

Klinički značaj izolacije netuberkuloznih mikobakterija u bolesnika liječenih od tuberkuloze pluća

Clinical significance nontuberculous mycobacteria isolation in patients treated for pulmonary tuberculosis

Boris Vrga, Boris Vrga ml.*

Sažetak

Klinički aspekt izolacije netuberkuloznih mikobakterija iz uzoraka respiratornog sustava (iskašljaj, aspirat bronha, bronhoalveolarni lavat) u bolesnika s plućnom tuberkulozom u Hrvatskoj još uvijek nije dovoljno poznat. Cilj rada je utvrđivanje učestalosti i kliničkog značaja koizolacije, te naknadne izolacije netuberkuloznih mikobakterija (NTM) u bolesnika od aktivne tuberkuloze pluća u Sisačko – moslavačkoj županiji, koja zadnja dva desetljeća ima najveću incidenciju tuberkuloze u Hrvatskoj. Retrospektivno su analizirani podaci za 285 bolesnika s pozitivnim kulturama uzoraka iz dišnoga trakta na *Mycobacterium tuberculosis*, koji su od 2007. do 2016. liječeni bolnički i kontrolirani ambulantno zbog aktivne tuberkuloze pluća na Odjelu za plućne bolesti OB „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak – lokacija Petrinja, a kod kojih su porastom na kulturi identificirane i NTM. Za određivanje kliničkog značaja izolata NTM korišteni su revidirani kriteriji Američkog torakalnog društva (ATS) i Američkog društva za infektivne bolesti (IDSA) iz 2007. godine. Ovom prvom kliničkom analizom navedenog fenomena u Hrvatskoj, registrirana su četiri bolesnika koji su imali koizolaciju NTM (1,4%) i dva bolesnika kod kojih su izolati NTM identificirani po završenom liječenju (0,7%). Troje bolesnika imalo je dvostruke (50%), a troje jednostruke izolate NTM. Kod nijednog od njih nisu bili ispunjeni cjeloviti kriteriji ATS/IDSA za plućnu mikobakteriozu i kod svih je nastupila spontana konverzija sputuma na NTM. Zaključuje se da se u svim slučajevima radilo o kolonizaciji dišnog sustava NTM bez razvoja klinički značajne plućne infekcije.

Ključne riječi: mikobakterij tuberkuloze, netuberkulozne mikobakterije (NTM), NTM-koizolacija, NTM-koinfekcija, naknadna NTM izolacija, tuberkuloza

Summary

The clinical aspect of the isolation of Nontuberculous Mycobacteria from samples taken from the respiratory tract (expectorate, bronchial aspirate, bronchoalveolar lavage) in patients with pulmonary TB in Croatia is still not known enough. The aim of the paper is to define the frequency and the clinical significance of the co-isolation as well as the subsequent isolation of Nontuberculous Mycobacteria (NTM) in patients with active pulmonary TB in Sisak-Moslavina county, which has had the highest incidence of TB in Croatia for the last two decades. There has been a retrospective analysis of data derived from positive sample cultures from the respiratory tract on *Mycobacterium Tuberculosis* in 285 patients, who, due to active pulmonary TB, underwent hospital treatment alongside with being checked as outpatients in the Pulmonary Ward of GH “Dr Ivo Pedišić” Sisak – location in Petrinja, and in whom NTM, too, were identified in their culture. What was used to determine the clinical relevance of the NTM isolate were the revised criteria of the American Thoracic Society (ATS) and Infectious Diseases Society of America (IDSA) from 2007. This first clinical analysis of the stated phenomenon in Croatia resulted in the registration of four patients with NTM isolation (1.4%) and two patients in whom the NTM isolates were identified after treatment had been completed (0.7%). Three patients had two-fold (50%), and three patients had one-fold NTM isolates. The complete ATS/IDSA criteria for pulmonary mycobacteriosis were not met in neither one of them and in all of them a spontaneous

* Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak – lokacija u Petrinji (Boris Vrga, dr. med.); Sveučilište „Josip Juraj Strossmayer“, Osijek, Medicinski fakultet (Boris Vrga ml., student IV. god. medicine)

Adresa za dopisivanje / Correspondence address: Boris Vrga, dr. med., Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak, lokacija Petrinja, Vinogradi bb, 44 250 Petrinja, Hrvatska; Tel. 044 527 953 E-mail: vrgaboris@gmail.com

Primljeno/Received 2019-01-07; Ispravljeno/Revised 2019-03-03; Prihvaćeno/Accepted 2019-03-15

conversion of sputum to NTM developed. It can be concluded that the issue in all the cases was the colonization of the respiratory tract by NTM without the development of clinically relevant pulmonary infection.

Key words: mycobacterium tuberculosis, nontuberculous mycobacteria (NTM), NTM coisolation, NTM co-infection, subsequent NTM isolation, tuberculosis

Med Jad 2019;49(2):111-120

Uvod

Netuberkulozne mikobakterije (NTM) su ubikvitarni mikroorganizmi koji žive u zemlji, prašini, površinskim vodama, moru, te vodovodnim sustavima za opskrbu ljudi.¹ Do danas je poznato preko 160 različitih vrsta NTM koje se međusobno razlikuju po geografskoj distribuciji, patogenom potencijalu i kliničkoj relevanciji koja varira od nevažne kolonizacije do kronične bolesti sa smrtnim završetkom.² Udisanjem aerosola u kojem su prisutne NTM može nastati plućna mikobakterioza, najčešća bolest izazvana NTM.³ Dok većina zaraženih osoba nikada ne obolijeva, osobe koje su preboljele tuberkulozu ili boluju od kronične opstruktivne plućne bolesti, pneumokonioze, bronhiektazija, cistične fibroze ili neke druge bolesti koja izaziva strukturna oštećenja plućnog tkiva, imaju povećani rizik od nastanka plućne mikobakterioze.⁴

Povećana učestalost plućne mikobakterioze u svijetu podudara se s istodobnim smanjenjem incidencije tuberkuloze, no još uvijek nisu posve jasni razlozi za ovaj inverzni epidemiološki odnos.^{5,6,7,8} Čak 81% istraživačkih studija provedenih na 16 geografskih područja na četiri kontinenta potvrdilo je smanjenje stope incidencije tuberkuloze, a 94% njih da se udio mikobakterioze pluća povećava u gotovo svim geografskim područjima.⁷ Procjenjuje se da je učestalost plućne mikobakterioze u SAD veća nego tuberkuloze.⁹ Sukladno tome, trend postupnog smanjenja ukupnoga broja mikrobioloških izolata *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) i porast broja izolata NTM iz uzoraka dišnog trakta, zapažen je i u Hrvatskoj.¹⁰ Dok je 2001. godine od ukupnog broja mikobakterijskih izolata na *M. tuberculosis* otpadalo 96%, a na NTM 4%, 2011. godine je postotak NTM izolata bio trostruko veći, pri čemu je više od 95% izolata identificirano iz uzoraka dišnoga trakta.¹¹

Budući da mikrobiološka izolacija NTM iz uzoraka dišnog trakta, zbog njihove sveprisutnosti u okolišu, sama po sebi ne znači bolest, definirani su klinički, mikrobiološki i radiološki kriteriji za postavljanje dijagnoze plućne mikobakterioze, te procjenu neophodnosti provođenja antimikobakterijske

terapije.¹² Prema revidiranim smjernicama Američkog torakalnog društva (American Thoracic Society, ATS) i Američkog društva za zarazne bolesti (Infectious Diseases Society of America, IDSA) iz 2007. godine, klinički kriteriji uključuju opće i respiratorne simptome, uz isključenje drugih mogućih ili vjerojatnih etioloških čimbenika koji bi ih mogli izazvati.¹² Radiološki kriteriji za postavljanje dijagnoze plućne mikobakterioze prema spomenutim smjernicama obuhvaćaju infiltrate, kavitacije i/ili noduse na radiogramu pluća; infiltrate, kavitacije i/ili noduse na CT-u, te multifokalne bronhiektazije i mikronoduse na HRCT-u.¹³ Da bi bili zadovoljeni mikrobiološki kriteriji, moraju biti izolirane pozitivne kulture iz najmanje dva odvojena uzorka sputuma ili pozitivna kultura najmanje jednog uzorka bronhoalveolarnog lavata ili aspirata bronha ili histopatološki nalaz granulomatozne upale i pozitivna kultura iz barem jednog uzorka sputuma.¹²

Kako se o kliničkom aspektu izolacije netuberkuloznih mikobakterija iz uzoraka respiratornog sustava (iskašljaj, aspirat bronha, bronhoalveolarni lavat) u bolesnika s plućnom tuberkulozom u Hrvatskoj, do sada nije izvještavalo, to smo odlučili retrospektivno istražiti učestalost i vrste izoliranih NTM u bolesnika s tuberkulozom pluća, te analizirati njihov utjecaj na klinički tijek i ishod liječenja.

Bolesnici i metode

Da bismo utvrdili značaj mikrobiološke izolacije NTM kod bolesnika tretiranih od aktivne tuberkuloze pluća, retrospektivno smo pregledali povijesti bolesti 374 bolesnika koji su u razdoblju od 1. siječnja 2007. do 31. prosinca 2016. godine liječeni zbog aktivne tuberkuloze na Odjelu za pulmologiju Opće bolnice „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak, smještenom na lokaciji nekadašnje Bolnice za plućne bolesti i tuberkulozu u Petrinji, na kojoj se od 2003. godine liječe plućni bolesnici iz Sisačko – moslavačke županije (SMŽ). Pritom smo registrirali 285 bolesnika koji su imali pozitivne kulture na *Mycobacterium tuberculosis* (76,2%), a među njima šestero bolesnika kod kojih su izolirani i *Mycobacterium tuberculosis* i NTM (2,1%). U razmatranje su uvršteni bolesnici koji su imali

izoliranu barem jednu kulturu *M. tuberculosis* i najmanje jedan izolat NTM iz plućnih izvora u koje smo uvrstili sputum, bronhoalveolarni lavat, aspirat bronha i punktate pleure, budući da je 21 bolesnik (5,6%) imao istodobno plućnu i vanplućnu tuberkulozu. Svi izolati detektirani su i identificirani prema međunarodno važećim standardnim metodama u Nacionalnom referentnom centru za tuberkulozu (NRL) i mikobakterije (NRLM) pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo u Zagrebu i svi podaci kojima raspolažemo rezultat su njihove obrade.

S opadanjem incidencije tuberkuloze, u ispitivanom je vremenskom razdoblju, kontinuirano opadao i apsolutni broj bolesnika s pozitivnom kulturom iz respiratornih uzoraka na *M. tuberculosis*.¹⁴ Inicijalna faza liječenja tuberkuloznih bolesnika provedena je kontinuiranom četvornom kombinacijom antituberkulotika u sastavu Eutizon, Rifampicin, Etambutol i Pirazinamid, koji su bili dozirani individualno prema tjelesnoj težini i modificirani prema prisustvu hepatske ili bubrežne bolesti, te rezultatima testova osjetljivosti. Kod bolesnika koji su nakon dvomjesečnog liječenja ostajali pozitivni, inicijalna je faza produžavana do negativizacije kulture sputuma kao optimalnog mikrobiološkog i epidemiološkog kriterija koji prediktira otpust bolesnika. Na ovu fazu nastavljana je kontinuirana stabilizacijska faza ambulantnog liječenja s dva antituberkulotika – Eutizonom i Rifampicinom, u trajanju od četiri mjeseca. Ovaj se algoritam liječenja pokazao iznimno efikasnim, tako da kod bolesnika liječenih od 2007. do 2016. godine nije zabilježen niti jedan recidiv bolesti. Ritam uzorkovanja bakterioloških pretraga za tuberkulozu usklađen je s algoritmima propisanim nacionalnim Napucima za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze.^{15,16}

Tijekom aktivnog antituberkuloznog tretmana, kod četvero bolesnika izolirane su pozitivne kulture NTM iz dišnoga trakta, što smo označili pojmom koizolacija ili suizolacija (1,4%), a kod dvoje bolesnika (0,7%) pozitivne kulture izolata NTM registrirane su nakon završenog liječenja, točnije 11, odnosno 45 mjeseci nakon prve izolirane kulture *M. tuberculosis*, što smo definirali pojmom naknadna izolacija NTM. Zadnja koizolacija registrirana je u siječnju 2015. godine, a zadnja naknadna izolacija NTM u ožujku 2014. godine. Vrijeme opserviranja ovih bolesnika nakon završene inicijalne i stabilizacijske faze liječenja bilo je različito, a ovisilo je o vrsti i broju izoliranih NTM, prisustvu plućnih komorbiditeta zbog kojih su bolesnici nastavljali kontrole, te njihovoj suradljivosti. Medijan njihova praćenja iznosio je 81 mjesec (minimalno 5, maksimalno 100 mj.), što praktički znači da je

polovina bolesnika praćena 2430 dana i manje, a druga polovina dulje od toga.

Rezultati

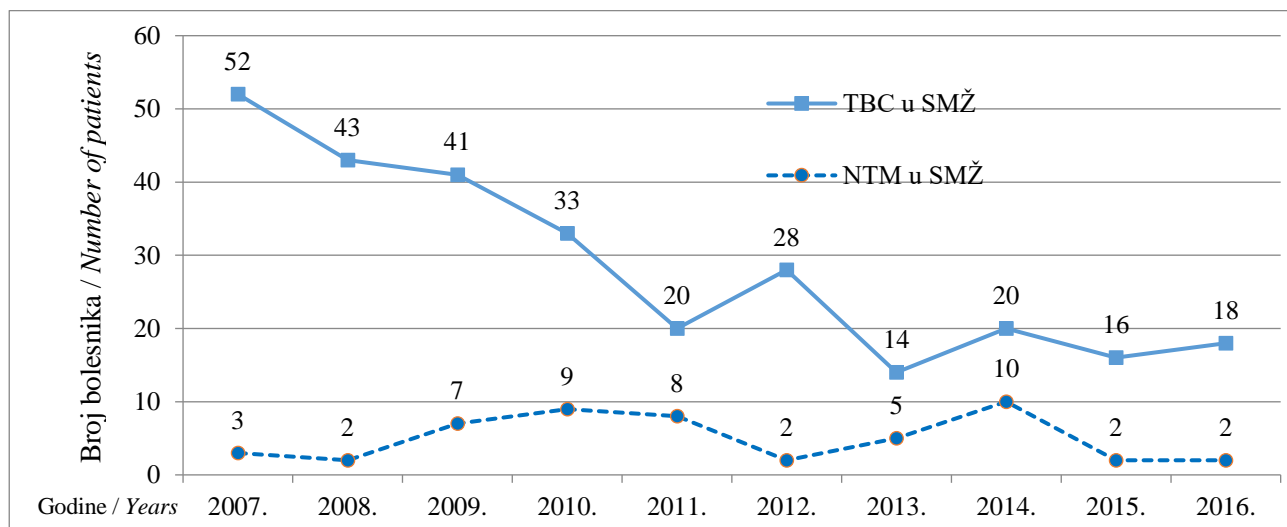
U promatranom vremenskom razdoblju registrirano je 46 bolesnika kod kojih je u uzorcima iz dišnoga sustava izolirano ukupno 81 NTM i to: *M. gordonae* 31 (38,2%), *M. kansasii* 13 (16%), *M. fortuitum* 12 (14,8%), *M. xenopi* 9 (11,1%), *M. terrae* 5 (6,2%), *M. chelonae* 3 (3,7%), *M. mucogenicum* 2 (2,5%), *M. vaccae* 1 (1,2%), *M. flavescens* 1 (1,2%), *M. intracellulare* 1 (1,2%), *M. thermoresistibile* 1 (1,2%), *M. triviale* 1 (1,2%) i *M. nonchromogenicum* 1 (1,2%). Kako je kod 19 bolesnika (41,3%) zbroj izoliranih kultura NTM bio veći od jedan, to smo slično drugim autorima,^{10,17} za računanje učestalosti izolacije NTM koristili samo jedan izolat po bolesniku definiran terminom epizoda NTM ili izolacijski događaj. To praktički znači da je svaka multipla izolacija jedne, te iste vrste NTM tretirana kao jedna izolacijska epizoda, pri čemu je sveukupno registrirano 46 takvih epizoda. Kako su kod četvorice bolesnika izolirane kulture dviju različitih vrsta NTM, to je svaka vrsta NTM tretirana kao zasebna izolacijska epizoda. Time se broj epizoda izolacije NTM povećao na 50. U statističkoj obradi podataka korištene su standardne deskriptivne statističke metode.

Grafički prikaz brojčanog odnosa između bolesnika s pozitivnim kulturama *M. tuberculosis* i izolacijskim epizodama NTM u Sisačko – moslavačkoj županiji, u studijskom razdoblju od 2007. do 2016. (Slika 1) ukazuje na trend smanjenja broja bolesnika s pozitivnim kulturama *M. tuberculosis*. Taj silazni smjer je kontinuiran, uz blaže oscilacije od 2011., dok je učestalost epizoda NTM znatno niža i uglavnom konstantna s povremenim pikovima porasta. Odnos bolesnika s identificiranim *M. tuberculosis* i epizodama NTM iz respiratornih uzoraka u našoj Županiji u skladu je s globalnim trendom po kojem se incidencija tuberkuloze smanjuje brže nego što se povećava incidencija NTM.⁷

U naših bolesnika s pozitivnom kulturom na *M. tuberculosis*, šestoro njih je imalo izolate NTM (2,1%), pri čemu je četvero bolesnika imalo koizolaciju (1,4%), a dvoje naknadnu izolaciju NTM (0,7%). U svim slučajevima *M. tuberculosis* je kultiviran prvi, a tek potom uslijedila je NTM kultivacija. Prema vrstama NTM, kod naših bolesnika koizolirani i naknadno izolirani su *M. gordonae* u tri slučaja (33,3%), *M. fortuitum* u dva (22,2%), *M. mucogenicum* u dva (22,2%), a u jednom slučaju *M. kansasii* (11,1%) i *M. chelonae* (11,1%). Među NTM

izolatima dvostruki su izolati dokazani u tri slučaja (50%), a identificirane vrste bile su *M. gordonae*, *M. mucogenicum* i *M. fortuitum*. Kod ostalih troje bolesnika radilo se samo o jednom izolatu, a to su bili *M. kansasii*, *M. chelonae* i *M. gordonae*.

Demografske, kliničke i radiološke karakteristike bolesnika s tuberkulozom pluća kod kojih smo registrirali koizolate i naknadne izolate NTM prikazali smo tablično (Tablica 1)



Slika 1. Odnos bolesnika s pozitivnim kulturama na *M. tbc* i epizodama NTM u SMŽ od 2007. do 2016.
 Picture 1 Correlation of patients with positive cultures to *MTB* and episodes of *NTM* in Sisak-Moslavina county from 2007 to 2016.

M. tbc – Mikobakterij tuberkuloze / *Mycobacterium tuberculosis*, NTM – netuberkulozne mikobakterije / *Nontuberculous Mycobacteria*, SMŽ – Sisačko – moslavačka županija / *Sisak – Moslavina County*

Tablica 1. Demografske, kliničke i radiološke karakteristike bolesnika s tuberkulozom pluća kod kojih smo registrirali koizolate i naknadne izolate NTM

Table 1 Demographical, clinical and radiological characteristics of patients with pulmonary tuberculosis in whom we have found co-isolates and subsequent isolates

Spol/ Gender	Dob/ Age	Komorbiditeti/ Comorbidity	Predispozicijski čimbenici/ Predisposing factors	RTG/CT nalaz/ RTG/CT finding
Ž/F	84	KOPB, diabetes mellitus, myocardiopathia ath., insufficiencia renalis	inhalacijski kortikosteroidi <i>inhaled corticosteroids</i>	bilobarni infiltrati, bronhiektazije <i>bilobar infiltrates, bronchiectasis</i>
Ž/F	61	hypertensio arterialis	GERB	infiltrat, pleuralni izljev <i>infiltrate, pleural outburst</i>
M/M	25	mb. Chron.	imunosupresivna terapija, pušenje <i>immunosuppressive therapy, smoking</i>	obostrani infiltrati <i>bilateral infiltrates</i>
Ž/F	67	KOPB, hypertensio art.	inhalacijski kortikosteroidi <i>inhaled corticosteroids</i>	Infiltrat <i>infiltrate</i>
M/M	36	diabetes mellitus	preboljela tbc., pušenje, snižen BMI <i>overcome tbc, smoking, reduced BMI</i>	obostrani infiltrati, obostrane kaverne <i>bilateral infiltrates, mutual caverns</i>

Ž/F	70	KOPB, hipertensio art.	inhalacijski kortikosteroidi <i>inhaled corticosteroids</i>	infiltrat, bronhiektazije <i>infiltrate, bronchiectasis</i>
-----	----	------------------------	--	--

M/M – muškarci / men; Ž/F – žene / female

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest / *chronic obstructive pulmonary disease*,

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest / *gastroesophageal reflux disease*,

BMI – Indeks tjelesne mase / *Body Mass Index*

Od demografskih podataka, analizirani su dob i spol. Među bolesnicima su se nalazile četiri žene i dva muškarca s medijanom životne dobi od 64 godine (raspon 25 - 84). Od komorbiditeta, najčešće je bio zastupljen KOPB (3 bolesnika), arterijska hipertenzija (3 bolesnika), diabetes mellitus (2 bolesnika), a po jedan bolesnik bolovao je od Chronove bolesti i bubrežne insuficijencije. Kao predispozicijski čimbenici za infekciju NTM registrirani su terapija inhalacijskim kortikosteroidima (3 bolesnika), pušenje (2 bolesnika), a u po jednom slučaju radilo se o ranije preboljeloj tuberkulozi pluća, GERB-u, sniženom indeksu tjelesne mase (BMI) i imuno-supresivnoj terapiji: Azathioprine (Imuran) i peroralni kortikosteroidi.

Radiološki i CT nalazi bolesnika kod kojih smo registrirali izolate *M. tuberculosis* i NTM ukazivali su na infiltrativne lezije koje su kod dvoje bolesnika bile bilateralne. Od četvero bolesnika s jednostranim

lezijama, bilobarne patološke promjene registrirane su kod njih dvoje. Kod jednoga bolesnika infiltrativne lezije bile su udružene s jednostranim pleuralnim izljevom, a kod drugoga s obostranim kavernama promjera do 17 mm. Dvoje bolesnika imalo je na CT-u bronhiektazije, čija učestalost u bolesnika s izolatima NTM varira kroz razne studije od 5–30%,¹⁸ a koje su poznate kao važan predispozicijski čimbenik za infekciju NTM. Četvero od šestoro bolesnika imalo je više od jedne radiološke abnormalnosti.

Od mikrobioloških podataka analizirani su broj i vrsta mikobakterijskih izolata, vrijeme od početka anti-tuberkuloznog tretmana do izolacije prve NTM, slijed i vrijeme konverzije pozitivnih kultura *M. tuberculosis* i NTM, te osjetljivost na lijekove. Podaci o mikrobiološkim kulturama, konverziji sputuma na BK i NTM, trajanju i ishodima liječenja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Mikrobiološke kulture, konverzija sputuma na BK i NTM, klinički ishodi i trajanje liječenja

Table 2. Microbiological cultures, sputum conversion to BK and NTM, clinical outcomes and the duration of treatment

Bolesnici/Patients	Kulture / Cultures		Vrijeme razlike (dani) <i>Time difference (days)</i>	Vrijeme konverzije (dani) <i>Conversion period (days)</i>		Klinički ishod <i>Clinical outcome</i>	Trajanje liječenja (dani) <i>Days of treatment</i>
	TBC broj <i>Number</i>	NTM broj i vrsta <i>Number and type</i>		TBC			
koizolacije / <i>co – isolation</i>							
1	6	2 (<i>M. gordonae</i>)	91	116	15	Umrla <i>Died</i>	118
2	10	2 (<i>M. fortuitum</i>)	126	154	33	Izlječenje <i>Healing</i>	275
3	11	1 (<i>M. kansasii</i>)	238	136	39	Izlječenje <i>Healing</i>	282
4	4	2 (<i>M. mucogenicum</i>)	73	95	69	Izlječenje <i>Healing</i>	216
naknadne izolacije / <i>non – co – isolation</i>							
5	1	1 (<i>M. gordonae</i>)	333	67	45	Izlječenje <i>Healing</i>	187
6	4	1 (<i>M. chelonae</i>)	1346	60	50	Izlječenje <i>Healing</i>	190

Prema podacima iz Tablice 2 razabire se da je u podskupini bolesnika s tuberkulozom pluća i izolatima NTM izolirano ukupno 36 kultura *M. tuberculosis*, pri čemu 33 iz sputuma, dva iz aspirata bronha i jedna iz pleuralnog punktata, te 9 kultura NTM. Prosječan broj pozitivnih kultura *M. tuberculosis* po bolesniku iznosio je 6 naspram 1,5 pozitivnih kultura NTM, pri čemu nije registrirana nijedna izolacija *M. tuberculosis* i NTM u istom respiratornom uzorku.

Medijan koizolacije NTM kod četvero bolesnika s aktivnom tuberkulozom pluća iznosio je 108,5 dana od početka antituberkuloznog liječenja, a medijan negativizacije kulture *M. tuberculosis*, odnosno trajanja inicijalne faze liječenja 126 dana, što je posljedica dugotrajne pozitivnosti bolesnice pod brojem 2, koja je, uz parenhimatozne lezije imala i BK pozitivan pleuralni izljev, te bolesnika pod brojem 3 koji je imao obostrane kaverne. Medijan ukupnog trajanja liječenja u slučaju koizolacije NTM iznosio je 275 dana s napomenom da u analizu nije uvrštena bolesnica pod brojem 1 koja je preminula 118. dana liječenja, a kod naknadne izolacije 188,5 dana, pri čemu nije registrirana statistički značajna razlika u duljini liječenja između ove dvije skupine bolesnika ($p > 0.05$). Kod svih bolesnika kod kojih su bakteriološki potvrđeni tuberkuloza pluća i izolati NTM iz dišnog trakta, postignuto je kliničko, bakteriološko i radiološko poboljšanje, te naposljetku izliječenje. Uzrok smrti kod preminule bolesnice nije bila tuberkuloza pluća ni NTM infekcija, već kardijalna dekompenzacija.

Kako su prema mikrobiološkim kriterijima ATS/IDSA za kliničku dijagnozu plućne mikobakterioze potrebna najmanje dva istovrsna izolata NTM, to su u prvi plan postavljeni dvostruki izolati *M. gordonae*, *M. mucogenicum* i *M. fortuitum*. Budući da su prva dva mikobakterija poznati kao kolonizatori i kontaminanti koji vrlo rijetko uzrokuju značajnu NTM infekciju u imunokompetentnih ljudi,¹² to smo veću pozornost posvetili bolesnici kod koje su u sputumu izolirane dvije kulture *M. fortuitum* koji, iako nisko virulentan, posjeduje stanoviti patogeni potencijal koji je posebice izražen kod bolesnika s bronhiektazijama ili drugim temeljnim bolestima pluća.¹⁹ Na radiogramu pluća bolesnica je imala infiltrat u srednjem režnju i istostrani pleuralni izljev, a *M. tuberculosis* izoliran je u kulturi u osam navrata u uzorcima sputuma, te u jednom navratu u aspiratu bronha i pleuralnom punktu. Koizolacija s *M. fortuitum* kod nje je identificirana 126 dana nakon početka liječenja i nije rezultirala pogoršanjem simptoma (pojačanje kašlja i zaduhe, povišena temperatura, gubitak tjelesne težine), progresijom postojećih ni pojavom novih patoloških lezija na

radiogramu i CT-u pluća. Koizolacija je protumačena kao kolonizacija, te je nastavljena antituberkulozna terapija, a već nakon 33 dana protekla od izolacije *M. fortuitum*, registrirana je spontana konverzija sputuma na ovu NTM.

Mada se jednostruki izolati NTM iz sputuma smatraju nedovoljnim nalazom za dijagnozu plućne mikobakterioze, prema mikrobiološkim kriterijima ATS/IDSA, novija istraživanja dokazuju kako jedan izolat NTM može biti rani znak prave plućne mikobakterioze i kako se odluka o liječenju može temeljiti samo na jednoj pozitivnoj kulturi dobijenoj iz aspirata ili lavata bronha,¹² ukoliko su klinička slika i radiološki nalaz koincidentni s razvijenom bolešću i ukoliko je izolirana NTM s visokim patogenim potencijalom,⁴ tim više što je utvrđeno da na određenim geografskim lokacijama, npr. u Južnoj Koreji, čak 14% bolesnika s jednom izoliranom kulturom *Mycobacterium avium complexa* (MAC), *M. kansasii* i *M. abscessus*, iz sputuma razvije plućnu mikobakteriozu nakon 14 mjeseci praćenja.²⁰

U tom smislu pažljivo kliničku procjenu inicirao je izolat *M. kansasii* koji se smatra jednim od najvirulentnijih NTM-a i kao takav često izaziva značajnu NTM infekciju sa simptomima i radiološkom slikom koja je vrlo slična infekciji s *M. tuberculosis*. Tim više što je izolacija *M. kansasii* u SMŽ u 43% slučajeva povezana s postojanjem dokazane ili prave plućne mikobakterioze²¹ i što se radilo o bolesniku s više čimbenika rizika za nastanak plućne mikobakterioze (prethodno preboljela tbc pluća, pušenje, smanjeni indeks tjelesne mase). Izostanak elicitacije simptoma i pojave novih plućnih lezija na RTG i CT pluća, naveli su nas na zaključak kako je i u ovom slučaju riječ o prolaznoj kolonizaciji iza koje je uslijedila višekratna spontana konverzija sputuma na izolirani NTM.

Tijekom redovitog praćenja bolesnika s izliječenom tuberkulozom pluća, pojedinačna NTM izolacija registrirana je kod dva bolesnika. Slijedom zapažanja da izolacija NTM u 1,1% slučajeva može prethoditi tuberkulozi pluća,¹⁸ pažljivo je razmotrena izolacija potencijalno patogenog *M. chelonae*, koji može biti uzročnik plućne mikobakterioze u imunosupresivnim stanjima,²² no koji se sve više priznaje kao rijedak, ali značajan uzrok kronične plućne infekcije i kod imunokompetentnih bolesnika.²³ Mada je izoliran čak 1346 dana (3,7 godina) nakon početka antituberkulozne terapije, kod bolesnika koji je zbog Chronove bolesti bio na imunosupresivnoj terapiji azatioprinom i peroralnim kortikosteroidima, provedena je temeljita mikrobiološka i radiološka obrada. Po završetku iste zaključeno je kako nisu zadovoljeni ATS/IDSA

kriteriji za pravu plućnu mikobakteriozu i da se radi o kolonizaciji.

Rasprava

Izolati NTM u tijeku ili po završenom liječenju tuberkuloze pluća nisu neuobičajena ni rijetka pojava. Prema literaturnim podacima kreću se u rasponu od 7,1% i 7,3% u Južnoj Koreji²⁴ i Sjevernom Tajvanu,²⁵ do 10,8% u Ontariju (Kanada)²⁶ i 14% u Oregonu (USA).⁹ Veliki broj izolata NTM zabilježen je kod bolesnika s kroničnom tuberkulozom pluća u Maliju (18%), koji su imali značajan utjecaj na klinički tijek, budući da su bolesnici empirijski liječeni kao multirezistentna tuberkuloza (MDR-TB) ili su pak bili kandidati za liječenje multirezistentne tuberkuloze, a ustvari se radilo o NTM infekciji u kojoj je dominirao *M. avium*.²⁷

U jedinome do sada objavljenom radu koji analizira ovaj fenomen u Hrvatskoj, no samo s mikrobiološkog aspekta i slijedno tome bez informacija o kliničkoj relevanciji i ishodima liječenja, registrirano je 4,3% NTM izolata iz dišnog trakta u bolesnika kod kojih je bakteriološki potvrđena tuberkuloza pluća, pri čemu je 67,9% bolesnika imalo koizolaciju, a 32,1% naknadnu izolaciju koja je u prosjeku uslijedila 19 mjeseci nakon izolacije *M. tuberculosis*.²⁸

Niski postotak izolacija NTM u bolesnika s tuberkulozom pluća u Hrvatskoj u odnosu na literaturne podatke iz drugih krajeva svijeta može se objasniti nedostatnim znanjem hrvatskih liječnika o NTM, financijskim aspektom identifikacije i nedostatkom odgovarajuće opreme lokalnih laboratorija.²⁸

Analizom stopa koizolacije NTM u različitim geografskim područjima, utvrdilo se da područja s niskom incidencijom tuberkuloze u populaciji imaju veću incidenciju koizolacije,^{9,26} od onih s visokom incidencijom tuberkuloze.^{24,25} Ovo otkriće neizravno podupire podatak da je vjerojatnost izolacije NTM i *M. tuberculosis* u Zagrebačkoj županiji, koja ima jednu od najnižih incidencija oboljelih od tuberkuloze u Hrvatskoj, tri puta manja u usporedbi sa svim ostalim županijama.²⁸ Kako Sisačko – moslavačka županija tijekom zadnja dva desetljeća ima najvišu incidenciju tuberkuloze u Hrvatskoj, to se je očekivala značajna razlika u učestalosti izolata NTM kod BK pozitivnih bolesnika u Hrvatskoj i Sisačko – moslavačkoj županiji, no usporedbom podataka o NTM izolacijama kod tuberkuloznih bolesnika u Hrvatskoj i Sisačko – moslavačkoj županiji u petogodišnjem vremenskom razdoblju od 2007. do 2011. godine nije dokazana statistički značajna razlika ($p > 0,05$, $Hi < 3.841$).²¹

Ključno pitanje koje si u slučaju koizolacije ili naknadne izolacije NTM, registrirane tijekom ili nakon liječenja plućne tuberkuloze, postavlja kliničar glasi: radi li se o relevantnoj plućnoj mikobakteriozi ili identifikacija pozitivne kulture NTM iz dišnih putova označava prolaznu infekciju, kolonizaciju ili kontaminaciju. Budući da mikrobiološka izolacija sama po sebi nije dostatan dokaz bolesti i da je za istu neophodno zadovoljenje kliničkih i radioloških kriterija, to je u takvim slučajevima indicirana temeljita evaluacija svih triju dijagnostičkih kriterija ATS/IDSA za definiciju prave ili relevantne NTM plućne bolesti.¹²

Zbog činjenice da bolesnici već imaju simptome i radiološke nalaze kompatibilne za plućnu tuberkulozu, razlika između NTM izazvane plućne bolesti i plućne tuberkuloze nije uvijek jasna, kako radi sličnih simptoma, tako i zbog radioloških preklapanja, pa je procjena značaja izolata NTM otežana, te može dovesti do dijagnostičkih i terapijskih pogrešaka, tim više što i same smjernice ATS/IDSA navode kako postoje klinički slučajevi koji njihovim uputama nisu izravno riješeni, a jedan od tih je upravo koizolacija NTM i *M. tuberculosis*.¹²

Budući da se prema strogim smjernicama ATS/IDSA dijagnoza mikobakterioze pluća postavlja eliminacijom alternativnih plućnih bolesti, to bi postojanje aktivne tuberkuloze pluća isključivalo mogućnost istodobne pojave prave plućne mikobakterioze. Takvu postavku opovrgavaju izvješća po kojima tuberkuloza i mikobakterioza pluća mogu postojati istodobno. Jedno od njih objavljeno je u Turskoj, pri čemu je plućna mikobakterioza bila uzrokovana vrlo patogenim *M. intracellulare*.²⁹ U kontekstu mješovitih *M. tuberculosis* – NTM koinfekcija, pojedini autori idu tako daleko da smatraju kako izolacija *M. abscessus* u sputumu bolesnika s aktivnom tuberkulozom pluća ustvari predstavlja koinfekciju.³⁰ Isto tako, jedan pozitivan uzorak sputuma na *M. kansasii* u kavitarnoj formi silikoze pluća, smatra se dostatnim za postavljanje dijagnoze plućne mikobakterioze i započinjanje terapije.³¹

Da je pojava koinfekcije *M. tuberculosis* i NTM fenomen koji se ne smije zanemarivati, dokazuje činjenica da je uspostavljen PCR (Polimerasa Chain Reaction) testni sustav koji omogućuje istovremenu detekciju i diferencijaciju između *M. tuberculosis* i NTM u kulturi sputuma.³² Uspostava ovoga testnog sustava dobiva na značaju zna li se da neprepoznavanje ove koinfekcije može dovesti do pogrešne dijagnoze kronične plućne, pa čak i multirezistentne tuberkuloze u kojoj testiranje osjetljivosti *M.*

tuberculosis na lijekove nije uspjelo zbog mješovitih kultura *M. tuberculosis* i NTM.³³

Da izolacija NTM iz dišnog trakta kod aktivnih tuberkuloznih bolesnika, nije uvijek nevina, kao što se možda pretpostavlja, dokazuju ispitivanja provedena u sjevernom Tajvanu.²⁵ Njima je ustanovljeno da je srednje trajanje antituberkuloznog liječenja osjetno dulje u bolesnika kod kojih je identificirano više NTM izolata (8,8 mj.) u odnosu na bolesnike s jednim NTM izolatom (7,6 mj.) ili bez izolata (7,5 mj.). Koliko god bila realna pretpostavka da oštećenja pluća izazvana tuberkuloznom upalom kondicioniraju kolonizaciju NTM koja može imati utjecaj na duljinu liječenja, kolonizirani bolesnici u konačnici nisu imali lošiju prognozu.²⁵ Razlog produljenog tretmana u ovoj studiji nije proizašao iz kolonizacije NTM, već zbog činjenice da su bolesnici s izoliranim NTM imali dvostruko više kaviteta, negoli oni bez NTM. Premda nismo sigurni da je srednje trajanje antituberkuloznog tretmana prava mjera procjene utjecaja NTM na ishod liječenja aktivne tuberkuloze pluća, na koju prema našem mišljenju više utječu opseg i karakter plućnih lezija, podnošljivost lijekova i rezistencija na iste, navodimo kako je medijan liječenja naših tuberkuloznih bolesnika s koizolacijom NTM iznosio 275 dana (9,2 mj.).

U svezi s bakteriološkom dijagnozom mikobakterioze pluća, napomenimo da je zabilježena pozitivna prediktivna vrijednost strožih mikrobioloških kriterija (više od dva pozitivna uzorka sputuma ili jedan pozitivan iskašljaj u kombinaciji s pozitivnim bronhoalveolarnim lavatom ili aspiratom) u postavljanju dijagnoze moguće i vjerojatne plućne mikobakterioze, te određivanju njezine incidencije i prevalencije.³⁴ Slijedom toga preporučena je primjena strožih kriterija u procjeni kliničkog značaja NTM vrsta manje patogenosti (*M. terrae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* i *M. chelonae*) i manje strožih kriterija za one vrste NTM koje imaju veću patogenost i veći klinički značaj u lokalnoj sredini (*M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. abscessus*, *M. avium*).

Studija provedena u Tajvanu dokazala je da je čak 21,8% bolesnika s jednom izolacijom NTM u sputumu (*MAC*, *M. chelonae* – *abscessus*, *M. kansasii*) tijekom prosječnog praćenja od 26,2 mj. imalo naknadno pozitivnu kulturu iste NTM, a da je 4% bolesnika u roku od 12 mj. razvilo pravu plućnu mikobakteriozu.³⁵ Kliničkim praćenjem dvoje naših bolesnika s bronhiektazijama u kojih su izolirani *M. kansasii* (x1) i *M. mucogenicum* (x2) nismo registrirali sekundarne ishode, tj. pojavu sljedeće pozitivne kulture sputuma na NTM i razvoja prave plućne mikobakterioze, što je posljedica činjenice da

su kao NTM kolonizatori u naših bolesnika izolirane NTM vrste nižeg patogenog potencijala.

Razdioba NTM vrsta u bolesnika liječenih od tuberkuloze pluća, uglavnom je sukladna onoj koju smo u spomenutom razdoblju registrirali u bolesnika s NTM izolatima bez aktivne tuberkuloze,²¹ što navodi na zaključak da su specifičnost vrsta i relativna učestalost NTM izolata slični, neovisno o tome ima li bolesnik ili nema tuberkulozu pluća.^{9, 24,25,36} Da bismo ustvrdili postoji li statistički značajna razlika u pojavnosti pojedinih NTM izolata u jednoj i drugoj skupini bolesnika, izvršili smo njihovu provjeru hi – kvadrat testom. Mada test nije u potpunosti korektno proveden zbog povećane nazočnosti frekvencija manjih od pet (bilo ih je 70% , a dopušteno je najviše 20%), rezultati ($\chi^2 = 6,58$ df = 4 n = 71 p = 0,681) pokazuju da među njima nema statistički značajne razlike, no, ustanovljena je statistički značajna razlika u dobi između podskupine bolesnika kod kojih su izolirani samo NTM i podskupine od 6 bolesnika kod kojih su izolirani NTM i *M. tuberculosis* (p < 0,05), a čiji su medijan i aritmetička sredina niži u odnosu na prvu podskupinu (Me = 65 naspram 68,6; AS = 58,3 naspram 66,2).

Za razliku od studija koje izvješćuju da bolesnici s mikrobiološki potvrđenom tuberkulozom pluća i izolatima NTM obuhvaćaju 20% svih multirezistentnih sojeva *M. tuberculosis* i 8% svih sojeva otpornih na Isoniazid,²⁸ odnosno da je učestalost izolacije NTM dvostruko veća u slučajevima tuberkuloze pluća rezistentne na više lijekova i izoniazid – rezistentnoj skupini,³⁶ kao i u 32% slučajeva u kojima je registrirana otpornost na jedan ili više antituberkulotika prve linije,³⁷ napominjemo kako u našoj podskupini bolesnika nije registrirana rezistencija na nijedan od standardnih anti-tuberkulotika. S time u vezi treba napomenuti kako pojedina izvješća ukazuju na neuspjeh u ispitivanju osjetljivosti *M. tuberculosis* na lijekove zbog suizolacije *M. tuberculosis* i NTM u 2,9% bolesnika.³³

Budući da plućna mikobakterioza može dugo vremena biti klinički indolentna, to je potrebno odgovarajuće, relativno dugo razdoblje praćenja, kako bi se odredio stvarni značaj NTM izoliranih iz sputuma.¹² Prema našim rezultatima, koizolati NTM iz respiratornih uzoraka tijekom liječenja aktivne tuberkuloze pluća pojavljuju se relativno kasno, s medijanom od 108,5 dana (raspon 73 – 238 dana) nakon započinjanja antituberkuloznog tretmana, što stvara bolje mogućnosti za validaciju njihova kliničkog značaja, budući da su simptomi i radiološki nalazi pluća u rezolutivnoj fazi, pa je lakše zamijetiti simptomatsko i radiološko pogoršanje.

U svim slučajevima koizolacije i naknadne izolacije NTM kod naših bolesnika s aktivnom ili predhodno tretiranom tuberkulozom pluća, radilo se o kolonizaciji NTM bez razvoja klinički značajne plućne infekcije, što potvrđuje pojava spontane konverzije sputuma kod koizolata i non-koizolata NTM s medijanom od 42 dana (raspon 15 – 69). Da je riječ o kolonizaciji posredno dokazuje činjenica da je medijan negativizacije kulture sputuma na BK iznosio 126 dana (raspon 95 – 154 dana), a medijan NTM koizolacije 108,5 dana (raspon 91 – 238 dana) nakon početka antituberkulozne terapije, tako da je teško vjerovati da bi prisustvo koizolata NTM u dišnom traktu, koji se u prosjeku javljaju 17,5 dana prije negativizacije kulture sputuma na BK, u znatnijoj mjeri utjecalo na tijek liječenja i brzinu konverzije sputuma.

Zahvaljujući tome, svi bolesnici s koizolatima NTM na standardnu su antituberkuloznu terapiju klinički i radiografski poboljšani, a bakteriološki negativizirani. Tijekom razdoblja kliničkog praćenja koje je prosječno trajalo 67,9 mjeseci (medijan = 81 mjesec) u ovoj skupini bolesnika nije bilo dodatnih pozitivnih kultura na *M. tuberculosis* i NTM vrste.

Ovo, prema našim saznanjima prvo kliničko istraživanje fenomena suizolacije NTM i *M. tuberculosis* i naknadne izolacije NTM iz respiratornih uzoraka kod bolesnika liječenih od aktivne tuberkuloze pluća u Hrvatskoj, podržava stav po kojem je ponajčešće riječ o prolaznoj i klinički neznčajnoj pojavi.² Premda su rijetke okolnosti u kojima je potreban specifičan tretman za obje mikobakterije,³⁸ ove fenomene ne treba potcjenjivati već uvijek klinički pratiti i pažljivo razmotriti potrebu za terapijskim tretmanom, pogotovo u onim slučajevima kada su izolati NTM dokazani u kroničnoj²⁷ i multirezistentnoj tuberkulozi^{28,36} i kada su među izolatima NTM identificirane virulentnije vrste.²⁴

Zaključci

Na temelju retrospektivne studije 285 bolesnika s pozitivnim kulturama respiratornih uzoraka na *Mycobacterium tuberculosis*, liječenih u razdoblju od 1. siječnja 2007. do 31. prosinca 2016. godine na Odjelu za plućne bolesti OB „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak – lokacija Petrinja registrirali smo šest bolesnika s pozitivnim NTM kulturama (2,1%), što je, prema dostupnim literaturnim podacima, dosada najniža učestalost izolacije NTM u tuberkuloznih bolesnika. Koizolacije su dokazane u 4 slučaja (1,4%), a u dva slučaja je registrirana naknadna NTM kultivacija (0,7%). Razdioba NTM vrsta u bolesnika liječenih od

tuberkuloze pluća, uglavnom je sukladna onoj koju smo u spomenutom razdoblju registrirali u bolesnika s NTM izolatima bez aktivne tuberkuloze. Suizolati NTM iz respiratornih uzoraka tijekom liječenja aktivne tuberkuloze pluća pojavili su se u prosjeku 108,5 dana od početka antituberkuloznog tretmana, a konverzija sputuma na BK nastupila je nakon 126 dana. Tijekom razdoblja kliničkog praćenja koje je u prosjeku iznosilo 67,9 mjeseci nakon završenog antituberkuloznog liječenja, kod bolesnika nije bilo pozitivnih kultura na *M. tuberculosis* i NTM vrste. U svim slučajevima koizolacije i naknadne izolacije NTM radilo se o prolaznoj kolonizaciji, bez razvoja klinički značajne plućne infekcije. Izolacija NTM nije utjecala na ishod liječenja tuberkuloze pluća, niti je tuberkuloza pluća utjecala na pojavu klinički značajne mikobakterioze pluća.

Literatura

1. Falkinham J O. Impact of human activities on the ecology of non-tuberculous mycobacteria. *Future Microbiol.* 2010;5:951-60.
2. Epstein M D, Aranda CP, Bonk S, Hanna B, Rom WN. The significance of mycobacterium avium complex cultivation in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Chest.* 1997;111:142-7.
3. Van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med.* 2013; 34:103-9.
4. Andrejak C, Nielsen R, Thomsen V, Duhaut P, Sorensen TH, Thomsen RW. Chronic respiratory disease, inhaled corticosteroids and risk of non-tuberculous mycobacteriosis. *Thorax.* 2013; 68:256-62.
5. Khan K, Wang J, Marras TK. Nontuberculous mycobacterial sensitization in the United States: national trends over three decades. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:306-13.
6. Cassidy PM, Hedberg K, Saulson A, Mc Nelly E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis.* 2009;49:e124-9.
7. Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014;18:1370-7.
8. Winthrop KL, McNelley E, Kendall B, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:977-82.
9. Kendall BA, Varley CD, Choi D, et al. Distinguishing tuberculosis from nontuberculous mycobacteria lung disease, Oregon, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011;17: 506-9.
10. Jankovic M, Samarzija M, Sabol I et al. Geographical distribution and clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria in Croatia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013; 17:836-41.

11. Žmak LJ, Janković M, Obrovac M, Katalinić – Janković V. Netuberkulozne mikobakterije. *Infektološki glasnik*. 2013;33:95-101.
12. Griffith DE, Aksamit T, Brown – Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment and prevention of nontuberculosis mycobacterial diseases. *Am J Resp Crit Care Med*. 2007;175:367-416.
13. Marušić A. Epidemiologija, slikovni prikaz i kliničko značenje infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama (disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet, 2010, str. 20.
14. Hrvatski zdravstveno – statistički ljetopis za 2007. i 2016. godinu, Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, WEB izdanje, str. 210 i 197, dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije>. Datum pristupa informaciji 6. I. 2019.
15. Naputak za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske, Zagreb, 1998.
16. Naputak za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze, II. dopunjeno i izmijenjeno izdanje. Republika Hrvatska Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2010.
17. Janković Makek M. Epidemiologija i klinička važnost plućnih infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama (disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet, 2014, str. 22.
18. Bonaiti G, Pesci A, Marruchella A, Lapodula G, Gori A, Aliberti S. Nontuberculous Mycobacteria in noncystic fibrosis bronchiectasis. *Biomed Res Int*. 2015; Article ID 197950, 8 pages; doi 10.1155/2015/197950.
19. Park S, Suh GY, Chung MP et al. Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* isolated from respiratory specimens, *Respir Med*. 2008;102:437-42.
20. Koh WJ, Chang B, Ko Y, et al. Clinical significance of a single isolation of pathogenic nontuberculous mycobacteria from sputum specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75:225-6.
21. Vrga B. Epidemiološki i klinički aspekti mikobakterioze pluća u Sisačko – moslavačkoj županiji. *Liječ Vjesn*. 2018;140:293-302.
22. Chien JY, Lai CC, Sheng WH, Yu CJ, Hsueh PR. Pulmonary infection and colonization with nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2012. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1382-5.
23. Hazelton TR, Newell JD Jr., Cook JL, Huitt GA, Lynch DA. CT findings in 14 patients with *Mycobacterium chelonae* pulmonary infection, *AJR. Am J Roentgenol*. 2000;175:413-6.
24. Jun HJ, Jeon K, Um SW, et al. Nontuberculous mycobacteria isolated during the treatment of pulmonary tuberculosis. *Respir Med*. 2009;103:1936-40.
25. Huang CT, Tsai YJ, Chu CS et al.: Clinical significance of isolation of nontuberculous Mycobacteria in pulmonary tuberculosis patients, *Respir Med*. 2009; 103:1484-91.
26. Damaraju D, Jamieson F, Chedore P, Marras TK. Isolation of non-tuberculous mycobacteria among patients with pulmonary tuberculosis in Ontario, Canada, *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013;17:676 -81.
27. Maiga M, Siddiqui S, Diallo S, et al. Failure to recognize nontuberculous mycobacteria leads to misdiagnosis of chronic pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*. 2012;7:e36902.
28. Žmak Lj, Obrovac M, Jankovic Makek M, Sabol I, Katalinic–Jankovic V. Isolation of non-tuberculous mycobacteria among tuberculosis patients during a five-year period in Croatia (postprint version). Dostupno na adresi: http://fulir.irb.hr/2291/1/zmak_et_al_postprint.pdf. Datum pristupa informaciji 4. I. 2019.
29. Yilmaz N, Uçar EY, Sağlam L. Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacteria coinfection of the lungs. *Turk Thorac J*. 2017;18:23-26.
30. Mertaniasih NM, Kusumaningrum D, Koendhori EB, Soedarsono, Kusmiati T, Dewi DN. Nontuberculous mycobacterial species and Mycobacterium tuberculosis complex coinfection in patients with pulmonary tuberculosis in Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. *Int J Mycobacteriol*. 2017;6:9-13.
31. Corbett EL, Hay M, Churchyard GJ, et al. Mycobacterium kansasii and M. scrofulaceum isolates from HIV-negative South African gold miners: incidence, clinical significance and radiology. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999;3:501-7.
32. Ustinovaa VV, Smirnovaa TG, Sochivkoc DG, et all. New assay to diagnose and differentiate between Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria, *Tuberculosis*. 2019;114:17-23.
33. Hwang SM, Lim MS, Hong YJ, et al. Simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013;93:642-6.
34. Jankovic M, Sabol I, Zmak L, et al. Microbiological criteria in non-tuberculous mycobacteria pulmonary disease: a tool for diagnosis and epidemiology. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20:934-40.
35. Lee MR, Yang CY, Shu CC, et al. Factors associated with subsequent nontuberculous mycobacterial lung disease in patients with a single sputum isolate on initial examination. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:250e1-7.
36. Zmak Lj, Obrovac M, Janković Makek M, Sabol I, Katalinic –Jankovic V.: Isolation of non-tuberculous mycobacteria among tuberculosis patients during a 5-year period in Croatia. *Infect Dis (Lond)*. 2015;47: 275-6.
37. Al Jarad N, Demertzis P, Jones DJ et al. Comparison of characteristics of patients and treatment outcome for pulmonary non-tuberculous mycobacterial infection and pulmonary tuberculosis. *Thorax*. 1996;51:137-9.
38. Park Y, Lee C, Lee S, et al. Rapid increase of nontuberculous mycobacterial lung diseases at a tertiary referral hospital in South Korea. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14:1069-71.