

Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας

Τόμ. 57, Αρ. 2 (2006)



Μυκοβακτηριακές λοιμώξεις των πτηνών

E. FRANGIADAKI (Ε. Γ. ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ), J. IKONOMOPOULOS (Ι. Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΠΟΥΛΟΣ), C. BALASKAS (Χ. ΜΠΑΛΑΣΚΑΣ), M. GAZOULI (Μ. ΓΑΖΟΥΛΗ)

doi: [10.12681/jhvms.15017](https://doi.org/10.12681/jhvms.15017)

Βιβλιογραφική αναφορά:

FRANGIADAKI (Ε. Γ. ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ) Ε., IKONOMOPOULOS (Ι. Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΠΟΥΛΟΣ) J., BALASKAS (Χ. ΜΠΑΛΑΣΚΑΣ) C., & GAZOULI (Μ. ΓΑΖΟΥΛΗ) Μ. (2017). Μυκοβακτηριακές λοιμώξεις των πτηνών. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, 57(2), 127-139. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15017>

Μυκοβακτηριακές λοιμώξεις των πτηνών

Ε. Γ. Φραγκιαδάκη, Ι. Α. Οικονομόπουλος,
Χ. Μπαλάσκα, Μ. Γαζούλη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η σημασία των μυκοβακτηριακών λοιμώξεων των πτηνών συστηματικής εκμετάλλευσης μπορεί σήμερα να είναι μειωμένη λόγω της ευρείας εφαρμογής σύγχρονων μεθόδων εκτροφής, η μελέτη τους όμως συνεχίζει να είναι επίκαιρη αναφορικά με την προστασία της υγείας των πτηνών, των ζώων και του ανθρώπου. Στις μυκοβακτηριακές λοιμώξεις των πτηνών εμπλέκονται κυρίως μέλη του *Mycobacterium avium* complex (MAC), το οποίο διακρίνεται σε 28 ορότυπους που ανά ομάδες συνιστούν είδη: οι ορότυποι 1 έως 6, 8 έως 11 και ο ορότυπος 21 αποτελούν το είδος *M. avium* subsp. *avium* (MA), οι ορότυποι 4 και 8 αναφέρονται και ως *M. avium* subsp. *hominisuis*, ενώ οι ορότυποι 7, 12 έως 20 και 22 έως 28 συνιστούν το *Mycobacterium intracellulare*. Από τα μυκοβακτήρια που συνιστούν το MAC, εκείνα που προκαλούν γενικευμένη φυματίωση στις όρνιθες είναι μόνο οι ορότυποι 1 έως 3 του MA. Λοίμωξη από τους υπόλοιπους ορότυπους του MA και από το *M. intracellulare* προκαλεί, συνήθως, μόνο εστιακές φυματιώδεις αλλοιώσεις. Στα παραπάνω έχει προστεθεί τελευταία και ένα ακόμη είδος, το *Mycobacterium genavense*, που αναγνωρίζεται ως παθογόνο για τα πτηνά. Περιστατικά μυκοβακτηριακών λοιμώξεων στα πτηνά έχουν καταγραφεί παγκοσμίως. Η εισαγωγή του νοσήματος σε μια εκτροφή γίνεται κυρίως με την αγορά μολυσμένων πτηνών που αποβάλλουν τα μυκοβακτήρια με τα κόπρανά τους. Η είσοδος του μικροβίου στον οργανισμό γίνεται στις περισσότερες περιπτώσεις μέσω της στοματικής, και σπανιότερα, μέσω της άνω αναπνευστικής οδού. Η φυματίωση των πτηνών σε μία εκτροφή εκδηλώνεται συνήθως με σποραδικά κρούσματα αφνίδιων θανάτων, απώλεια βάρους και μείωση της ωοπαραγωγής. Τα κλινικά συμπτώματα μπορεί επίσης να προέρχονται από την προσβολή του εντέρου, των οστών, των πνευμόνων ή του δέρματος. Τα νεκροτομικά ευρήματα είναι παθολογικά μόνο εφόσον ανευρεθούν φυμάτια στα παρεγχυματικά όργανα και κυρίως στο μυελό των οστών. Για την εργαστηριακή διάγνωση των μυκοβακτηριακών λοιμώξεων των πτηνών χρησιμοποιούνται ορολογικές εξετάσεις, η μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων κοπράνων και η απομόνωση του μυκοβακτηρίου με καλλιέργεια από παθολογικά υλικά, που αποτελεί και σήμερα τη μέθοδο αναφοράς. Τα τελευταία χρόνια εφαρμόζονται και κάποιες μέθοδοι που βασίζονται σε τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, από τις οποίες πιο ευρέως διαδεδομένη είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (ΑΑΠ). Η καλλιέργεια παθολογικών υλικών για

Mycobacterial infections of fowl

Fragkiadaki E., Ikononopoulos J., Balaskas C.,
Gazouli M.

ABSTRACT. The significance of mycobacterial infections of birds may have been decreased considerably by the broad application of modern farming practices, but their study continues to be important with reference to fowl, animal and public health protection. Mycobacterial infections of birds are mainly caused by members of the *Mycobacterium avium* complex (MAC). This is divided into 28 serotypes that are grouped into species: serotypes 1 to 6, 8 to 11 and serotype 21 consist the *M. avium* subsp. *avium* (MA), serotypes 4 and 8 are also referred to as *M. avium* subsp. *hominisuis*, whereas serotypes 7, 12 to 20 and 22 to 28 consist the *Mycobacterium intracellulare*. Serotypes 1 to 3 of MA are the only ones that cause systemic tuberculosis in chickens. *M. intracellulare* and the rest of the serotypes that consist MA usually cause only focal tuberculous lesions. Recently, another member of the *Mycobacterium* species, namely *Mycobacterium genavense*, has been added to those that can infect fowl. Cases of fowl mycobacteriosis have been reported from practically every place on earth. The disease usually enters a farm by carrier animals that excrete mycobacteria in their feces. The bacteria usually gain entrance into the host through the oral route and rarely through the upper respiratory tract. Sporadic incidences of sudden death, loss of weight and drop of egg production consist evidence of fowl mycobacteriosis in a farm. Clinical symptoms can also result from infection of the intestine, bones, lung or the skin. Tuberculous lesions located in the viscera and more significantly the bone marrow, when revealed during post-mortem examination, consist pathognomonic findings. The diagnostic investigation of mycobacterial infections in the laboratory usually relies on serology, the microscopic examination of fecal smears and culture that continues to consist the method of reference. These are nowadays implemented by specific Molecular Biology methods, the most broadly applied of which is the polymerase chain reaction (PCR). Cultivation of clinical material for the isolation of mycobacteria begins with the decontamination of the sample that aims to neutralize the bacteria that would over grow mycobacteria. The product is then inoculated onto selective media. Those that are commonly incorporated to the cultivation of MAC are Lowenstein-Jensen and Middlebrook 7H11. Incubation is performed in 5-10% carbon dioxide atmosphere for no less than 4-6 weeks. Identification of colonies relies on biochemical tests or PCR that can decrease substantially the time required for a definite result. Identification

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Εργ.
Ανατομίας & Φυσιολογίας Αγρ. Ζώων, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

Ημερομηνία υποβολής: 24.03.2006
Ημερομηνία εγκρίσεως: 07.08.2006

Agricultural University of Athens, Faculty of Animal Science, Department of Anatomy and Physiology, Iera odos 75, 118 55, Athens, Greece

Submission date: 24.03.2006
Approval date: 07.08.2006

την απομόνωση μυκοβακτηρίων ξεκινά με την απομόλυνση (decontamination) του δείγματος από άλλα συνυπάρχοντα βακτήρια, των οποίων η ανάπτυξη δεν θα επέτρεπε την ανάδειξη της παρουσίας των μυκοβακτηρίων. Στη συνέχεια ακολουθεί ενοφθαλμισμός σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα που για το MAC είναι συνήθως το Lowenstein-Jensen και το Middlebrook 7H11. Η επώαση γίνεται σε ατμόσφαιρα 5-10% διοξειδίου του άνθρακα για τουλάχιστον 4-6 εβδομάδες. Η ταυτοποίηση των αποικιών που αναπτύσσονται γίνεται με ειδικές βιοχημικές δοκιμές ή με την ΑΑΠ που μειώνει κατά πολύ το χρόνο που απαιτείται για την τελική γνωμάτευση. Οι γενωμικές περιοχές, που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του MAC με ΑΑΠ, είναι οι ακόλουθες: *16S rRNA*, *hsp65*, *IS1245* και η *IS901*. Ειδικά για το *M. genavense*, που είναι από γενετικής απόψεως πολύ συγγενές με το MA, εφαρμόζεται ΑΑΠ για την ενίσχυση μίας επιλεγμένης περιοχής του γονιδίου της πρωτεΐνης θερμικού shock 65kDa και στη συνέχεια η πέψη του προϊόντος ενίσχυσης με το ένζυμο περιορισμού *SaII*.

Λέξεις ευρετηρίασης: Μυκοβακτήρια, πτηνά, καλλιέργεια, Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σημασία των μυκοβακτηριακών λοιμώξεων για τα πτηνά των συστηματικών εκμεταλλεύσεων μπορεί σήμερα να είναι μειωμένη λόγω της ευρείας εφαρμογής σύγχρονων μεθόδων εκτροφής, αλλά η μελέτη τους συνεχίζει να είναι επίκαιρη αναφορικά με την προστασία της υγείας των ζώων, των πτηνών και του ανθρώπου. Τελευταίως, η ευρεία εφαρμογή τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας στη μελέτη των μυκοβακτηρίων και στην επιδημιολογική διερεύνηση των λοιμώξεων που προκαλούν έχει επιφέρει αλλαγές στη συστηματική κατάταξη των μυκοβακτηρίων.

ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

Τα κυριότερα παθογόνα είδη του γένους *Mycobacterium* συνιστούν κατά βάση δύο ομάδες: το *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBc), που περιλαμβάνει τα *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canetti*, και το *Mycobacterium avium* complex (MAC) (Carter και Wise 2004).

Οι μυκοβακτηριακές λοιμώξεις των πτηνών προκαλούνται κυρίως από το MAC, τα στελέχη του οποίου έχουν ταξινομηθεί σε 28 ορότυπους που ανά ομάδες συνιστούν είδη: οι ορότυποι 1 έως 6, 8 έως 11 και ο ορότυπος 21 συνιστούν το *M. avium* subsp. *avium* (MA), που αναφέρεται και ως *M. avium* (Thorel και συν. 1990), ενώ ειδικά οι ορότυποι 4 και 8 αναφέρονται και ως *M. avium* subsp. *hominisuis*, επειδή απομονώνονται από ανθρώπους και χοίρους (Mijls και συν. 2002). Οι ορότυποι 7, 12 έως 20 και 22 έως 28 συνιστούν το *Mycobacterium intracellulare* (Thorel και συν. 1990).

of MAC by PCR is usually performed by targeting the following genomic regions: *16S rRNA*, *hsp65*, *IS1245* and *IS901*. For *M. genavense*, that is genetically very closely related to MA, PCR is usually incorporated for the amplification of a region within the gene that codes 65kDa heat shock protein, preceded by the digestion of the amplification product with the restriction endonuclease, *SaII*.

Key words: *Mycobacterium* spp., birds, mycobacterial culture, Polymerase Chain Reaction

Στο MAC περιλαμβάνονται 2 ακόμα είδη, χαρακτηριστικό των οποίων είναι η εξάρτηση από τη μυκοβακτηρίνη (προϊόν μεταβολισμού μυκοβακτηρίων που έχει την ιδιότητα να δεσμεύει ιόντα σιδήρου) για την in-vitro ανάπτυξή τους. Αυτά τα είδη είναι το *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, που απομονώθηκε από παραγεγυματικά όργανα άγριων περιστερών (*Columba livia*) (McDiarmid 1948), και το *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Chiodini και συν. 1984), που προκαλεί την παραφυματίωση των μηρυκαστικών και εμπλέκεται πιθανώς στην αιτιοπαθογένεια της νόσου του Crohn του ανθρώπου (Cave και συν. 1973, Burnham και συν. 1978, Chamberlin και συν. 2001). Από τα μυκοβακτήρια που συνιστούν το MAC, εκείνα που προκαλούν γενικευμένη φυματίωση στις όρνιθες είναι μόνο οι ορότυποι 1 έως 3 του MA (Schaefer 1965, Marks και συν. 1969). Λοίμωξη από τους υπόλοιπους ορότυπους του MA και από το *M. intracellulare* προκαλεί κατά κανόνα μόνο εστιακές φυματιώδεις αλλοιώσεις (Tell και συν. 2001).

Επιδημιολογικές μελέτες, με τη χρήση μεθόδων μοριακής τυποποίησης, κατέδειξαν ότι τα στελέχη του MAC, που απομονώνονται από πτηνά, φέρουν στο γένωμά τους τις μεταθετές αλληλουχίες (IS) 901 και 1245 σε τριάδες, των οποίων η διάταξη είναι διακριτή από αυτές των στελεχών που απομονώνονται από τον άνθρωπο και αυτών που ανήκουν στο MAP (Klausen και συν. 1997).

Το 1993 αναγνωρίστηκε και ένα ακόμη είδος του γένους *Mycobacterium*, το *M. genavense*, που απομονώθηκε από ασθενείς με AIDS τελικού σταδίου στη Γενεύη της Ελβετίας. Το *M. genavense* διαπιστώθηκε στη συνέ-

χεια ότι ήταν παθογόνο και για τα πτηνά (Böttger και συν. 1993), αφού ταυτοποιήθηκε σε περιστατικά δερματικής και γενικευμένης φυματίωσης άγριων και ωδικών πτηνών (Hoop και συν. 1993, Hoop και συν. 1996).

ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

Περιστατικά μυκοβακτηριακών λοιμώξεων στα πτηνά έχουν καταγραφεί σε όλες της περιοχές της Γης με μεγαλύτερη συχνότητα στην Αφρική (Tadesse και συν. 2003α) και σε περιοχές της βόρειας εύκρατης ζώνης (Calnek και συν. 1997), όπως στην Ευρώπη (Kiehn και συν. 1996, Hoop και συν. 1996, Martin και Schimmel 2000, Gonzalez και συν. 2002, Hoop 2002) και στη Βόρεια Αμερική (Portaels και συν. 1996, Hoenerhoff και συν. 2004). Το ποσοστό προσβολής των πτηνών που εκτρέφονται συστηματικά κυμαίνεται αναλόγως της περιοχής από 1-26% (Calnek και συν. 1997, Tell και συν. 2001).

Τα μυκοβακτήρια, συμπεριλαμβανομένων και των παθογόνων για τα πτηνά, είναι σαπρόφυτα με ευρεία διάδοση στη φύση και παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στις συνθήκες του περιβάλλοντος και στη δράση χημικών απολυμαντικών ουσιών. Τα παθογόνα μυκοβακτήρια διατηρούν τη λοιμογόνο τους ικανότητα σε πτώματα υπό σήψη και σε υγρό έδαφος για 1-4 χρόνια και επιβιώνουν τουλάχιστον για 150 ημέρες σε αποξηραμένα κόπρανα βοοειδών. Εξουδετερώνονται από διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5% και από παράγωγα της φαινόλης (Carter και Wise 2004).

Η μυκοβακτηριακή μόλυνση σε ένα σμήνος πραγματοποιείται κυρίως με την εισαγωγή μολυσμένων πτηνών (Calnek και συν. 1997, Ashford και συν. 2001) ή και με τα άγρια πτηνά, τα οποία σε ποσοστό έως και 81% είναι φορείς μυκοβακτηρίων (Tell και συν. 2001).

Η αποβολή του MAC γίνεται με τα κόπρανα των μολυσμένων πτηνών, ενώ η μετάδοσή του στα υγιή γίνεται κυρίως από το στόμα, τουλάχιστον όσον αφορά στα στελέχη υψηλής λοιμογόνου δύναμης (Hoop και συν. 1993, Bercovier και Vincent 2001). Στο τελευταίο, που έχει αποδειχθεί και πειραματικά (Ashour 1972, Clark και Collins 1995, Tell και συν. 2001), συνηγορεί και η εντονότερη διήθηση του εντερικού βλεννογόνου σε σύγκριση με άλλα όργανα των προσβεβλημένων πτηνών, με οξείαντοχα βακτήρια του MAC (Clark et Collins 1995, Portaels και συν. 1996, Kiehn και συν. 1996, Tell και συν. 2001, Saif 2003). Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί και περιστατικά ορνίθων ωοπαγωγής με φυμάτια στους ρινοκώλους, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι δυνατή και η αερογενής προσβολή (Gonzalez και συν. 2002). Πάντως και το *M. genavense* φαίνεται ότι μεταδίδεται μέσω της στοματι-

κής οδού, αν και πειραματικά αυτό δεν έγινε δυνατό να διαπιστωθεί, κάτι που πιθανώς σχετίζεται με τη μικρή λοιμογόνο δύναμη των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν (Hoop και συν. 1993, Bercovier και Vincent 2001).

Εκτός από τα κόπρανα των μολυσμένων πτηνών, σημαντικό μέσο διασποράς των μυκοβακτηρίων στη φύση είναι οι παθητικοί φορείς, όπως οι κατσαριδές (*Blatta orientalis*) (Fischer και συν. 2003α), οι γαιοσκώληκες (*Oligochaeta, Lumbricidae*) (Fischer και συν. 2003β), τα δίπτερα (Fischer και συν. 2001) και τα κεντώδη παράσιτα (Tadesse και συν. 2003β).

Η κάθετη μετάδοση των μυκοβακτηρίων στα πτηνά είναι σπάνια (Calnek και συν. 1997), αν και έχει καταγραφεί απομόνωση MA από αυγά που προέρχονταν από πειραματικά μολυσμένες ωοπαραγωγές όρνιθες (Bojarski 1968, Long και συν. 2000).

Η ευπάθεια των πτηνών στο MA φαίνεται ότι σχετίζεται με το είδος τους. Πιο ευαίσθητα είναι τα μέλη του γένους Galliformes (όρνιθες, ορτύκια, φασιανοί, γαλοπούλες), Anseriformes (πάπιες, αγριόπαπιες, χήνες) (Kauppinen και συν. 2001), Columbiformes (Bougiouklis και συν. 2005) και Gruiformes (γερανοί) (Hejlícek και Tremml 1995, Tell και συν. 2001). Τα είδη που προσβάλλονται από το *M. genavense* είναι κυρίως τα Passeriformes (κόρακες, καρκαάξες κλπ.) και Psittaciformes (ψιττακοί) (Portaels και συν. 1996, Hoop 2002). Η καταπόνηση επηρεάζει αρνητικά την ανθεκτικότητα των πτηνών στις μυκοβακτηριακές λοιμώξεις, κάτι που έχει αποδειχθεί σε σχέση με το συνωστισμό, τη μη ισορροπη διατροφή (Squibb και συν. 1972), άλλες συνυπάρχουσες ασθένειες, τον αποραμφισμό, την αποκοπή των περσύγων και τις αντίξοες καιρικές συνθήκες (Calnek και συν. 1997, Tell και συν. 2001, Tadesse και συν. 2003α). Αντίθετα, το φύλο δεν φαίνεται να επιδρά στην ευπάθεια των πτηνών στις μυκοβακτηριακές λοιμώξεις, ενώ το γεγονός ότι τα ενήλικα πτηνά εκδηλώνουν συμπτώματα πιο συχνά από τα νεαρά αποδίδεται στη χρονιότητα της εξέλιξης της νόσου (Tell και συν. 2001, Tadesse και συν. 2003α).

Η τυπική μορφή της φυματίωσης των πτηνών σπάνια απασχολεί τη συστηματική πτηνοτροφία (Martin και Schimmel 2000, Tell και συν. 2001, Saif 2003, Carter και Wise 2004). Κρούσματα αναφέρονται σποραδικά και αφορούν συνήθως σε πτηνά ζωολογικών κήπων (Portaels και συν. 1996), σε ωδικά (Böttger και συν. 1993, Hoop και συν. 1996, Hoop 2002), άγρια πτηνά (Tell και συν. 2001, Hoenerhoff και συν. 2004) και πτηνά χωρικής πτηνοτροφίας (Tadesse και συν. 2003α).

Το MA και το *M. genavense* έχουν απομονωθεί και από βοοειδή, χοίρους (Komijn και συν. 1999, Dvorska και συν. 2004), θηλαστικά ζώα συντροφιάς (Kiehn και

συν. 1996, Hughes και συν. 1999, Lucas και συν. 2000), από ασθενείς με AIDS (Yakrus και Good 1990, Coyle και συν. 1992, Pechere και συν. 1995), αλλά και από υγιείς ανθρώπους (Dumonceau και συν. 1995). Τα στελέχη MAC που απομονώθηκαν από το περιβάλλον, από ζώα, από πτηνά και από ανθρώπους ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν λοίμωξη στα πτηνά (Bono και συν. 1995, Pavlik και συν. 2000). Όλα τα στελέχη ανθρώπινης προέλευσης αποδείχθηκαν απαθολόγια για τα πτηνά, ενώ διαπιστώθηκε ότι ήταν όμοια με στελέχη του χοίρου, αλλά και με περιβαλλοντικά σαπρόφυτα (Bono και συν. 1995, Komijn και συν. 1999). Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι μερικά από τα ανθρώπινα αυτά στελέχη του MA προέρχονταν από περιοχές όπου τα κρούσματα φυματίωσης των πτηνών ήταν ιδιαίτερα αυξημένα (Pavlik και συν. 2000).

Πάντως, η άμεση μετάδοση του MAC μεταξύ των ανθρώπων ή από τα πτηνά στον άνθρωπο και αντίστροφα είναι μάλλον απίθανη, αν και το ενδεχόμενο να δρουν τα πτηνά ως μηχανικοί φορείς και να διασπείρουν στο περιβάλλον και τους ορότυπους του MAC, που φαίνεται να είναι παθολόγοι μόνο στον άνθρωπο ή στα θηλαστικά, δεν μπορεί να αποκλειστεί (Tell και συν. 2001).

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

Η ποικιλομορφία της ανοσοποιητικής ανταπόκρισης των διαφόρων ειδών πτηνών στα μυκοβακτήρια, το γεγονός ότι αυτή εξαρτάται από το είδος ή ακόμη και από το στέλεχος που προκαλεί τη λοίμωξη, αλλά και η μικρή σχετικά σημασία τους για τη σύγχρονη συστηματική πτηνοτροφία, δεν έχει ενθαρρύνει τη μελέτη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που έχει η παθογένεια των μυκοβακτηριακών λοιμώξεων των πτηνών (Ehlers και Richter 2000, Cromie και συν. 2000).

Η είσοδος των μυκοβακτηρίων στον οργανισμό των πτηνών γίνεται από το στόμα και η πρώτη εντόπισή τους αφορά στο λεμφικό ιστό του εντέρου (Calnek και συν. 1997, Sangari και συν. 2001). Η προσβολή γίνεται συνήθως σε νεαρή ηλικία, όταν το ανοσοποιητικό τους σύστημα δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως και απαιτούνται αρκετοί μήνες ή και χρόνια προκειμένου να εκδηλωθούν κλινικά συμπτώματα (Feldman, 1938).

Η εξέλιξη της λοίμωξης από αυτό το στάδιο εξαρτάται από την ανοσοποιητική επάρκεια του ξενιστή και από την ικανότητά του να περιορίσει τη διασπορά των μυκοβακτηρίων στον οργανισμό του. Η ανοσία στις μυκοβακτηριακές λοιμώξεις βασίζεται στα πτηνά, όπως και στα θηλαστικά, στα μακροφάγα και σε ορισμένες κατηγορίες Τ-λεμφοκυττάρων, κυρίως των κυτταροτο-

ξικών Τ-λεμφοκυττάρων και των NK-λεμφοκυττάρων. Αυτά, σε συνδυασμό με τη δράση συγκεκριμένων κυτταροκινών [γ-ιντερφερόνη, ιντερλευκίνη-2, TNF, παράγοντας διέγερσης κοκκιοκυττάρων (GM-CSF)], μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις να περιορίσουν και να θανατώσουν τα μυκοβακτήρια που προκαλούν τη λοίμωξη (Koptopoulos 1993, Velasco-Velazquez και συν. 2003). Ειδικά στα πτηνά έχει διαπιστωθεί ότι σημαντική είναι η συμβολή και των γδ Τ-λεμφοκυττάρων που δραστηριοποιούνται έντονα παρουσία μυκοβακτηριακών αντιγόνων. Αυτή η αντίδραση φαίνεται να επηρεάζεται ή να βασίζεται στην παρουσία διαλυτών παραγόντων που εκκρίνονται από τα CD4+ και τα αβ Τ λεμφοκύτταρα (Arstila 1996). Στην πρώτη περίοδο μόλυνσης, κατά την οποία δεν έχει αναπτυχθεί ακόμα η ειδική ανοσοποιητική ανταπόκριση του ξενιστή, τα μυκοβακτήρια που βρίσκονται μέσα στα μακροφάγα μεταφέρονται μέσω της λεμφικής κυκλοφορίας από την πρωτοπαθή εστία στο αίμα (βακτηραιμία). Μετά από αυτό το στάδιο, τα μυκοβακτήρια μπορεί να εντοπιστούν σε διάφορα όργανα του σώματος (φάση πρώιμης γενίκευσης), όπου δημιουργούνται κοκκώδη κίτρινωπά ή γκριζόφαια φυμάτια μεγέθους κεχριού (κεχροειδής μορφή φυματίωσης) (Tsaggaris 1993). Τα κυριότερα όργανα εντόπισης των φυματίων είναι το ήπαρ, ο σπλήνας, το έντερο και ο μυελός των οστών, αλλά έχουν επίσης βρεθεί και στην ωοθήκη, στους όρχεις και στους νεφρούς (Calnek και συν. 1997).

Αν τα λοιμογόνα μυκοβακτήρια επικρατήσουν, εισέρχονται σε φάση ανεμπόδιστου πολλαπλασιασμού μέσα στα μακροφάγα και τότε αναπτύσσεται στη θέση εισόδου τους αντίδραση που χαρακτηρίζεται ως πρωτοπαθής εστία. Η πρωτοπαθής εστία ή πρωτογενές φυμάτιο, που είναι εξιδρωματικού τύπου (πλούσια σε πρωτεΐνες, οι οποίες προοδευτικά υφίστανται πήξη), απαντάται σχεδόν πάντα στο πεπτικό σύστημα των μολυσμένων πτηνών (Tsaggaris 1993). Ο όρος «πρωτοπαθές σύμπλεγμα», που στα θηλαστικά χαρακτηρίζει το σύνολο των αλλοιώσεων της πρωτοπαθούς εστίας και των προσβεβλημένων επιχώριων λεμφογαγγλίων, δεν είναι δόκιμος ειδικά για τα ορνιθοειδή, επειδή αυτά δεν διαθέτουν τυπικά λεμφογάγγλια όμοια με αυτά των θηλαστικών και των υδροβίων πτηνών (Hodges 1974).

Τις επόμενες ημέρες ή εβδομάδες, τα μυκοβακτήρια πολλαπλασιάζονται αρχικά μέσα στα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα οποία τελικά ρήγνυνται, και στη συνέχεια μέσα σε μη ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, τα οποία προοδευτικά ενεργοποιούνται. Στο στάδιο αυτό, δύο σειρές Τ-λεμφοκυττάρων, τα CD4 λεμφοκύτταρα μέσω της κυτταρικής ανοσίας και τα CD8 μέσω της επιβραδυνόμενου τύπου αντίδρασης υπερευαισθησίας, αρχίζουν να καταστρέφουν τα προσβεβλημένα μακροφά-

γα. Από αυτή τη διαδικασία απελευθερώνονται λυτικά ένζυμα που προκαλούν τοπική καταστροφή των ιστών. Ο τύπος της νέκρωσης που δημιουργείται χαρακτηρίζεται ως τυροειδοποίηση ή τυροειδής νέκρωση από τη μορφή της νεκρής μάζας που μοιάζει με ξερό λευκό τυρί (Tsaggaris 1993). Στο εσωτερικό των τυροειδοποιημένων αλλοιώσεων, τα μυκοβακτήρια παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση (λανθάνουσα περίοδος). Παρόμοιες είναι οι αλλοιώσεις που δημιουργούνται και στην περίπτωση που η λοίμωξη προκαλείται από το *Mycobacterium genavense*, οπότε και παρατηρείται συνάθροιση μακροφάγων, και ανάλογα με την ανοσοποιητική ανταπόκριση του ξενιστή, σχηματισμός κοκκιομάτων σε διάφορα όργανα (Lucas και συν. 2000). Η δημιουργία νεκρωτικών αλλοιώσεων στα πτηνά που προσβάλλονται από μυκοβακτήρια φαίνεται ότι σχετίζεται και με την έκθεση των πτηνών σε σαπροφυτικά μυκοβακτήρια, κάτι που οδηγεί στην έντονη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού τους συστήματος κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, με αποτέλεσμα την άμεση εξόντωση των κυττάρων που φέρουν στην επιφάνειά τους μυκοβακτηριακά αντιγόνα (Schaefer και συν. 1973).

Οι τυροειδοποιημένες εστίες, που δημιουργούνται κατά το στάδιο της πρώιμης γενίκευσης ή κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας περιόδου που συνήθως είναι μακροχρόνια, υδροποιούνται, με αποτέλεσμα την εξάπλωση των μυκοβακτηρίων σε όλον τον οργανισμό, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό νέων φυματίων. Συνήθως παρατηρείται ένα ευμέγεθες φυμάτιο στο κέντρο της προσβεβλημένης περιοχής και πολλά μικρότερα περιφερικά αυτού, λόγω των διαδοχικών επιμολύνσεων από τη ρήξη των αρχικών φυματίων (Gupta και Katoch 1997).

Ανεξαρτήτως της ιστολογικής εικόνας που θα επικρατήσει τελικά, οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται δεν είναι χαρακτηριστικές προσβολής από κάποιο συγκεκριμένο είδος μυκοβακτηρίου και επομένως η διάκριση μεταξύ τους απαιτεί μικροβιολογική διερεύνηση του κάθε περιστατικού (Hoop και συν. 1993).

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

Η φυματίωση των πτηνών σε μία εκτροφή εκδηλώνεται συνήθως με σποραδικά κρούσματα αιφνίδιων θανάτων (Cornil και Megnin 1884). Τα πτηνά μπορεί να εμφανίσουν μειωμένη ζωτικότητα και προοδευτική απώλεια βάρους, παρά το γεγονός ότι η όρεξή τους παραμένει αμετάβλητη. Με την πάροδο των ημερών παρατηρείται συρρίκνωση των καλλαίων, τα οποία γίνονται κυανωτικά ή και αναιμικά (Artopios 1992, Portaels και συν. 1996, Tell και συν. 2001, Tell και συν. 2003α). Η ωοπαράγωγή του σμήνους μειώνεται και παρατηρούνται σποραδικοί θάνατοι λόγω εσωτερικής αιμορ-

ραγίας από ρήξη του ηπατικού ή σπληνικού παρεγχύματος, εξαιτίας της ανάπτυξης φυματίων (Calnek και συν. 1997). Σε περίπτωση φυματιώδους εντερίτιδας εκδηλώνεται επίμονη διάρροια και έντονη απίσχνανση, ενώ όταν προσβάλλεται ο μυελός των οστών, κάτι που συνήθως συμβαίνει μόνο μετά από εκτεταμένη αιματογενή εξάπλωση της λοίμωξης (Hodges 1974), αναπτύσσεται φυματιώδης οστεομυελίτιδα και αρθρίτιδα, που εκδηλώνονται με χωλότητα. Σε αυτήν την περίπτωση οι αρθρώσεις μπορεί να είναι εξοιδημένες και θερμές. Η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί και με δερματική μορφή, που παρατηρείται πιο συχνά στα ψιττακοειδή και εκδηλώνεται κυρίως με υπερκεράτωση στις γωνίες του ράμφους. Οι νήσες και τα περιστέρια νοσούν, όταν συνεκτρέφονται με ορνιθοειδή και εκδηλώνονται παρόμοια συμπτώματα με αυτά.

Αιματολογικά, τα προσβεβλημένα πτηνά εμφανίζουν έντονη λευκοκυττάρωση με αριστερή μετατόπιση του λευκοκυτταρικού τύπου και αναιμία, που μπορεί να είναι και βαριάς μορφής (Artopios 1992, Portaels και συν. 1996, Calnek και συν. 1997, Tell και συν. 2001, Tell και συν. 2003α).

Νεκροτομικά, τα πτηνά παρουσιάζουν διόγκωση του ήπατος και της σπλήνας και πάχυνση του εντερικού τοιχώματος, που μπορεί και να μη συνοδεύεται από την παρουσία φυματίων (Hoop και συν. 1996). Σε περιστατικά έντονης προσβολής των πτηνών από το MA σχηματίζονται και φυμάτια που εντοπίζονται κυρίως στο ήπαρ, στον σπλήνα, στο έντερο και στον μυελό των οστών (Calnek και συν. 1997). Η παρουσία φυματίων στους πνεύμονες των ορνιθοειδών είναι πολύ σπάνια, σε αντίθεση με τα βοοειδή και τον άνθρωπο (Artopios 1992, Calnek και συν. 1997), ενώ δεν παρατηρείται ασβεστοποίηση των φυματίων (Hodges 1974, Calnek και συν. 1997). Σε περίπτωση προσβολής από το *Mycobacterium genavense*, που θεωρείται και πιο λοιμογόνο, οι αλλοιώσεις είναι ανάλογες (Hoop και συν. 1993, Bercovier και Vincent 2001), αλλά τα όργανα που προσβάλλονται πιο συχνά είναι με φθίνουσα σειρά το έντερο, οι πνεύμονες, το ήπαρ, ο σπλήνας και τα νεφρά (Portaels και συν. 1996).

Συμπερασματικά, η ορνιθίως φυματίωση δεν εκδηλώνεται με χαρακτηριστικά συμπτώματα και τα νεκροτομικά ευρήματα είναι σχεδόν παθολογικά μόνο εφόσον ανεβρεθούν φυμάτια σε παρεγχυματικά όργανα και ιδιαίτερα στο μυελό των οστών (Hodges 1974). Κατά συνέπεια απαιτείται διαφορική διάγνωση από άλλες νόσους και παθολογικές καταστάσεις που προκαλούν απίσχνανση των πτηνών και δημιουργία οξιδίων στα εσωτερικά τους όργανα, όπως η σαλμονέλλωση, οι λευκώσεις, η οξεία μορφή της νόσου του Marek, η κολλοκκιομάτωση, η ασπεργίλλωση κ.α. (Artopios 1992).

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟ- ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

Για την εργαστηριακή διαγνωστική διερεύνηση των μυκοβακτηριακών λοιμώξεων των πτηνών χρησιμοποιείται:

1. Η μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων κοπράνων.
2. Ορολογικές δοκιμές: α) η δοκιμή της σύνδεσης του συμπληρώματος (CFT-Complement Fixation Test), β) η ταχεία αιμοσυγκόλληση σε πλάκα, γ) η ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA-Radio Immuno Assay) και δ) η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).
3. Η απομόνωση των μυκοβακτηρίων και η ταυτοποίησή τους με βιοχημικές ή μοριακές τεχνικές, και
4. Η επεξεργασία παθολογικών υλικών με σκοπό την ανίχνευση σε αυτά, τεμαχίων μυκοβακτηριακού DNA, με τη χρήση κυρίως της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (ΑΑΠ- PCR-Polymerase Chain Reaction) ή DNA ανιχνευτών.
5. Η ανάλυση υλικών με σκοπό την ανάδειξη συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA που επιτρέπουν την τυποποίηση μυκοβακτηρίων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται γι' αυτόν το σκοπό είναι η τυποποίηση με ανάλυση πολυμορφισμού DNA με ένζυμα περιορισμού (RFLP typing), που εφαρμόζεται μόνο σε βακτήρια απομονωμένα σε καλλιέργεια, και η τυποποίηση βάσει αλληλένθετων (spacer) αλληλουχιών (spoligo-typing), που μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε παθολογικά υλικά, αλλά μόνο αναφορικά στο MTBc.

Η απομόνωση μυκοβακτηρίων αποτελεί και σήμερα τη μέθοδο αναφοράς, αν και η ΑΑΠ αναγνωρίζεται ως η τεχνική που μπορεί να εξασφαλίσει ταχύτητα, υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (OIE 2003, Tell και συν. 2003β, Tell και συν. 2003γ). Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια γίνεται ανάλυση της διαδικασίας μικροβιολογικής απομόνωσης μυκοβακτηρίων και της ΑΑΠ.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

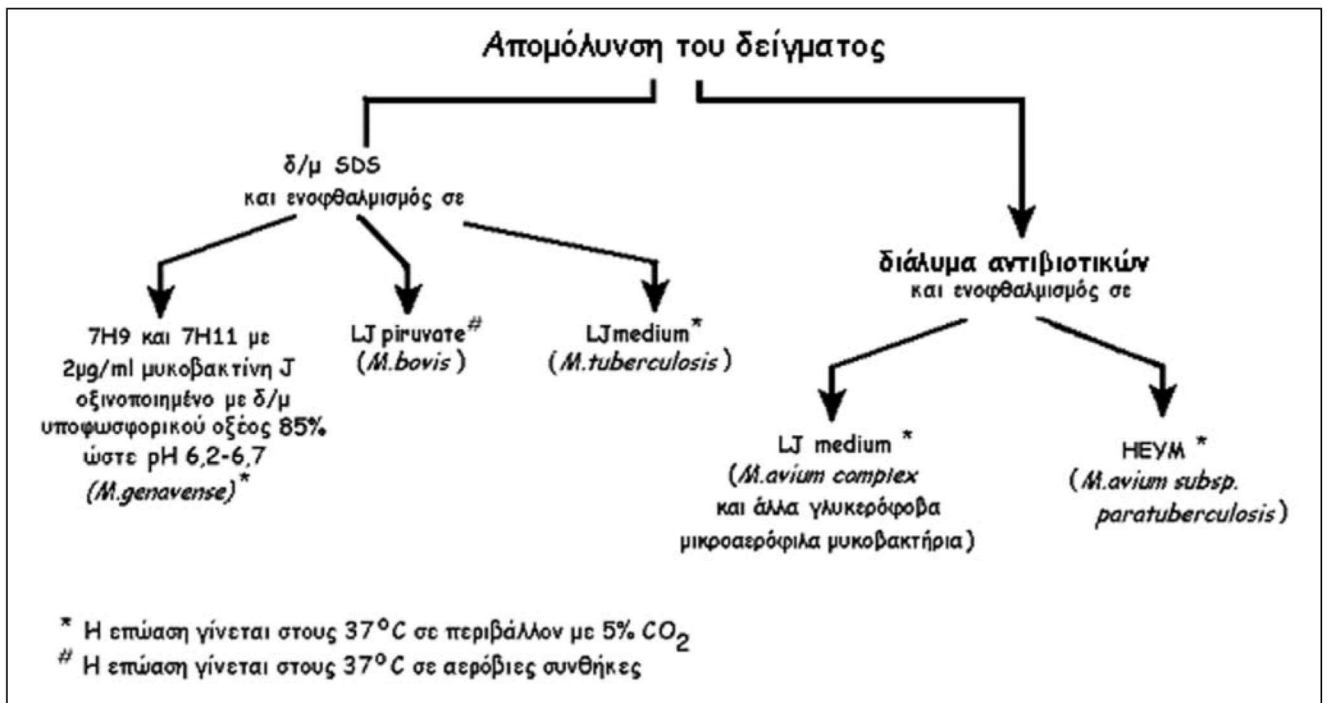
Η καλλιέργεια για την ανάδειξη της παρουσίας μυκοβακτηρίων σε ένα δείγμα είναι μία ιδιαίτερα χρονοβόρα και δυσχερής διαδικασία λόγω της απαιτητικής φύσης τους και της βραδείας ανάπτυξής τους (Cowan και Steel 1993).

Το πρώτο βήμα της απομόνωσης μυκοβακτηρίων σε θρεπτικά υλικά είναι η απομόλυνση (decontamination) του υλικού που θα καλλιεργηθεί (Reddacliff και συν. 2003, Manterola και συν. 2003). Αυτή αποσκοπεί στη θανάτωση άλλων βακτηρίων του δείγματος, των οποίων η ταχύτητα ανάπτυξης δεν θα επέτρεπε

την ανάδειξη της παρουσίας των μυκοβακτηρίων. Η διαδικασία απομόλυνσης είναι συχνά πηγή ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων, ιδίως στην περίπτωση που στο κλινικό δείγμα υπάρχουν μυκοβακτήρια μειωμένης ζωτικότητας ή μορφές μυκοβακτηρίων με ατελές κυτταρικό τοίχωμα (Brown και συν. 2003, Reddacliff και συν. 2003). Η μέθοδος που θα επιλεγεί για την απομόλυνση του δείγματος εξαρτάται από το είδος του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί, από το μικροβιακό φορτίο του δείγματος που θα καλλιεργηθεί, αλλά και από το είδος του μυκοβακτηρίου που θα επιδιώκεται να απομονωθεί. Λαμβάνοντας υπόψιν αυτές τις παραμέτρους, η απομόλυνση γίνεται συνήθως με ένα από τα διαλύματα που αναφέρονται παρακάτω, για χρονικό διάστημα που μπορεί να κυμαίνεται από 30 λεπτά έως και 24 ώρες: α) 3% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) και 1% NaOH (Carricajo και συν. 2001, Manterola και συν. 2003), β) 0,75% HPC (1-hexadecylpyridinium chloride) (Corner και Trajstman 1988), γ) μίγμα αντιβιοτικών που συνήθως αποτελείται από βανκομυκίνη, αμπικιλλίνη και νεομυκίνη (Reddacliff και συν. 2003).

Μετά την απομόλυνση του δείγματος ακολουθεί ο ενοφθαλμισμός του σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα (Cowan και Steel 1993, Quinn και συν. 2002). Ειδικά για το MAC χρησιμοποιείται συνήθως το Lowenstein-Jensen και το Middlebrook 7H11, που επωάζονται συνήθως σε ατμόσφαιρα 5-10% διοξειδίου του άνθρακα για τουλάχιστον 4-6 εβδομάδες (Tell και συν. 2003β) (Εικόνα 1).

Τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι αναφορές σε μελέτες που επικεντρώθηκαν στον καθορισμό των καλλιεργητικών απαιτήσεων του *M. genavense* (Coyle και συν. 1992, Kirschner και συν. 1994, Realini και συν. 1997, Thomsen και συν. 1999). Αν και σε αρκετές από αυτές τις μελέτες εκτιμούνται παράμετροι, όπως συνθήκες επώασης, εκλεκτικά υποστρώματα και προετοιμασία του δείγματος για σπορά, τα συμπεράσματα που εξαγονται δεν επαρκούν για να καταλήξει κανείς σε μια μέθοδο που να διασφαλίζει την ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου *in vitro*. Το γεγονός αυτό μπορεί φυσικά να αποδοθεί στις ιδιαίτερες καλλιεργητικές απαιτήσεις του *M. genavense*, που φαίνεται ότι εμφανίζει και εξαιρετικά περιορισμένη ικανότητα επιβίωσης στη συνήθη διαδικασία της απομόλυνσης (Thomsen και συν. 1999, Realini και συν. 1997), αλλά και στην απουσία μιας μελέτης που να αξιολογεί το σύνολο των παραμέτρων που θα τεκμηριώναν μια μεθοδολογία. Εξάλλου, τα αποτελέσματα των μελετών αυτών δεν φαίνεται να επαληθεύονται και από άλλα εργαστήρια, γεγονός που στοιχειοθετεί το γνωστικό έλλειμμα που υπάρχει έως σήμερα αναφορικά στην καλλιέργεια του *M. genavense*.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόλυνσης και των εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται συνήθως αναλόγως του είδους του μυκοβακτηρίου που επιχειρείται να απομονωθεί.

Figure 1. Schematic demonstration of selected decontamination protocols and inoculated specific media used for isolation, depending on suspected *Mycobacterium* spp.

Οι περισσότερες έρευνες συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι το *M. genavense* αναπτύσσεται καλύτερα σε μικροαερόφιλες συνθήκες (Realini και συν. 1998), γεγονός που εξηγεί πιθανώς το υψηλότερο ποσοστό επιτυχούς απομόνωσής του σε υγρά θρεπτικά υλικά (7H9 ή BACTEC). Η χρήση των τελευταίων, μετά από οξינוποίησή τους με υποφωσφορικό οξύ, βελτιώνει περαιτέρω την πιθανότητα ανάπτυξής του, κάτι που ισχύει και για την προσθήκη αίματος και ξυλάνθρακα στο υπόστρωμα (Realini και συν. 1999). Τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα φαίνεται ότι δεν υποστηρίζουν την ανάπτυξη του *M. genavense*, με μόνη ίσως εξαίρεση το 7H11 με μυκοβακτίνη J μετά από επώαση τουλάχιστον 8 εβδομάδων (Coyle και συν. 1992, Thomsen και συν. 1999).

Η ταυτοποίηση των αποικιών που αναπτύσσονται γίνεται με ειδικές βιοχημικές δοκιμές (Cowan και Steele 1993), των οποίων όμως η αξιολόγηση είναι δυσχερής για στελέχη ή είδη μυκοβακτηρίων που αναπτύσσονται με πολύ βραδύ ρυθμό (Thomsen και συν. 1999). Για το λόγο αυτόν, πολλά εργαστήρια καταφεύγουν σήμερα στη μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώνονται.

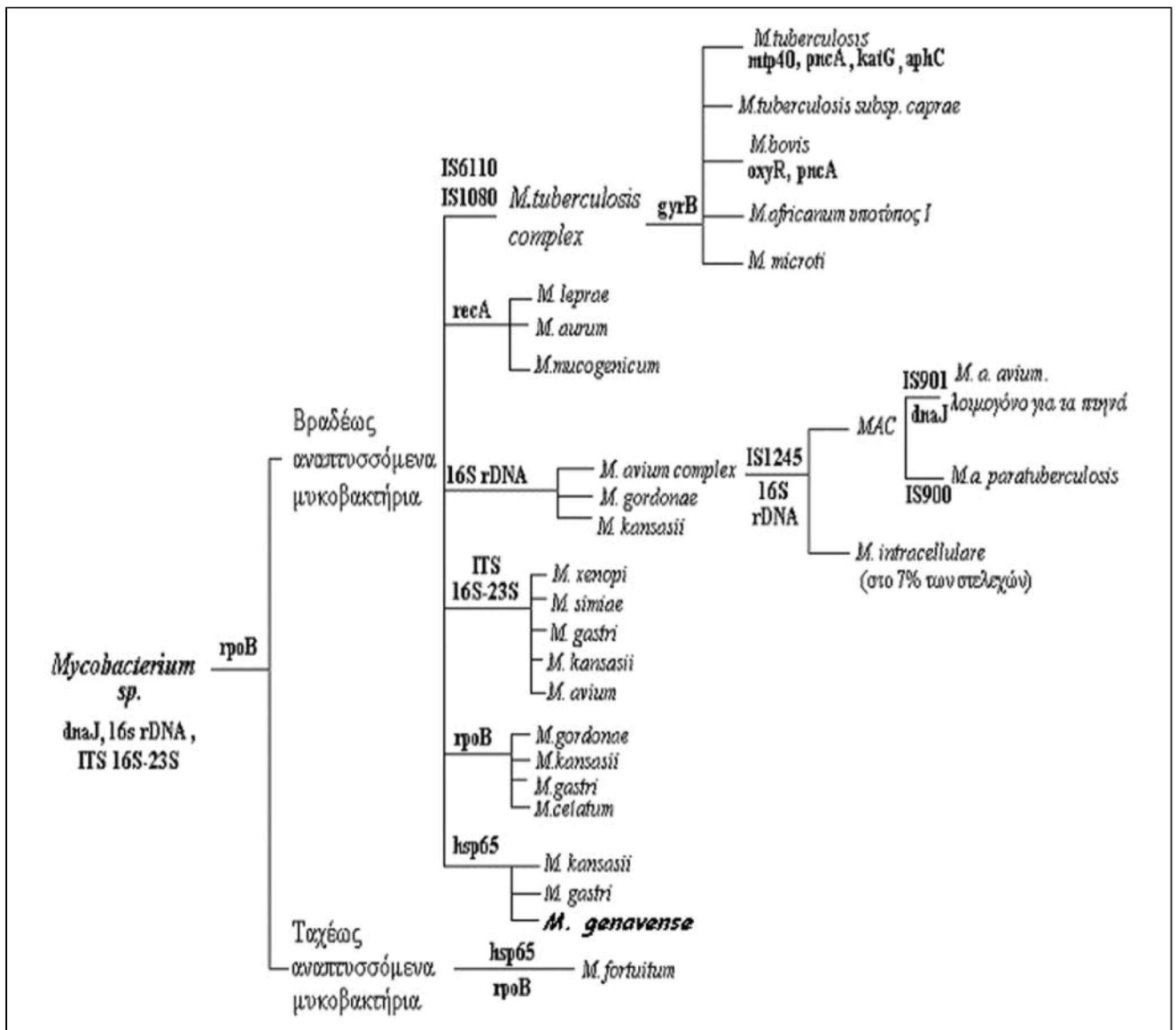
Το πρόβλημα της παρατεταμένης διάρκειας επώασης που απαιτείται για την απομόνωση των μυκοβακτηρίων σε καλλιέργεια επιλύεται τουλάχιστον εν μέρει με τη χρήση του ραδιομετρικού συστήματος BACTEC

(Becto Dickinson Microbiology Systems). Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υλικών, συνήθως του 7H12 ή 7H9, που εμπλουτίζονται με ραδιενεργώς σεσημασμένο παλμιτικό οξύ (Realini και συν. 1997, Carlson και συν. 1998). Η διαπίστωση της παρουσίας μυκοβακτηρίων, αλλά και του βαθμού της ανάπτυξής τους, γίνεται μέσω του προσδιορισμού του ραδιενεργού άνθρακα που απελευθερώνεται κατά τον μεταβολισμό του παλμιτικού οξέως. Ο απαιτούμενος χρόνος επώασης των θρεπτικών υλικών με τη μέθοδο BACTEC μειώνεται στις 2-4 εβδομάδες.

Τέλος, χρησιμοποιείται και η μη ραδιομετρική αυτοματοποιημένη τεχνική καλλιέργειας MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει το θρεπτικό υπόστρωμα Middlebrook 7H9 που έχει εμπλουτιστεί με φθορίζοντα δείκτη, ο οποίος ανιχνεύει την παρουσία οξυγόνου κατά την ανάπτυξη των μυκοβακτηρίων. Ο χρόνος επώασης που απαιτείται και σε αυτήν την περίπτωση είναι περίπου 2-4 εβδομάδες.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΑΠ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Mullis και Faloona 1987) είναι μια τεχνική για την *in vitro* ενζυμική σύνθεση επιλεγμένων αλληλουχιών γενετικού υλικού, με τη χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών



Εικόνα 2. Διαγνωστικός αλγόριθμος για τη μοριακή ταυτοποίηση των σημαντικότερων μυκοβακτηρίων (τροποποιημένος από Dvorska και συν. 2001).

Figure 2. Diagnostic algorithm for the molecular identification of major pathogenic mycobacteria (modified from Dvorska et al. 2001).

που οριοθετούν εκατέρωθεν την αλληλουχία αυτή. Περιλαμβάνει τρία στάδια: την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, τον υβριδισμό των εκκινητών σε αυτό και την επέκτασή τους με την καταλυτική δράση της DNA πολυμεράσης. Τα 3 αυτά στάδια συνιστούν έναν κύκλο ενίσχυσης της ΑΑΠ, η οποία επιτυγχάνει με αλληλάλληλες επαναλήψεις αυτού του κύκλου, τον εκθετικό πολλαπλασιασμό των αντιγράφων του επιλεγμένου τεμαχιδίου DNA.

Η ΑΑΠ επιτρέπει την ενίσχυση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που είναι ειδικές για τα μυκοβακτήρια, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η ανίχνευση, αλλά και η ταυτοποίησή τους απευθείας από

ένα δείγμα, ακόμη και όταν σε αυτό περιέχονται ελάχιστα αντίγραφα της περιοχής-στόχου (Mullis και Faloona 1987). Η ΑΑΠ χρησιμοποιείται ευρέως πλέον για την εξέταση δειγμάτων από κλινικά περιστατικά, καθώς έχουν γίνει κοινώς αποδεκτά τα συγκριτικά πλεονεκτήματα που προσφέρει έναντι των διαγνωστικών μεθόδων που ήταν διαθέσιμες έως σήμερα (Kirschner και συν. 1994, Mendenhall και συν. 2000, Tell και συν. 2003β, Tell και συν. 2003γ).

Στο γένομα των μυκοβακτηρίων υπάρχουν περιοχές που επιτρέπουν τη διάκρισή τους σε επίπεδο γένους και άλλες που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των ειδών μεταξύ τους. Στο δενδρογράμμα που ακολουθεί

Πίνακας 1. Εκκινητές που έχουν προταθεί και χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις ΑΑΠ για την ανίχνευση και διάκριση των κυριότερων παθογόνων μυκοβακτηρίων.

Table 1. Suggested PCR primers, which are used for the detection and identification of major pathogenic mycobacteria.

ΕΙΔΟΣ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ Mycobacterium species	ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΤΟΧΟΣ Target region	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ (5'→3') Primers sequence (5'→3')	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ (ζβ) Fragment size (bp)	ΒΙΒΛΙΟΓΡ. ΑΝΑΦΟΡΑ Reference	ΘΕΣΗ ΣΤΟ ΓΕΝΩΜΑ Genome position
<i>Mycobacterium spp.</i>	<i>16S rRNA</i>	F:-ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC- R:TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA-	543	Huard και συν. 2003	752-1295
<i>M. tuberculosis complex</i>	<i>IS6110</i>	F:-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC- R:-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-	245	Huard και συν. 2003	3158-3402
<i>M. avium complex</i>	<i>IS1245</i>	F:-AGGTGGCGTCGAGGAAGAC- R:-GCCGCCGAAACGATCTAC-	427	Guerrero και συν. 1995	16732-17159
<i>M. avium subsp. avium</i>	<i>IS901 (one tube-nested)</i>	NP1:-TTAACACGATGAGTCATGCG- NP2:-GCTTATCGATGTCCTTGATC-	509	Pavlik et al, 2000	489-998
		NP3:-GTACCCGCGCAAGACCTGG- NP4:-AAGTCCAGCAGCCGTGCTG-	376		593-969
<i>M. avium complex M. genavense</i>	<i>hsp65</i>	MKMTB 13A: - AGCGATGGACAAGGT- MPTB II : - CCTCGATGCGGTGCTTGC-	693	Mendenhall και συν. 2000	609-1310

απεικονίζεται ένας διαγνωστικός αλγόριθμος για τη μοριακή ταυτοποίηση των κυριότερων μυκοβακτηρίων, μέσω της ανίχνευσης ειδικά επιλεγμένων γενωμικών περιοχών (Εικόνα 2, Πίνακας 1). Από αυτές, εκείνες που χρησιμοποιούνται κυρίως στη διαδικασία ταυτοποίησης του MAC με ΑΑΠ είναι οι ακόλουθες: *16S rRNA*, *hsp65*, *IS1245* και η *IS901*.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το *16S rRNA* υπάρχει στο γένωμα κάθε βακτηρίου και αποτελεί τυπική περιοχή-στόχο για τη φυλογενετική μελέτη και την ταυτοποίησή τους. Το γονίδιο του ριβοσωμικού RNA (rRNA) είναι πολυνουκλεοτιδίο (~1500 ζβ) που βρίσκεται σε πολλά αντίγραφα στο βακτηριακό κύτταρο και αποτελεί βασικό συστατικό των βακτηριακών ριβοσωμάτων. Στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του rRNA του *Mycobacterium sp* υπάρχουν περιοχές των οποίων η σύσταση είναι παρόμοια για όλα τα είδη του γένους. Αυτές οι περιοχές, που χαρακτηρίζονται και συντηρητικές, χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των διαφόρων ειδών μυκοβακτηρίων, ενώ η διάκριση μεταξύ τους βασίζεται στη διερεύνηση της παρουσίας ποικιλόμορφων περιοχών εντός του γονιδίου, των οποίων η σύσταση διαφέρει ανά είδος ή και ανά στέλεχος (Böddinghaus και συν. 1990, Ananiss-Aghajani και συν. 1996, Dvorska και συν. 2001).

Το ίδιο ισχύει και για το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη θερμικού shock 65kDa (heat shock protein 65kDa- hsp65), η οποία παράγεται όταν το βακτήριο υποβληθεί σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης και αποτελεί σημαντικό συστατικό των αντιγόνων της

επιφάνειας πολλών μικροοργανισμών (Telenti και συν. 1993, Mendenhall και συν. 2000, Dvorska και συν. 2001, Tell και συν. 2003β, Tell και συν. 2003γ).

Οι ενδογενείς αλληλουχίες ένθεσης (insertion sequence-IS) συναντώνται στο γένωμα των οργανισμών και όταν μετατίθενται απενεργοποιούν επαναστρέψιμα το γονίδιο της περιοχής στην οποία εισβάλλουν (OIE 2004). Οι μεταθετές αλληλουχίες, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από 800-2.000 ζβ, μπορεί να μετέχουν στο φαινόμενο της μετατόπισης (transposition), κατά το οποίο μικρές, μετατοπιζόμενες αλληλουχίες DNA (μεταθετά στοιχεία, transposons) αντιγράφονται και εισάγονται σε διάφορες θέσεις μέσα στα χρωμοσώματα (Curtis 1999).

Η σημασία των μεταθετών στοιχείων στο γένωμα του ξενιστή δεν έχει εξακριβωθεί. Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι πρόκειται για αλληλουχίες που κωδικοποιούν πληροφορίες που βοηθούν αποκλειστικά στο φαινόμενο της μετατόπισής τους και που όταν ενσωματωθούν στο γενετικό υλικό του βακτηρίου, επιδρούν αρνητικά στη διατήρηση της ακεραιότητας του γενώματός του. Συνεπώς, όσο πιο πολλά αντίγραφα μεταθετών στοιχείων ενσωματώνονται στο DNA τόσο πιο καταστροφική επίδραση ασκούν στο βακτήριο-ξενιστή (Tanaka και συν. 2004). Ωστόσο, άλλοι εκτιμούν ότι το γένωμα είναι ένα καλά οργανωμένο σύστημα στο οποίο οι μεταθετές αλληλουχίες ασκούν ευεργετική δράση, γιατί πιθανώς το εμπλουτίζουν με γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες. Πάντως, υπάρχει και η άποψη ότι τα μεταθετά στοιχεία και οι

ένθετες αλληλουχίες, όπως και οι άλλοι παράγοντες μεταλλαγής, μπορεί να επιδρούν τόσο θετικά όσο και αρνητικά στο γένωμα του ξενιστή κατά το φαινόμενο της μετατόπισης (Chao και συν. 1983).

Η ένθετη αλληλουχία IS1245 κωδικοποιεί μία μεταθετάση (transposase), που εμφανίζει 64% ομολογία με την ένθετη αλληλουχία IS1081, που υπάρχει στο MTBc. Η περιοχή αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ως στόχος πολλών αντιδράσεων ΑΑΠ, που προτάθηκαν κατά καιρούς για την ανίχνευση του MAC (Guerrero και συν. 1995, Picardeau και Vincent 1996, van Soolingen και συν. 1998, Bauer και Andersen 1999, Komijn και συν. 1999, Dvorska και συν. 2002), εκτός από το *M. intracellulare* που κατά κανόνα δεν φέρει αυτήν την ένθετη αλληλουχία (Guerrero και συν. 1995). Ο αριθμός των αντιγράφων της IS1245 ποικίλλει ανά στέλεχος. Έτσι, έχουν βρεθεί στελέχη του MA που δεν φέρουν κανένα αντίγραφο της IS1245 και στελέχη του *M. intracellulare* που φέρουν κάποια αντίγραφα στο γένωμά τους (Beggs και συν. 2000). Τα στελέχη MA των οροτύπων 1 έως 3, που είναι λοιμογόνα για τα πτηνά, φέρουν μόνο 3 αντίγραφα της IS1245, γεγονός που μει-

ώνει την ευαισθησία της αντίστοιχης ΑΑΠ (Ritacco και συν. 1998). Το αντίθετο ακριβώς ισχύει για την ένθετη αλληλουχία IS901, επειδή υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα σε όλα τα στελέχη των οροτύπων 1, 2 και 3 του MA (Kunze και συν. 1992), γεγονός που αυξάνει την ευαισθησία της ΑΑΠ που στοχεύει στην ενίσχυση της (Bono και συν. 1995, Pavlik και συν. 2000, Dvorska και συν. 2003).

Η μεγάλη γενετική συγγένεια του MA με το *M. genavense* δεν επιτρέπει την ανίχνευση και ταυτοποίηση του τελευταίου με τη χρήση μόνο της ΑΑΠ. Για τον λόγο αυτό, η τακτική που εφαρμόζεται συνήθως συνίσταται στη χρήση ΑΑΠ για την ενίσχυση επιλεγμένης περιοχής του γονιδίου της πρωτεΐνης θερμοικού shock 65kDa (heat shock protein 65kDa- hsp65), που υπάρχει στο γένωμα τόσο του MA όσο και του *M. genavense*, και στη συνέχεια, στην πέψη του προϊόντος ενίσχυσης με το ένζυμο περιορισμού *SalI*. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη διάκριση του *M. genavense*, που παράγει δύο κλάσματα DNA από το MA που παράγει εντελώς διακριτή εικόνα (Mendenhall και συν. 2000). □

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Ananiss-Aghajani E, Jones K, Holtzman A, Aronson T, Glover N, Boian S, Brunk C (1996) Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 34:98-102.
- Artopoulos B (1992) Poultry Pathology. Aristotle University of Thessaloniki, 329-334.
- Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosini O (2001) Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev sci tech Off Int Epiz*, 20:325-337.
- Ashour N (1972) Contribution to the experimental infection of young chickens with *Mycobacterium avium*. *Acta Vet Brno*, 41:421-427.
- Arstila TP (1996) T cells subsets and the activation of $\gamma\delta$ T cells. In: Vainio O, Imhof BA, editors. Immunology and development biology of the chicken. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 71-78.
- Bauer J, Andersen AB (1999) Stability of Insertion Sequence IS1245, a marker for differentiation of *Mycobacterium avium* strains. *J Clin Microbiol*, 37:442-444.
- Beggs ML, Stevanova R, Eisenach KD (2000) Species identification of *Mycobacterium avium* complex isolates by a variety of molecular techniques. *J Clin Microbiol*, 38:508-512.
- 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. simiae* and *M. genavense*. *Rev Sci Tech Off int Epiz*, 20:265-290.
- Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC (1990) Detection and identification of Mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol*, 28:1751-1759.
- Bojarski J (1968) Occurrence of *Mycobacterium* in eggs of tuberculin-positive hens. *Med Weter*, 24:21-23.
- Bono M, Jemmi T, Bernasconi C, Burki D, Telenti A, Bodmer T (1995) Genotyping of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *J Clin Microbiol*, 61:371-373.
- Böttger EC, Hirschell B, Coyle MB (1993) *Mycobacterium genavense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 43:841-843.
- Bougiouklis P, Brellou G, Fragkiadaki E, Iordanidis P, Vlemmas I, Georgopoulou I (2005) Outbreak of avian mycobacteriosis in a flock of two-year-old domestic pigeons (*Columba livia* f. domestica). *Avian Diseases*, 49:442-445.
- Brown ST, Brett I, Almenoff PL, Lesser M, Terrin M, Teirstein AS (2003) Recovery of cell wall-deficient organisms from blood does not distinguish between patients with sarcoidosis and control patients. *Chest*, 132:413-417.
- Burnham WR, Lennard-Jones JE, Stanford JL, Bird RG (1978) Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease. *The Lancet*, 2:693-696.
- Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM (1997) Diseases of Poultry, 10th edition. Mosby-Wolfe, 167-178.
- Carlson LDC, Wallis CK, Coyle MB (1998) Standardized BACTEC method to measure clarithromycin susceptibility of *Mycobacterium genavense*. *J Clin Microbiol*, 36:748-751.
- Carricajo A, Fonsale N, Vautrin AC, Aubert G (2001) Evaluation of BacT/Alert 3D liquid culture system for recovery of mycobacteria from clinical specimens using Sodium Dodecyl (Lauryl) Sulfate-NaOH decontamination. *J Clin Microbiol*, 39:3799-3800.
- Carter GR, Wise DJ (2004) Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology- 6th edition, Iowa State Press, 207-213.
- Cave DR, Mitchell DN, Kane SP, Brooke BN (1973) Further animal evidence of a transmissible agent in Crohn's disease. *Lancet*, 17:1120-1122.
- Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz N, Shafran I, El-Zaatari FA (2001) *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 15:337- 346.

- Chao L, Vargas C, Spear BB, Cox EC (1983) Transposable elements as mutator genes in evolution. Nature, 303:633-635.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS (1984) Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. Cornell Vet, 74:218-262.
- Clark SL, Collins MT (1995) A single dose oral challenge model of disseminated *Mycobacterium avium* infection. Abstract of General Meeting of the American Society for Microbiology, 95:139.
- Corner LA, Trajstman AC (1988) An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. Vet Microbiol, 18:127-134.
- Cornil V, Megnin P (1884) Tuberculose et diphterie des gallinaces. CR Soc Biol, 36:617-621.
- Cowan and Steel's (1993) Manual for the identification of Medical Bacteria, 3rd edition, Cambridge University Press.
- Coyle MB, Carlson LDC, Wallis CK, Leonard RB, Raisys VA, Kilburn JO, Samadpour M, Böttger EC (1992) Laboratory aspects of "*Mycobacterium genavense*", a proposed species isolated from AIDS patients. J Clin Microbiol, 30: 3206-3212.
- Cromie RL, Ash NJ, Brown MJ, Stanford JL (2000) Avian immune response to *Mycobacterium avium*: the wildfowl example. Develop Comp Immunol, 24:169-185.
- Curtis A (1999) The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd edition. <http://www.virodict.uk>
- Dumonceau JM, Fonteyne PA, Realini L, Van Gossum A, Van Vooren JP, Portaels F (1995) Species- specific *Mycobacterium genavense* DNA in intestinal tissues of individuals not infected with Human Immunodeficiency Virus. J Clin Microbiol., 33: 2514-2515.
- Dvorska L, Bartos M, Martin G, Erler W, Pavlik I (2001) Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods. Vet Med Czech, 46:309-328.
- Dvorska L, Bull TJ, Bartos M, Matlova L, Svastova P, Weston RT, Kintr J, Parmova I, van Soolingen D, Pavlik I (2003) A standardised restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. J Microbiol Methods, 55:11-27.
- Dvorska L, Matlova L, Bartos M, Parmova I, Bartl J, Svastova P, Bull TJ, 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.
- Ehlers S, Richter E (2000) Gamma interferon is essential for clearing *Mycobacterium genavense* infection. Infection and Immunity, 68:3720-3723.
- Feldman WH (1938) Avian tuberculosis infections. Williams & Williams, Baltimore, MD.
- Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Bartl J, Melicharek I, Weston RT, Pavlik I (2001) Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. Med Vet Entomol, 15:208-211.
- Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Pavlik I (2003α) Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. Med Vet Entomol, 17:145-150.
- Fischer OA, Matlova L, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du Maine R, Melicharek I, Bartos M, Pavlik I (2003β) Earthworms (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) and mycobacteria. Vet Microbiol, 91:325-338.
- Gonzalez M, Rodriguez-Bettos A, Gimeno I, Flores JM, Pizarro M (2002) Outbreak of avian tuberculosis in 48-week-old commercial layer hen flock.. Avian Diseases, 46:1055-1061.
- 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.
- Gupta UD, Katoch VM (1997) Understanding the phenomenon of persistence in mycobacterial infections. Indian J Lepr, 69:385-393.
- Hejlíček K, Tremf F (1995) Comparison of pathogenesis and epizootology signification of avian mycobacteriosis in different sorts of domestic and free-living syanthropic fowl. Vet Med Czech, 40:187-194.
- Hodges RD (1974) The histology of the fowl. Academic Press, 181-183.
- Hoenerhoff M, Kiupel M, Sikarskie J, Bolin C, Simmons H, Fitzgerald S (2004) Mycobacteriosis in an American Bald Eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). Avian Diseases, 48: 437- 441.
- Hoop RK (2002) *Mycobacterium tuberculosis* infection in a canary (*Serinus canaria* L.) and a blue-fronted Amazon Parrot (*Amazona amazona aestiva*). Avian Diseases, 46:502-504.
- Hoop RK, Bottger EC, Pfyffer GE (1996) Etiological Agents of Mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995. J Clin Microbiol, 34:991-992.
- Hoop RK, Böttger EC, Ossent P, Salfinger M (1993) Mycobacteriosis due to *Mycobacterium genavense* in six pet birds. J Clin Microbiol, 31:990-993.
- Huard RC, Lazzarini LCO, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL (2003) PCR-based method to differentiate the subspecies of *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. J Clin Microb 41:1637-1650.
- Hughes MS, Ball NW, Love DN and al. (1999) Disseminated *Mycobacterium genavense* infection in an FIV-positive cat. J Fel Med Surgery, 1:23-29.
- Kauppinen J, Hintikka E, Iivanainen E, Katila M (2001) PCR-based typing of *Mycobacterium avium* isolates in an epidemic among farmed lesser white-fronted geese (*Anser erythropus*). Vet Microbiol, 81:41-50.
- Kiehn TE, Hoefler H, Bottger EC, Ross R, Wong M, Edwards F, Antinoff N, Armstrong D (1996) *Mycobacterium genavense* infections in pet animals.. J Clin Microbiol, 34:1840-1842.
- Kirschner PUV, Hein R, Bottger EC (1994) Bias of culture techniques for diagnosing mixed *Mycobacterium genavense* and *Mycobacterium avium* infection in AIDS. J Clin Microbiol, 32:828-831.
- Klausen J, Giese SB, Fursted K, Ahrens P (1997) Distribution of serotypes, IS901 and a 40 kDa protein in *Mycobacterium avium* complex strains isolated from man and animals in Denmark. APMIS, 105:277-282.
- Komijn RE, de Haas PEW, Schneider MME, Eger T, Nieuwenhuijs JHM, van den Hoek RJ, Bakker D, van Zijd Erveld FG, van Soolingen D (1999). Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in the Netherlands and comparison of IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism patterns of porcine and human isolates. J Clin Microbiol, 37:1254-1259.
- Koptopoulos G. (1993) Fundamentals of Veterinary Immunology. Kyriakidis editions, Thessaloniki, 57, 148, 62.
- Kunze ZM, Portaels F, McFadden JJ (1992) Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of Insertion Sequence IS901. J Clin Microbiol, 30:2366-2372.
- Long EG, Ewing EPJr, Barlett JH, Horsburgh CRJr, Birkness KA, Yakrus MA, Newman GW, Quinn FD (2000) Changes in the

- virulence of *Mycobacterium avium* after passage through embryonated hen's eggs. FEMS Microbiol Letters, 190:267-272.
- Lucas J, Lucas A, Furber H, James G, Hughes Ms, Martin P, Chen S, Mitchell D, Love D, Malik R (2000) *Mycobacterium genavense* infection in two aged ferrets with conjunctival lesions. Austr Vet J, 78:685-689.
- Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Corea I, Martinez E, Ausina V (2003) Comparison of the Sodium Dodecyl Sulfate-Sodium Hydroxide specimen processing method with the C18-Carboxypropylbetaine specimen processing method using the MB/BacT liquid culture system. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 22:35-42.
- Marks J, Jenkins PA, Schaefer WB (1969) Infection and incidence of a third type of *Mycobacterium avium*. Tubercle, 50:394.
- Martin G, Schimmel D (2000) *Mycobacterium avium* infections in poultry-a risk for human health or not? Dtsch Tierarztl Wochenschr, 107:53-58.
- McAdam RA, Hermans PW, van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty D, van Embden JD, Dale JW (1990) Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. Mol. Microbiol, 4:1607-1613.
- McDiarmid A (1948) The occurrence of tuberculosis in the wild wood-pigeon. J Comp Path Ther, 58:128-133.
- Mendenhall M.K., Ford S.L., Emerson C.L., Wells R.A., Gines L.G., Eriks I.S. (2000) Detection and differentiation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium genavense* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion analysis J Vet Diagn Invest, 12:57-60.
- Mijs W, De Haas P, Rossau R, Van Der Laan T, Rigouts L, Portaels F, van Soolingen D (2002) Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. Int J Syst Evol Microbiol, 52:1505-1518.
- Mullis KB, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth Enzymol, 155:335-350.
- OIE (2003) Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Office International des Epizooties.
- OIE (2004). Treatment of mycobacterial infections. http://www.oie.int/eng/rt/2001/a_r20103.htm
- Pavlik I, Svatova P, Bartl J, Dvorska L, Rychlik I (2000) Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex stains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. Clin Diagn Lab Immunol, 7:212-217.
- Pechere M, Opravil M, Wald A, Chave JP, Bessesen M, Sievers A, Hein R, von Overbeck J, Clark RA, Tortoli E and al. (1995) Clinical and epidemiologic features of infection with *Mycobacterium genavense*. Swiss HIV Cohort Study. Archives of Internal Medicine, 155(4).
- Picardeau M, Vincent V (1996) Typing of *Mycobacterium avium* isolates by PCR. J Clin Microbiol, 34:389-392.
- Portaels F, Realini L, Bauwens L, Hirschell B, Meyers WM, De Meurichy W (1996) *Mycobacteriosis* caused by *Mycobacterium genavense* in birds kept in a zoo: 11-year survey. J Clin Microbiol, 34:319-323.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC (2002) Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell Publishing, 97-105.
- Realini L, De Ridder K, Palomino JC, Hirschel B, Portaels F (1998) Microaerophilic conditions promote growth of *Mycobacterium genavense*. J Clin Microbiol, 36:2565-2570.
- Realini L, Van Der Stuyft P, De Ridder K, Hirschell B, Portaels F (1997) Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of *Mycobacterium genavense* in BACTEC primary cultures. J Clin Microbiol, 35:2791-2794.
- Realini L, De Ridder K, Hirschel B, Portaels F (1999) Blood and Charcoal added to acidified agar media promote the growth of *Mycobacterium genavense*. Diagn Microbiol Infect Dis, 34:45-50.
- Reddacliff LA, Vadali A, Whittington RJ (2003) The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. Vet Microbiol, 95:271-282.
- Ritacco V, Kremer K, van der Laan T, Pijenburg JE, de Haas PEW, van Soolingen D (1998) Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. Int J Tuberc Lung Dis, 33:1389-1391.
- Saif YM (2003) Diseases of poultry- 11th edition. Iowa State Press, 836-844.
- Sangari FJ, Goodman J, Petrofsky M, Kolonoski P, Bermudez LE (2001) *Mycobacterium avium* invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes. Infection and Immunity, 69:1515-1520.
- Schaefer WB (1965) Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Am Rev Respir Dis, 92:S85-S93.
- Schaefer WB, Beer JV, Wood NA, Boughton E, Jenkins PA, Marks JA (1973) A bacteriological study of endemic tuberculosis in birds. J Hyg, 71:549-558.
- Squibb RL, Solotorovsky M, Beisel WR (1972) Quantitation of the Bioenergetics of a tuberculosis infection in chicks. Appl Microbiol, 24:924-928.
- Tadesse S, Woldemeskel M, Molla B, Tibbo M, Kidane D, Medhim G, Britton S (2003α) Avian *Mycobacteriosis* in domestic chickens from selected agro-climatic regions in Ethiopia. J Applied Res in Vet Med, 62:254-260.
- Tadesse S, Woldemeskel M, Medhia G, Tibbo M, Molla B, Abate G, Britton S (2003β) T-cell responses to *Mycobacterium avium* PPD antigens in gastro-intestinal helminth co-infected chickens in Central Ethiopia. J Immunoassay Immunochem, 24:57-72.
- Tanaka MM, Rosenberg NA, Small PM (2004) The control of copy number of IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Biology and Evolution, 21:2195-2201.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, 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.
- Tell LA, Woods L, Cromie RL (2001) *Mycobacteriosis* in birds. Rev Sci Tech Off int Epiz, 20:180-203.
- Tell LA, Woods L, Foley J, Needham ML, Walker RL (2003α) A model of avian *mycobacteriosis*: clinical and histopathologic findings in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) intravenously inoculated with *Mycobacterium avium*. Avian Diseases, 47: 433-443.
- Tell LA, Foley J, Needham L, Walker RL (2003β) 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, 47:444-452.
- Tell LA, Leutenegger CM, Larsen RS, Agnew DW, Keener L, Needha ML, Rideout BA (2003γ) Real-time polymerase chain reaction testing for the detection *Mycobacterium genavense* and

- Mycobacterium avium complex species in avian samples. *Avian Diseases*, 47:1406-1415.
- Thomsen VØ, Dragsted UB, Bauer J, Fuursted K, Lundgren J (1999) Disseminated infection with *Mycobacterium genavense*: a challenge to physicians and mycobacteriologists. *J Clin Microbiol*, 37:3901-3905.
- Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV (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.. *Int J Syst Bacteriol*, 40:254–260.
- Tsaggaris Th. (1993) *General Pathology*. Kyriakidis Editions, Thessaloniki, 374-379.
- van Soolingen D, Bauer J, Ritacco V, Leao SC, Pavlik I, Vincent V, Rastogi N, Gori A, Bodmer T, Garzelli C, Garcia MJ (1998) IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J Clin Microbiol*, 36:3051-3054.
- van Soolingen D (2001) Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Internal Medicine*, 249:1-26.
- Velasco-Velazquez MA, Barrera D, Gonzalez- Arenas A, Rosales C, Agramonte-Hevia J (2003) Macrophage- *Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microbial Pathogenesis*, 35:125-131.
- Yakrus MA, Good RC (1990) Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol*, 28:926-929.