

## ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

ДИФЕРЕНЦИРАНЕ НА ВИДОВЕ МИКОБАКТЕРИИ ОТ  
*Mycobacterium avium* COMPLEX

Таня Савова\*, Магдалена Боновска\*\*, Албена Димитрова\*, Николай Лалковски\*

\*Национален Диагностичен Ветеринарномедицински Научноизследователски Институт –  
София

\*\*Институт по микробиология, БАН – София

## РЕЗЮМЕ

*Mycobacterium avium* complex (MAC) включва *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. lepraemurium* и *M. intracellulare*.

*Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAA) и *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) са патогенни микроорганизми с висока степен на идентичност на нуклеотидните последователности в определени региони на техния геном.

Извършено е сравнително изпитване за специфичност на щамове *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAA) и *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) чрез бактериологични (твърди хранителни среди на *Herrold's Egg* и *Löwenstein-Jensen* и течна хранителна среда *Middlebrook 7H-9*), и молекулярно-биологични методи (конвенционална PCR) с два диагностични търговски кита (специфични съответно за *M. avium* и *M. paratuberculosis*).

Установено е, че използваните търговски PCR китове не диференцират изпитваните два вида микобактерии, за разлика от микробиологичния метод чрез изолация на твърди хранителни среди.

**Ключови думи:** *Mycobacterium avium* complex, диференциране, микробиология, PCR

Патогенните микобактерии се класифицират в две основни групи: *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), включващ видовете *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* и *M. microti*, и *Mycobacterium avium* complex (MAC), включващ *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. paratuberculosis* и *M. lepraemurium*.

Въпросът за контрола и превенцията на инфекциите, причинявани от *M. avium* (MAA) и *M. paratuberculosis* (MAP), доказано свързани с някои имунодефицитни състояния при хората, става все по-актуален. Това поставя пред медицинските и ветеринарномедицинските специалисти изискването за разработване и внедряване на по-специфични, чувствителни и бързи методи за тяхното навременно откриване и диференциране (OIE, Manual, 2014, 2. 3. 6. и 2.01.11).

Бактериологичното изследване все още е основен диагностичен тест – „златен стандарт“ за откриване на MAA и MAP (Митов, 2000; Tell et al., 2003; OIE, 2014). Отделните видове микобактерии имат различни изисквания към хранителните среди. Затова микробиологичните изследвания залагат на съвременни разработени среди, съдържащи различни суплементи, стимулиращи растежа на микобактериите (Thorel et al., 1990; Ristow et al., 2006; Salgado et al., 2007; Whittington et al., 2013).

Недостатък на бактериологичните методи е дългият срок на култивиране на микобактериите. Ayele et al. (2005) установяват, че за растежа на MAP бактериите е необходимо до 32-седмично култивиране върху твърда среда на *Herrold*. Marcy et al. (2000) наблюдават поява на колонии от *M. avium* върху твърдата

среда на *Löwenstein-Jensen* към края на 4-тата седмица.

В световната диагностична практика успешно се наложиха молекулярно-биологичните методи, базирани на полимеразно-верижната реакция (PCR), които отговарят на основните изисквания за бързина, чувствителност и специфичност, и многократно скъсяват времето за изследване (Mullis, 1990; Найденски, Хр., 1997; Боновска, М., 2008; Saggiase et al., 2010;).

Чувствителността на диагностичните методи не е еднаква, затова изследванията трябва да бъдат комплексни. Комбинацията от микробиологични, молекулярно-биологични, серологични и други методи е гаранция за бърза и точна диагноза (Tell et al., 2003; Bogli-Stubber et al., 2005; Salgado et al., 2007; Slaná et al., 2009; Saggiase et al., 2010).

Цел на настоящото изследване е да бъде проучена възможността за използване на различни съвременни течни и твърди хранителни среди и готови търговски PCR китове за диференциране на *M. avium* и *M. paratuberculosis*.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В проучването ни са включени 24 щамове, от които 3 референтни (*M. avium* Kirshberg, *M. bovis* 7725 и *M. tuberculosis* 7578) и 21 теренни – *M. avium* (9), *M. paratuberculosis* (11) и *M. bovis* (1), изолирани от лимфни възли, вътрешни органи и чревно съдържимо на говеда, свине и птици.

За бактериологично изследване използвахме следните течни и твърди хранителни среди, растежът върху които бе отчитан ежеседмично:

1. Течна среда на *Middlebrook 7H-9* от Remel-Kansas, USA.

2. Течна среда на *Middlebrook 7H-9* с polysorbate 80 – B&D & Company, USA.

3. Твърда среда на *Löwenstein-Jensen* с *glicerole* – B&D & Company, USA.

4. Твърда среда на *Löwenstein-Jensen* с *pyruvate* – B&D & Company, USA.

5. Твърда среда – *Herrold's Medium* с *Mycobactin J* и *pyruvate* на Remel-Kansas.

6. Твърда среда – *Herrold's EggYolk Agar Slants* с *Mycobactin J* и *ANV B&D*.

Наличието на *M. avium* и *M. paratuberculosis* бе доказано чрез използване на комерсиални амплификационни PCR китове “*Mycobacterium avium spp. avium*” на Genekam Biotechnology за *M. avium* и “*Mycobacterium Paratuberculosis Vet*” на Sacace Biotechnologies за *M. paratuberculosis*. ДНК бе получена от бактериални изолати и директно от тъканни проби на изменени вътрешни органи с изолационни китове *MTB/NTM ACE Detection* и *MTB/BCG ACE Detection* на фирма Seegene.

Реакцията протече в термоциклер “*Techné*” *TC-412* по протоколите, приложени към китовете. Получените амплификати бяха позитивирани чрез електрофореза върху 2% агарозен гел, оцветен 10 мин. в разтвор на етидиев бромид. Резултатите бяха отчетени върху UVP-транслиуминатор и фотодокументирани с *Visi-Doc-It* система. Големината на получените амплификати бе определена с ДНК маркер от 100 bp (базови двойки).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Използваните в нашето изследване щамове *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* и *M. paratuberculosis* посяхме върху четири твърди и две течни хранителни среди, предлагани от различни фирми за култивиране на микобактерии, за да сравним тяхната специфичност. Представените резултати (сн. 1, 2 и 3) показват, че паратуберкулозните бактерии (MAP) се развиват еднакво добре и на двете твърди среди на *Herrold* – с микобактин и с микобактин и пируват (сн. 1), но не показват растеж върху средите на *Löwenstein-Jensen* (*L-J*) с пируват, даже и след 6-месечно култивиране (сн. 2).

Посетите успоредно щамове *M. avium*, *M. tuberculosis* и *M. bovis* растяха добре върху средите на *L-J*, като *M. bovis* се развиваше по-добре и по-бързо върху средата на *L-J* с пируват. На средата на *L-J* с глицерол видим

растеж на *M. avium* се появи около 20-ия ден (сн. 2), за разлика от Marcy et al. (2000), които наблюдават поява на колонии в края на 4-тата седмица. Tell et al. (2003) установяват най-добър растеж и образуване за по-кратко време на по-голям брой колонии от *M. avium* върху твърдата среда на *L-J* с добавка на глицерол.

Трите вида бактерии, обаче не растяха върху средите на *Herrold* (сн. 3). Подобни наблюдения имат Thorel et al. (1990), De Juan et al. (2006), Ristow et al. (2006), Salgado et al. (2007), Whittington et al. (2011) и др., които култивират на твърди среди с микобактин различни видове микобактерии и доказват зависимостта към него единствено на паратуберкулозните микобактерии, поради невъзможността да го продуцират сами.

Получените резултати показват, че твърдите селективни среди могат успешно да се използват за диференциране представителите на двата микобактериални комплекса – МАС и МТС, както и на *M. avium* (МАО) от *M. paratuberculosis* (МАР).

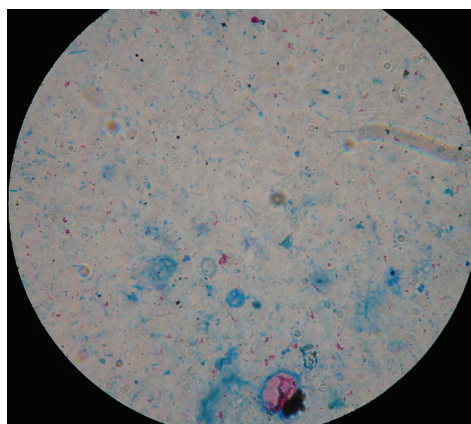
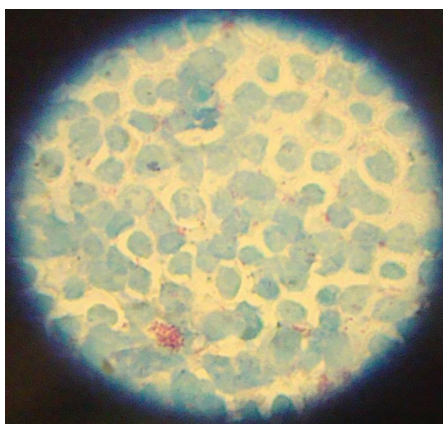
В течните среди на Мидълбрук (*Middlebrook 7H-9* и *Middlebrook 7H-9* с *polysorbate 80*) всички посети МАО и МАР щамове и изолати се развиваха добре. Тези резултати ни дават основание да потвърдим специфичността на фирмените културални среди. Подобни проучвания имат Marcy et al. (2000) и Whittington et al. (2013), които препоръчват течната среда *Middlebrook 7H-9* като много подходяща за култивиране на *M. avium* и *M. paratuberculosis*.



Сн. 1.(ляво) Бактериален растеж на *M. paratuberculosis* (МАР) върху *Herrold's Medium*

Сн. 2.(срeда) Бактериален растеж на МАР и *M. avium* (МАО) върху среди на *Löwenstein-Jensen*

Сн. 3.(дясно) Бактериален растеж на МАР и МАО върху *Herrold's Medium*



Сн. 4. Микроскопска снимка на МАР

Сн. 5. Микроскопска снимка на МАО

При направените натривки, оцветени по Ziel-Neelsen, наблюдавахме розово-червени клетки на фона на синьо оцветена околна тъкан. Паратуберкулозните бактерии бяха къси, неподвижни, често струпани на купчинки, някои от тях с формата на коки (Сн. 4), докато МАА бактериите бяха нежни, дребни пръчици, пръснати поединично на зрителното поле (Сн. 5). Микроскопското изследване на тъканни препарати, макар и необходимо, не е достатъчно за поставяне на диагноза и според много изследователи има само ориентировъчно значение, което ние напълно приемаме (De Juan et al., 2006; Slana et al. 2009).

В проведените PCR изследвания с амплификационния кит *Mycobacterium avium*, spp. *avium*, изпитавме ДНК, изолирана от тъкани на опитно заразени с МАА животни и птици, МАР ДНК от говедо, елен и муфлон; *M. bovis* от говедо и референтните щамове МАА Kirchberg, *M. bovis* 7728 и *M. tuberculosis* 7578, използвани като контроли (сн. 1).

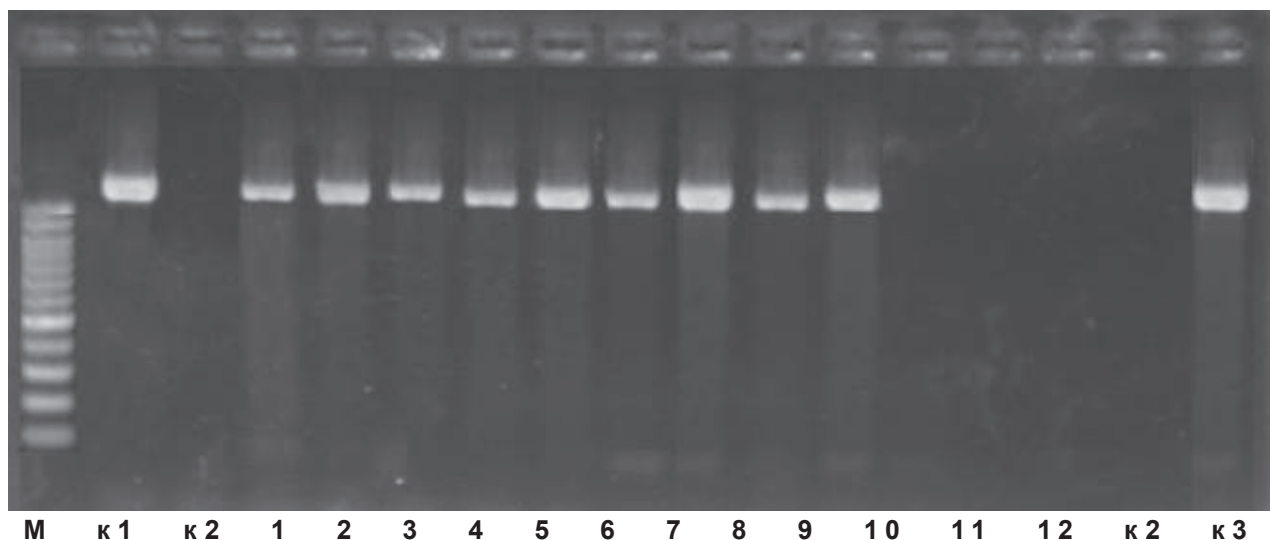
При последващата електрофореза получихме ДНК амплификати с големина 1279 bp от положителните контроли (фиг. 1: к1, к3),

от МАА (фиг. 1: 1-6) и МАР (фиг. 1: 7-9). От *M. bovis* и *M. tuberculosis* не се наблюдаваха PCR амплификати (фиг. 1: 10-12).

Специфичността на търговския кит *Mycobacterium paratuberculosis* Vet проверихме чрез PCR амплификация с ДНК от *M. paratuberculosis* и *M. avium*.

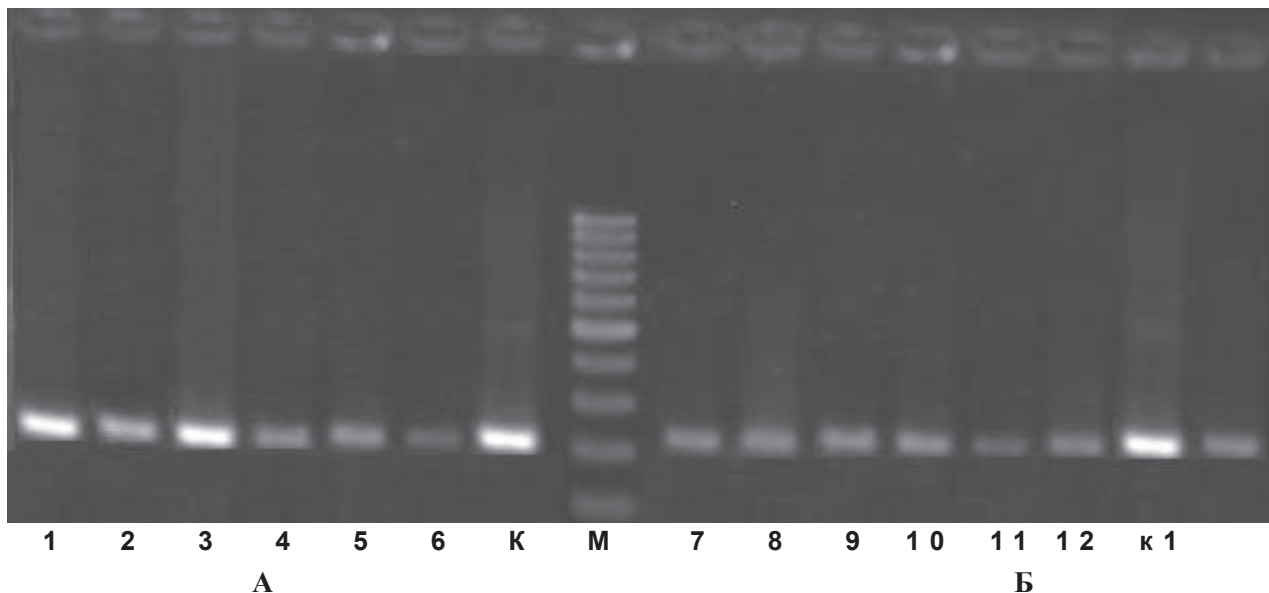
След позитивиране на реакцията установихме амплификати с големина 209 bp при всички изследвани МАР и МАА щамове (фиг. 2: А 1-6; Б 7-12), еднакви по големина с положителната контрола от кита и референтния щам *M. paratuberculosis* 12146.

Доказано е, че PCR е много по-точна от микроскопията, по-бърза от културалното и по-специфична от хистологичното изследване, тъй като позволява микроорганизмите да се определят по тяхната генетична информация (Mullis, 1990). Englund et al. (2002), Tell et al. (2003), Vansnick et al. (2004) отбелязват, че повечето PCR праймери, с които се работи, не диференцират *M. paratuberculosis* от другите представители на *Mycobacterium avium* complex и дават еднакви по големина ДНК амплификати, което може да се отдаде



Фиг. 1. PCR амплификати от 1279 bp, получени от щамове на МАС и МТС, с търговски кит *Mycobacterium avium*, spp. *avium*

Легенда: М. – маркер 100 bp; к1 – положит. контрола *M. avium* Kirchberg; к2 – отриц. контрола ( $H_2O$ ); к3 – положителна контрола от кита; 1. МАА от морски свинчета далак; 2. МАА м. свинчета черва; 3. МАА зайци бъбрек; 4. МАА ярки черва; 5. МАА ярки бъбрек; 6. МАА ярки ч. дроб; 7. МАР 8819; 8. МАР 1/09 елен; 9. МАР 5/12 муфлон; 10. *M. bovis* 123/96 говедо; 11. *M. bovis* 7725; 12. *M. tuberculosis* 7578.



**Фиг. 2.** PCR амплификати от 209 bp на MAP (А) и МАА (Б), получени с търговски кит *Mycobacterium paratuberculosis Vet*

**Легенда:** К – MAP контрола от кита; к1 – положителна контрола *M. paratuberculosis* 12146 говедо.  
 А 1-6. MAP щамове от тънки черва на: MAP2/11 – елен лопатар; MAP3/11 – елен лопатар шилар;  
 MAP4/12 – елен лопатар; MAP5/12 – муфлон; MAP6/13 – муфлон; MAP7/13 – муфлон; Б 7-9. МАА щамове  
 от лимфни възли на: МАА 20/95 – говедо; МАА 22/95 – свиня; МАА 321/97 – свиня; Б 10-12. МАА щамове  
 от вътрешни органи на: МАА 2/98 – гълъб; МАА 2/99 – кокошка и МАА 3/06 – опитна кокошка.

на високата степен на идентичност на нуклеотидните последователности в определени региони на техния геном (Bannantine et al., 2002). Използваните от нас PCR китове за доказване на *M. paratuberculosis* и *M. avium* също не се оказаха достатъчно специфични за разграничаване на двата вида бактерии. Амплификационни ДНК продукти с големина съответно 1279 bp (фиг. 1) и 209 bp (фиг. 2) получихме от всички изследвани MAP и МАА щамове. Двата кита, обаче, могат успешно да диференцират представителите на *Mycobacterium avium* complex от тези на *Mycobacterium tuberculosis* complex (сн. 1).

Нашите изследвания потвърдиха високата чувствителност на изпитаните китове, с които получихме амплификационни продукти, еднакви с тези на положителните им контроли. Китове са надеждни, но не достатъчно специфични, за да се използват като единствен тест при диагностика на птичата туберкулоза или паратуберкулозата. Получените от нас резултати ясно показват, че при комплексно изследване, включващо бактериоло-

гични и молекулярно-биологични методи, могат да се получат точни резултати относно диференцирането на отделните представители на *Mycobacterium avium* complex. Тези резултати са в потвърждение на установеното от Bogli-Stuber et al. (2005), Salgado et al. (2007), Slaná et al. (2009) и Saggese et al. (2010), че за диагностициране на микобактериозите трябва да бъдат използвани комбинации от културални и PCR методи.

## ИЗВОДИ

Течните хранителни среди на *Middlebrook 7H-9* с и без полисорбат са еднакво подходящи за култивиране на *M. avium* и *M. paratuberculosis*.

Изпитването на различни твърди среди показва, че *M. paratuberculosis* расте добре на средите на *Herrold* с добавка на микобактин, но не показва растеж върху средите на *Löwenstein-Jensen* с глицерол или пируват. *M. avium* се развива добре върху *Löwenstein-*

*Jensen*, но не и върху средите на *Herrold*. Тези различия могат да се използват за диференциране на микобактериалните изолати.

Апробирани са два различни търговски PCR кита и е доказана тяхната приложимост за диагностика на паратуберкулозата при говедата и туберкулозата при птиците.

Използваните два PCR кита за доказване на *M. paratuberculosis* и *M. avium* не са достатъчно специфични за разграничаване на двата вида, но успешно диференцират представителите на *Mycobacterium avium* complex от *Mycobacterium tuberculosis* complex.

## ЛИТЕРАТУРА

- Боновска, М.**, 2008. Нови възможности за лабораторна диагностика на туберкулозата при преживни животни. *Животновъдни науки*, 45: (3), 204-208
- Митов, Г., Н. Цанев, Ю. Дочева, Р. Аврамова, Ив. Митов**, 2000. Туберкулозни бактерии. В: *Микробиология*. (Ред. Г. Митов, Ю. Дочева). Изд. „АРСО“, С., 379-389
- Найденски, Хр., Зл. Янкова**, 1997. Полимеразна верижна реакция – същност и приложение в диагностиката на туберкулоза. *Пневм. и фтизиатрия*, 32: 3-4, 64-69
- Ayle, W. Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I.**, 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurised cow's milk in the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1210-1214
- Bannantine, J. P., Baechler, E., Zhang, Q., Li, L. L., Kapur, V.** 2002. Genome Scale Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* Reveals Potential Diagnostic Sequences. *J. C. M.*, 40, 4, 1303-1310
- Bogli-Stuber, K., Kohler, C., Seitert, G., Glanemann, B., Antognoli, M. C., Salman, M. D., Wittenbrink, M. M., Wittwer, M., Wassenaar, T., Jemmi, T., Bissig-Choisat, B.**, 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. *J. Appl. Microbiol.* 99, 587-97
- DE Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A. & Dominguez, L.**, 2006. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (9), 5927-5932
- Englund, S., Bölske, G., Johansson, K. E.**, 2002. An IS900 like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 267-271
- Marcy, K. Mendenhall, Scott, L. Ford, Carlene, L. Emerson, Rae, A. Wells, L. G. G. a. I. S. Eriks.**, 2000. Detection and Differentiation of *Mycobacterium Avium* and *Mycobacterium Genavense* by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Digestion Analysis. *J VET Diagn Invest*, 12-57
- Mullis, K. B.**, 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 4, 262, 56-61
- Ristow, P., Silva, M. G., Fonseca, L. S. & Lilienbaum, W.**, 2006. Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal culture protocols and media. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 26(1):1-4
- Saggese, M. D., I. Tizard, D. N. Phalen**, 2010. Comparison of sampling methods, culture, acid-fast stain, and polymerase chain reaction assay for the diagnosis of mycobacteriosis in ring-neck doves (*Streptopelia risoria*). *Journal of avian medicine and surgery*, 4, 24, 263-271
- Salgado, M., Juan Kruze, Michael, T. Collins**, 2007. Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *J. Vet. Diagn. Invest* 19: 99-102
- Slaná, I, Milan Bartoš, Petr Roubal, Vladimír Babák, Ivo Pavlík**, 2009. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M.a.avium* Detected by Culture, IS 900 and IS 901 highly sensitive PCR in Bulk Tank Milk from Dairy Herds in the Czech Republic between 2002 and 2004. Vol. 27, No 5: 372-378
- Tell, L. A., J. Foley, M. L. Needham, R. L. Walker**, 2003. Diagnosis of avian mycobacteriosis: comparison of culture, acid-fast stains, and polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium avium* in experimentally inoculated Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Avian diseases*, 2, 47, 444-452
- Thorel, M. F., M. Krichevsky, V. V. Lévy-Frébault**, 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 3, 40, 254-260
- Vansnick, E., P. de Rijk, F. Vercammen, D. Geysen, L. Rigouts, F. Portaels**, 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary microbiology*, 3, 100, 197-204
- Whittington, R. J., A.-M. Whittington, A. Waldron, D. J. Begg, K. de Silva, A. C. Purdie, K. M. Plain**, 2013. Development and validation of a liquid medium (M7H9C)

for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to replace modified Bactec 12B medium. Journal of clinical microbiology, 12, 51, 3993-4000

OIE. Manual 2014. Avian tuberculosis. Chapter 2.3.6.: 497-506

OIE Manual 2014. Paratuberculosis. Chapter. 2.1.11.

## DIFFERENTIATION OF TYPES MYCOBACTERIA FROM *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX

*T. Savova\**, *M. Bonovska\*\**, *A. Dimitrova\**, *Nikolay Lalkovski\**

\*National Diagnostic Veterinary Research Institute – Sofia

\*\*Institute of Microbiology, Academy of Sciences – Sofia

### ABSTRACT

*Mycobacterium avium* complex (MAC) includes *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. lepraemurium* and *M. intracellulare*.

*Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAA) and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) are pathogenic bacteria with a high degree of identity to the nucleotide sequences in certain regions of their genome.

There has been a comparative study of specificity of strains of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAA) and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) by bacteriological (solid media *Herrold's Egg* and *Löwenstein-Jensen* and liquid media) and the molecular biological methods (conventional PCR) with two commercial diagnostic kits (respectively specific for *M. avium* and *M. paratuberculosis*).

It has been found that commercial PCR kits does not differentiate two test species of mycobacteria, as opposed to the microbiological method by isolation of solid media.

**Key words:** *Mycobacterium avium* complex (MAC), differentiation, microbiology, PCR