

MITTETUBERKULOOSSETE MÜKOBAKTERITE (NTM) POOLT PÕHJUSTATUD INFEKTSIOONIDE EPIDEMIOLOOGIAST KODU- JA METSLOOMADEL EESTIS

M. Sudakov, J. Kumar, S. Kokassaar, L. Häkkinen

ABSTRACT. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) infections of domestic- and wild animals in Estonia. Epidemiological investigation of nontuberculous mycobacteria (NTM) infections in swine and cattle showed remarkably high prevalence of this infection in Estonia, the most important role possesses *Mycobacterium avium* complex (MAC). Selective examinations made in slaughterhouses – during period of 1996–2002 – detected tuberculosis-like lesions of lymph nodes in 3,8% of examined swine and in 2,4% of cattle.

67 cultures of mycobacteria were isolated. As a result of PCR-identification 52 (77.6%) strains are referred to *M. avium* and two to *M. intracellulare*. Exotic zoo animals and species of wild animals, susceptible to NTM, are the ecological reservoir of given infection and can play an important role in selection of virulent types of opportunistic mycobacteria.

We have determined sporadic cases of avian tuberculosis in chickens and avian mycobacteriosis in wild boar and badger. Special interest offer cases of mycobacterioses, diagnosed in various animal species in Tallinn Zoo, including two Bukhara deer's, giving a precedent of isolation of *M. avium* in pathological material from wild animals (mammals) in Estonia. A causative agent of avian tuberculosis was isolated from a peacock, pheasant and Japanese crane. Other atypical mycobacteria were isolated from yak and from reptiles – boa and anaconda.

Keywords: epidemiology of mycobacterioses, NTM-infection, tuberculosis in animals, *Mycobacterium avium* complex, PCR-diagnostics.

Sissejuhatus

Tuberkuloos ja mittetuberkuloosse etioloogiaga mükobakterioosid kuuluvad zoonootiliste infektsioonide hulka, kusjuures aids ja tuberkuloos jagavad nakkushaiguste poolt põhjustatud surmajuhtumite poolest esimest ja teist kohta. Eestis on inimeste haigestumus tuberkuloosi viimase aastakümne jooksul rohkem kui kahekordistunud (>50 juhtu 100 000 elaniku kohta) ja ravimresistentse tuberkuloosi sageduselt tõusis Eesti maailmas esimesele kohale (Krüüner, 2001). Järjest kasvab mittetuberkuloosete e NTM-infektsioonide (NTM – *nontuberculous mycobacteria*, *syn. atypical mycobacteria*) osatähtsus, olles laialdasemalt levinud lastel ja eriti immuunsushäiretega inimestel (aids). 2002. aastal jõudis HIVga nakatunud inimeste arv maailmas 42 miljonini ja hukkunute arv 3,1 miljonini (AIDS Epidemic Update, 2002). HIVga kaasnev raku poolt vahendatud immuunsuse supressioon soodustab paljude oportunistlike infektsioonide, sh NTMi progresseerumist. Olemasolevate andmete kohaselt põeb mükobakterioosi 60–70% HIVi nakatunud inimestest ning 40%l aidsihaigetest on mükobakterioos surma põhjuseks. HIVga nakatumine muudab järsult mükobakteriooside epidemioloogiat ja seoses aidsiepidemiaga nimetatakse mükobakterioosi *emerging disease*, progresseeruva levikuga haiguseks (Casal, 2000).

Samuti on paljudes veiste klassikalisest tuberkuloosist vabades riikides NTM-infektsioon loomadel oluliseks probleemiks. Atüüpilised mükobakterid (eeskätt *M. avium-intracellulare complex* – MAC) põhjustavad veistel ja eriti sigadel tuberkuloosilaadseid muutusi lümfisõlmedes, mis alandab toodetava liha kvaliteeti, ning mükobakterioosiga kaasneva tuberkuliinireaktsiooni tõttu raskendab tuberkuloosi diferentsiaaldiagnostikat (Komijn *et al.*, 1999; Duerrling *et al.*, 1998). Peale selle võivad kontamineeritud loomsed toiduained osutada inimeste nakatumise allikaks (Ramasoota *et al.*, 2001).

Tuberkuloosi ja NTM poolt esile kutsutud mükobakteriooside leviku piiramine põhineb nende infektsioonide efektiivsete kontrollmeetodite väljatöötamisel.

Tähtsaks sammuks mükobakteriooside efektiivse kontrolli alal on kiirete molekulaarsete identifitseerimis- meetodite kasutamine (PCR, DNA-sond) diagnostikas ja epidemioloogilistes uuringutes.

Eestis likvideeriti tuberkuloos veistel 1977. ja sigadel 1970. aastal. Järgmisel perioodil registreeriti üksikuid tuberkuloosi juhtumeid veistel 1980. ja 1986. a. atüüpiliste mükobakterite (e NTM) poolt esile kutsutud mükobakterioosid muutusid aktuaalseks nii veistel kui ka sigadel alates 60ndatest aastatest (Martma, Tähnas, 1986).

Võtmesõnad: mükobakteriooside epidemioloogia, NTM-infektsioon, tuberkuloos loomadel, PCR-diagnostika, *Mycobacterium avium* kompleks.

Materjal ja uurimismeetodid

Uuringud viidi läbi Eesti Põllumajandusülikooli Agrobiokeskuse mükobakteriooside laboris ja vivaariumis. Uuringutes kasutati kulturaalseid, patomorfoloogilisi ja molekulaarmeetodeid (polümeraasne ahelreaktsioon ja DNA-sond), niatsiinitesti; biotesti katseloomadel ning intradermaalset tuberkuliinitesti (IDTT).

Bakterioloogiliselt testiti kodu- ja metsloomade ning lindude kliinilisi proove. Peamiseks uurimisobjektiks olid tuberkuliin-positiivsed ja NTM-infektsiooni kahtlusega loomad (tuberkuloosilaadsed muutused lümfisõlmedes või teistes organites). Bakterioloogiliselt uuriti ka mükobakteriaalse infektsiooni leviku võimalusi loomakasvatussaaduste kaudu (piim, kanamunad). Isolaatide samastamiseks kasutati kulturaalseid ja molekulaarseid meetodeid, niatsiini- ja biotesti.

Uuringud teostati 67 Eesti päritolu atüüpiliste mükobakterite kultuuriga, mis isoleeriti spontaanselt nakatunud loomadelt (siga, lehm, kana, hirv jt), aga samuti lehmapiimast ja kanamunadest. Uuriti Eestis tsirkuleerivate NTM e atüüpiliste mükobakterite taksonoomilist kuuluvust, bioloogilisi ja immunomoduleerivaid omadusi.

PCR- (*Polymerase chain reaction*) meetodit kasutati tuberkuloositekitajate *M. tuberculosis*'e, *M. bovis*'e, *M. avium*'i ja *M. intracellulare* määramiseks. Löwenstein-Jensen'i söötmelt kogutud rakumaterjal suspendeeriti TE-puhvriga (pH 8,0) eppendorf-tuubis ja dekontamineeriti. DNA eraldamiseks rakukultuurist kasutati van Soolingeni meetodit (Van Soolingen *et al.*, 1994). Rakukestade purustamiseks kasutati lüsoosüümilahust, lisaks CTABi ja proteinaas K tööstlust, DNA ekstraheeriti fenool-kloroformiga ja sadestati isopropanooliga. DNA lahustati 20 µl-s TE-puhvril. PCR teostati *Techne Progene Thermal Cycler*'iga.

M. avium'i detekteerimiseks kasutati praimeritena P1 (5'-GCC GCC GAA ACG ATC TAC) ja P2 (5'-AGG TGG CGT CGA GGA AGA C), mille tulemusena amplifitseeritakse positiivse tulemuse korral 427 bp pikkune DNA lõik IS 1245-s (Guerrero jt, 1995). *M. intracellulare* esinemist kultuuris testiti praimeritega IN 38 (5'-GAA CGC CCG TTG GCT GGC CAT TCA CGA AGG AG-3') ja IN 41 (5'-GCG CAA CAC GGT CGG ACA GGC CTT CCT CGA-3'), kus positiivse tulemuse korral amplifitseerub 666 bp pikkune fragment (Devallois *et al.*, 1996).

M. tuberculosis'e/*M. bovis*'e eristamiseks kasutati eelnevalt väljatöötatud primereid, mis põhinevad *oxyR* geeni üksiku nukleotiidi polümorfusel (Espinoza de los Monteros *et al.*, 1998). Selleks kasutati primereid *oxyRTB-2.1* (5'-TGG CCG GGC TTC GCG CGT-3'), *oxyRMT-1* (5'-GCA CGA CGG TGG CCA GGC A-3') ja *oxyRMB-1* (5'-TGC ACG ACG GTG GCC AGG TA-3'). *M. bovis*'e positiivse tulemuse korral amplifitseeritakse 270 bp DNA lõik.

Positiivseteks kontrollideks olid referentstüved *M. avium* D4ER, *M. intracellulare*, *M. bovis* Vallee, *M. tuberculosis* ATCC 25177, negatiivseks kontrolliks oli destilleeritud vesi.

PCR produktid analüüsiti 1,8%lisel TBE-agarosil, värviti etiidiumbromiidiga ja vaadeldi 302 nm UV transilluminaatoril.

Mükobakterikultuuri identifitseerimine DNA-sondi meetodil teostati TÜ Kliinikumi tuberkuloosi ja mükobakteriooside referentslaboris (med-dr Annika Krüüner) kommertsiaalsete DNA-testidega (GenProbe Inc.) AMTDT (*M. tuberculosis complex*) ning AccuProbe *M. avium complex* (MAC) ja AccuProbe *M. avium*.

MAC isolaadi serotüübid määrati Taanis (dr Steen Giese, Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen).

Biotest tehti merisigadel, küülikutel ja kanadel. Iga doosiga nakatati vähemalt kaks katselooma. Nakatamise doosiks oli 1 mg/ml füsioloogilises lahuses, merisigadele subkutaanselt, küülikutele ja kanadele intravenoosselt. Kuu aega pärast nakatamist katseloomad tuberkuliniseeriti intradermaalselt (IDDT). Kõik katseloomad uuriti loomuliku surma või eutanaasiajärgselt patomorfoloogiliselt ja bakterioloogiliselt.

Uurimistulemused

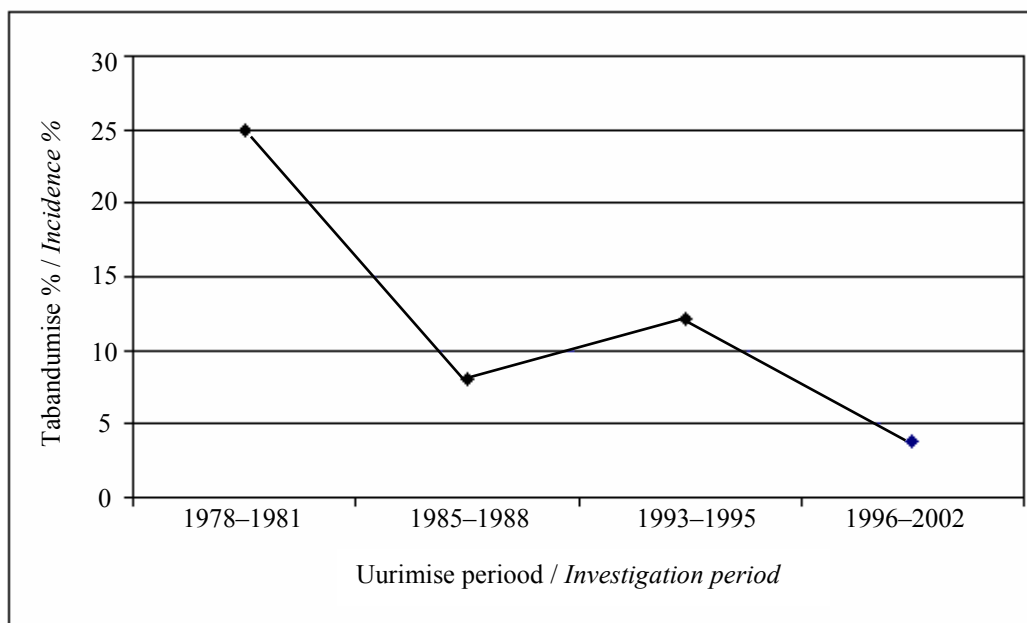
Sigade mükobakterioosi levik ja etioloogia

Sigade lümfisõlmede uuringute patomorfoloogilist ekspertiisi tehti Rakvere lihakombinaadis ning Äksi, Vedu ja Aravete tapatsehhis.

Osast tuberkuloosilaadsete muutustega (TLM) tabandunud mesenteriaalsetest lümfisõlmedest, mis sisaldasid kaseooseid ja/või petrifitseerunud koldeid, tehti külv Löwenstein-Jensen'i söötmel. Kokku uuriti aastatel 1996–2002 3760 siga, kellest nimetatud muutused avastati 142-l (3,8%). Enamikus uuritud loomade gruppides TLM sigadel puudusid, kuid erinevates farmides kõikus tabandumuse protsent suures ulatuses. Näiteks esinesid ühes Järvamaa farmis lümfisõlmede muutused kõigil 56-l uuritud seal (1998. a uuringu andmetel).

Vaatamata taoliste majapidamiste olemasolule tuleb märkida viimastel aastatel täheldatud üldist tendentsi sigade mükobakterioosi haigestumise vähenemise suunas. Joonisel 1 on toodud lümfisõlmede TLM tabandumise keskmiste näitajate dünaamika enam kui 20-aastase perioodi jooksul (uuritud on üle 21 000 sea lihakeha). Jooniselt on näha, et pärast suhteliselt suurt tabandumist 1978–1981. aastal, mil haigust leiti igal neljandal

uuritud seal, jäi see näitaja järgnevatel aastatel suhteliselt stabiilseks vahemikus 8,2–12,1% ning oluline langemine toimus viimaste aastate jooksul.



Joonis 1. Lihakombinaatides uuritud sigade tuberkuloosilaadse lümfadeniidi esinemissagedus
Figure 1. Incidence of caseous lesions in the lymph nodes of slaughter pigs

Meie poolt saadud andmed loomade mükobakteriooside levikust ja etioloogiast Eestis on kooskõlas teiste teadlaste uuringute andmetega. Komijni jt (1999) andmetel oli sigade lümfadeniidiga tabandumise protsent erinevates Hollandi farmides 8–78%. Duerrling jt (1998) viitavad, et 59 371 sea uurimine Saksamaa lihakombinaatides viis 10% lihakehade väljapraakimisele *Mycobacterium spp.* poolt nakatud mesenteriaalsete lümfisõlmede tõttu.

Tabel 1. Sigadelt isoleeritud *M. avium*'i kompleksi kultuuride identifitseerimise tulemused
Table 1. Identification results of *M. avium* complex isolated from pigs

Nr No	Isoleerimise koht Site of isolation	Tüve number Strain number	Isoleerimise kuupäev Date of isolation	Identifitseerimise tulemused ja meetod Methods and results of identification
1	Ekseko, Viljandimaa	M210	03.11.97	<i>M. avium</i> (PCR)
2	Estonia, Järvamaa	M214	22.05.98	<i>M. avium</i> (AccuProbe), MAC (PCR)
3	Kõpsta, Lääne-Virumaa	M217	16.06.97	<i>M. avium</i> (AccuProbe, PCR)
4	Tamsalu, Lääne-Virumaa	M218	13.05.98	<i>M. avium</i> (AccuProb ja PCR)
5	Ekseko, Viljandimaa	M224	16.07.98	<i>M. avium</i> (AccuProbe ja PCR)
6	Ekseko, Viljandimaa	M225	25.06.98	MAC (PCR)
7	Estonia, Järvamaa	M234	20.04.99	<i>M. avium</i> (PCR)
8	Aravete, Järvamaa	M235	31.05.99	<i>M. avium</i> (PCR)
9	Estonia, Järvamaa	M237	29.06.99	<i>M. avium</i> (PCR)
10	Aravete, Järvamaa	M240	26.07.99	<i>M. avium</i> (PCR)
11	Jampo, Tartumaa	M242	12.11.99	<i>M. avium</i> (PCR)
12	Paali, Raplamaa	M265	01.08.00	<i>M. avium</i> (PCR)
13	OÜ Rebane, Lääne-Virumaa	M280	23.09.01	<i>M. avium</i> (PCR)

Sigadelt isoleeriti kokku 24 mükobakterite kultuuri, millest 17 (70,8%) kuulusid *M. avium*'i kompleksi (tabel 1). Sigade tuberkuloosilaadse lümfadeniidi etioloogias märgib enamik autoreid otsustavaks MACi, kusjuures mitmed autorid rõhutavad sigade mükobakterioosi kontrolli vajadust tapamajades (Augustijn *et al.*, 1997; Morita *et al.*, 1997).

Mükobakterioos veistel ja lehmapiima bakterioloogiline uurimine

Veiste lümfisõlmede patomorfoloogilist ekspertiisi tehti Rakvere lihakombinaadis, kus 123 uuritud loomast avastati 3 vasikal (2,4%) tuberkuloosilaadsed muutused: kahel bronhiaalsetes ja ühel mesenteriaalsetes lümfisõlmedes.

Bakterioloogiliselt uuriti kokku 47 patoloogilise materjali proovi tuberkuliinile reageerivatelt veistelt 7 Eesti maakonnast. Kokku isoleeriti 17 mükobakterite kultuuri (5 vasikatelt ja 12 lehmadelt), kusjuures PCR ja biotesti tulemustel ei kuulunud ükski isolaatidest *M. tuberculosis*'e kompleksi. Kolm kultuuri olid skotokromogeensed ja 13 kultuuri (76,4%) määratleti PCR-identifitseerimise tulemusena *M. avium*'i *intracellulare* kompleksi kuuluvateks.

Veisekarjades, kus esines tuberkuliinile reageerivaid lehmi, uuriti bakterioloogiliselt ka piimaproove. Kokku isoleeriti 197 piimaproovist 14 mükobakterite kultuuri. Nendest 3 kultuuri määrati kui *M. avium* ja üks MAC; osa lehmapiimade kultuuride identifitseerimine jätkub käesoleval uuringuetapil. Üks lehma piimaproovist isoleeritud mükobakterite tüvi (M205) osutus virulentseks kanadele. MAC patogeensete tüvede olemasolu lehmapiimas viitab potentsiaalsele võimalusele NTM-infektsiooni transmissiooniks veistelt inimestele läbi loomsete toiduainete (Helicek, Treml, 1997; Menzies, 1999).

Kanade tuberkuloos

Eestis likvideeriti kanade tuberkuloos 1968. aastal, sellele aitas kaasa suurtes linnukasvatustehnikas juurutatud puuride tehnoloogia, mis takistab nakkuse levikut alimenteraalsetel teel. Pikk nakkusvaba periood katkes 1995. aastal, mil me diagnoosisime kaks kanade tuberkuloosi juhtu (Sudakov *et al.*, 1998). On huvitav märkida, et Avilovi jt (1997) andmeil esines 1995. aastal ka Venemaal kanade tuberkuloosi haigestumise järsk tõus.

1997. aastal diagnoositi tuberkuloos kanal Tartumaal Ülenurme valla eratalus. Teine samas talus isoleeritud mükobakterite kultuur oli *M. intracellulare*. Bakterioloogilise ekspertiisi korras diagnoosisime 2000. aastal ühe kanade tuberkuloosi juhu Viljandimaal ja 2001. aastal kaks juhtu Lääne-Virumaal (tabel 2).

Tabel 2. Kanade tuberkuloosi juhtumid Eestis 1995–2002. aastal

Table 2. Cases of tuberculosis of chickens in Estonia between 1995–2002

Tüve number <i>Strain number</i>	Isoleerimise koht <i>Site of isolation</i>	Isoleerimise kuupäev <i>Date of isolation</i>	Identifitseerimise tulemused ja meetod <i>Methods and results of identification</i>	Biotesti tulemused <i>Results of biotest</i>
M177	Koeru, Lääne-Virumaa	31.01.95	<i>M. avium</i> serotüüp 3	Positiivne
M178	Kadrina, Lääne-Virumaa	23.06.95	<i>M. avium</i> serotüüp 3	Positiivne
M202	Reola, Tartumaa	14.04.97	<i>M. avium</i> serotüüp 3 <i>M. avium</i> (PCR) MAC (AccuProbe)	Positiivne
M266	Halliste, Viljandimaa	01.08.00	<i>M. avium</i> (PCR)	Positiivne
M276	Ardja, Lääne-Virumaa	13.03.01	<i>M. avium</i> (PCR)	Positiivne
M279	Vinni, Lääne-Virumaa	22.08.01	<i>M. avium</i> (PCR)	Positiivne

111st kanamunade proovist tehti bakterioloogilised külvid Löwenstein-Jensen'i söötmele. Uurimise tulemusel saadi 3 MAC isolaati, millest kaks (M204 ja M219) olid kanade tuberkuloosi tekitajad ja üks – *M. intracellulare* (M209). Peab märkima, et kaks kultuuri (M209 ja M219) olid isoleeritud talust (Reola, Tartumaa), kus ka 1997. aastal diagnoosisime kanade tuberkuloosi (M202, tabel 2).

M. avium'i sarnased mükobakterid moodustavad loomade ja inimese mükobakteriooside etioloogias 75–90% Soomes (Tala, Viljanen, 1995), Rootsis (Romanus, 1995) ja Venemaal (Ottens, 1994). Andre (1996) arvates tuleb välja selgitada, millist rolli omab lindude tuberkuloos veiste tuberkuloosi ja inimeste tervishoiu seisukohalt. Eestis on MAC-infektsioon sigadel ja veistel laialt levinud ja selle avaldumine kanadel on muutunud tootmistingimustes küllalt seaduspäraseks tagajärjeks.

NTM-infektsioon mets- ja loomaaia loomadel

Kirjanduse andmetel on nii mets- kui ka loomaaialoomad *M. bovis*'e nakkuse reservuaariks, sealjuures *M. bovis* isoleeriti mäkradelt, hirvedelt jt loomaliikidelt (Flamand *et al.*, 1994; Newell, Hewinson, 1995).

Kokku uurisime 46 metslooma proovi (peamiselt lümfisõlmed): 26 metssiga, 3 karu, 3 ilvest ja 14 põtra, millest oli saadud ainult üks mükobakteri kultuur metssealt (M277). Veel üks kultuur (mägralt) oli saadatud ekspertiisi Veterinaar- ja Toidulaborist. Mõlemad kultuurid määrati PCR-identifitseerimisel kui *M. avium*. Tuleb märkida, et mägral 2000. aastal ja metsseal (2001) diagnoositud *M. avium*'i infektsioon on esimesteks bakterioloogiliselt tõestatud mükobakterioosi juhtumeiks metsloomadel Eestis.

Tabel 3. Mets- ja loomaaloomade bakterioloogilise uurimise ja PCR-identifitseerimise tulemused
Table 3. Results of bacteriological analysis of clinical samples from wild animals and animals in zoo and PCR-identification of isolated strains

Loomaliik <i>Source of samples</i>	Kultuuride arv <i>Number of culture</i>	Isoleeritud tüved <i>Strain number</i>	PCR-identifitseerimine <i>PCR-identification</i>
Metssiga <i>Wild boar</i>	1	M277	<i>M. avium</i>
Mäger <i>Badger</i>	1	M252	<i>M. avium</i>
Buhhara hirv <i>Bukhara deer</i>	3	M230 M236	<i>M. avium</i> * <i>M. avium</i>
Jakk <i>Yak</i>	1	M243	kiir kasv <i>fast growth</i>
Jaapani kurg <i>Japanese crane</i>	1	M248	<i>M. avium</i>
Paabulind <i>Peacock</i>	1	M232	<i>M. avium</i>
Faasan <i>Pheasant</i>	7	M247, M260 M259, M261, M262, M263 M258	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>Ei kuulu / Not belong to MAC</i>
Kuninglik boa <i>King boa</i>	1	M244	x
Kollane anakonda <i>Yellow anaconda</i>	1	M245	x
Kokku <i>Total</i>	17		x

* – identifitseeritud PCR ja GenProbe alusel / *PCR and GenProbe identification*x – uuringuid pole teostatud / *investigations not performed*

Lisaks sellele isoleeriti bakterioloogilise ekspertiisi tulemusena 1999–2000. a rida NTM kultuure Tallinna Loomaaia loomade patoloogilisest materjalist. Nimelt isoleeriti mükobaktereid kahelt krooniliselt põdevalt hirvelt, kelle pikaajaline antibakteriaalne ravi konventsionaalsete vahenditega ei andnud positiivset efekti. Lahangul leiti lümfisõlmede tuberkuloosilaadsed ja mädased muutused. Mõlemalt loomalt isoleeritud mükobakterite kultuurid kuulusid PCR-meetodil identifitseerimisel MACi, kusjuures üks neist oli *M. avium*. *M. avium*'i tüvi isoleeriti samuti jaapani kure ja paabulinnu kliinilisest materjalist (tabel 3). Faasanite 7 isolaadist 2 olid *M. avium* ja 4 MAC. Jakilt isoleeriti kiiresti kasvav mükobakterite kultuur, kahelt maolt (boa ja anakonda) isoleeritud atüüpilised mükobakterid on senini identifitseerimata.

Vaatamata sigade ja veiste mükobakteriooside suhteliselt laialdasele levikule, puudusid käesoleva ajani andmed metsloomade ja loomaaloomade MAC-infektsiooni kohta Eestis. Saadud andmed laiendavad teadmisi mets- ja eksootiliste loomade NTM-nakkuse etioloogiast, allikatest ja levikust.

Tulemuste arutelu

Eesti farmides moodustab NTM-ga sensibiliseeritud ja tuberkuliinile reageerivate lehmade arv 0–5%, üksikjuhtudel kuni 18% karjast; vasikate hulgas aga koguni 30% (Martma, Tähnas, 1986). Läbiviidud epidemioloogilised uuringud kinnitasid selle infektsiooni märkimisväärset levikuulatust Eestis, kusjuures juhtivat rolli etioloogias omab *Mycobacterium avium* complex (MAC). 1996.–2002. a läbiviidud valikuliste uuringute põhjal täheldati lümfisõlmede tuberkuloosilaadseid muutusi keskmiselt 3,8% lihakombinaatidesse toodud sigadel ja 2,4% veistel.

Tuberkuloosikahtlusega (reageerisid tuberkuliinile või omasid tuberkuloosilaadseid muutusi) loomade kliiniliste proovide bakterioloogilistel uuringutel ei eraldatud ühelgi juhul imetajate tuberkuloosi tekitajat (*M. tuberculosis* complex). Valdavaks loomade mükobakterioosi põhjustajaks seal, veisel, mägral, metsseal ja hirvel oli *M. avium* või MACi esindajad. *M. avium*'i infektsioon põhjustas ka kanade tuberkuloosi juhtumeid ja tuberkuloosi Tallinna Loomaaia lindudel (faasanid, paabulind, jaapani kurg).

Väärrib märkimist, et neljal juhul isoleeriti MAC lehmapiimast ja kolmel juhul kanamunadest, mis ühtib teiste uurijate andmetega, kes juhivad tähelepanu tuberkuloosi (mükobakterioosi) leviku võimalusele toiduainete kaudu (Šindler, 1989). Näiteks Perelmani jt (1990) andmeil on inimeste tuberkuloosi haigestumise põhjuseks keskmiselt 5–10% juhtudest *M. bovis*, veiste tuberkuloosi suhtes problemaatilistes piirkondades aga kuni 20–30%.

Loomade tuberkuloosi efektiivse kontrolli aluseks on diagnostiliste meetodite suutlikkus õigeaegselt tuvastada nakatunud loomi karjades. Praegusel ajal on tõsiseks probleemiks tuberkuloosi ja atüüpiliste mükobakterite poolt põhjustatud mükobakteriooside diferentsiaaldiagnostika. Komparatiivse (simultaanse) tuberkuliinistest tulemused võimaldavad anda reageerinud loomade sensibiliseerumise põhjustele ainult oletatava hinnangu, mükobakterite isoleerimine ja identifitseerimine konventsionaalsete bakterioloogiliste meetoditega on samas väga aeganõudev.

Kooskõlas taksonoomiliste andmetega on peale 71 *Mycobacterium species*'i määratletud tuberkuloositekitajate (kaasa arvatud lindude ja hiirte tuberkuloositekitajad), leepra ja paratuberkuloosi veel vähemalt 18 aeglase kasvuga ja 6 kiirekasvulist mükobakterite liiki, mis on inimesele ja/või loomadele patogeensed (Shinnick, Good, 1994). Lisaks sellele esineb mükobakterite puhul lai spekter ökoloogiliselt olulisi liigisiseseid erinevusi, mille identifitseerimine on üle jõu käiv enamikule meditsiinilistele ja veterinaarsetele diagnostika laboritele. Nimelt kõige olulisem inimeste ja loomade mükobakteriooside tekitaja – *Mycobacterium avium* complex ühendab 28 etioloogiliselt erinevat serotüüpi (Mangura, Reichman, 1998). David ja Griffith (1997) toonitavad, et seoses atüüpiliste mükobakterite osatähtsuse kasvuga inimeste ja loomade patoloogias, aga ka nende diferentseerimise vajadusega *M. tuberculosis*'e kompleksist, on usaldusväärsete ja kiirete mükobakterite identifitseerimismeetodite kasutusele võtmine käesoleval ajal prioriteetseks ülesandeks.

Meie uuringud tõestasid molekulaarsete ekspressmeetodite tõhusust *M. bovis*'e/*M. tuberculosis*'e ja MAC-kompleksi identifitseerimisel, mis langeb hästi kokku ka teiste autorite saadud uurimistulemustega (Vitale *et al.*, 1998; Öhman, 1995; Šarov, Sedov, 1998). Grebennikova jt (1999) märgivad, et PCR ei jää tundlikkuse poolest alla biotestile.

Paljude autorite arvates on PCR üheks kõige spetsiifilisemaks ja kiiremaks mükobakterite identifitseerimise meetodiks; lootustandvaid tulemusi on saadud mükobakterite otsesel määramisel patoloogilises materjalis, piimas jm, see loob võimaluse mükobakteriooside PCR-diagnostikaks elusloomadel (MacGregor *et al.*, 1999; Vitale *et al.*, 1998). Lähtudes PCR kasutamise kogemustest epidemioloogilistes uuringutes Suurbritannias, peavad Clifton-Hadley jt (1998) seda meetodit tähtsaks loomade tuberkuloosi kontrolli vahendiks.

Edasisi uuringuid vajavad geneetiliselt lähedaste *M. avium*'i-*intracellulare* kompleksi diferentseerimise kriteeriumide määratlemise küsimused. Erinevalt humaanmeditsiinist omab see küsimus veterinaarmeditsiinis suuremat epidemioloogilist tähtsust, kuna *M. avium* on lindude tuberkuloosi tekitaja ning tema tuvastamine nõuab farmis veterinaarsete piirangute kehtestamist.

Praegusel ajal suureneb Eestis järsult registreeritav HIVga nakatumine. Nakatumisjuhtude arv suurenes 12-lt 1999. aastal kuni 1474-ni 2001. aastal ning WHO andmetel on Eesti esimesel kohal Euroopas HIVga nakatunute arvu poolest miljoni elaniku kohta (AIDS Epidemic Update: 2002). Aidsi haigestumine suurendab vastuvõtlikkust mükobakteriaalsetele infektsioonidele ning isegi madala virulentsusega mükobakteriga nakatumine võib põhjustada progresseeruva iseloomuga mükobakterioosi. Selles kontekstis on väga aktuaalne loomade ja loomse päritoluga produktide potentsiaalse rolli kindlakstegemine MAC-infektsiooni ülekandumisel loomalt inimesele.

Kokkuvõttena tuleb märkida, et praegusel ajal ei suuda mükobakterite detekteerimise ja identifitseerimise molekulaarsed meetodid (PCR, DNA-sond) veel täielikult asendada konventsionaalseid bakterioloogilisi meetodeid (kaasa arvatud kultuuri isoleerimine) mükobakteriooside diagnoosimisel. Sellele vaatamata paistab molekulaarne PCR-diagnostika silma kõrge tundlikkuse ja spetsiifilisusega, võimaldades viia epidemioloogilised uuringud kvalitatiivselt uuele, geneetilisele tasemele ning mitmekordselt vähendada ajakulu lõpliku diagnoosi panemisel.

Kokkuvõte

1. Loomade NTM-infektsiooni epidemioloogilised uuringud kinnitasid selle infektsiooni märkimisväärt levikuulatust Eestis: lümfisõlmede tuberkuloosilaadseid muutusi täheldati keskmiselt 3,8% lihakombinaatidesse toodud sigadel ja 2,4% veistel.
2. Sagedaimaks mükobakterioosi tekitajaks Eestis on *M. avium* ja *M. avium*'i-*intracellulare* kompleks, kuhu kuulus 76,4% veistelt ja 70,8% sigadelt isoleeritud NTM kultuuridest.
3. 179 piimaproovi uuringu tulemusena isoleeriti 14 mükobakterite kultuuri (7,8%), sh 3 kultuuri *M. avium*.
4. Aastatel 1995–2001 diagnoositi Eestis 6 tuberkuloosi sporaadilist juhtumit kanadel.
5. Esmakordselt diagnoositi Eestis *M. avium*'i-infektsiooni juhtumeid metsloomadel (mägral ja metsseal) ja Tallinna Loomaaia hirvedel.
6. Tallinna Loomaaias tehti kindlaks *M. avium*'i-tuberkuloosi juhtumid kahel faasanil, paabulinnul ja jaapani kurel. Atüüpilisi mükobaktereid isoleeriti samuti jakilt ja madudelt (boa ja anakonda).
7. PCR-amplifikatsiooni tulemuste põhjal identifitseeriti 30-st atüüpiliste mükobakterite isolaadist 23 kui *M. avium* (10 sigadelt, 3 kanadelt, 3 vasikatelt, 2 saepurust ning üks hirvelt, kanamunast ja lehmapiimast).

8. Inimese ja loomade peamise mükobakteriooside tekitaja *M. avium*'i isoleerimine piimast ja kanamunadest viitab reaalsele ohule infektsiooni transmissiooniks inimestele loomse päritoluga toiduainete kaudu.
9. Eestis täheldatav inimeste HIVga nakatumise kiire kasv nõuab NTM-infektsiooni kontrolli programmi väljatöötamist.

Kirjandus

- AIDS Epidemic Update: December 2002. – Available electronically at www.who.int/hiv/pub/epidemiology/epi2002/en/
- Andre, J.-P. 1996. Les mycobacterioses chez les oiseaux de cage et de voliere. Revue bibliographique. – Revue Med. Vet., 147, 907–912.
- Augustijn, M., Bijker, P. G. H., Komijn, R. E. 1997. Mycobacterium avium infection in man and swine; the role of porc in human infections. – World Congress on Food Hygiene, The Hague, 212.
- Avilov jt: Авиллов В. М., Пылинин В. Ф., Овдиенко Н. П., Ведерников В. А. 1997. Больше внимания профилактике и борьбе с туберкулезом животных. – Ветеринария, 8, 3–9.
- Casal, M. 2000. Mycobacteriosis as an emerging disease. – Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 18, 1, 55–58.
- Clifton-Hadley, R. S., Inwald, J., Archer, J., Hughes, S., Palmer, N., Sayers, A. R., Sweeney, K., Van Embden, J. D. A., Hewinson, R. G. 1998. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates using: spoligotyping-epidemiological issues. – Society for veterinary epidemiology and preventive medicine (Ed. Thrusfield M. V. and Goodall E. A.), 15–27.
- David, E., Griffith, M. D. 1997. Nontuberculous mycobacteria: Review article. – Current Opinion in Pulmonary Medicine, 3, 2, 139–145.
- Devallois, A., Picardeau, M., Goh, K. S., Sola, C., Vincent, V., Rastog, N. 1996. Comparative evaluation of PCR and commercial DNA probes for detection and identification to species level of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. – J. Clin. Microbiol., 34, 2756–2759.
- Duerrling, H., Ludewig, F., Uhlemann, J., Gericke, R. 1998. Peat as a source of *Mycobacterium avium* infection for pigs. – Tierärztliche Umschau, 53, 5, 259–261.
- Espinoza de los Monteros, L. E., Galín, J. C., Gutiérrez, M., Samper, S., Garsia Marin, J. F., Carlos, M., Domínguez, L. R., Baquero, F., Gomez-Mampaso, E., Blazquez, J. 1998. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. – J. Clin. Microbiol., 36, 239–242.
- Flamand, J. R. B., Greth, A., Haagsma, J., Griffin, F. 1994. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): diagnosis and monitoring. – Veterinary Record, 134, 115–118.
- Grebennikova jt: Гребенникова Т. В., Грабовский В. В., Кальнов С. Л., Непоклонов Е. А., Сумский Н. И. 1999. Дифференциальная диагностика микобактерий методом полимеразной цепной реакции. – Ветеринария, 3, 17–22.
- Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer, T. 1995. A Novel Insertion Element from *Mycobacterium avium*, IS 1245. – J. Clin. Microbiol., 33, 2, 304–307.
- Helicek, K., Treml, F. 1997. Animal foci and routes of transmission of *Mycobacterium avium*. – Epidemiol. Microbiol. Immunol., 46, 3, 115–118.
- Kazwala, R. R., Daborn, C. J., Kusiluka, L. J., Jiwa, S. F., Sharp, J. M., Kambarage, D. M. 1998. Isolation of *Mycobacterium* species from raw milk of pastoral cattle of the Southern Highlands of Tanzania. – Trop. Anim. Health. Prod., 30, 4, 233–239.
- Komijn, R. E., de Haas, P. E., Schneider, M. M., Eger, T., Nieuwenhuijs, J. H., van den Hoek, R. J., Bakker, D., van Zijl Erveld, F. G., van Soelingen, 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, 5, 1254–1259.
- Krüüner, A. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* – spread and drug resistance in Estonia. – Dissertationes Medicinæ Univerſitati Tartuensis, 69, Tartu University press. – 137 pp.
- MacGregor, R. R., Dreyer, K., Herman, S., Hocknell, P. K., Nghiem, L., Tevere, V. J., Williams, A. L. 1999. Use of PCR in detection of *Mycobacterium avium* complex (MAC) bacteremia: Sensitivity of the assay and effect of treatment for MAC infection on concentrations of human immunodeficiency virus in plasma. – J. Clin. Microbiol., 37, 1, 90–94.
- Mangura, B. T., Reichman, L. B. 1998. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM). – Textbook of pulmonary diseases, 6th ed. (ed. Baum G. L., Crapo J. D., Celli B. R., Karlinksky), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 631–638.
- Martma, Tähnas: Мартма О. В., Тяхнас К. К. 1986. О возбудителях и течении микобактериоза. – Туберкулез крупного рогатого скота и меры борьбы с ним, Новосибирск, 78–82.
- Menzies, D. 1999. Interpretation of repeated tuberculin tests – boosting, conversion and reversion. – Am. J. Respir. Crit. Care Med., 159, 1, 15–21.

- Morita, Y., Shimizu, H., Maruyama, S., Katsube, Y. 1997. Distribution of IS901 in strains of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex from animals, patients and environments in Japan. – World Congress on Food Hygiene, The Hague, 207.
- Newell, D. G., Hewinson, R. G. 1995. Control of bovine tuberculosis by vaccination. – Veterinary Record, 136, 459–463.
- Otten: Оттен Т. Ф. 1994. Особенности бактериологической диагностики и этиотропной терапии микобактериозов легких. – Туберкулез и город: проблемы профилактики, диагностики и лечения. – Санкт-Петербург, 143–149.
- Perelman jt: Перельман М. И., Корякин В. А., Протопопова Н. М. 1990. Туберкулез. – Москва: Медицина, 304.
- Ramasoota, P., Chansirpornchai, N., Kallenius, G., Hoffner, S. E. Svenson, S. B. 2001. Comparison of *Mycobacterium avium* complex (MAC) strains from pigs and humans in Sweden by random amplified polymorphic DNA (RAPD) using standardized reagents. – Vet. Microbiol., 78, 3, 251–259.
- Romanus, V. 1995. Mycobacterial infections in Sweden. – Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 98, 15–16.
- Shinnick, T. M., Good, R. C. 1994. Mycobacterial taxonomy. – Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13, 11, 884–890.
- Sudakov, M., Koslov, N., Häkkinen, L. 1998. Avian tuberculosis and animal mycobacterioses in Estonia. – Veteriaarmeditsiin, Tartu, 104–107.
- Šarov, Sedov: Шаров А. Н., Седов В. А. 1998. Тест-системы ПЦР при туберкулезе. – Ветеринария, 3, 20–22.
- Šindler: Шиндлер Е. М. 1989. Эпидемиологическое значение туберкулеза КРС для сельских районов Курганской области и эффективность профилактических мероприятий. – Автореф. дис. канд. мед. наук, Новосибирск, 32.
- Tala, E., Viljanen, M. 1995. Mycobacterial infections in Finland. – Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 98, 7–8.
- Van Soolingen, D., de Haas, D. P. W., Hermans, P. W. M., van Embden, J. D. A. 1992. RLFP Analysis of Mycobacteria. NIPHEP, Bilthoven, Holland, 54.
- Van Soolingen, D., de Haas, P. E. W., Hermans, P. W. M., van Embden, J. D. A. 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. – Methods Enzymol., 235, 196–205.
- Weldingh, K., Rosenkrands, I., Jacobsen, S., Rasmussen, P. B., Elhay, M. J., Andersen, P. 1998. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. – Infect. Immun., 66, 8, 3492–3500.
- Vitale, F., Capra, G., Maxia, L., Reale, S., Vesco, G., Caracappa, S. 1998. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. – J. Clin. Microbiol., 36, 4, 1050–1055.
- Öhman, R. 1995. Identification and characterization of mycobacterial antigens and enzymes. – Göteborg, Sweden. – 47 pp.

Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) infections of domestic- and wild animals in Estonia

M. Sudakov, J. Kumar, S. Kokassaar, L. Häkkinen

Summary

According to extensive experimental data, mycobacterioses caused by nontuberculous mycobacteria (NTM; atypical mycobacteria) are acquiring the increasing importance in human pathology. Persons with various types of immunodeficiency present here a risk group of special concern.

In veterinary a serious problem appears to be the differentiation of tuberculin reactions in cattle sensitized with atypical mycobacteria, sometimes leading to the need of control slaughters for establishing the reasons of sensibilisation; also the tuberculosis-like lesions of lymph nodes caused by mycobacterioses in swine, lowering the quality of pork.

In Estonia bovine tuberculosis has not been reported since 1987, nevertheless the relatively widespread NTM-infections need constant attention to questions of bacteriological diagnosis of mycobacterioses. A significant progress could be achieved by using molecular diagnostic methods.

An another major problem in these days is tracing the potential sources and transmission routes of pathogens causing NTM-mycobacterioses in humans and animals, specially the causative agent of avian tuberculosis – *M. avium* and members of *M. avium* complex. There still stands the question about a potential role of animals as a source of infection in humans.

Conventional pathomorphological methods were used investigating pathological materials. In total 3760 swine carcasses were examined in meat-plants. A part of swine samples together with clinical samples from other animal species were examined bacteriologically by inoculation on Löwenstein-Jensen medium.

We used primers P1 and P2 for detecting *M. avium* giving, in case of a positive result, a 427 bp fragment derived from *IS 1245* sequence. The presence of *M. intracellulare* in a culture was detected with primers IN 38 and IN 41, giving a 666 bp fragment.

In differentiation of *M. bovis/tuberculosis* we have used allele-specific PCR based on *oxyR* gene sequence polymorphisms.

Epidemiological investigation of nontuberculous mycobacteria (NTM) infections in swine and cattle showed remarkably high prevalence of this infection in Estonia, the most important role possesses *Mycobacterium avium* complex (MAC). Selective made examinations in slaughterhouses – during period of 1996–2002 – detected tuberculosis-like lesions of lymph nodes in 3,8 the lowest incidence in the last 30 years (Figure 1).

67 cultures of mycobacteria were isolated. As a result of PCR-identification 52 (77.6%) strains are referred to *M. avium* and two to *M. intracellulare*. Exotic zoo animals and species of wild animals, susceptible to NTM, are the ecological reservoir of given infection and can play an important role in selection of virulent types of opportunistic mycobacteria.

1. The epidemiological investigations of animal NTM infections confirmed the remarkable presence of infection in Estonia: the tuberculosis-like changes in lymph nodes in animals brought to the slaughterhouse were established in 3,8% of pigs and 2,4% of cattle.
2. The predominant causative agents of mycobacterioses in Estonia are *M. avium* and *M. avium-intracellulare* complex (76% of NTM cultures from cattle and 70,8% from pigs were isolated).
3. 14 cultures of mycobacteria (7,8%), 3 cultures of *M. avium* among them, were isolated from 179 milk probes.
4. 6 sporadic cases of tuberculosis in hens were diagnosed in 1995–2001.
5. For the first time the *M. avium* infection was diagnosed in wild animals (badgers and wild boars) and deers in Tallinn Zoo.
6. The *M. avium* infection in two pheasants, peacock and Japanese crane was established. Atypical mycobacteria were isolated also from yak and snakes (boa and anaconda).
7. 23 out of 30 isolated atypical mycobacteria (10 from pigs, 3 from hen, 3 from calves, 2 from sawdust, 1 from deer, 1 from egg and cow milk) were identified as *M. avium* with PCR amplification.
8. The isolation of *M. avium* as the most frequent causative agent of mycobateriosis in man and animals from milk and eggs refer to the real danger of transmission the infection to man with animal products.
9. The vast spread of HIV in human population forces to elaborate effective control program for NTM infection.