

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**KLINIŠKAI SVARBIŲ ATIPINIŲ MIKOBAKTERIJŲ PAPLITIMAS IR JŲ  
ANTIMIKROBINIO ATSPARUMO NUSTATYMAS VILNIAUS UNIVERSITETO  
LIGONINĖS SANTAROS KLINIKOSE 2015 – 2018 METAIS**

Magistrantas:

RIMVYDAS JONIKAS

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovė:

Prof., habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo konsultantė:

Edita Vasiliauskienė

\_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir

laboratorinės medicinos katedros vedėja

doc. dr. Dovilė Karčiauskaitė

leidžiama ginti

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_  
Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2018 m., Vilnius

# TURINYS

SANTRUMPOS .....	4
ĮVADAS .....	5
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Mikobakterijų charakteristikos.....	7
1.2. Atipinės mikobakterijos.....	9
1.3. Mikobakteriozių diagnostika .....	10
1.3.1. Klinikinė ir radiologinė mikobakteriozių diagnostika .....	10
1.3.2. Mikobakteriozių laboratorinė diagnostika .....	11
1.3.2.1. Mikrobiologiniai tyrimai.....	11
1.3.2.2. Atipinių mikobakterijų identifikavimas .....	12
1.4. Atipinių mikobakterijų atsparumas antibakteriniams vaistams ir jį lemiantys genai .....	13
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	15
2.1. Tyrimo medžiaga.....	15
2.2. Laboratorinė įranga ir naudojami reagentai .....	15
2.3. Tyrimo metodai .....	18
2.3.1. Genominės DNR išskyrimas iš atipinių mikobakterijų kultūrų.....	18
2.3.2. Genominės DNR pagausinimas .....	19
2.3.3. Atvirkštinė hibridizacija.....	19
2.3.4. Atvirkštinės hibridizacijos rezultatų vertinimas .....	20
2.4. Statistinė analizė.....	21
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	22
3.1. Nustatytų kliniškai svarbių atipinių mikobakterijų paplitimas ir įvairovė.....	22
3.2. PGR metodo rezultatai .....	24
3.3. Rezultatų aptarimas.....	26
3.4.1. Retrospektyvinės analizės rezultatų aptarimas .....	26
3.4.2. PGR metodo rezultatų aptarimas .....	28

IŠVADOS.....	30
SANTRAUKA.....	31
SUMMARY.....	32
PADĒKA.....	33
LITERATŪROS SARAŠAS.....	34
PRIEDAI .....	42

## SANTRUMPOS

AM – atipinės mikobakterijos

ATS – (angl. *American Thoracic Society*) Amerikos krūtinės chirurgų draugija

DNR – deoksiribonukleorūgštis

GAM – greitai augančios mikobakterijos

IDSA – (angl. *Infectious Diseases Society of America*) Amerikos infekcinių ligų draugija

JVT – jautrumo vaistams tyrimas

LOPL – lėtinė obstrukcinė plaučių liga

MAK – *Mycobacterium avium* kompleksas

MALDI-TOF – (angl. matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight) ant matricos vykstanti, lazerio spinduliuote sužadinta, desorbicija/ionizacija su lėkio trukmės matavimu

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

RAB – rūgščiai atsparios bakterijos

rRNR – ribosiminė ribonukleorūgštis

T – timinas

TB – tuberkuliozė

TTL – Tuberkuliozės tyrimų laboratorija

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas

## IVADAS

Atipinės mikobakterijos (AM) – tai grupė išorinės aplinkos bakterijų, priklausančių *Mycobacterium* genčiai, išskyrus tuberkuliozę sukeliančias *Mycobacterium tuberculosis* kompleksui priklausančias mikobakterijas ir raupsų sukėlėją *Mycobacterium leprae*. Nors AM randamos natūralioje aplinkoje ir praktiškai neperduodamos nuo žmogaus žmogui arba nuo gyvūno žmogui, jų sukeltų infekcijų skaičius sparčiai auga visame pasaulyje, ypač tarp vyresnio amžiaus žmonių, pacientų, sergančių lėtinėmis plaučių ligomis ar esant įgimtiems ar įgytiems imuninės sistemos sutrikimams [1, 2]. Literatūros duomenimis, AM paplitimas ir rūšinė įvairovė skiriasi tarp šalių, tačiau tikslūs epidemiologiniai duomenys nėra žinomi. Lietuvoje iki šiol nėra jokių statistinių duomenų apie sergamumą AM sukeliomomis infekcijomis, nėra nustatyta kokios AM rūšys dažniausiai sukelia infekcijas, nes ilgą laiką šių bakterijų identifikacija tuberkuliozės laboratorijose buvo grindžiama tik įprastais mikrobiologiniais ir biocheminiais tyrimais.

Svarbu paminėti ir tai, jog skirtingos AM sukelia skirtingas infekcijas, kurios gydomos įvairiais antibakterinių vaistų deriniais, todėl AM būtina identifikuoti iki rūšies. Be to, yra žinoma, kad AM gali turėti įgimtą arba įgytą atsparumą kai kuriems antibakteriniams vaistams, todėl yra rekomenduojama atlikti jautrumo vaistams tyrimus (JVT), ypač pacientams, kuriems nėra atsako į paskirtą gydymą arba kai empirinis gydymas yra neveiksmingas esant ligos atkryčiui. Vis dėlto, koreliacija tarp *in vitro* atliktų JVT ir *in vivo* atsako į gydymą yra maža.

Šiuo metu Klinikinių ir laboratorijos standartų institutas (CLSI) rekomenduoja AM JVT atlikti mikropraskiedimo metodu skystoje terpėje. Tačiau šio metodo greitis labai priklauso nuo mikobakterijų augimo greičio, todėl gali trukti nuo vienos iki kelių savaitių, todėl ir tinkamo gydymo skyrimas gali būti uždeliamas. Dėl šios priežasties pastaruosius dešimtmečius buvo ieškoma greitesnių būdų nustatyti bakterijų jautrumą įvairiems vaistams. Taip buvo atrasti specifiniai AM genai, siejami su atsparumu antibakteriniams vaistams. Šiuo metu geriausiai yra ištirti *rml* genas, koduojantis 23S ribosominės ribonukleorūgšties (rRNR) subvieneto peptidiltransferazės domeną, *rrs* genas, koduojantis 16S rRNR subvienetą ir *erm(41)* genas, atsakingas už rRNR metiltransferazę. Vystantis molekulinės biologijos mokslui, atsirado galimybė nustatyti kliniškai svarbių AM atsparumą vaistams daug greičiau nei fenotipiniais metodais.

Šio darbo tikslas buvo įvertinti kokios AM yra dažniausiai aptinkamos VšĮ Vilniaus universiteto Santaros klinikose bei molekulinio polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metodu nustatyti *M. avium* komplekso, *M. abscessus* komplekso ir *M. chelonae* atsparumą antibakteriniams vaistams bei jų lemiančius genų mutacijas.

# DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

## **Darbo tikslas:**

Įvertinti kliniškai svarbių atipinių mikobakterijų paplitimą, rūšinę įvairovę ir ištirti jų atsparumą antimikrobiniam vaistams VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose 2015-2018 metų laikotarpyje.

## **Uždaviniai:**

1. Atlikti retrospektyvinę Tuberkuliozės tyrimų laboratorijos duomenų analizę ir įvertinti kliniškai svarbių atipinių mikobakterijų paplitimą ir rūšinę įvairovę VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose 2015-2018 metais.
2. PGR metodu ištirti atipinių mikobakterijų atsparumą makrolidiniams bei aminoglikozidiniams antibiotikams ir jų lemiančias mutacijas.
3. Įvertinti PGR metodo tinkamumą nustatant atipinių mikobakterijų atsparumą antibiotikams.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

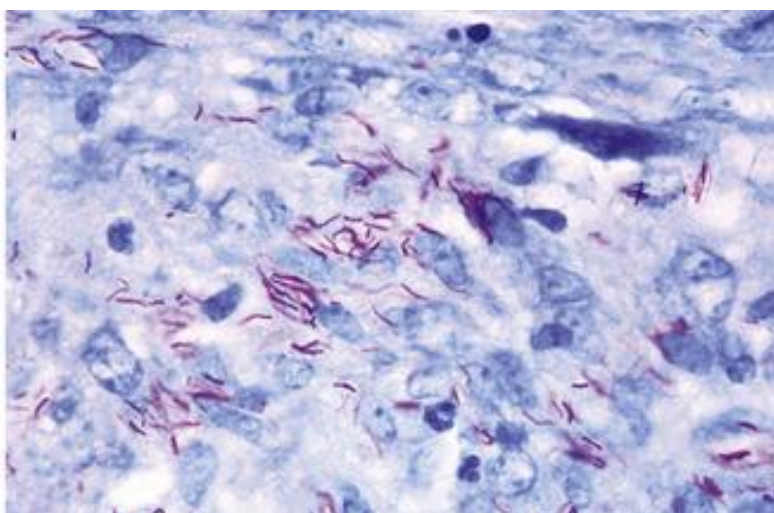
## 1.1. Mikobakterijų charakteristikos

Mikobakterijų identifikacija prasidėjo dar XIX amžiaus pabaigoje, kai buvo atrastas tuberkuliozės (TB) sukėlėjas *Mycobacterium tuberculosis*. Mokslininkai Lehmanas ir Neumanas pirmieji pasiūlė tokią šių bakterijų klasifikaciją: karalystė – Bacteria, tipas – Actinobacteria, būrys – Actinomycetales, šeima – Mycobacteriaceae, gentis – Mycobacterium [3]. Ši mikobakterijų klasifikacija naudojama ir dabar.

Visas *Mycobacterium* genties bakterijas praktiniu požiūriu galima išskirstyti į 3 pagrindines grupes pagal jų sukeliamų ligų diagnostiką ir gydymą: 1) *Mycobacterium tuberculosis complex* – šiai grupei priskiriamos mikobakterijos sukelia tuberkuliozę (TB); 2) *Mycobacterium leprae* – sukelia Hanseno ligą. Visos likusios mikobakterijos yra apjungiamos į trečiąją grupę ir vadinamos atipinėmis mikobakterijomis (AM). Didžioji dalis jų yra aplinkos saprofitai, bet tam tikros rūšys yra patogenai gyvūnams ir gali būti oportunistiniai patogenai žmogui, sukeldami įvairių organų ir jų sistemų ligas, vadinamas mikobakteriozėmis.

*Mycobacterium* genties bakterijos yra nejudrios (išskyrus *Mycobacterium marinum*, kurios makrofaguose gali judėti [4]), lėtai augančios bakterijos, kurios neformuoja sporų ir yra obligaciniai aerobai. Mikobakterijos pasižymi dideliu pleomorfiškumu – ląstelių forma gali varijuoti priklausomai nuo rūšies ir aplinkos sąlygų.

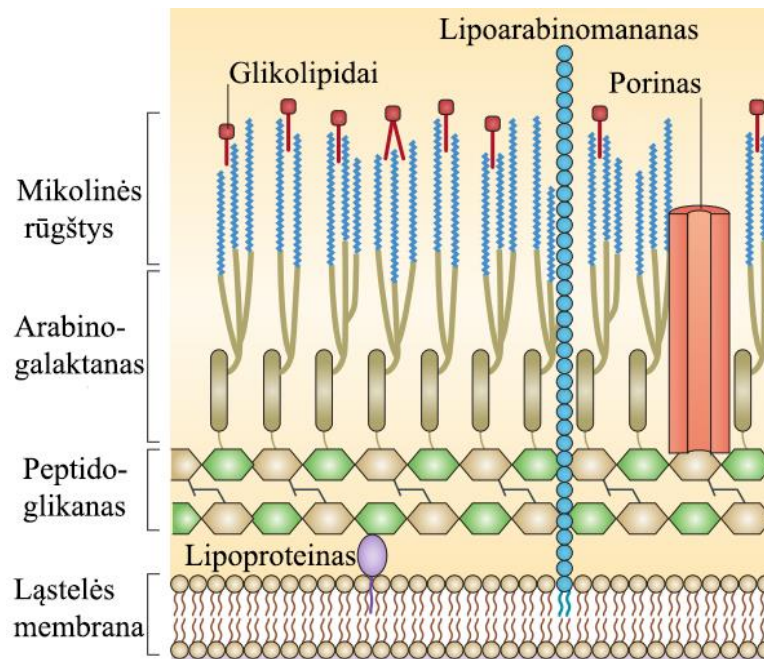
Mikobakterijos yra rūgščiai atsparios bakterijos (RAB) – dažomos Cylio-Nilseno būdu karbolio fuksinu ir blukinant rūgštiniais alkoholių tirpalais, nepraranda spalvos ir lieka nusidažiusios ryškiai avietine spalva (1 pav.).



1 pav. *Mycobacterium avium* komplekso bakterijos, dažytos Cylio-Nilseno būdu.

[5]

Šią ir kitas specifines šių bakterijų savybes nulemia ypatinga ląstelės sienelės struktūra, kurią sudaro ilgų grandinių mikolinės rūgštys, išsišakojęs polisacharido arabinogalaktanas bei kryžminis tinklas peptidoglikanų [2, 3] (2 pav.). Taip pat bakterijų sienelėje yra baltymai porinai, per kuriuos į ląstelę gali patekti mažos hidrofilinės medžiagos, pavyzdžiui, gliukozė [8].



2 pav. Mikobakterijų ląstelės sienelės struktūra [6]

Svarbiausias ląstelės sienelės komponentas yra mikolinės rūgštys. Tai ilgos grandinės riebalų rūgštys, kurios sudaro iki 60% visos ląstelės sausosios masės [8]. Šios rūgštys pasižymi stipriomis hidrofobinėmis savybėmis, dėl to apsaugo mikobakterijų ląsteles nuo dehidratacijos, šeiminko ląstelių išskiriamų reaktyvių deguonies ir azoto medžiagų baktericidinio poveikio bei antibiotikų [5, 6]. Be to, iš mikolinių rūgščių sintetinamas trihalozės dimikolatas („cord“ faktorius), kuris inicijuoja imuninį atsaką ir granulomos formavimąsi aplink patogeną [9]. „Cord“ faktorius taip pat apsaugo makrofagų fagocituotas mikobakterijas nuo susijungimo su lizosomomis [11].

Taip pat yra pastebėta, jog AM gali formuoti biofilmo struktūras. Biofilmas – tai bakterijų, sukimbančių tarpusavyje bei su kontaktuojamu paviršiumi, grupė [12]. Tokias bakterijų grupes yra sunku sunaikinti, naudojant įprastas dezinfekcijos priemones, pavyzdžiui, chlorą [13], jos pasižymi didesniu atsparumu aukštomis antibakterinių vaistų koncentracijoms [14].



## 1.2. Atipinės mikobakterijos

Šiuo metu AM grupę sudaro daugiau nei 150 skirtingų bakterijų rūšių [15]. Jos yra plačiai paplitusios gamtoje, daugiausiai jų randama dirvožemyje bei įvairiuose vandens šaltiniuose, ežeruose, namų [16] ir ypač daug lignoninių vandentiekio sistemose [17]. Kaip tipiniai aplinkos organizmai jie nėra lepūs [18], tačiau jų išskyrimui iš tiriamosios medžiagos būtina naudoti specialias mitybines terpes [19]. Norint prislopinti šalutinės mikrofloros augimą, gali būti naudojami įvairūs antibakteriniai vaistai [19] ir malachito žaliasis dažas [20]. Kai kurioms AM reikia specifinių mitybinių terpių, pavyzdžiui, *M. haemophilum* auginimui *in vitro* į terpę dedamas amonio geležies citratas, *M. genavense* auga terpėje, kurios sudėtyje yra kraujo, anglies, kazeino ir mielių ekstrakto [19]. Yra ir tokių AM rūšių, pvz., *M. tilburgii*, kurių iki šiol nėra pavykę išauginti mitybinėse terpėse, ši rūšis identifikuojama tik atlikus 16S rRNR sekvenavimą iš pažeisto audinio [21].

Didžiąją mikobakterijų dalį optimaliausia augimo temperatūra svyruoja nuo 28°C iki 37°C laipsnių, priklausomai nuo rūšies [22]. Tačiau yra pastebėta, jog kai kurios AM rūšys yra atsparios aukštomis temperatūroms, pavyzdžiui, norint sunaikinti 90% *M. avium* kultūros, ją reikia veikti 17 valandų 50°C temperatūra [23], todėl jos gali išgyventi, jei vandentiekio sistemose yra palaikoma žemesnė temperatūra. Taip pat AM geba augti ir labai žemo pH aplinkoje, pvz., *M. avium* pH-2,2 [24].

AM priklausomai nuo savo dauginimosi greičio yra skirstomos į greitai augančias mikobakterijas (GAM) (sudaro vizualiai matomas kolonijas per 7 dienas) ir lėtai augančias (reikia ilgesnio nei 7 dienų inkubacijos laiko) bakterijų grupes. Nustatyta, kad tam tikros kliniškai svarbios lėtai augančių AM rūšys dažnai sukelia plaučių mikobakteriozes. Šiai grupei priskiriamos tokios AM rūšys kaip *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. avium* kompleksas (MAK), susidedantis iš *M. avium*, *M. intracellulare* ir *M. chimaera*. MAK be plaučių infekcijos, taip pat dažnai yra atsakingas už limfmazgių bei išplitusią infekciją [22]. Tuo tarpu kita lėtai auganti mikobakterija *M. gordonae* yra žinoma kaip dažniausiai mėginių užteršimą lemianti bakterija [22], tačiau ji taip pat gali sukelti plaučių mikobakteriozes [22, 23]. GAM grupei priskiriamos *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*. Šios grupės pagrindinis atstovas yra *M. abscessus*, kuris dažniausiai sukelia plaučių, odos, minkštųjų audinių infekciją, tuo tarpu *M. chelonae* ir *M. fortuitum* aptinkama minkštųjų audinių, kaulų infekcijos metu [19, 22].

Nors AM randamos natūralioje aplinkoje ir yra oportunistiniai patogenai žmogui, jų ląstelės sienelės savybės, biofilmų susidarymas, hidrofobiškumas, aukštos temperatūros bei žemo pH toleravimas leidžia šioms bakterijoms kolonizuoti žmogaus organizmą. AM dažniausiai patenka į žmogaus organizmą per kvėpavimo takus aerozolių pavidalu [27], tačiau gali patekti ir

iš užteršto dirvožemio ar vandens telkinio per žaizdą, operacijų metu [28] ar virškinimo traktą [24]. Patekusios į organizmo vidų, AM gali sukelti įvairias ligas, pavyzdžiui, odos ir minkštųjų audinių infekcijas, plaučių ligas, limfmazgių uždegimą, meningitą, virškinamojo trakto infekciją ar net sisteminę infekciją. Dažniausiai pasitaikantys predisponuojantys veiksniai yra struktūriniai plaučių pažeidimai, sergant lėtinėmis plaučių ligomis (cistine fibroze, lėtine obstrukcine plaučių liga (LOPL), bronhektazėmis bei kitomis ligomis), imuninės sistemos sutrikimai, žmogaus imunodeficito virusas (ŽIV), ypač kai CD4<sup>+</sup> T limfocitų kraujyje yra mažiau nei 50/μl, po transplantacijų, kai vartojami imunosupresiniai vaistai. Taip pat dažnesnės infekcijos stebimos biologinės terapijos metu naudojant interferono gama ar interliukino 12 inhibitorius, tokiais atvejais AM infekcijos rizika išauga 5-10 kartų [29].

### **1.3. Mikobakteriozių diagnostika**

Klinikinėje praktikoje AM sukeltųjų mikobakteriozių diagnostika yra ganėtinai sudėtinga, nes šie mikroorganizmai yra plačiai aplinkoje paplitę, ir vien tik bakterijos izoliavimas dar nereiškia infekcijos buvimo [30]. Norint patvirtinti, jog ligą sukėlė AM, reikia atsižvelgti į paciento klinikinių simptomų, radiologinių bei mikrobiologinių duomenų visumą.

#### **1.3.1. Klinikinė ir radiologinė mikobakteriozių diagnostika**

Plaučių mikobakteriozė yra viena dažniausių AM sukeltųjų ligų [29]. Tačiau šios ligos klinikiniai simptomai yra nespecifiniai – sausas kosulys, karščiavimas, padidėjęs prakaitavimas, dusulys, skrepliavimas, kraujo iškosėjimas, nuovargis. Žmogaus bendra sveikatos būklė progresuoja kartu su sunkėjančia AM sukelta liga. Rizika susirgti didesnė, esant struktūriniams plaučių pažeidimams, sergant lėtinėmis plaučių ligomis (lėtine obstrukcine plaučių liga, cistine fibroze, bronhektazėmis, plaučių alveoline proteinoze, pneumokonioze, po persirgtos plaučių tuberkuliozės, α1 antitripsino stokos atveju, esant krūtinės ląstos deformacijai) arba esant įgimtiems ar įgytiems imuninės sistemos sutrikimams, sergantiems genetiniais sindromais. Mikobakteriozės rizika taip pat didėja vartojant TNF α antagonistus, imunosupresinius vaistus po organų transplantacijos ar dėl autoimuninių ligų, inhaliuojamus ir sisteminius kortikosteroidus bei chemoterapinius preparatus [22].

Atliekant radiologinius tyrimus, negalima išskirti specifinių plaučių pokyčių, atitinkančių tik AM sukeltą infekciją. Krūtinės ląstos rentgenogramoje galima matyti į TB panašius rentgeninius plaučių pokyčius (plaučių viršutinių skilčių infiltracija ar (ir) ertmės). Krūtinės ląstos kompiuterinėje tomogramoje gali būti matomi židiniai plaučiuose ir/ar bronhektazės. AM

sukeltos infekcijos plaučiuose esančios ertmės yra didesnės ir jose dažniau matoma skysčio, negu sergant TB, dažniau pasitaiko pokyčių abiejuose plaučiuose [31]. Tačiau vien šių duomenų nepakanka, kad būtų galima atskirti AM sukeltos plaučių infekcijos nuo TB [22].

Išplitusios AM infekcijos metu pacientams su pažengusia ŽIV infekcija klinikiniai simptomai yra labai įvairūs ir gali būti lengvai priskiriami kitoms infekcijoms. Dažniausi simptomai, sergant išplitusia MAK infekcija yra karščiavimas (80%), naktinis prakaitavimas (35%) ir svorio kritimas (25%) [22].

AM, sukeliančios limfmazgių uždegimą, paprastai lieka vienoje vietoje ir neplinta. Dažniausiai liga yra lengvos formos, yra stebimi padidėję pažeisti limfmazgiai, tačiau kitų negalavimų pacientai nejaučia [19].

Odos, minkštųjų audinių ir kaulų AM infekcija dažniausiai pasireiškia po durtinių žaizdų, atvirų traumų, lūžių ar operacinių procedūrų. Dažniausiai infekcijos vietoje yra sukeliamas uždegimas ir gali formuotis abscesas, daugumoje atvejų dėl GAM [22].

### **1.3.2. Mikobakteriozių laboratorinė diagnostika**

Mikobakteriozių laboratorinė diagnostika apima kelis atskirus tyrimus: RAB aptikimas tepinėlyje, grynos AM kultūros išauginimas, naudojant skystąsias ir standžiąsias mitybines terpes ir išskirtos kultūros identifikavimas biocheminiais ar molekuliniais metodais. Atliekant šiuos tyrimus, svarbu prisiminti, jog AM yra plačiai paplitusios aplinkoje, todėl visada yra galimas paciento ėminių užteršimas aplinkos saprofitinėmis AM. Dažnai pasitaiko, kad skreplių ėminiai yra užteršiami čiaupo vandens saprofitinėmis AM, kai pacientai praskalauja burną prieš surenkant ėminį [32] arba kai atliekama bronchoskopo ar kitų prietaisų dezinfekcija, naudojant mikobakterijomis kolonizuotą vandenį [33].

#### **1.3.2.1. Mikrobiologiniai tyrimai**

Vienas iš dažniausiai AM aptikimui naudojamų mikrobiologinių tyrimų yra RAB mikroskopijos tyrimas. Atliekant šį tyrimą, tiriamosios medžiagos tepinėlius rekomenduojama dažyti fluorochrominiais dažais ir tirti fluorescenciniu mikroskopu arba dažyti Cylio-Nilseno būdu ir tirti šviesiniu mikroskopu [34]. Vis dėlto, tepinėlyje aptikus RAB, negalima diferencijuoti AM ir *M. tuberculosis* kompleksui priklausančių mikobakterijų, todėl būtina atlikti kitus papildomus tyrimus (nustatyti AM rūšį), kad patvirtinti mikobakteriozės diagnozę [34].

Vadovaujantis naujausiomis Amerikos krūtinės chirurgų draugijos (angl. *American Thoracic Society*, ATS) ir Amerikos infekcinių ligų draugijos (angl. *Infectious Diseases Society of America*, IDSA) rekomendacijomis, diagnozuojant plaučių mikobakteriozes, reikia mažiausiai

trijų skreplių ar kitos tiriamosios medžiagos ėminių, paimtų skirtingomis dienomis, geriausiai surinktus iš ryto, kad būtų galima diagnozuoti AM sukeltą infekciją [22].

Grynos AM kultūros išauginimas pasėlyje yra esminis mikobakteriozės diagnostinis kriterijus. Vis dėlto, pasėlyje išaugintos AM turi klinikinę reikšmę tik tuo atveju, kai pacientui yra išaugusios trys kultūros iš mikroskopiškai neigiamų ėminių, arba dvi kultūros iš ėminių, iš kurių bent vienas yra mikroskopiškai teigiamas, arba AM išauga pasėlyje iš BAL ar sterilių ėminių (smegenų skysčio, biopsinės medžiagos ir pan.).

AM *in vitro* sąlygomis yra auginamos skystose ir standžioje mitybinėje terpėje [22], nes tokiu būdu vidutiniškai 15% padidėja AM aptikimo tikimybė, nei auginant sukėlėją tik skystoje mitybinėje terpėje [35]. Plačiausiai AM auginimui yra naudojama Bactec MGIT (Becton Dickinson, Sparks, MD) bakterijų kultivavimo sistema, naudojanti skystas terpes. Bactec MGIT auginimo mėgintuvėliuose yra fluorescuojantis junginys, kurio fluorescencija yra slopinama deguonies. Kai šiuose mėgintuvėliuose dauginasi mikobakterijos, jos sunaudoja deguonį, todėl gautas fluorescencijos signalas stiprėja, fiksuodamas kultūros augimą. Skystoje mitybinėje terpėje AM auga vidutiniškai 15 dienų, tačiau šis laikas gali svyruoti nuo 5 iki 22 dienų, priklausomai ar tai lėtai augančios ar GAM [27, 28]. AM auginimui pasėlyje taip pat naudojamos ir standžiosios mitybinės terpės: Levenšteino-Jenseno, MiddleBrook 7H10 ir 7H11 mitybinės terpės [22]. AM kultūra, išauginta standžioje mitybinėje terpėje, gali būti įvertinta morfologiškai ir kiekybiškai, atskiriamas mišrių kultūrų augimas, tačiau AM izoliavimo jautrumas yra mažesnis, lyginant su skystomis mitybinėmis terpėmis [29, 30], be to kultūros augimas trunka nuo 21 iki 50 dienų [35].

### **1.3.2.2. Atipinių mikobakterijų identifikavimas**

Standžioje ar skystoje terpėje išaugintas AM yra būtina identifikuoti iki rūšies biocheminiais ar molekuliniais metodais, kadangi skirtingos AM rūšys pasižymi skirtingu atsparumu antibakteriniams vaistams [39], be to skirtingų mikobakterijų sukeltos mikobakteriozės gydymas skirtingais vaistų deriniais nei TB [22].

Tradicškai AM kultūros gali būti identifikuojamos pagal augimo greitį (GAM, lėtai augančios mikobakterijos), kolonijų pigmentaciją ir AM biocheminius rodiklius. Tačiau šiems identifikacijos metodams dažnai trūksta atkartojamumo dėl pačių mikobakterijų fenotipinio variabilumo, taip pat turimos duomenų bazės yra nepakankamos naujai atsirandančių mikobakterijų rūšių identifikacijai [40]. Be to, norint identifikuoti mikobakterijas biocheminiais metodais, rezultatų reikia laukti papildomai 3-6 savaites. Dėl visų šių ištyrimo trūkumų klinikinės TB laboratorijos dabartiniu metu beveik nebenaudoja tradicinių identifikavimo metodų ir yra perėjusios prie greitesnių molekulinėlių metodų.

Pastaruosius 10 metų publikacijose gausiai kalbama apie pigų ir labai greitą mikobakterijų identifikavimo metodą MALDI-TOF – tai ant matricos vykstanti, lazerio spinduliuote sužadinta desorbcija/ionizacija su lėkio trukmės matavimu [33–35]. Šiuo metu identifikacijos tikslumas labai priklauso nuo turimos duomenų bazės, pagal kurią lyginami MALDI-TOF gauti duomenys, todėl identifikacijos tikslumas svyruoja nuo 25% iki 90% [44].

Dabartiniu metu klinikinėse laboratorijose mikobakterijų identifikacijai yra naudojami komerciniai mikobakterijų identifikavimo rinkiniai, kuriuose naudojami deoksiribonukleorūgščių (DNR) zondai. Visi šie rinkiniai yra paremti nukleorūgščių pagausinimu ir atvirkštine hibridizacija. Vienas tokių komercinių rinkinių yra Hain Lifescience (Nehren, Vokietija) gamintojo GenoType® Mycobacterium CM ir GenoType® Mycobacterium AS. Mikobakterijas identifikuojant šiais rinkiniais yra atliekamas 23S rRNR geno pagausinimas ir pagausintų produktų atvirkštinė hibridizacija prie nitroceliuliozinės juostelės, kurioje yra fiksuoti specifiniai zondai, atitinkantys tam tikras mikobakterijų rūšis. GenoType® Mycobacterium CM ir AS rinkinių pagalba galima diferencijuoti iki 15 dažniausiai sutinkamų kliniškai svarbių mikobakterijų rūšių, tarp jų ir *M. tuberculosis*, ir 16 papildomų retesnių AM rūšių. Vis dėlto, šių komercinių rinkinių kai kurių zondu specifiskumas nesiekia 100% ir yra galimos kryžminės reakcijos, todėl rūšys identifikuojamos neteisingai. Taip dažniausiai pasitaiko genetiškai panašioms ir retesnėms mikobakterijų rūšims [45].

Mikobakterijų konservatyvių genų sekvenavimas išlieka pagrindiniu metodu, norint identifiкуoti mikobakterijų rūšį. Genų sekvenavimui yra pasirenkami tokie mikobakterijų genų regionai kaip 16S rRNR [46], 65 kDa karščio šoko baltymai (*hsp65* genas) [47], RNR polimerazės β-subvienetas (*rpoB* genas)[48] ir superoksidazės dismutazė (*sodA* genas)[48].

#### **1.4. Atipinių mikobakterijų atsparumas antibakteriniams vaistams ir jį lemiantys genai**

AM sukelta infekcija ne visuomet gydytina. Gydomo taktikos pasirinkimas priklauso nuo ligos pasireiškimo klinikinės formos bei sukėlėjo rūšies. Yra nustatyta, kad AM yra ganėtinai atsparios antibakteriniams vaistams, todėl dažniausiai skiriamas empirinis gydymas pirmos eilės antituberkuliozinių (izoniazidas, etambutolis, rifampicinas, rifabutinas) vaistų ir makrolidų deriniu. Papildomai gali būti skiriama aminoglikozidų arba fluorochinolonų [31]. Visų AM sukeltų infekcijų atveju gydymas tęsiamas dar 12 mėnesių po to, kai skrepliuose ar kitoje tiriamojoje medžiagoje AM neberandama, ar esant neabejotinam klinikiniam pagerėjimui [22]. Dėl tokio ilgai trunkančio gydymo AM gali įgyti atsparumą vartojamiems antibakteriniams vaistams. Pavyzdžiui,

yra duomenų, jog *M. avium* komplekso mikobakterijos po makrolidinės monoterapijos mutuoja ir įgyja atsparumą makrolidiniams antibiotikams [49].

JVT išlieka kebliu klausimu klinikinėms laboratorijoms, kadangi kai kurių vaistų (rifampicino, etambutolio ir kt. priklausomai nuo bakterijų rūšies) efektyvumas *in vivo* ir *in vitro* skiriasi [22]. Tačiau yra pastebėta patikima koreliacija tarp MAK ir amikacino bei makrolidinių antibiotikų, bei tarp *M. kansasii* ir rifampicino [50], todėl AST/IDSA rekomenduoja atlikti antibakterinių JVT tarp MAK ir klaritromicino, *M. kansasii* ir rifampicino, bei tarp GAM ir klaritromicino, amikacino ir kitų vaistų [22]. Kiti autoriai siūlo visai neatlikti AM JVT, nes gaunami rezultatai gali suklaidinti ir parodyti klaidingą jautrumą (vedantį prie nesėkmingo gydymo) arba atsparumą (vedantį prie efektyvių vaistų nenaudojimo gydymui), išskyrus atvejus, kai ėminys gautas iš sterilios vietos, infekcijos atkryčio metu, įtariant įgytą bakterijų atsparumą, ir ATS/IDSA rekomenduojamais atvejais [51].

Dažniausiai AM atsparumą makrolidiniams antibiotikams nulemia viena iš mutacijų, esanti *rrl* geno A2058 ir A2059 padėtyse [52]. Šis genas koduoja 23S rRNR subvieneto peptidiltransferazės domeną. Dėl nukleotidų pakaitos iš adenozino į guanoziną, citoziną arba uracilą, priklausomai nuo nukleotido, makrolidiniai antibiotikai gali nesudaryti patvarios jungties arba visiškai nesijungti prie rRNR, ir nebeslopinti baltymų sintezės šiuose organizmuose [43, 44].

Visos bakterijos, tarp jų ir AM, gali turėti įgimtą atsparumą kai kuriems vaistams. Vienas iš įgimtų būdų apsisaugoti nuo makrolidinių antibiotikų - indukuoti *erm* geną. Iš viso yra žinomi 44 *erm* genai, besiskiriantys tarpusavyje priklausomai nuo bakterijų rūšies [55]. Iš visų *erm* genų, 4 yra priskiriami AM: *erm*(38) genas priklauso *M. smegmatis*, *erm*(39) – *M. fortuitum*, *erm*(40) - *M. magiritense* [56] ir *erm*(41) – *M. abscessus* subps. *abscessus* ir *M. abscessus* subsp. *bolletii* [57]. *erm* genai koduoja rRNR metilazes, kurios prijungia metilo grupę prie 23S rRNR peptidiltransferazės adenino, taip sutrukdant makrolidų prisijungimą prie ribosomos. Tačiau AM, turinčios šio geno iškritą, pvz., *M. abscessus* subsp. *massiliense* [57], arba turinčios taškinę mutaciją T→C 28-oje geno pozicijoje, yra jautrios makrolidiniams antibiotikams [52], išskyrus atvejus, kai yra mutacija *rrl* gene.

AM atsparumą aminoglikozidiniams vaistams gali lemti mutacijos *rrs* gene, kuris koduoja 16S rRNR subvienetą [58]. Tačiau nustačius mutaciją *rrs* gene, dar nereiškia, kad mikobakterijos bus atsparios visiems aminoglikozidiniams vaistams, pavyzdžiui, *M. abscessus*, turintis *rrs* geno mutaciją 1408 pozicijoje, yra atparus amikacinui ir kanamicinui, tačiau jautrus streptomycinui [59].

## 2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

### 2.1. Tyrimo medžiaga

Tyrimas buvo atliekamas VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Tuberkuliozės tyrimų laboratorijoje (TTL) nuo 2015 m. balandžio mėnesio iki 2018 m. sausio mėnesio. Tyrimo metu atlikta 166 AM retrospektyvinė laboratorijos duomenų analizė, įvertintas AM paplitimas, rūšinė įvairovė. PGR metodu nustatytas *M. avium* komplekso, *M. abscessus* komplekso bei *M. chelonae* mikobakterijų atsparumas makrolidiniams ir aminoglikozidiniams antibiotikams. Iš viso ištirta 51 kultūra.

Tyrimui buvo naudotos AM kultūros, išaugintos TTL skystoje ar standžioje mitybinėse terpėse iš pacientų, kuriems įtariama mikobakteriozė, skreplių, bronchų aspirato, bronchų alveolinio lavažo arba pooperacinės medžiagos ėminių. Taip pat nedidelė dalis tirtų AM kultūrų buvo atgabentos į TTL iš kitų tuberkuliozės laboratorijų. Tyrimas buvo atliekamas trimis etapais: 1) iš grynos kultūros išskiriama genomine DNR; 2) atliekamas DNR pagausinimas; 3) pagausintos DNR atvirkštinė hibridizacija ant nitroceliuliozinių juostelių.

DNR išskyrimą bei rūšies nustatymą atliko ir įvertino TTL darbuotojai.

### 2.2. Laboratorinė įranga ir naudojami reagentai

AM genomines DNR išskyrimas atliekamas naudojant GenoLyse® VER 01 (Hain LifeScience, Vokietija, katalogo Nr. IFU-51610-08) komercinį rinkinį. Rinkinio sudėtis pateikta 1 lentelėje.

1 lentelė. „GenoLyse® VER 1.0 Kit for Extraction of Bacterial DNA“ rinkinio sudėtis

DNR išskyrimo rinkinio komponentai	Kiekis rinkinyje
Lizės buferis (A-LYS) Sudėtis: 1% ne anijoninė paviršiaus aktyvi medžiaga (PAM), <0,2% NaOH, dažas	2 ml
Neutralizuojantis buferis (A-NB) Sudėtis: buferis	2 ml

Genomines DNR išskyrimui reikalinga papildoma įranga ir priemonės pateiktos 2 lentelėje.

2 lentelė. Papildoma įranga ir priemonės DNR išskyrimui

<b>Priemonės pavadinimas</b>
Laboratorinė centrifuga (Eppendorf centrifuge 5415 R)
Biologinės saugos spinta su HEPA filtru
Dozatoriai 10-100 µl tūriams
Kaitintuvas (sausos karščio termoblokas)
Purtyklė
Atliekų konteineris
Laikmatis
Sterilios 1 µl kilpelės
Sterilios 3 ml Pastero pipetės
Absorbuojantis popierius
Vienkartiniai sterilūs 2-120 µl antgaliai su filtru
Stovėlis mėgintuvėliams
Sterilūs 1,5 ml talpos centrifuginiai mėgintuvėliai
Dezinfektantas
Vienkartinės apsaugos priemonės (pirštinės, chalatas, kepuraitė, 3M respiratorius su HEPA filtru)

AM DNR pagausinimas ir PGR produktų atvirkštinė hibridizacija atliekami komerciniu rinkiniu GenoType® NTM-DR VER 1.0 (Hain LifeScience, Vokietija, katalogo Nr. IFU-297-01). Rinkinio sudėtis pateikta 3 lentelėje.



3 lentelė. GenoType® NTM-DR VER 1.0 reagentai ir jų sudėtis

<b>PGR reakcijos rinkinio komponentai</b>	<b>Kiekis rinkinyje</b>
Pagausinimo mišinys A (AM-A) Sudėtis: buferis, nukleotidai, Taq polimerazė	0,15 ml
Pagausinimo mišinys B (AM-B) Sudėtis: druskos, specifiniai pradmenys, dažas (violetinės spalvos)	0,53 ml
<b>Hibridizacijos reakcijos rinkinio komponentai</b>	
Nitroceliuliozinės juostelės (STRIPS), padengtos specifiniais žymenimis	12
Denatūravimo tirpalas (DEN), dažytas (mėlynos spalvos) Sudėtis: <2% NaOH	0,3 ml
Hibridizacijos buferis (HYB), dažytas (žalios spalvos) Sudėtis: 8-10% anijoninė PAM	20 ml
Plovimo tirpalas (STR), dažytas (raudonos spalvos) Sudėtis: >25% ketvirtinių amonio junginių, <1% anijoninė PAM	20 ml
Skalavimo tirpalas (RIN) Sudėtis: buferis, <1% NaCl, <1% anijoninė PAM	50 ml
Koncentruotas konjugatas (CON-C), Sudėtis: dažas (oranžinės spalvos), streptavidinu konjuguota šarminė fosfatazė	0,2 ml
Konjugato buferis (CON-D) Sudėtis: buferis, <1% blokuojantys reagentai, <1% NaCl	20 ml
Koncentruotas substratas (SUB-C) Sudėtis: <70% dimetilsulfoksidas, <10% 4-nitrotetrazolio chloridas, <10% 5-brom-4-chlor-3-indolilfosfatas	0,2 ml
Substrato buferis (SUB-D) Sudėtis: buferis, <1% MgCl <sub>2</sub> , <1% NaCl	20 ml
Vertinimo lapas	1
Plokštelė hibridizacijai	1

DNR pagausinimui ir atvirkštinei hibridizacijai reikalinga įranga ir priemonės pateiktos 4 lentelėje.

4 lentelė. Papildoma įranga ir priemonės DNR pagausinimui ir atvirkštinei hibridizacijai.

<b>Priemonės pavadinimas</b>
Termopurtyklė (TwinCubator, Hain LifeScience, Gmbh, Vokietija)
Termocikleris (Labcyler SensoQuest Gmbh, Vokietija)
Dozatoriai 10, 20, 200 ir 1000 µl tūriams
Laikmatis
Absorbuojantis popierius
Aliuminio folija
Sterilūs 20, 200 ir 1000 µl dozatorių antgaliai su filtru
PGR mėgintuvėliai, be DNazių ir RNazių
Pincetas
Atliekų konteineris

## **2.3. Tyrimo metodai**

### **2.3.1. Genominės DNR išskyrimas iš atipinių mikobakterijų kultūrų**

Genominės DNR išskyrimas buvo atliekamas TTL bakteriologinių tyrimų patalpose, griežtai laikantis darbų saugos reikalavimų.

DNR išskyrimas vykdomas iš skystos (Bactec MGIT 960) arba iš standžios (Levenšteino-Jenseno) mitybinių terpių. Izoliuojant DNR iš Bactec MGIT terpės, pirmiausiai 1 ml skystos terpės su bakterijų kultūra yra perkeliama į sterilų centrifugavimo mėgintuvėlį ir centrifuguojamas 15 min. 10 000 x g aeroliams atspariame rotoriuje. Po centrifugavimo supernatantas pašalinamas ir į susidariusias nuosėdas įpilamas 100 µl A-LYZ, ir tirpalas sumaišomas purtykle. Dirbant su standžia terpe, prieš tai aptarti žingsniai praleidžiami, ir 1-2 bakterijų kultūros kolonijos perkeliamos tiesiai į 100 µl A-LYZ buferį ir išmaišoma purtyklėje. Toliau DNR išskyrimo eiga yra vienoda kultūroms, išaugintoms ant abiejų tipų terpių. Gautas tirpalas yra inkubuojamas kaitintuve 95 °C temperatūroje 5 min. Po inkubacijos į mėginį įpilamas neutralizacijos buferis A-NB. Mėginys vėl centrifuguojamas 5 min. 16000 x g. Po centrifugavimo supernatantas perkeliamas į kitą mėgintuvėlį ir, jei iš karto nenaudojamas PGR tyrimams, laikomas -20 °C temperatūroje.

### 2.3.2. Genominės DNR pagausinimas

PGR buvo atliekama TTL molekulinų tyrimų patalpose. Prieš darbą laminarinė spinta apšvitinama ultravioletine (UV) šviesa ir darbo vieta išvaloma 1% hipochlorito rūgšties tirpalu dėl kryžminės taršos PGR produktais.

Vienai pagausinimo reakcijai sumaišomi 10 µl AM-A ir 35 µl AM-B reagento. Atskiroje patalpoje į mišinį įdedama 5 µl tiriamosios DNR, kad bendras tūris būtų 50 µl. Kaip neigiama kontrolė naudojama 5 µl vandens PGR tyrimams. Pagausinimas atliekamas termociklieriu pagal 5 lentelėje pateiktas sąlygas. Po pagausinimo, jei PGR produktai iš karto nenaudojami tolimesnei analizei, jie yra laikomi -20 °C temperatūroje.

5 lentelė. PGR atlikimo sąlygos

Žingsniai	Reakcijos trukmė	Temperatūra	Ciklų skaičius
1	15 min.	95°C	1 ciklas
2	30 sek.	95°C	10 ciklų
3	2 min.	65°C	
4	25 sek.	95°C	
5	40 sek.	50°C	20 ciklų
6	40 sek.	70°C	
7	8 min.	70°C	1 ciklas

### 2.3.3. Atvirkštinė hibridizacija

Pagausintų DNR produktų hibridizacija ant nitroceliuliozinių juostelių yra atliekama naudojant GenoType® NTM-DR VER 1.0 (Hain LifeScience, Vokietija) komercinį rinkinį. Šio rinkinio metodas yra grindžiamas DNA-STRIP® technologija. Nitroceliuliozinės juostelės yra padengtos aukšto specifiškumo žymenimis, kurie yra komplementarūs selektyviai pagausintai DNR sekai. Hibridizacijos metu tiriamos specifinės viengrandės DNR sekos prisijungia prie juostelėje esančių žymenų, tuo tarpu pašalinės sekos yra nuplaunamos ir pašalinamos. Konjugacijos reakcijos metu prie specifiškai prisijungusios DNR grandinės yra pritvirtinama šarminė fosfatazė, kuri naudojant substratą duoda spalvinę reakciją.

GenoType® NTM-DR VER 1.0 rinkiniu nustatomas tokių kliniškai svarbių AM kaip *M. avium* komplekso (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*), *M. abscessus* komplekso (*M.*

*abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*) bei *M. chelonae* atsparumas makrolidiniams ir aminoglikozidiniams antibiotikams ir ši atsparumą lemiančios genų mutacijos. Makrolidiniams antibiotikams atsparumas nustatomas esant mutacijoms *erm(41)* bei *rml*, o aminoglikozidiniams – *rrs* genuose.

Į hibridizacijai skirtą plokštelę su šulinėliais įpilama 20 µl denatūravimo tirpalo (DEN) (atskiram šulinėlyje tiriamas atskiras mėginys), 20 µl amplifikuotos DNR, mišinys sumaišomas ir inkubuojamas 5 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos į šulinėlį įpilama 1 ml hibridizacijos buferio (HYB) ir į tirpalą su pincetu įdedamos nitroceliuliozinės juostelės, padengtos specifiniais žymenimis. Juostelės inkubuojamos termopurtyklėje (TwinCubator) 30 min. 45 °C temperatūroje. Po to tirpalas pašalinamas ir į šulinėlį įpilamas plovimo skystis (STR). Juostelės inkubuojamos termopurtyklėje 15 min. 45 °C. Tirpalas pašalinamas ir į šulinėlį pilama 1 ml skalavimo mišinio (RIN), inkubuojama termopurtyklėje 1 minutę kambario temperatūroje. Po inkubacijos pašalinamas RIN, įpilamas 1 ml praskiesto konjugato tirpalo (CON) ir inkubuojama 30 min. termopurtyklėje kambario temperatūroje. Po to pašalinamas tirpalas ir juostelės plaunamos RIN tirpalu ir 1 min. inkubuojamos, tai atliekama du kartus. Visiškai pašalinus RIN, juostelės inkubuojamos 1 min. distiliuotame vandenyje kambario temperatūroje ir po inkubacijos vanduo visiškai pašalinamas. Toliau įpilamas 1 ml. praskiesto substrato tirpalo (SUB) ir inkubuojama kambario temperatūroje kol juostelių kontrolinės zonos yra aiškiai matomos, uždengiant juosteles folija, kad jų neveiktų tiesioginė saulės šviesa. Priklausomai nuo aplinkos sąlygų tai gali užtrukti nuo 3 iki 20 min. Reakcija staigiai sustabdoma kelis kartus praplaunant juosteles distiliuotu vandeniu.

#### **2.3.4. Atvirkštinės hibridizacijos rezultatų vertinimas**

Po hibridizacijos nitroceliuliozinės juostelės nusausinamos absorbuojančiu popieriumi ir priklijuojamos ant tam skirtų vertinimo lapų (Priedas 1) ir saugomos nuo saulės šviesos. Dėl techninių priežasčių, atstumai tarp žymenų ant juostelės gali varijuoti. Tiksliam rezultato įvertinimui, naudojama rinkinyje esanti įvertinimo kortelė (Priedas 2).

Kiekvienoje juostelėje yra 24 specifiniai žymenys:  
CC – konjugacijos kontrolė;  
UC – universali kontrolė;  
SP1-SP10 – mikobakterijų rūšies specifiniai žymenys;  
*erm(41)* – lokuso kontrolė;  
*erm(41)* C28 – mutacijos žymuo;  
*erm(41)* T28 – mutacijos žymuo;  
*rml* – lokuso kontrolė;  
*rml* WT – laukinio tipo žymuo;  
*rml* MUT1-MUT4 – mutacijos žymuo;

*rrs* – lokuso kontrolė;  
*rrs* WT – laukinio tipo žymuo;  
*rrs* MUT1 - mutacijos žymuo.

Konjugacijos kontrolės (CC) zonoje išryškėjęs ruoželis rodo konjugato prijungimo ir substrato reakcijų efektyvumą.

Universalios kontrolės (UC) zona aptinka visas mikobakterijas ir kitas gramteigiamas bakterijas su dideliu G+C nukleotidų skaičiumi.

Rūšiai specifinės zonos (SP) padeda nustatyti kuriai mikobakterijų rūšiai priklauso tiriamos mikobakterijos DNR.

Lokuso kontrolinės zonos (*erm(41)*, *rml*, *rrs*) nustato ar yra tam tikro geno regionas tiriamoje DNR sekoje. *erm(41)* genas yra nustatomas tik *M. abscessus* komplekso mikroorganizmuose, todėl esant kitai mikobakterijai ši zona nenusidažo.

Nusidažant *erm(41)* C28 juostelei tiriamoje bakterijos padermėje *erm(41)* geno 28 pozicijoje yra C nukleotidas. Tai rodo, jog organizmas yra jautrus makrolidiniams antibakteriniams vaistams, išskyrus atvejus, kai yra mutacijų *rml* gene. Bakterijos turi atsparumą makrolidams, kai *erm(41)* gene 28 pozicijoje yra timino (T) nukleotidas. *erm(41)* C28 ir *erm(41)* T28 zonos yra svarbios tik *M. abscessus* subsp. *abscessus* ir *M. abscessus* subsp. *bolletii*, bet ne *M. abscessus* subsp. *massiliense* dėl šios rūšies gene įvykusios iškritos, kuri lemia jautrumą makrolidams ir esant 28 geno pozicijoje T nukleotidui, išskyrus atvejus, kai yra *rml* geno mutacijų.

Nusidažiusios *rml* laukinio tipo zonos rodo, jog tiriamą bakterijų padermę yra jautri makrolidams. Tuo tarpu bet kurios genų mutacijos išryškėjimas rodo bakterijų atsparumą makrolidiniams antibiotikams.

Nusidažius *rrs* WT zonai yra nustatomas tiriamos AM jautrumas aminoglikozidams, o išryškėjęs mutacijos ruoželiui, vertinama, kad padermė yra atspari šiems antibakteriniams vaistams.

Interpretacijos vertinimo pavyzdžiai pateikiami 3 priedų lape.

## **2.4. Statistinė analizė**

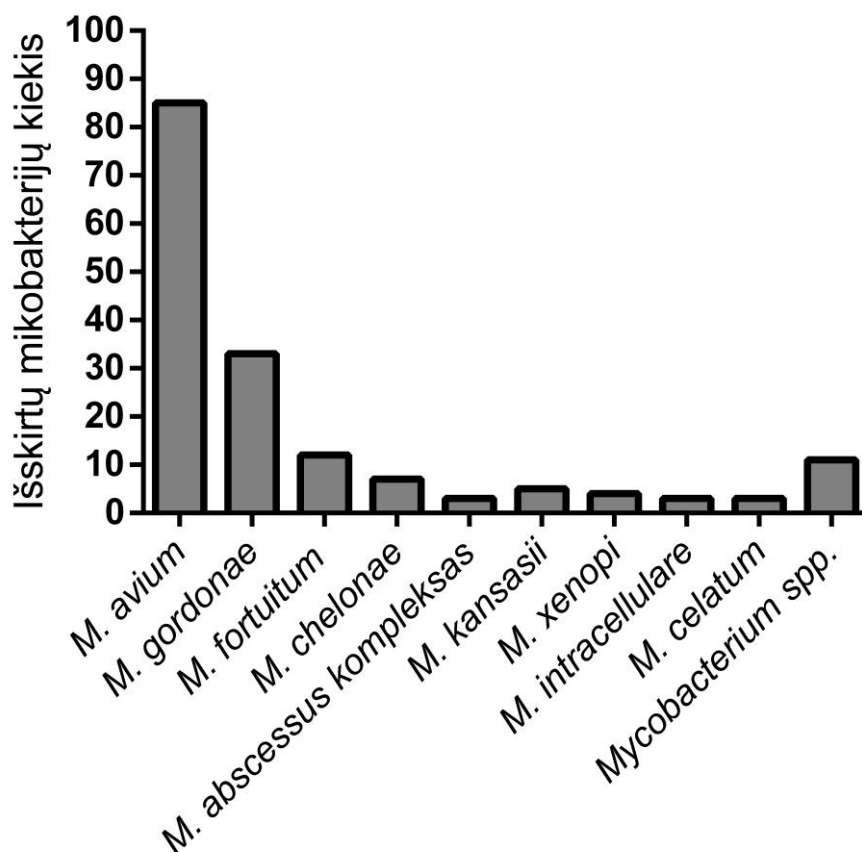
Aprašomoji statistika ir kiti statistiniai skaičiavimai buvo atlikti naudojant RStudio (versija 1.0.136) statistikos paketą. Lyginant pacientų amžių tarp lyčių buvo naudojamas Mano-Vitnio-Vilkoksono rangų sumų kriterijus nepriklausomoms imtims.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Nustatytų kliniškai svarbių atipinių mikobakterijų paplitimas ir įvairovė

Tyrimo metu buvo retrospektyviai išanalizuoti VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro TTL duomenys apie 2015-2018 metais izoliuotas AM, atsižvelgiant į išskirtą rūšį, paciento lytį bei amžių.

Iš viso laboratorijoje 2015-2018 metais iš 132 ligonių skreplių, bronchoalveolinio lavažo, bronchų aspirato, bronchų nuoplovų, pooperacinės medžiagos ėminių buvo išskirtos 166 AM kultūros, iš kurių 155 buvo identifikuotos iki rūšies/komplekso lygio, likusios 11 buvo identifikuotos tik kaip bakterijos, priklausančios *Mycobacterium* genčiai (3 paveikslas), t.y. rūšis nenustatyta (*Mycobacterium spp.*). Iš 155 identifikuotų AM didžiąją dalį mikroorganizmų sudarė *M. avium* – 51,2% (N=85), *M. gordonae* – 19,9% (N=33) bei *M. fortuitum* 7,2% (N=12). Kitos išskirtos AM buvo: *M. abscessus* kompleksas – 1,8% (kurį sudarė *M. abscessus* (N=1), kuriai nebuvo nustatytas porūšis, *M. abscessus* subsp. *abscessus* (N=1), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (N=1)), *M. chelonae* 4,2% (N=7), *M. kansasii* 3% (N=5), *M. xenopi* 2,4% (N=4), *M. intracellulare* 1,8% (N=3), *M. celatum* 1,8% (N=3).



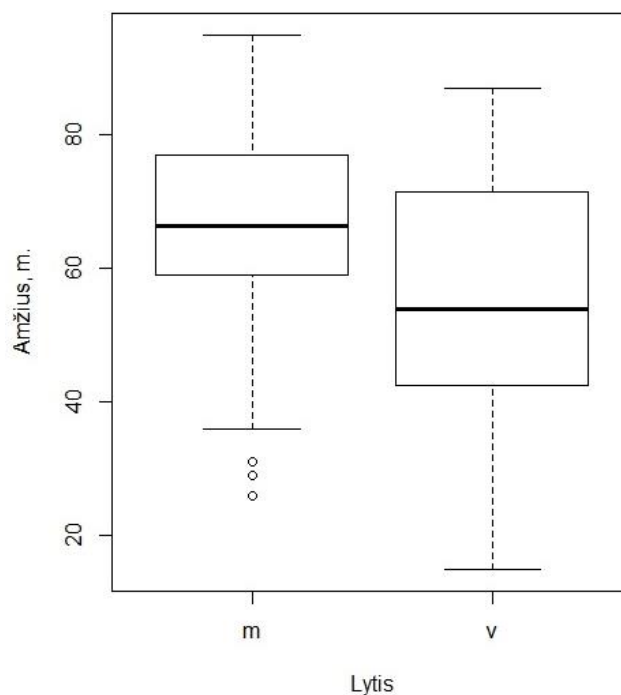
3 pav. Nustatytos AM rūšys ir jų paplitimas (N=166)

Didžiąją ėminių dalį, iš kurių buvo išskirtos AM, sudarė skrepliai – 71,1% (6 lentelė). 11 kultūrų skystoje arba standžioje mitybinėje terpėje, iš kurių identifikuota AM rūšis, buvo atgabentos į TTL iš kitų gydymo įstaigų (siuntime nebuvo pažymėta iš kokio ėminio atliktas pasėlis). Apibendrinant, dauguma ėminių, iš kurių buvo išaugintos ir identifikuotos AM, buvo respiraciniai, išskyrus vieną, kuris buvo iš pooperacinės medžiagos.

6 lentelė. Ėminiai, iš kurių buvo išskirtos AM

	Bronchų aspiratas	Bronchų nuoplovos	BAL	Kultūra	Pooperacinė medžiaga	Skrepliai
<i>M. avium</i>	8	2	17	6	1	51
<i>M. gordonae</i>	3	—	—	1	—	29
<i>M. fortuitum</i>	—	—	2	—	—	10
<i>M. chelonae</i>	—	—	—	3	—	4
<i>M. abscessus</i>	—	—	—	—	—	3
<i>kompleksas</i>						
<i>M. kansasii</i>	2	—	1	—	—	2
<i>M. xenopi</i>	—	—	—	1	—	3
<i>M. intracellulare</i>	—	—	—	—	—	3
<i>M. celatum</i>	—	—	1	—	—	2
<i>Mycobacterium spp.</i>	—	—	—	—	—	11
Iš viso	13 (7,8%)	2 (1,2%)	21 (12,7%)	11 (6,6%)	1 (0,6%)	118 (71,1%)

Atliekant retrospektyvinę AM duomenų analizę, įvertinti pacientų lytis ir amžius. Iš 132 pacientų 73 buvo moterys (55,3%) ir 59 – vyrai (44,7%). Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp lyčių nebuvo. Pacientų amžiaus mediana (3 ir 1 kvartilų skirtumas) buvo 61,3 m. (76 – 52 m.). Lyginant pacientų amžių tarp lyčių nustatyta, jog vyrų amžius buvo statistiškai reikšmingai mažesnis – 55,6 m. (71 – 42 m.) nei moterų – 66,1 m. (77 – 59 m.),  $p=0,00088$  (4 paveikslas).



4 pav. Pacientų, kuriems buvo izoliuota AM, amžiaus pasiskirstymas tarp lyčių

### 3.2. PGR metodo rezultatai

PGR metodu tirtos 5 skirtingos AM rūšys: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* ir *M. chelonae*. Viso PGR metodu ištirta 51 AM kultūra. Tyrimo metu buvo vertintos *erm(41)*, *rrl* ir *rrs* genų mutacijos, kurios siejamos su AM atsparumu makrolidiniams bei aminoglikozidiniams antibiotikams. PGR tyrimo rezultatai kiekvienai AM rūšiai pateikiami 7 lentelėje, vizualiai jie parodyti 5 paveiksle.

Ištirus 51 AM kultūrą nustatyta, kad absoliuti dauguma tirtų padermių buvo jautrios makrolidams ir aminoglikozidams, kadangi *rrl* ir *rrs* genų mutacijų regionuose nebuvo stebima teigiama hibridizacija. Išimtį sudarė dvi AM rūšys – *M. abscessus* subsp. *abscessus* ir *M. abscessus* subsp. *bolletii*, kurioms buvo nustatytas T nukleotidas *erm(41)* geno 28 pozicijoje, lemiantis atsparumą makrolidams (5 paveikslas, 1 ir 4 juostelės).

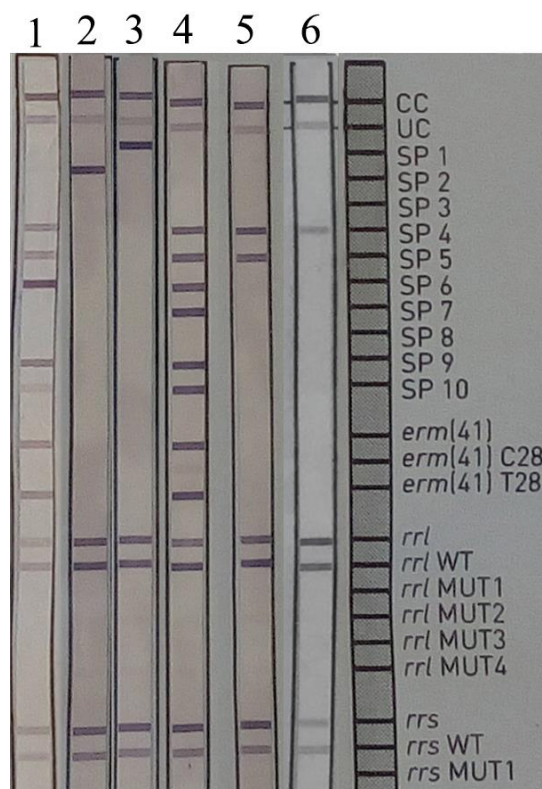


7 lentelė. PGR metodo rezultatai

Mikobakterijos rūšis	Ištirtų AM skaičius	<i>erm(41)</i>	<i>rrl</i>		<i>rrs</i>	
			WT*	Mutacija	WT	Mutacija
<i>M. avium</i>	40	nėra	40	0	40	0
<i>M. intracellulare</i>	2	nėra	2	0	2	0
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	1	T28	1	0	1	0
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	1	T28	1	0	1	0
<i>M. chelonae</i>	6	nėra	6	0	6	0
Iš viso	51		51	0	51	0

Pastaba: WT\* – laukinis tipas (angl. *wild type*)

Viena kultūra, prieš tai identifikuota GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 rinkiniu kaip *M. avium*, PGR tyrimo metu GenoType NTM-DR rinkiniu buvo identifikuota kaip kita mikobakterijų rūšis (*Mycobacterium spp.*), kadangi teigiamą hibridizaciją rodė tik SP 4 iš rūši identifikuojančių ruoželių nitroceliuliozinėje juostelėje (5 paveikslas, 6 juostelė).



5 pav. PGR tyrimo atvirkštinės hibridizacijos rezultatai. 1 juostelė – *M. abscessus* subsp. *abscessus*, 2 juostelė – *M. intracellulare*, 3 juostelė – *M. avium*, 4 juostelė – *M. abscessus* subsp. *bolletii*, 5 juostelė – *M. chelonae*, 6 juostelė – *Mycobacterium spp.*

### 3.3. Rezultatų aptarimas

#### 3.4.1. Retrospektyvinės analizės rezultatų aptarimas

Pastaruoju metu AM sukeltos infekcijos sulaukia vis daugiau dėmesio dėl to, kad įvairiose pasaulio šalyse yra stebimas jų dažnio augimas. Didėjant AM aprašančių studijų skaičiui, taip pat buvo atkreiptas dėmesys į tai, jog AM rūšių paplitimas labai skiriasi priklausomai nuo regiono [61–63]. Tačiau Lietuvoje iki šiol nebuvo atlikta nei vieno sistematizuoto tyrimo dėl AM paplitimo, nėra žinoma kokios AM rūšys dominuoja, kadangi ši ligų grupė nėra priskiriama infekcinėms ligoms ir duomenys apie ją nėra kaupiami. Atsižvelgiant į tai, jog skirtingos AM rūšys skiriasi savo gebėjimu sukelti infekciją žmonėms, o gydymo taktikos pasirinkimas priklauso nuo ligos sukėlėjo, yra labai svarbu nustatyti kliniškai reikšmingiausias AM rūšis [24, 59, 60].

Šiame tyrime analizuotų AM rūšių paplitimas atitiko Wouter Hoefsloot ir kitų bendraautorių jungtiniame tyrime pastebėtą tendenciją, jog šiaurinėje Europos dalyje dominuoja *M. avium* kompleksui priklausančios AM [65]. Nepaisant to, jog vienoje Europos šalyse MAK buvo retesnis, bendroje imtyje tai vis tiek buvo dažniausiai aptinkama rūšis. Antra pagal dažnumą AM rūšis Europoje yra *M. gordonae*. Šiame tyrime *M. gordonae* taip pat buvo antra pagal paplitimą po *M. avium*. Lyginant duomenis tarp Lietuvos ir artimiausių jos kaimynų, matomi panašūs rezultatai: Estijoje taip pat didžiausią dalį izoliuotų AM sudaro *M. avium*, *M. gordonae* bei *M. fortuitum*. Estijoje ketvirtoje vietoje pagal aptikimo dažnumą yra *M. intracellulare* ir sudaro 7,4% visų izoliuotų AM [66], o šiame darbe šios rūšies mikobakterijos buvo vienos iš mažiausiai pasitaikančių – 1,8%. Tuo tarpu Lenkijoje labiausiai paplitusios AM yra *M. kansasii* (35%), MAK (23%) ir *M. xenopi* (22%) [65]. Šie duomenys labai skiriasi nuo mūsų tyrimo duomenų, kadangi *M. kansasii* ir *M. xenopi* buvo vienos iš rečiausių aptiktų mikobakterijų.

*M. gordonae* yra viena dažniausiai iš pacientų klinikinių ėminių išauginamų AM rūšių visame pasaulyje [65]. Tai patvirtina ir mūsų tyrimo duomenys. Nors yra žinoma, jog *M. gordonae* yra dažniausias laboratorinės taršos sukėlėjas naudojant vandentiekio vandenį, ši AM labai retai sukelia plaučių infekciją [22]. Literatūros duomenimis, *M. gordonae* sukelta plaučių infekcija dažnai pasireiškia sunkiems imunosupresinės būklės ligoniams, pvz., ŽIV infekuotiems, steroidų terapijos metu, po transplantacijų [22], tačiau pasitaiko atvejų, kai suserga ir sveiki jauni žmonės, neturintys jokių rizikos veiksnių [67]. Marimoto su kolegomis, stebėję 209 ligonių atvejus, kuriems buvo išskirta *M. gordonae* nustatė, kad plaučių mikobakteriozė buvo patvirtinta tik 1,4% visų atvejų [68]. Mūsų tyrimo metu nebuvo galimybės nustatyti, ar kultūroje išskirta *M. gordonae* pacientams sukėlė plaučių infekciją, tad atsižvelgus į aukščiau pateiktus duomenis ir didelį mikroorganizmo paplitimą, *M. gordonae* galima vertinti kaip laboratorinės taršos sukėlėją iš

vandentiekio. Viena iš priežasčių, kodėl šis mikroorganizmas dažnai izoliuojamas, bet patvirtintų infekcijų skaičius yra mažas, gali būti tai, kad pacientai prieš ėminio ėmimo procedūras burną skalauja čiaupo vandeniu, kuris neretai būna užterštas šiomis aplinkos mikobakterijomis [69]. Tokiais atvejais liginėse gali atsirasti pseudoinfekcijos protrūkiai, galintys lemti papildomų lėšų panaudojimą tolimesnei diagnostikai atlikti [32]. Todėl siekiant sumažinti ėminių užteršimo aplinkos AM tikimybę, rekomenduojama geriau informuoti pacientus ir medicinos personalą, kaip turi būti renkami skreplių ir kiti respiraciniai ėminiai mikrobiologiniams tyrimams. Taip pat liginėse yra rekomenduojama naudoti pakankamai aukštos temperatūros vandenį, bent 45°C, kurioje *M. gordonae* ilgai neišgyvena [22].

Įdomu yra pastebėti, jog mūsų tyrimo metu beveik visos AM buvo išskirtos iš respiracinių ėminių, nepaisant to, kad kai kurios rūšys (*M. fortuitum*, *M. chelonae*) dažniau pasireiškia odos ar minkštųjų audinių infekcijų metu. Vis dėlto, šiame tyrime tik viena AM (*M. avium*) buvo išauginta iš pooperacinės medžiagos. Galima daryti prielaidą, jog AM sukeltomis ekstrapulmoninės infekcijos Lietuvoje yra labai retos ir jų diagnostika yra sudėtinga.

Šiame tyrime AM buvo izoliuotos dažniau iš moteriškos lyties pacientų. Panašus pasiskirstymas tarp lyčių buvo stebimas ir kitose Europos šalyse: Vokietijoje [70], Prancūzijoje [71], Portugalijoje [72]. Tuo tarpu kitose šalyse (Jungtinėje Karalystėje [73], Nyderlanduose [74], Italijoje [75], centrinėje Graikijoje [76]) AM buvo dažniau išskiriamos vyrų grupėje. Tuo tarpu Jungtinėse Amerikos Valstijose (JAV), priešingai nei Europos šalyse, AM sukeltomis infekcijomis moterys serga dažniau nei vyrai [60, 61]. Manoma, kad tokie duomenys galėtų būti paaiškunami, atsižvelgiant į vyrų ir moterų sergamumo LOPL dažnius. JAV užregistruoti LOPL atvejai yra pasiskirstę tarp lyčių panašiai, kaip ir sergamumo mikobakterioze dažniai [79]. Tuo tarpu Lietuvoje, vadovaujantis Higienos instituto duomenimis [80], beveik nėra jokio skirtumo tarp vyrų ir moterų sergamumo LOPL. Tai atitinka šiame tyrime izoliuotų AM pasiskirstymą tarp lyčių.

Šiame tyrime pacientų, kuriems buvo išskirtos AM, amžiaus mediana buvo artima Europos bendram vidurkiui – 62,5 m. [2]. Taip pat iš mūsų tyrimo duomenų pastebėta, jog vyrų ir moterų amžius tarpusavyje statistiškai reikšmingai skiriasi – AM buvo dažniau izoliuotos vyresnėms moterims nei vyrams. Tokie duomenys gali būti paaiškunami, atsižvelgiant į mikobakteriozės rizikos veiksnius, būtent LOPL, bronchektazę bei ŽIV infekciją ir šių ligų dažnių pasiskirstymą tarp skirtingų amžiaus grupių Lietuvos populiacijoje. Lietuvos Higienos instituto duomenimis, LOPL, bronchektazė ir ŽIV dažniau serga 45 – 64 metų vyrai [80], tai atitinka šiame tyrime stebimą vyrų amžiaus medianą 55,6 m. Tuo tarpu vyresniems žmonėms (65 metai ir daugiau), šios ligos dažniau pasitaiko moterų tarpe [80], ir tai taip pat atitinka šio tyrimo nustatytą moterų amžiaus medianą 66,1 m.

### 3.4.2. PGR metodo rezultatų aptarimas

Norint pasiekti gerų gydymo rezultatų, būtina žinoti konkrečios AM jautrumą keliems antibiotikams, nes gydymo taktikos pasirinkimas priklauso nuo ligos pasireiškimo klinikinės formos, sukėlėjo, ligos išplitimo, ligonio imuninės būklės, gretutinių ligų. Vis dėlto, AM jautrumo vaistams nustatymas šiais laikais vis dar lieka kontraversiškas, kadangi jautrumas (atsparumas) vaistui *in vitro* ne visada sutampa su veiksmingumu *in vivo*. Vadovaujantis naujausiomis ATS/IDSA rekomendacijomis, JVT siūloma atlikti tik MAK infekcijos atveju klaritromicinui, GAM (*M. fortuitum*, *M. abscessus*, ir *M. chelonae*) infekcijos atveju – amikacinui, imipenemui (tik *M. fortuitum*), doksiciklinui, fluorchinolonams, klaritromicinui, linezolidui ir tobramicinui (tik *M. chelonae*) bei *M. kansasii* infekcijos atveju – rifampicinui [22]. Nustatant AM jautrumą vaistams, auksiniu standartu yra laikomas mikropraskiedimo metodas skystoje terpėje [54], tačiau tokių tyrimų atlikimas užtrunka pakankamai ilgai, kadangi priklauso nuo mikobakterijų augimo greičio.

Pastaruoju metu buvo atrasta nemaža dalis genų, atsakingų už įgytą ir įgimtą AM atsparumą antibakteriniams vaistams. Šiuo metu geriausiai ištyrinėti yra *rml*, *erm(41)* ir *rrs* genai. Jų aptikimas molekuliniais metodais yra daug greitesnis, nei jautrumo vaistams nustatymas mikropraskiedimo metodu, todėl gali būtų gera alternatyva JVT. Mūsų atliktame tyrime buvo naudojamas komercinis GenoType® NTM-DR VER 1.0 rinkinys, kuriuo buvo ieškomos plaučių mikobakteriozes sukeliančių AM dažniausiai pasitaikančios mutacijos, siejamos su atsparumu antimikrobiniais vaistams.

Išanalizavus PGR metodo rezultatus, mūsų tyrimo metu nebuvo aptikta nei viena AM, turinti *rml* ir *rrs* genų mutacijas, siejamas su atsparumu makrolidiniams bei aminoglikozidiniams antibiotikams. Tokie duomenys gali būti paaiškinti tuo, kad naujai izoliuotos AM, tokios kaip *M. avium*, paprastai būna jautrios makrolidams, tačiau jei yra taikomas neteisingas gydymas, pavyzdžiui, klaritromicino monoterapija, greitai įgyja atsparumą šiems vaistams. Viename tyrime, kuriame *M. avium* sukelta kraujo infekcija ŽIV sergantiems pacientams buvo gydyta vien tik skirtingomis klaritromicino dozėmis, buvo nustatyta, kad 46% bakterijų įgijo atsparumą šiam vaistui dviejų mėnesių laikotarpyje [81]. Nors didžioji dalis AM įgyja atsparumą vaistams dėl *rml* geno mutacijos, yra manoma, kad egzistuoja ir kitas mechanizmas šiam atsparumui atsirasti [82], todėl neaptikta mutacija ne visuomet gali būti interpretuojama kaip esamas jautrumas vaistams. Nepaisant to, yra pastebėtas gana didelis (96%) atitikimas, tarp *rml* geno mutacijos ir fenotipinio atsparumo klaritromicinui bei tarp *rrs* mutacijos ir fenotipinio atsparumo amikacinui [83].

Vertinant *erm(41)* geno polimorfizmą, tyrimo metu buvo nustatytos dviejų mikobakterijų (*M. abscessus* subsp. *abscessus* ir *M. abscessus* subsp. *bolletii*) atsparumas makrolidams. Šio geno polimorfizmo nustatymas yra gana patikimas, nustatant *M. abscessus* komplekso bakterijų

jautrumą klaritromicinui [52]. Tačiau reikėtų atkreipti dėmesį, jog *M. abscessus* subsp. *massiliense* dažniausiai turi iškritą šiame gene, ir nepaisant T nukleotido polimorfizmo, bus jautri makrolidams, tačiau gali pasitaikyti ir šios rūšies bakterijų, neturinčių iškritos šiame gene [84]. Tokiu atveju, remiantis vien tik hibridizacijos rezultatu nebūtų galima tiksliai įvertinti šių AM atsparumo makrolidams.

Apibendrinant PGR metodu gautus rezultatus, galima teigti, jog jis yra pakankamai geras, siekiant nustatyti dažniausias AM genų mutacijas, lemiančias atsparumą makrolidiniams bei aminoglikozidiniams antibiotikams. Vis dėlto, yra nustatyta, jog kai kuriais atvejais dėl *rml* geno mutacijų, PGR produktai gali jungtis prie jiems nespecifiškų vietų nitroceliuliozinėje juostelėje [83]. Taip pat reikėtų pabrėžti, kad aptiktos *rml*, *rrs* genų mutacijos arba *erm(41)* geno T nukleotido polimorfizmas ne visais atvejais gali sutapti su fenotipiniu atsparumu atitinkamiems vaistams, kadangi yra ir kiti mechanizmai, per kuriuos gali būti slopinamas vaistų poveikis. Nepaisant to, PGR metodas turi savo pranašumą, nes yra labai greitas, todėl jo naudojimas klinikinėje praktikoje galėtų padėti gydytojams pasirinkti tinkamą gydymą, tačiau visuomet molekulinį tyrimų interpretacija turėtų būti vertinama objektyviai, atsižvelgiant į visų ligonio laboratorinių, instrumentinių, histologinių tyrimų rezultatų visumą.

## IŠVADOS

1. Vši Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose 2015 – 2018 metais dažniausiai paplitusios kliniškai svarbios AM rūšys buvo *M. avium* (51,2%), *M. goodnae* (19,9%) ir *M. fortuitum* (7,2%), rečiau aptinkamos – *M. abscessus* kompleksas (1,8%), *M. chelonae* (4,2%), *M. kansasii* (3%), *M. xenopi* (2,4%), *M. intracellulare* (1,8%), *M. celatum* (1,8%).
2. PGR metodu ištyrus 51 AM, nei vienai jų nebuvo aptiktos *rrs* ir *rml* genų mutacijos, siejamos su atsparumu makrolidams ir aminoglikozidams. Tuo tarpu tik dvejoms AM rūšims (*M. abscessus* subsp. *abscessus* ir *M. abscessus* subsp. *bolletii*) buvo nustatytas *erm(41)* geno T nukleotido polimorfizmas, susijęs su atsparumu makrolidams.
3. Įvertinus PGR metodu gautus rezultatus, galima teigti, kad jis yra pakankamai geras, siekiant nustatyti dažniausias AM genų mutacijas, siejamas su atsparumu makrolidams ir aminoglikozidams, tačiau jo rezultatus būtina interpretuoti atsižvelgiant į kitų tyrimų visumą.

# SANTRAUKA

Magistro baigiamojo darbo autorius: **Rimvydas Jonikas**

Magistro baigiamojo darbo vadovas : **Prof. habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė**

Magistro baigiamojo darbo konsultantė : **Edita Vasiliauskienė**

**Magistro baigiamojo darbo tema:** Kliniškai svarbių atipinių mikobakterijų paplitimas ir jų antimikrobinio atsparumo nustatymas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose 2015 – 2018 metais.

**Darbo tikslas:** Įvertinti kliniškai svarbių atipinių mikobakterijų (AM) paplitimą, rūšinę įvairovę ir ištirti jų atsparumą antimikrobiniais vaistams VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose 2015-2018 metų laikotarpyje.

**Tyrimo medžiaga ir metodai.** Tyrimas buvo atliktas VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Tuberkuliozės tyrimų laboratorijoje. Buvo atlikta 166 atipinių mikobakterijų retrospektyvinė analizė, nustatytos labiausiai ir rečiausiai paplitusios atipinių mikobakterijų rūšys. PGR metodu, naudojant GenoType® NTM-DR VER 1.0 komercinį rinkinį, buvo tirtas *M. avium* komplekso, *M. abscessus* komplekso bei *M. chelonae* atsparumas makrolidiniams ir aminoglikozidiniams antibiotikams, iš viso ištirta 51 kultūra.

**Rezultatai.** Retrospektyvinės analizės metu nustatyta, kad labiausiai paplitusios AM buvo *M. avium* – 51,2% (N=85), *M. gordonae* – 19,9% (N=33) bei *M. fortuitum* 7,2% (N=12), rečiau aptinkamos – *M. abscessus* kompleksas 1,8% (N=3), *M. chelonae* 4,2% (N=7), *M. kansasii* 3% (N=5), *M. xenopi* 2,4% (N=4), *M. intracellulare* 1,8% (N=3), *M. celatum* 1,8% (N=3). PGR metodu nustatyta, jog nei viena iš 51 tirtų AM neturėjo *rrl* ir *rrs* genų mutacijų, siejamų su atsparumu makrolidams ir aminoglikozidams. Tik *M. abscessus* subsp. *bolletii* ir *M. abscessus* subsp. *abscessus* rūšims buvo nustatytas *erm(41)* geno 28 pozicijoje esantis T nukleotidas, siejamas su atsparumą makrolidams.

**Išvados.** VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose 2015 – 2018 metais dažniausiai izoliuojamos AM buvo *M. avium*, *M. gordonae* ir *M. fortuitum*. Visos PGR metodu tirtos AM neturėjo genų mutacijų, lemiančių atsparumą makrolidams ir aminoglikozidams. Tik dvejomis rūšimis – *M. abscessus* subsp. *abscessus* ir *M. abscessus* subsp. *bolletii*, buvo nustatytas *erm(41)* geno polimorfizmas, siejamas su tirtų mikobakterijų atsparumu makrolidams. PGR metodas gali būti naudojamas, siekiant nustatyti dažniausias AM genų mutacijas, siejamas su atsparumu makrolidams ir aminoglikozidams, tačiau jo rezultatus būtina interpretuoti atsižvelgiant į kitų klinikinių tyrimų visumą.

## SUMMARY

Author of Master's degree thesis: **Rimvydas Jonikas**

Academic supervisor of Master's degree thesis: **Prof. habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė**

Consultant of Master's degree thesis: **Edita Vasiliauskienė**

**Master's degree thesis:** Prevalence of clinically relevant non-tuberculous mycobacterium and antimicrobial resistance detection at Vilnius University Hospital Santaros Klinikos in 2015 – 2018.

**Aim of the study:** evaluate the prevalence of clinically relevant nontuberculous mycobacteria, species diversity and to investigate their resistance to antibacterial drugs at Vilnius University Hospital Santaros Klinikos during 2015-2018 period.

**Materials and methods.** The study was conducted at Vilnius University Hospital Santaros Klinikos Center of Laboratory Medicine Tuberculosis Laboratory. A retrospective analysis of 166 nontuberculous mycobacteria was performed. Macrolides and aminoglycosides resistance for *M. avium* complex, *M. abscessus* complex and *M. chelonae* was determined by using GenoType® NTM-DR VER 1.0 commercial kit, a total of 51 cultures were tested.

**Results.** During the retrospective analysis, the most isolated nontuberculous mycobacteria were *M. avium* – 51.2% (N = 85), *M. gordonae* - 19.9% (N = 33) and *M. fortuitum* 7.2% (N = 12), and less commonly found were *M. abscessus* complex of 1.8% (N = 3), *M. chelonae* 4.2% (N = 7), *M. kansasii* 3% (N = 5), *M. xenopi* 2.4% (N = 4), *M. intracellulare* 1.8% (N = 3), *M. celatum* 1.8% (N = 3). None of the investigated nontuberculous mycobacteria had mutations in *rrl* and *rrs* genes, indicating macrolides and aminoglycoside resistance respectively. However, a T nucleotide was determined at 28 position of *erm(41)* gene of *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. abscessus* subsp. *bolletii*, associated with resistance to macrolides.

**Conclusions.** The most frequently isolated nontuberculous mycobacteria at Vilnius University Hospital Santaros Klinikos were *M. avium*, *M. gordonae* and *M. fortuitum* during 2015 – 2018 year period. None of the analyzed nontuberculous mycobacteria exhibited mutations showing acquired resistance to macrolides and aminoglycosides. However, an *erm(41)* gene polymorphism was identified for two isolates - *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. abscessus* subsp. *bolletii* showing resistance to macrolides. Detection of common gene mutations of nontuberculous mycobacteria, associated with resistance to macrolides and aminoglycosides, using PCR method is reasonably good, although results should be interpreted in consideration with other clinical tests.



## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Tuberkuliozės tyrimų laboratorijos vedėjai Editai Vasiliauskienei už kantrybę, supratingumą, suteiktas pastabas, patarimus ir pagalbą atliekant magistro baigiamąjį darbą.

Taip pat dėkoju darbo vadovei profesorė habil. dr. Zitai Aušrelei Kučinskienei už pastabas ir patarimus rašant baigiamąjį darbą.

Esu dėkingas Tuberkuliozės tyrimų laboratorijos darbuotojams Laimai Vasiliauskaitei, Aistei Poškutei bei Uršulei Miknevičiūtei už pagalbą įsisavinant metodiką reikalingą šiam darbui atlikti.

Noriu padėkoti Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedrai už suteiktą galimybę atlikti šį magistro baigiamąjį darbą.

## LITERATŪROS SARAŠAS

- [1] E. D. Chan and M. D. Iseman, “Underlying host risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease,” *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 34, no. 1, pp. 110–123, 2013.
- [2] D. R. Prevots and T. K. Marras, “Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria a review,” *Clin. Chest Med.*, vol. 36, no. 1, pp. 13–34, Mar. 2015.
- [3] T. M. Shinnick and R. C. Good, “Mycobacterial taxonomy,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 11, pp. 884–901, Nov. 1994.
- [4] L. M. Stamm, J. H. Morisaki, L.-Y. Gao, R. L. Jeng, K. L. McDonald, R. Roth, *et al.*, “*Mycobacterium marinum* Escapes from Phagosomes and Is Propelled by Actin-based Motility,” *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 9, pp. 1361–1368, 2003.
- [5] R. Louis and L. Kevin, “Myriad acid-fast bacilli (MAC) in histiocytic infiltrate (Ziehl-Neelsen stain),” 2015. [Online]. Available: <https://clinicalgate.com/lung-infections-2/>.
- [6] L. Brown, J. M. Wolf, R. Prados-Rosales, and A. Casadevall, “Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, no. 10, pp. 620–30, 2015.
- [7] M. Jankute, J. A. G. Cox, J. Harrison, and G. S. Besra, “Assembly of the Mycobacterial Cell Wall,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 69, no. 1, pp. 405–423, 2015.
- [8] P. a Lambert, “Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria,” *J Appl Microbiol*, vol. 92, p. 46S–54S, 2002.
- [9] K. H. Z. Bentrup and D. G. Russell, “Mycobacterial persistence: Adaptation to a changing environment,” *Trends Microbiol.*, vol. 9, no. 12, pp. 597–605, 2001.
- [10] S. Vander Beken, J. R. Al Dulayymi, T. Naessens, G. Koza, M. Maza-Iglesias, R. Rowles, *et al.*, “Molecular structure of the Mycobacterium tuberculosis virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 2, pp. 450–460, 2011.
- [11] J. Indrigo, R. L. Hunter, and J. K. Actor, “Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages,” *Microbiology*, vol. 149, no. 8, pp. 2049–2059, 2003.
- [12] T. T. Aung, J. K. H. Yam, S. Lin, S. M. Salleh, M. Givskov, S. Liu, *et al.*, “Biofilms of Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria Targeted by New Therapeutic Approaches,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, no. 1, pp. 24–35, Jan. 2016.
- [13] J. O. Falkinham, E. D. Hilborn, M. J. Arduino, A. Pruden, M. A. Edwards, and M. A.

- Edwards, “Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 123, no. 8, pp. 749–58, Aug. 2015.
- [14] E. Marini, M. Di Giulio, G. Magi, S. Di Lodovico, M. E. Cimarelli, A. Brenciani, *et al.*, “Curcumin, an antibiotic resistance breaker against a multiresistant clinical isolate of *Mycobacterium abscessus*,” *Phyther. Res.*, no. November, pp. 1–8, 2017.
- [15] B. A. Forbes, “Mycobacterial Taxonomy,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 55, no. 2, pp. 380–383, 2017.
- [16] J. O. Falkinham, “Environmental sources of nontuberculous mycobacteria,” *Clin. Chest Med.*, vol. 36, no. 1, pp. 35–41, 2015.
- [17] S. D’Antonio, P. Rogliani, G. Paone, A. Altieri, M. G. Alma, M. Cazzola, *et al.*, “An unusual outbreak of nontuberculous mycobacteria in hospital respiratory wards: Association with nontuberculous mycobacterial colonization of hospital water supply network,” *Int. J. Mycobacteriology*, vol. 5, no. 2, pp. 244–247, 2016.
- [18] J. Falkinham, “The biology of environmental Mycobacteria,” *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 1, pp. 477–487, 2009.
- [19] J. van Ingen, “Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Infections,” *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 34, no. 1, pp. 103–109, Mar. 2013.
- [20] F. Portaels, A. De Muynck, and M. P. Sylla, “Selective isolation of mycobacteria from soil: a statistical analysis approach,” *J. Gen. Microbiol.*, vol. 134, no. 3, pp. 849–55, 1988.
- [21] N. G. Hartwig, A. Warris, E. van de Vosse, A. G. M. van der Zanden, T. Schülin-Casonato, J. van Ingen, *et al.*, “*Mycobacterium tilburgii* infection in two immunocompromised children: importance of molecular tools in culture-negative mycobacterial disease diagnosis,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 12, pp. 4409–11, Dec. 2011.
- [22] D. E. Griffith, T. Aksamit, B. A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, *et al.*, “An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 175, no. 4, pp. 367–416, Feb. 2007.
- [23] M. J. M. Vaerewijck, G. Huys, J. C. Palomino, J. Swings, and F. Portaels, “Mycobacteria in drinking water distribution systems: Ecology and significance for human health,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, no. 5, pp. 911–934, 2005.
- [24] T. Bodmer, E. Miltner, and L. E. Bermudez, “*Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 182, no. 1, pp. 45–49, Jan. 2000.
- [25] D. Wagner and L. S. Young, “Nontuberculous mycobacterial infections: A clinical review,”

- Infection*, vol. 32, no. 5, pp. 257–270, 2004.
- [26] K. Morimoto, Y. Kazumi, Y. Shiraishi, T. Yoshiyama, Y. Murase, S. Ikushima, *et al.*, “Clinical and microbiological features of definite *Mycobacterium gordonae* pulmonary disease: the establishment of diagnostic criteria for low-virulence mycobacteria,” *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 109, no. 9, pp. 589–593, Sep. 2015.
- [27] S. N. Mullis and J. O. Falkinham, “Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 115, no. 3, pp. 908–914, Sep. 2013.
- [28] H. Sax, G. Bloemberg, B. Hasse, R. Sommerstein, P. Kohler, Y. Achermann, *et al.*, “Prolonged Outbreak of *Mycobacterium chimaera* Infection After Open-Chest Heart Surgery,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 61, no. 1, pp. 67–75, Jul. 2015.
- [29] E. Henkle and K. L. Winthrop, “Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts,” *Clin. Chest Med.*, vol. 36, no. 1, pp. 91–99, 2015.
- [30] J. van Ingen, “Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease,” *Clin. Chest Med.*, vol. 36, no. 1, pp. 43–54, 2015.
- [31] J. E. Stout, W.-J. Koh, and W. W. Yew, “Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 45, pp. 123–34, Apr. 2016.
- [32] M. Zlojtro, M. Jankovic, M. Samarzija, L. Zmak, V. K. Jankovic, M. Obrovac, *et al.*, “Nosocomial pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with a hospital’s water supply contamination: a case series of 135 patients,” *J. Water Health*, vol. 13, no. 1, pp. 125–130, Mar. 2015.
- [33] T. Guimarães, E. Chimara, G. V. B. do Prado, L. Ferrazoli, N. G. F. Carvalho, F. C. dos S. Simeão, *et al.*, “Pseudooutbreak of rapidly growing mycobacteria due to *Mycobacterium abscessus* subsp *bolletii* in a digestive and respiratory endoscopy unit caused by the same clone as that of a countrywide outbreak,” *Am. J. Infect. Control*, vol. 44, no. 11, pp. e221–e226, 2016.
- [34] S. Laifangbam, H. Singh, N. Singh, K. Devi, and N. Singh, “A comparative study of fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis,” *Kathmandu Univ. Med. J.*, vol. 7, no. 3, pp. 226–230, Feb. 2010.
- [35] A. Sorlozano, I. Soria, J. Roman, P. Huertas, M. J. Soto, G. Piedrola, *et al.*, “Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 19, no. 10, pp. 1259–1264, 2009.
- [36] W. K. Chew, R. M. Lasaitis, F. A. Schio, and G. L. Gilbert, “Clinical evaluation of the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with radiometric (Bactec) and solid media for isolation of *Mycobacterium* species,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 47, no. 9, pp. 821–

827, 1998.

- [37] R. Ganeswrie, C. S. Chui, S. Balan, and S. D. Puthuchery, "Comparison of BACTEC MGIT 960 system and BACTEC 460 TB system for growth and detection of Mycobacteria from clinical specimens.," *Malays. J. Pathol.*, vol. 26, no. 2, pp. 99–103, 2004.
- [38] J. J. Lee, J. Suo, C. B. Lin, J. D. Wang, T. Y. Lin, and Y. C. Tsai, "Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria," *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol. 7, no. 6, pp. 569–574, 2003.
- [39] S. Cowman, K. Burns, S. Benson, R. Wilson, and M. R. Loebinger, "The antimicrobial susceptibility of non-tuberculous mycobacteria," *J. Infect.*, vol. 72, no. 3, pp. 324–331, 2016.
- [40] B. Springer, L. Stockman, K. Teschner, G. D. Roberts, B. Springer, L. Stockman, *et al.*, "Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria : molecular versus phenotypic methods . Two-Laboratory Collaborative Study on Identification of Mycobacteria : Molecular versus Phenotypic Methods," vol. 34, no. 2, pp. 296–303, 1996.
- [41] M. C. Mediavilla-Gradolph, I. De Toro-Peinado, M. P. Bermúdez-Ruiz, M. D. L. Á. García-Martínez, M. Ortega-Torres, N. Montiel Quezel-Guerraz, *et al.*, "Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [42] A. Lotz, A. Ferroni, J.-L. Beretti, B. Dauphin, E. Carbonnelle, H. Guet-Revillet, *et al.*, "Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 12, pp. 4481–6, Dec. 2010.
- [43] M. Pignone, K. M. Greth, J. Cooper, D. Emerson, and J. Tang, "Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 6, pp. 1963–70, Jun. 2006.
- [44] S. P. Buckwalter, S. L. Olson, B. J. Connelly, B. C. Lucas, A. A. Rodning, R. C. Walchak, *et al.*, "Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacterium species, Nocardia species, and Other Aerobic Actinomycetes.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 54, no. 2, pp. 376–84, Feb. 2016.
- [45] E. Tortoli, M. Pecorari, G. Fabio, M. Messinò, and A. Fabio, "Commercial DNA probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 307–10, Jan. 2010.
- [46] T. Rogall, T. Flohr, and E. C. Böttger, "Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 136, no. 9, pp. 1915–20, 1990.
- [47] A. McNabb, D. Eisler, K. Adie, M. Amos, M. Rodrigues, G. Stephens, *et al.*, "Assessment

- of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources.,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 42, no. 7, pp. 3000–11, Jul. 2004.
- [48] T. Adékambi, P. Colson, and M. Drancourt, “rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria.,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 12, pp. 5699–708, Dec. 2003.
- [49] D. E. Griffith, B. A. Brown-Elliott, B. Langsjoen, Y. Zhang, X. Pan, W. Girard, *et al.*, “Clinical and Molecular Analysis of Macrolide Resistance in *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 174, no. 8, pp. 928–934, Oct. 2006.
- [50] J. van Ingen and E. J. Kuijper, “Drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria,” *Future Microbiol.*, vol. 9, no. 9, pp. 1095–1110, 2014.
- [51] L. Guglielmetti, F. Mougari, A. Lopes, L. Raskine, and E. Cambau, “Human infections due to nontuberculous mycobacteria: the infectious diseases and clinical microbiology specialists’ point of view,” *Future Microbiol.*, vol. 10, no. 9, pp. 1467–1483, 2015.
- [52] S. Bastian, N. Veziris, A.-L. Roux, F. Brossier, J.-L. Gaillard, V. Jarlier, *et al.*, “Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by erm(41) and rrl sequencing.,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 2, pp. 775–81, Feb. 2011.
- [53] P. Pfister, S. Jenni, J. Poehlsgaard, A. Thomas, S. Douthwaite, N. Ban, *et al.*, “The structural basis of macrolide-ribosome binding assessed using mutagenesis of 23 S rRNA positions 2058 and 2059,” *J. Mol. Biol.*, vol. 342, no. 5, pp. 1569–1581, 2004.
- [54] B. A. Brown-Elliott, K. A. Nash, and R. J. Wallace, “Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 25, no. 3, pp. 545–582, Jul. 2012.
- [55] R. MARILYN C., “Nomenclature Center for MLS Genes,” 2017. [Online]. Available: <http://faculty.washington.edu/marilynr/>.
- [56] K. A. Nash, N. Andini, Y. Zhang, B. A. Brown-Elliott, and R. J. Wallace, “Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria.,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 10, pp. 3476–8, Oct. 2006.
- [57] K. A. Nash, B. A. Brown-Elliott, R. J. Wallace, and Jr., “A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*.,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 4, pp. 1367–76, Apr. 2009.
- [58] B. Springer, Y. G. Kidan, T. Prammananan, K. Ellrott, E. C. Böttger, and P. Sander,

- “Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance.” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 10, pp. 2877–84, Oct. 2001.
- [59] T. Prammananan, P. Sander, B. A. Brown, K. Frischkorn, G. O. Onyi, Y. Zhang, *et al.*, “A Single 16S Ribosomal RNA Substitution Is Responsible for Resistance to Amikacin and Other 2-Deoxystreptamine Aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*,” *J. Infect. Dis.*, vol. 177, no. 6, pp. 1573–1581, 1998.
- [60] J. Wu, Y. Zhang, J. Li, S. Lin, L. Wang, Y. Jiang, *et al.*, “Increase in nontuberculous mycobacteria isolated in Shanghai, China: Results from a population-based study,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, 2014.
- [61] C. Lin, C. Russell, B. Soll, D. Chow, S. Bamrah, R. Brostrom, *et al.*, “Increasing Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Specimens from US-Affiliated Pacific Island Jurisdictions1,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 3, pp. 485–491, 2018.
- [62] S. K. Brode, A. Marchand-Austin, F. B. Jamieson, and T. K. Marras, “Pulmonary versus nonpulmonary nontuberculous mycobacteria, Ontario, Canada,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 11, pp. 1898–1901, 2017.
- [63] T. S. Hermansen, P. Ravn, E. Svensson, and T. Lillebaek, “Nontuberculous mycobacteria in Denmark, incidence and clinical importance during the last quarter-century,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [64] P. Blanc, H. Dutronc, O. Peuchant, F. A. Dauchy, C. Cazanave, D. Neau, *et al.*, “Nontuberculous Mycobacterial infections in a French Hospital: A12-year retrospective study,” *PLoS One*, vol. 11, no. 12, pp. 1–12, 2016.
- [65] W. Hoefsloot, J. Van Ingen, C. Andrejak, K. Ängeby, R. Bauriaud, P. Bemer, *et al.*, “The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study,” *Eur. Respir. J.*, vol. 42, no. 6, pp. 1604–1613, 2013.
- [66] M. J. van der Werf, C. Ködmön, V. Katalinić-Janković, T. Kummik, H. Soini, E. Richter, *et al.*, “Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 14, no. 1, p. 62, Dec. 2014.
- [67] S. A. Mazumder, A. Hicks, and J. Norwood, “*Mycobacterium gordonae* pulmonary infection in an immunocompetent adult,” *N. Am. J. Med. Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 205–7, Apr. 2010.
- [68] K. Morimoto, Y. Kazumi, Y. Shiraishi, T. Yoshiyama, Y. Murase, S. Ikushima, *et al.*, “Clinical and microbiological features of definite *Mycobacterium gordonae* pulmonary disease: The establishment of diagnostic criteria for low-virulence mycobacteria,” *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 109, no. 9, pp. 589–593, 2015.

- [69] P. M. Arnow, M. Bakir, K. Thompson, and J. L. Bova, "Endemic Contamination of Clinical Specimens by *Mycobacterium gordonae*," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 31, no. 2, pp. 472–476, Aug. 2000.
- [70] F. C. Ringshausen, D. Wagner, A. de Roux, R. Diel, D. Hohmann, L. Hickstein, *et al.*, "Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease, Germany, 2009-2014.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 22, no. 6, pp. 1102–5, 2016.
- [71] M. Dailloux, M. L. Abalain, C. Laurain, L. Lebrun, C. Loos-Ayav, A. Lozniewski, *et al.*, "Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients.," *Eur. Respir. J.*, vol. 28, no. 6, pp. 1211–5, Dec. 2006.
- [72] A. Amorim, R. Macedo, A. Lopes, I. Rodrigues, and E. Pereira, "Non-tuberculous mycobacteria in HIV-negative patients with pulmonary disease in Lisbon, Portugal," *Scand. J. Infect. Dis.*, vol. 42, no. 8, pp. 626–628, Aug. 2010.
- [73] B. S. Davies, C. H. Roberts, S. Kaul, J. L. Klein, and H. J. Milburn, "Non-tuberculous slow-growing mycobacterial pulmonary infections in non-HIV-infected patients in south London," *Scand. J. Infect. Dis.*, vol. 44, no. 11, pp. 815–819, Nov. 2012.
- [74] J. van Ingen, S. A. Bendien, W. C. M. de Lange, W. Hoefsloot, P. N. R. Dekhuijzen, M. J. Boeree, *et al.*, "Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands.," *Thorax*, vol. 64, no. 6, pp. 502–6, Jun. 2009.
- [75] G. Del Giudice, C. Iadevaia, G. Santoro, E. Moscariello, R. Smeraglia, and C. Marzo, "Nontuberculous mycobacterial lung disease in patients without HIV infection: a retrospective analysis over 3 years," *Clin. Respir. J.*, vol. 5, no. 4, pp. 203–210, Oct. 2011.
- [76] I. Gerogianni, M. Papala, K. Kostikas, E. Petinaki, and K. I. Gourgoulialis, "Epidemiology and clinical significance of mycobacterial respiratory infections in Central Greece."
- [77] E. E. Bodle, J. A. Cunningham, P. Della-Latta, N. W. Schluger, and L. Saiman, "Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in patients without HIV infection, New York City.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 3, pp. 390–6, Mar. 2008.
- [78] P. M. Cassidy, K. Hedberg, A. Saulson, E. McNelly, and K. L. Winthrop, "Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 49, no. 12, pp. e124–e129, Dec. 2009.
- [79] E. S. Ford, J. B. Croft, D. M. Mannino, A. G. Wheaton, X. Zhang, and W. H. Giles, "COPD surveillance - United States, 1999-2011," *Chest*, vol. 144, no. 1, pp. 284–305, 2013.
- [80] "Lietuvos sveikatos statistika," 2016. [Online]. Available: [https://stat.hi.lt/default.aspx?report\\_id=168](https://stat.hi.lt/default.aspx?report_id=168).
- [81] R. E. Chaisson, C. A. Benson, M. P. Dube, L. B. Heifets, J. A. Korvick, S. Elkin, *et al.*, "Clarithromycin Therapy for Bacteremic *Mycobacterium avium* Complex Disease," *Ann.*



*Intern. Med.*, vol. 121, no. 12, pp. 905–911, 1994.

- [82] B. A. Brown-Elliott, K. A. Nash, and R. J. Wallace, “Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 25, no. 3, pp. 545–82, Jul. 2012.
- [83] F. Mougari, J. Loiseau, N. Veziris, C. Bernard, B. Bercot, W. Sougakoff, *et al.*, “Evaluation of the new GenoType NTM-DR kit for the molecular detection of antimicrobial resistance in non-tuberculous mycobacteria,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 72, no. 6, pp. 1669–1677, Jun. 2017.
- [84] S. J. Shallom, N. S. Moura, K. N. Olivier, E. P. Sampaio, S. M. Holland, and A. M. Zelazny, “New Real-Time PCR Assays for Detection of Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the Mycobacterium abscessus Group,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, no. 11, pp. 3430–7, Nov. 2015.



Priedas 2

**GenoType NTM-DR**  
VER 1.0  
00297-0915-04-1

species
<i>erm(41) C28</i>
<i>erm(41) T28</i>
<i>rrl</i> WT
<i>rrl</i> MUT
<i>rrs</i> WT
<i>rrs</i> MUT
MA resistant
AG resistant

**HAIN**  
LIFESCIENCE

Priedas 3

