF. Oba te badania wykazały się podobną skutecznością i pozwoliły na identyfikację 52 szczepów. Spośród NTM najbardziej rozpowszechnione w środowisku są *M. avium ssp. avium* oraz *M. avium ssp. hominissuis*. Dlatego też do identyfikacji tych gatunków wykorzystano real-time PCR, co zapewniło szybkie i skuteczne uzyskanie wyniku (liczba zidentyfikowanych szczepów *M. avium* taka sama jak w przypadku zastosowania standardowej metody Hain Lifescience CM) oraz ograniczenie kosztów badań związanych z koniecznością stosowania znacznie droższych i bardziej pracochłonnych metod identyfikacyjnych, takich jak testy Hain. Dodatkowo, w celu określenia

podgatunku *M. avium* wykonano sekwencjonowanie NGS i przeprowadzono analizę genów IS901, IS1245, IS311. Identyfikacja gatunkowa poprzez poznanie sekwencji nukleotydowej okazała się być najskuteczniejszą i najdokładniejszą metodą, ponieważ pozwoliła na zidentyfikowanie dwóch szczepów, których identyfikacja z wykorzystaniem pozostałych technik okazała się być niemożliwa, a ponadto umożliwiła określenie podgatunku prątków *M. avium*. Najczęściej izolowanym szczepem prątków atypowych wśród badanych zwierząt był *M. avium ssp. avium* – 17 szczepów.

Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły dowodów naukowych, świadczących o słuszności postawionej tezy mówiącej o tym, że zwierzęta wolno żyjące i towarzyszące są rezerwuarem bakterii z rodzaju *Mycobacterium*. Potwierdzenie tej tezy pozwala stwierdzić, że obok bydła domowego zwierzęta te mogą stanowić zagrożenie epidemiologiczne jako źródło i wektor bakterii groźnych dla zdrowia i życia człowieka. Zastosowane niestandardowe metody wykrywania i identyfikacji gatunkowej prątków umożliwiły zaś usprawnienie diagnostyki zakażeń bakteriami z rodzaju *Mycobacterium* w KLR Gruzlicy PIWet - PIB.

Summary

Mycobacteria are gram-positive, aerobic, non-mobile and non-enveloping microorganisms. According to the currently valid classification, acid-fast mycobacteria belong to the class of *Schizomycetes*, the order *Actinomycetales*, the family *Mycobacteriaceae* and the genus *Mycobacterium*. They have a lipid-rich hydrophobic cell wall, much thicker than in most other bacteria, and an additional layer of arabinogalactan. Cell envelope lipids account for about 40% of the dry weight of the cell wall with the percentage of waxes at the level of 4 - 25%. *Mycobacterium* cell size is species dependent and range from 1 - 6 μm in length and 0.3- 0.6 μm in width. Usually these bacteria have the shape of straight or slightly bent sticks with rounded ends and a rough cell surface. They are divided into the group of typical (MTBC) and atypical mycobacteria (NTM). Mycobacteria from the MTBC group, including *M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. africanum* and *M. pinnipedi*, are responsible for causing tuberculosis. In cattle tuberculosis is eliminated ex officio, and since 2009 Poland has the status of a country free from bovine tuberculosis. The group of non-tuberculous bacilli is represented by over 140 species. Many of these bacteria, can infect both humans and many animal species similarly like MTBC. However, the diagnosis of mycobacterial diseases is mainly focused on identifying infections in domestic cattle. These animals are regularly subjected to tuberculinization in order to select individuals suspected of being infected with mycobacteria. This test for companion and free-living animals is performed only in the case of their abroad export and suspicion of tuberculosis in the herd (bisons). Intradermal tuberculinization tests are also carried out when animals of other species are present on the farm where the disease was diagnosed in cattle. Therefore, the assessment of the epidemiological situation among free-living and companion animals based only on a single scientific reports describing individual cases of infection. The role of these organisms in the spread of the diseases caused by bacteria of the genus *Mycobacterium* may be significant due to the high risk of close contact with humans or, in the case of free-living animals, by sharing the feeding areas with farm animals. In this study, samples of internal organs of companion and free-living animals were tested in order to confirm the thesis that these animals can be a reservoir of Mycobacteria. The slow growth rate combined with the difficulties in species identification resulting from the high similarity between many species of mycobacteria make the diagnosis of mycobacteria diseases difficult in interpreting the results if there are only classic methods used (Hain tests). Modern techniques of molecular biology and techniques based on the analysis

of cellular proteins are a diagnostic tool that allows both quick detection and effective identification of the pathogen species. Therefore, in this PhD thesis modern methods of detection and identification of mycobacteria, not previously used in the routine tests carried out at NRL for Tuberculosis of NVRI were used in order to improve current diagnostics.

519 free-living and companion animals were tested. Mycobacterial infections were found in 94 animals belonging to 18 species: eurasian wild boar, european bison, sitatunga antelope, alpaca, red deer, domestic donkey, horse, ferret, wolf, gundia, yellow-bellied turtle, red-eared turtle, cumberland slider, zebrafish, malaysian muskrat, lovebird, green peacock, white stork. 94 strains were isolated with the use of classical methods of inoculating biological material on solid and liquid media. As many as 40 of them were mycobacteria belonging to the MTBC group, which was found by analyzing the morphology of the colonies, performing the Becton Dickinson MGIT Tbc Identification immunochromatographic test, and additionally by multiplex PCR testing. The same results were obtained using the real – time PCR method which detects the presence of the genetic material of tuberculous Mycobacteria in tissue samples, which proves the high research potential of this method. The species of individual bacterial isolates from the *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Group were identified by using the Hain Lifescience MTBC test and the New Generation Sequencing of the whole genome. The typical mycobacterial strains included *M. bovis* - 29 strains and *M. caprae* - 11 strains. The remaining atypical mycobacterial species were identified by standard Hain Lifescience CM test and MALDI - TOF mass spectroscopy. Both of these studies showed similar effectiveness and allowed the identification of 52 strains. Among the NTM, *M. avium* ssp. *avium* and *M. avium* ssp. *hominissuis* are the most widespread in the environment. Therefore, qPCR was used to identify these species, which ensured a quick result (the number of *M. avium* strains identified was the same as using the standard Hain Lifescience CM method) and reduced research costs related to the need to use much more expensive identification methods. Additionally, NGS sequencing was performed and IS901, IS1245, IS311 genes were analysed to identify *M. avium* subspecies. Species identification by studying the nucleotide sequence proved to be the most effective and accurate method, as it allowed the identification of two strains which could not be identified using other techniques, and also allowed the identification of *M. avium* mycobacterial subspecies. The most frequently isolated strain of atypical mycobacteria among the tested animals was *M. avium* ssp. *avium* - 17 strains.

The results of the conducted studies provided scientific evidences confirming the correctness of the thesis that free-living and companion animals are reservoirs of bacteria of the genus *Mycobacterium*. The confirmation of this thesis allows to state that, apart from domestic

cattle, these animals may pose an epidemiological threat as a source and vector of bacteria dangerous to human health and life. The applied non-standard methods of detection and species identification of mycobacteria made it possible to improve the diagnosis of *Mycobacterium* infections in NRL for Tuberculosis of NVRI.