

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA NETUBERKULOZNIH MIKOBakterIJA PRIMJENOM GENOTYPE MYCOBACTERIUM CM/AS TESTA

Emir Halilović¹, Alma Imamović¹, Nijaz Tihčić¹, Adisa Ahmić²,
Amela Hercegovac², Amela Bećirović¹, Vildana Hadžić³, Mirela Habibović²

Izvod: Istraživanje ima za cilj utvrditi učestalost i raznolikost kliničkih izolata netuberkuloznih mikobakterija (NTM). Od 306 uzoraka primjenom molekularnog testa prisustvo NTM je potvrđeno kod 65 (21,20%). Najčešće izolovane vrste su *M. fortuitum* (30,3%), *M. goodii* (24,2%), *M. chelonae* (15,2%), *M. xenopi* (7,6%), *M. kansasii* (4,5%), *M. avium ssp.* (3%), *M. celatum* (3%), *M. mucogenicum* (1,5%), *M. peregrinum* (1,5%), *M. goodii* (1,5%) i *Mycobacterium sp.* (7,6%). Utvrđivanje lokalnog spektra NTM važno je zbog značajnih geografskih varijacija izolovanih vrsta. Iako su molekularna ispitivanja relativno skupa, ona imaju prednost što osiguravaju brzu i tačnu identifikaciju različitih vrsta NTM.

Ključne riječi: netuberkulozne mikobakterije, GenoType Mycobacterium CM/AS Test, molekularna identifikacija.

Uvod

Rod *Mycobacterium* danas obuhvata 177 vrsta i 13 podvrsta opisanih u popisu bakterijskih vrsta s odobrenim imenima (www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html). To su aerobni, nepokretni mikroorganizmi, sa izrazitom acido-alkoholnom otpornošću pri bojenju. Specifičan sastav ćelijskog zida i njegova debljina čine mikobakterije otpornim na teške metale, sredstva za dezinfekciju i antibiotike (Johnson i Odell, 2014). Isključivi patogeni čovjeka su članovi *M. tuberculosis* kompleksa (MTBC) i *M. leprae*, dok se sve ostale vrste uobičajeno nazivaju netuberkuloznim mikobakterijama (*non-tuberculous mycobacteria*, NTM) i smatraju oportunističkim patogenima ljudi, domaćih i divljih životinja, riba i ptica (Falkinham, 2013).

NTM su ubikvitarni mikroorganizmi prisutni u tlu, prašini, površinskim vodama, moru i sistemima vodosnabdijevanja. Na boravak u ovakvim sredinama idealno su prilagođene svojom ljepljivom površinom i mogućnošću da rastu na niskim koncentracijama organskih tvari (Falkinham, 2013). Iako ne jednako važne kao MTBC, NTM su sve češći uzročnici oboljenja ljudi koja se mogu svrstati u četiri grupe: plućne infekcije, limfadenitis, infekcije kože i mekih tkiva i diseminirana bolest kod imunokompromitovanih osoba (van Ingen, 2013). Broj opisanih vrsta NTM znatno je porastao u posljednje tri decenije zahvaljujući poboljšanim tehnikama kultivacije i identifikacije, kao i spoznaji o njihovom kliničkom značaju, pri čemu se uočavaju

¹Univerzitetski klinički centar Tuzla, Poliklinika za laboratorijsku dijagnostiku, Zavod za mikrobiologiju, Prof. Dr Ibri Pašića bb, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina (emke2004@yahoo.com)

²Prirodno matematički fakultet Tuzla, Univerzitetska 4, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

³Bolnica za plućne bolesti i tuberkulozu, Bašbunar 5, 72270 Travnik, Bosna i Hercegovina

značajne razlike u geografskoj rasprostranjenosti izolovanih vrsta (Maurya i sar., 2015; Manika i sar., 2015).

Tačna identifikacija NTM neophodna je za odgovarajući terapijski tretman i rane epidemiološke intervencije. Identifikacija do nivoa vrste na osnovu fenotipskih i biohemijskih svojstava u nekim slučajevima nije moguća. To je postupak koji je dugotrajan i sklon greškama, sa nedovoljnom diskriminacijskom snagom. Uvođenje vrlo osjetljivih i specifičnih molekularnih metoda za brzu identifikaciju mikobakterija znatno je povećalo brzinu i tačnost postupka. Ove metode uključuju široku raznovrsnost komercijalno dostupnih i *in house* testova s višestrukim protokolima ekstrakcije nukleinske kiseline i amplifikacije različitih genskih ciljeva (IS6110, *hsp65*, 16S rRНК, 23S rRНК) (Tortoli, 2014).

Molekularni testovi linijskih proba razvijeni su za brzu identifikaciju mikobakterija poraslih na čvrstoj ili tečnoj podlozi. Ovi testovi se temelje na reverznoj hibridizaciji amplificiranih produkata s oligonukleotidnim probama imobiliziranim na membranoznoj traci, rezultirajući vidljivim razvojem boje reakcije. Komercijalno su dostupna dva testa linijskih proba: INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Ghent, Belgium) i GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany). Primjenom GenoType Mycobacterium CM/AS Testa moguće je identifikovati 35 različitih vrsta mikobakterija na osnovu nukleotidnih razlika 23S rRНК genske regije. Dva komercijalno dostupna kompleta ponuđena su odvojeno, GenoType Mycobacterium CM, kojim je moguće identifikovati 17, i GenoType Mycobacterium AS, za identifikaciju 18 manje uobičajenih vrsta mikobakterija (Tortoli, 2014).

Stoga je cilj istraživanja utvrditi spektar lokalno cirkulirajućih kliničkih izolata NTM kod uzoraka pozitivnih kultura primjenom molekularnog testa.

Materijal i metode rada

Istraživanjem je obuhvaćen konsekutivni uzorak od 306 ispitanika prikupljenih u periodu od januara 2014. do decembra 2015. godine na Odjelu za mikobakterijske infekcije Zavoda za mikrobiologiju UKC Tuzla. Selektivni kriterij za uključenje u istraživanje je jedan uzorak pozitivnih kultura po ispitaniku. Svi uzorci su dekontaminirani standardnom *N*-acetil-*L*-cisteina-natrijum-hidroksi metodom, analizirani direktnim pregledom mikroskopskih preparata bojenih metodom po Ziehl-Neelsen-u i paralelno kultivisani na čvrstoj i tečnoj podlozi. Za molekularnu identifikaciju uzoraka pozitivnih kultura korišten je GenoType Mycobacterium CM/AS Test (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), na osnovu preporuka datih od strane proizvođača (Hain LifeScience, 2008), a uključuje korake izolacije DNK, multipleks amplifikacije specifičnih sekvenci nukleinske kiseline lančanom reakcijom polimeraze (*polymerase chain reaction*, PCR) i reverzne hibridizacije. Interpretacija rezultata izvršena je katricom za očitavanje reaktivnih proba i poređenjem dobivenog obrasca sa odgovarajućim obrascem na interpretacijskom grafikonu.

U statističkoj obradi podataka korištene su metode neparametrijske statistike, a podaci su obrađeni aplikacijskim statističkim programom SPSS Statistics 17.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

Rezultati istraživanja i diskusija

Od ukupno 306 uzoraka pozitivnih kultura kod 230 (75,20%) potvrđeno je prisustvo MTBC primjenom molekularnog testa. NTM su izolovane kod 65 (21,20%), a gram-pozitivne bakterije sa visokim sadržajem GC kod 11 (3,60%) uzoraka (Tabela 1).

Tabela 1. Molekularna identifikacija uzoraka pozitivnih kultura.

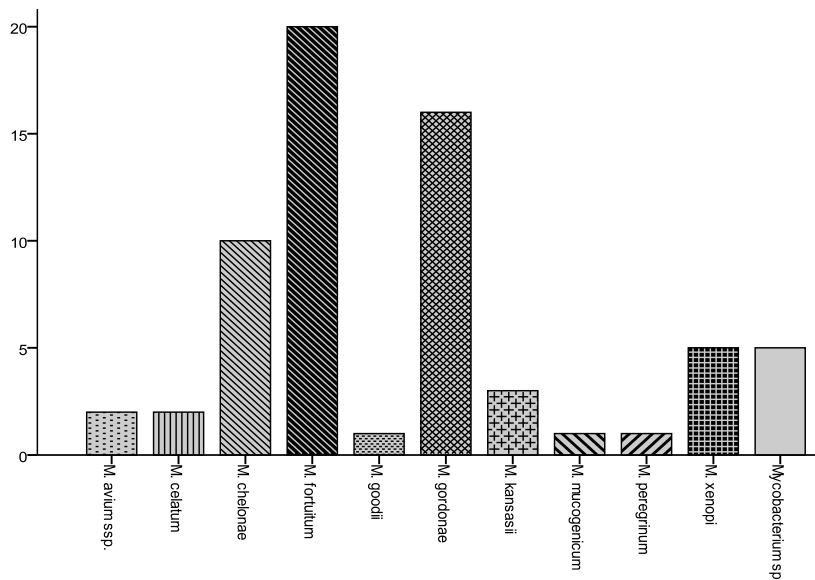
Table 1. Molecular identification of samples positive cultures.

Organizam <i>Organism</i>	Broj izolata <i>Number of isolates</i>	Stopa izolacije (%) <i>Rate of isolation (%)</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	230	75,20
Netuberkulozne mikobakterije <i>Non-tuberculous mycobacteria</i>	65	21,20
Gram pozitivne bakterije <i>Gram positive bacteria</i>	11	3,60
Ukupno <i>Total</i>	306	100

Istraživanje je pokazala da među izolovanim vrstama mikobakterija dominira MTBC. Ovakvi rezultati ne čude jer su članovi ovog kompleksa najčešće izolovane vrste mikobakterija u svijetu (Singh i sar. 2013; Živanović i sar., 2014).

Stopa izolacije NTM u istraživanju je iznosila 21,20% (65/306). Šezdeset izolata NTM identificirano je do nivoa vrste primjenom molekularnog testa. Izolovano je 10 različitih vrsta NTM. Najčešće izolovana vrsta je *M. fortuitum* (n = 20, 30,3%), a stope izolacije ostalih 9 vrsta su: *M. gordonae* (n = 16, 24,2%), *M. chelonae* (n = 10, 15,2%), *M. xenopi* (n = 5, 7,6%), *M. kansasii* (n = 3, 4,5%), *M. avium ssp.* (n = 2, 3%), *M. celatum* (n = 2, 3%), *M. mucogenicum* (n = 1, 1,5%), *M. peregrinum* (n = 1, 1,5%) i *M. goodii* (n = 1, 1,5%). Kod 5 (7,6%) uzoraka identifikacija do nivoa vrste nije bila moguća (Grafikon 1).

M. fortuitum je i najčešća brzorastuća mikobakterija izolovana u istraživanjima koja su provedena u Indiji (Singh i sar., 2013; Maurya i sar., 2015). Visoka stopa izolacije *M. gordonae* ne čudi jer je ova vrsta uobičajeni mikobakterijski kontaminant izolovan iz respiratornih uzoraka i u većini slučajeva smatra se nepatogenom. Također se sreće i u koinfekciji s *M. tuberculosis* (Hoza i sar., 2016). Relativno niska stopa izolacije *M. xenopi*, najčešće izolovane NTM iz respiratornih uzoraka u istraživanju provedenom u Srbiji (Živković i sar., 2014), usporediva je sa rezultatima istraživanja Sookan i Coovadia (2014). Niska stopa izolacije *M. avium ssp.*, koji pripada *M. avium-M. intracellulare-M. kansasii* kompleksu, jedan je od važnih rezultata ovog istraživanja. Čak i zajednička stopa izolacije *M. avium ssp.* i *M. kansasii* u našem istraživanju neuporedivo je niža od objavljenih u drugim istraživanjima (Sookan i Coovadia., 2014; Manika i sar., 2015). Nema jasnog objašnjenje za ovo, ali je činjenica da se stopa izolacije NTM stalno mijenja u većini geografskih regija.



Graf. 1. Stopa izolacije NTM primjenom GenoType Mycobacterium CM/AS Testa.
 Graph. 1. The rate of isolation of NTM by using Genotype Mycobacterium CM/AS Test.

M. celatum je rijedak patogen čovjeka. To je spororastuća mikobakterija sa sličnim biohemijskim karakteristikama i morfologijom kolonija kao *M. avium* kompleks, *M. xenopi*, *M. malmoense* i *M. shimoidei*. Njegova dijagnostika je izazov jer često biva pogrešno identifikovan kao *M. tuberculosis*. Za čovjeka izvor infekcije mogu biti domaće životinje (Pate i sar., 2011). Zabilježene su brojne incidentne infekcije *M. mucogenicum* u bolnicama i izvorima vodosnabdijevanja. Ovaj mikroorganizam se nalazi kod imunokompromitovanih, ali i imunokompetentnih osoba. Povezan je sa infekcijama katetera, oboljenjima centralnog-nervog i respiratornog sistema, te infekcijama kože i mekih tkiva (Adékambi i sar., 2009). Opisan je mali broj slučajeva sporadičnih infekcija uzrokovanih *M. peregrinum*, a češća pojava ove brzorastuće mikobakterije u respiratornim uzorcima je neobična i može se pripisati određenim izvorima iz okoline kakvi su sistemi vodosnabdijevanja. Osobe koje se bave akvakulturom podložne su infekciji ovim mikroorganizmom (Guz i sar., 2013).

Kod 5 uzoraka kultura izolovane NTM su identifikovane kao *Mycobacterium* sp.. Tačna identifikacija može biti provedena primjenom drugih molekularnih metoda kakva je analiza polimorfizama dužine restrikcijskih fragmenata (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) ili sekvenična analiza 16S RNK i *hsp65* gena (Tortoli, 2014).

Važna prednost koju pruža genotipizacijski set je mogućnost otkrivanja miješanih infekcija. U istraživanju je utvrđena miješana infekcija u uzorku jedne tečne kulture. Koegzistirajuće vrste izolovane iz tog uzorka su bile *M. gordonae* i *M. kansasii*. Na ovu sposobnost molekularnog testa ukazuju i Couto i sar. (2010). Ishod terapijskog režima u mnogome zavisi od tačne diskriminacije mikobakterija.

Zaključak

Rezultati pokazuju da je GenoType Mycobacterium CM/AS Test koristan za brzu i tačnu diskriminaciju mikobakterija. Primjena testa naglašava važnost NTM kao potencijalnih patogena i pomaže pri odabiru adekvatne terapije. U zemljama sa visokom incidencom tuberkuloze, terapijski neuspjeh ovog oboljenja može se pripisati koinfekciji s NTM, te je nužna njihova diskriminacija od MTBC. Rezultati testa, zajedno sa epidemiološkim podacima, mogu se koristiti i za utvrđivanje potencijalnih izvora infekcije.

Literatura

- Adékambi T. (2009). *Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review. *Clinical Microbiology and Infection*, 15 (10), 911-918.
- Couto I., Machado D., Viveiros M., Rodrigues L., Amaral L. (2010). Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (8), 1161-1164.
- Falkinham J.O. 3rd (2013). Ecology of nontuberculous mycobacteria-where do human infections come from? *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34 (1), 95-102.
- Guz L., Grądzki Z., Krajewska M., et al. (2013). Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium peregrinum* in ornamental fish. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57 (4), 489-492.
- Hain LifeScience GmbH (2008). GenoType Mycobacterium CM ver 1.0. Dostupno: <http://mycobactoscana.it/Manuale/PDF/Alleg08.2.pdf>.
- Hoza A.S., Mfinanga S.G.M., Rodloff A.C., Moser I., König B. (2016). Increased isolation of nontuberculous mycobacteria among TB suspects in Northeastern, Tanzania: public health and diagnostic implications for control programmes. *BMC Research Notes*, 9, 109.
- Johnson M.M., Odell J.A. (2014). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*, 6 (3), 210-220.
- Manika K., Tsirikla S., Tsaroucha E., et al. (2015). Distribution of nontuberculous mycobacteria in treated patients with pulmonary disease in Greece – relation to microbiological data. *Future Microbiology*, 10 (8), 1301-1306.
- Maurya A.K., Nag V.L., Kant S., et al. (2015). Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria among Extrapulmonary Tuberculosis Cases in Tertiary Care Centers in Northern India. *BioMed Research International*, 2015, 465403.
- Pate M., Žolnir-Dovč M., Kušar D., et al. (2011). The First Report of *Mycobacterium celatum* Isolation from Domestic Pig (*Sus scrofa domestica*) and Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and an Overview of Human Infections in Slovenia. *Veterinary Medicine International*, 2011, ID 432954, 8.
- Singh A.K., Maurya A.K., Umrao J., et al. (2013). Role of GenoType Mycobacterium Common Mycobacteria/Additional Species Assay for Rapid Differentiation Between *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Different Species of Non-Tuberculous Mycobacteria. *Journal of Laboratory Physicians*, 5 (2), 83-89.

- Sookan L., Coovadia Y.M. (2014). A laboratory-based study to identify and speciate non-tuberculous mycobacteria isolated from specimens submitted to a central tuberculosis laboratory from throughout KwaZulu-Natal Province, South Africa. *South African Medical Journal*, 104 (11), 766-768.
- Tortoli E. (2014). Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27 (4), 727–752.
- van Ingen J. (2013). Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34 (1), 109-109.
- Euzéby J.P. (1997). List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Mycobacterium*. Dostupno: www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html. Posljednji pristup: 24. Januar 2017. godine.
- Živanović I., Vuković D., Dakić I., Savić B. (2014). Species of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens from Serbia. *Archive Biological Science*, 66 (2), 553-561.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA USING GENOTYPE MYCOBACTERIUM CM/AS TEST

Emir Halilovic¹, Alma Imamovic¹, Nijaz Tihic¹, Adisa Ahmic²,
Amela Hercegovac², Amela Becirovic¹, Vildana Hadzic³, Mirela Habibovic²

Abstract

The study aims to determine the frequency and diversity of clinical isolates of nontuberculous mycobacteria (NTM). Of the 306 samples, the presence of NTM was confirmed in 65 (21.20%). The most frequently isolated species were *M. fortuitum* (30.3%), *M. gordonae* (24.2%), *M. chelonae* (15.2%), *M. xenopi* (7.6%), *M. kansasii* (4.5%), *M. avium ssp.* (3%), *M. celatum* (3%), *M. mucogenicum* (1.5%), *M. peregrinum* (1.5%), *M. goodii* (1.5%) and *Mycobacterium sp.* (7.6%). The determination of the local spectrum NTM is important because of the significant geographical variation. Although molecular testing is relatively expensive, they provide a rapid and accurate identification of different types of NTM.

Key words: nontuberculous mycobacteria, GenoType Mycobacterium CM/AS Test, molecular identification.

¹University Clinical Center Tuzla, Polyclinic for Laboratory Diagnostics, Department of Microbiology, Prof. Dr Ibri Pašića bb, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina (emke2004@yahoo.com)

²Faculty of Science, Univerzitetska 4, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

³Hospital for Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Bašbunar 5, 72270 Travnik, Bosnia and Herzegovina