



Središnja medicinska knjižnica

Janković Makek, Mateja (2014) *Epidemiologija i klinička važnost plućnih infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama [Epidemiology and clinical relevance of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples in Croatia]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/2134>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mateja Janković Makek

**Epidemiologija i klinička važnost plućnih
infekcija uzrokovanih netuberkuloznim
mikobakterijama**

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Ovaj je rad izrađen u Klinici za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb te u Odsjeku za netuberkulozne mikobakterije Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

Voditelj rada: Prof. dr.sc. Miroslav Samaržija

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru, prof.dr.sc. Miroslavu Samaržiji na uloženom trudu, vrijednim savjetima i nesebičnoj pomoći.

Veliko hvala i svim kolegama s Odsjeka za netuberkulozne mikobakterije Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo te kolegama iz brojnih općih bolnica i kliničkih centara s kojima sam surađivala tijekom izrade ovog rada.

Na kraju, hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori i ljubavi.

Mateja

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

1. UVOD	1
1.1. Povijest	1
1.2. Morfološke i fiziološke karakteristike netuberkuloznih mikobakterija	2
1.3. Identifikacija novih vrsta i taksonomija	5
1.4. Izvori i putevi prijenosa netuberkuloznih mikobakterija	9
1.5. Epidemiologija infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama	9
1.6. Kliničke karakteristike bolesti uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama	13
1.7. Dijagnoza plućne mikobakterioze	15
1.8. Liječenje bolesti uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama	17
1.9. Rastući interes za netuberkulozne mikobakterije u Hrvatskoj	19
2. HIPOTEZE	21
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
4. MATERIJALI I METODE	22
4.1. Koncept istraživanja	22
4.2. Prikupljanje uzoraka	22
4.3. Identifikacija netuberkuloznih mikobakterija	25
4.4. Definicija bolesti korištenjem mikrobioloških kriterija	26
4.5. Definicija bolesti korištenjem cjelovitih kriterija	27
4.6. Obrada podataka i zaštita identiteta ispitanika	27
5. REZULTATI	29
5.1. Izolati netuberkuloznih mikobakterija plućnog porijekla	29
5.2. Važnost pojedinih vrsta netuberkuloznih mikobakterija ovisno o mikrobiološkim kriterijima	35
5.3. Važnost pojedinih vrsta netuberkuloznih mikobakterija ovisno o cjelovitim kriterijima	40
5.4. Korelacija mikrobioloških i cjelovitih kriterija	44
5.5. Klinički podaci	46
5.6. Liječenje plućnih mikobakterioza	50
5.7. Plućne mikobakterioze uzrokovane najčešćim patogenim vrstama netuberkuloznih mikobakterija u Hrvatskoj	53
5.7.1. <i>M. xenopi</i>	53
5.7.2. <i>M. avium</i> complex	53
5.7.3. <i>M. kansasii</i>	54

6. RASPRAVA	55
6.1. Izolati netuberkuloznih mikobakterija iz uzoraka plućnog porijekla	55
6.2. Klinička važnost pojedinih vrsta netuberkuloznih mikobakterija u Hrvatskoj	58
6.3. Incidencija plućne mikobakterioze u Hrvatskoj i korelacija mikrobioloških i cjelovitih kriterija	61
6.4. Klinička slika plućnih mikobakterioza	64
6.5. Liječenje plućnih mikobakterioza	68
7. ZAKLJUČAK	72
8. SAŽETAK	74
9. SUMMARY	75
10. LITERATURA	76
11. ŽIVOTOPIS	86

POPIS KRATICA

AIDS	stečeni sindrom imunodeficijencije (eng. acquired immunodeficiency syndrome)
ATS	Američko torakalno društvo (eng. American Thoracic Society)
BMI	indeks tjelesne mase (eng. body mass index)
BTS	britansko torakalno društvo (eng. British Thoracic Society)
CF	cistična fibroza
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
HIV	virus humane imunodeficijencije (eng. human immunodeficiency virus)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (od eng. high-performance liquid chromatography)
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
IDSA	Američko društvo za zarazne bolesti (eng. Infectious Diseases Society of America)
IGRA	test otpuštanja gama-interferona (eng. interferon-gamma release assay)
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MALDI-TOF	matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (eng. matrix-assisted laser desorption ionization-time of light)
MOTT	druge mikobakterije osim <i>M. tuberculosis</i> (eng. <i>Mycobacteria</i> other than <i>M. tuberculosis</i>).
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NTM	netuberkulozne mikobakterije
PPD	pročišćeni derivati proteina (eng. purified protein derivative)
RGM	brzorastuće mikobakterije (eng. rapidly growing mycobacteria)
RNK	ribonukleinska kiselina
SGM	spororastuće mikobakterije (eng. slowly growing mycobacteria)

1. UVOD

1.1. Povijest

Pretpostavlja se da se rod *Mycobacterium* prvi put pojavljuje prije više od 150 milijuna godina, a "moderni" članovi roda kao *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) prije otprilike 20 000 do 35 000 godina. Otkako je Robert Koch 1882.g. otkrio i opisao *M. tuberculosis*, neprestano raste broj novih vrsta, opisanih i izoliranih iz različitih životinjskih i okolišnih izvora. U početku su se sve te vrste nazivale „atipičnom *M. tuberculosis*“, no u sljedećih je nekoliko desetljeća postalo jasno da se rod *Mycobacterium* sastoji od tri glavna dijela: *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*), *Mycobacterium leprae* i netuberkuloznih mikobakterija (NTM).

Soznaja o patogenom potencijalu netuberkuloznih mikobakterija raste od 50-tih godina dvadesetog stoljeća nadalje, a prekretnicom se smatra rad Buhlera i Pollacka. U njemu se opisuju dva slučaja plućne bolesti slične tuberkulozi, no uzrokovane drugom vrstom mikobakterije, danas poznatom pod imenom *M. kansasii* (1). Pojava AIDS-a i postignuća u molekularnoj biologiji značajno su utjecala na otkrivanje, identifikaciju i porast broja NTM. Sve je to unaprijedilo spoznaju o mikobakterijama i njihovoj uključenosti u različite kliničke entitete i bolesti u imunokompromitiranih, ali i imunokompetentnih osoba.

Runyon i Timpe su 1950-tih godina prvi klasificirali i opisali netuberkulozne mikobakterije (2). Runyon je promatrao mikobakterije očima biologa. S obzirom na brzinu rasta, morfologiju kolonija i stvaranje pigmenta na svjetlu, podijelio ih je u četiri grupe: spororastuće (nekromogene, fotokromogene, skotokromogene) i brzorastuće mikobakterije (3). Davidson je 1989. godine NTM podijelio prema kliničkoj

značajnosti na uvjetno patogene, oportunističke mikobakterije i čiste saprofite (4). Granicu između jednih i drugih nije uvijek lako odrediti tako da se smatra da i saprofiti u određenim uvjetima mogu biti uzročnici bolesti.

Za NTM su nekad upotrebljavani danas napušteni nazivi "atipične mikobakterije", okolišne mikobakterije, oportunističke mikobakterije ili "druge mikobakterije osim *M. tuberculosis*" (MOTT). Kritičari spomenutih imena bili su u pravu, jer su ove mikobakterije prema svojim osobinama tipični predstavnici roda *Mycobacterium*. Iako sam naziv netuberkulozne mikobakterije nije idealan, pogotovo ne u hrvatskom jeziku, udomaćio se u svim publikacijama te će biti korišten i u ovoj disertaciji.

1.2. Morfološke i fiziološke karakteristike netuberkuloznih mikobakterija

Rod *Mycobacterium* i danas je jedini član obitelji *Mycobacteriaceae* i broji više od 160 vrsta. Klasificiran je u red *Actinomycetales* i razred *Actinomycetes* (5). Mikobakterije su aerobni, nepokretni, lagano zavijeni štapići dužine 1-10 µm (najčešće 3-5 µm) i širine 0,2-0,6 µm, bez spora, a vrijeme replikacije je od 18-24 sata. Fakultativni su intracelularni mikroorganizmi i ne posjeduju klasične faktore virulencije poput toksina, fimbrija ili kapsula.

Poznavanje i razumijevanje fiziologije i morfoloških karakteristika NTM-a, ključno je za razumijevanje njihove ekologije, puteva prijenosa te otpornosti na antibiotike i različita dezinfekcijska sredstva. U tablici 1 prikazane su morfološke i fiziološke karakteristike važne za ekologiju netuberkuloznih mikobakterija (5). Nedavno je ustanovljeno da NTM, slično kao i gram-negativne bakterije, posjeduju vanjsku membranu. Međutim, za razliku od one gram-negativnih bakterija, vanjska

membrana NTM-a bogata je dugolančanim masnim kiselinama (C40-C80, mikolične kiseline) koja stoga čini oko 40% ukupne mase stanice NTM-a (7).

Lipidima bogata vanjska membrana odgovorna je za karakteristike stanice NTM-a kao što su nepropusnost za hidrofilne nutrijente i otpornost na dezinfekcijska sredstva, teške metale i antibiotike. Nadalje, uzrokuje hidrofobnost samih stanica NTM-a koje su stoga sklone pričvršćivanju i rastu na različitim površinama (npr. stvaranje biofilma), kao i stvaranju aerosola. Rast u formi biofilma dodatno povećava otpornost na dezinfekcijska sredstva (8) i antibiotike (9). Kombinacija nepropusne vanjske membrane i malog broja (1 do 2) ribosomalnih RNK (rRNK) operona (10) doprinosi sporom rastu NTM-a.

Mnoge vrste NTM-a su relativno otporne na visoke temperature (11), niski pH i niske razine kisika. Uz rast u formi biofilma, navedeno doprinosi raznolikosti staništa NTM-a te objašnjava njihovu čestu izolaciju iz vodenih sistema (prirodnih i umjetnih), kućanstava, aerosola, zemlje i prašine.

Iako se NTM u okolišu moraju nadmetati sa znatno snalažljivijim mikroorganizmima, njihova je prednost mogućnost rasta u uvjetima smanjene dostupnosti nutrijenata i kisika. Nadalje, otpornost na dezinfekcijska sredstva doprinosi njihovom odabiru nad drugim mikroorganizmima pa, u odsutnosti suparnika, njihov spor rast više ne predstavlja značajan nedostatak.

Tablica 1. Morfološke i fiziološke karakteristike važne za ekologiju netuberkuloznih mikobakterija (NTM) (5).

Karakteristika	Posljedica
Vanjska membrana bogata lipidima	Površina stanice je hidrofobna
	Olakšano je prijanjanje za površinu i stvaranje „biofilma“
	Nepropusnost za hidrofilne nutrijente
	Otpornost na antibiotike
	Otpornost na dezinfekcijska sredstva
	Spor rast (1 generacija/dan)
Jedan ili dva rRNK operona	Spor rast, otpornost na antibiotike
Mikroaerobnost	Rast uz niske vrijednosti kiska (6-12%)
Oligotrofnost	Rast uz prisustvo niskih koncentracija ugljika
Tolerancija topline	Preživljavanje i rast u bojlerima i sustavima za recirkulaciju vruće vode
Otpornost na amebe	Preživljavanje u biofilmovima nastanjenim s fagocitirajućim amebama

1.3. Identifikacija novih vrsta i taksonomija

Kako se otkrivaju nove vrste i taksonomija mikobakterija se kontinuirano mijenja. Identifikacija novih vrsta se temelji na konvencionalnom opisu prema Runyonovoj klasifikaciji (tablica 2), biokemijskim osobinama soja i stupnju DNK hibridizacije. Rastom broja vrsta i podvrsta s različitim biokemijskim osobinama, razvijene su nove metode i stvoreni novi standardi za njihovu diferencijaciju (12,13,14,15,16,17).

Za prihvaćanje nove vrste, uključeni su standardni konvencionalni načini identifikacije: biokemijske karakteristike, rast i stvaranje pigmenta, ali i novi poput plinske kromatografije (13), tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) (14), inačica masene spektrometrije zasnovane na principu matricom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije (MALDI-TOF) (15) i genetske osnove temeljene na sekvenciranju gena (16,17). Od 1990. do 1999. godine prepoznato je 28 (18), a od 2000. do kraja 2007. godine još 41 nova vrsta NTM (tablica 3) (19). Od posljednje 41 novootkriven vrste, najmanje ih je 26 opisano kao uzročnici bolesti u ljudi, a među njima je čak šest pripadnika grupe brzorastućih mikobakterija. Ovo ilustrira današnju brzinu u taksonomiji mikobakterija i dodatno otežava interpretaciju njihova nalaza.

Vrste koje pripadaju pojedinoj grupi često se javljaju kao dio kompleksa, a mogu se razlikovati u virulenciji ili patogenezi. Neke od vrsta koje su prije smatrane samostalnim, danas se sastoje od više srodnih vrsta posljedično otkrivenim biokemijskim i genetskim razlikama. Primjer za to je *M. tuberculosis* complex. Ovaj se kompleks danas sastoji od *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* i *M. bovis*, koji je kasnije diferenciran u *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* i *M. canettii* (20).

Sličan fenomen je vidljiv i u *M. avium* complex-u. Originalno jedna vrsta, u međuvremenu je podijeljena u vrste *M. avium*, *M. intracellulare* i *M. scrofulaceum*

(21,22,23). Ova identifikacija je bazirana na biokemijskim i molekularnim kriterijima kao što su plinska kromatografija mikoličnih kiselina i sekvenciranje.

Tablica 2. Podjela netuberkuloznih mikobakterija (NTM) prema Runyonu (3).

Grupa	Karakteristike	Važne vrste
I	spororastuće; stvaraju pigment po izlaganju svjetlosti (fotokromogene)	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i>
II	spororastuće; stvaraju pigment u mraku (skotokromogene)	<i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. gordonae</i>
III	spororastuće; bez pigmenta (nefotokromogene)	<i>M. malmoense</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. avium-complex</i> , <i>M. ulcerans</i> ,
IV	brzorastuće	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i>

Tablica 3. Nove vrste netuberkuloznih mikobakterija (NTM), otkrivene između siječnja 2000. i rujna 2007. godine (19).

Godina	Vrsta	izvor	Runyon grupa	Dodatne informacije
2000.	<i>M. botniense</i>	voda	2	<i>M. xenopi</i> - like
2000.	<i>M. kubicae</i>	čovjek	2	između sporo / brzo rastućih
2000.	<i>M. septicum</i>	čovjek	4	
2000.	<i>M. elephantis</i>	slon	4	
2001.	<i>M. heckeshornense</i>	čovjek	2	<i>M. xenopi</i> -like

2001.	<i>M. doricum</i>	čovjek	2	
2001.	<i>M. immunogenum</i>	čovjek	4	<i>M. abscessus</i> grupa
2001.	<i>M. frederiksbergense</i>	kontaminirana zemlja	4	
2002.	<i>M. palustre</i>	čovjek / drugo	2	
2002.	<i>M. lacus</i>	čovjek	3	
2002.	<i>M. vanbaalenii</i>	kontaminirana zemlja	4	
2002.	<i>M. holsaticum</i>	čovjek	4	
2003.	<i>M. pinnipedii</i>	tuljan		<i>M. tuberculosis</i> - complex
2003.	<i>M. shottsii</i>	grgeč	3	ne raste >30°C
2003.	<i>M. montefiorensense</i>	jegulja	3	ne raste >30°C
2004.	<i>M. saskatchewanense</i>	čovjek	2	
2004.	<i>M. parascrofulaceum</i>	čovjek	2	
2004.	<i>M. parmense</i>	čovjek	2	
2004.	<i>M. nebraskense</i>	čovjek	2	
2004.	<i>M. chimaera</i>	čovjek	3	MAC grupa
2004.	<i>M. psychrotolerans</i>	voda/ribnjak	4	
2004.	<i>M. canariasense</i>	čovjek	4	
2004.	<i>M. cosmeticum</i>	čovjek	4	
2004.	<i>M. pyrenivorans</i>	kontaminirana zemlja	nepoznato	

2004.	<i>M. massiliense</i>	čovjek	4	<i>M. abscessus</i> grupa
2005.	<i>M. florentinum</i>	čovjek	nepoznato	spororastuća pigmentirana
2005.	<i>M. pseudoshottsii</i>	grgeč	1	
2006.	<i>M. arupense</i>	čovjek	3	brzorastuća na 30°C
2006.	<i>M. phocaicum</i>	čovjek	4	
2006.	<i>M. neworleansense</i>	nepoznato	4	<i>M. fortuitum</i> grupa
2006.	<i>M. houstonense</i>	nepoznato	4	<i>M. fortuitum</i> grupa
2006.	<i>M. aubagnense</i>	čovjek	4	<i>M. mucogenicum</i> grupa
2006.	<i>M. bolletii</i>	čovjek	4	<i>M. abscessus</i> grupa
2006.	<i>M. boenickei</i>	nepoznato	4	<i>M. fortuitum</i> grupa
2006.	<i>M. conceptionense</i>	čovjek	4	<i>M. fortuitum</i> grupa
2006.	<i>M. fluoranthenivorans</i>	zemlja	nepoznato	
2006.	<i>M. kumamotonense</i>	čovjek	3	<i>M. terrae</i> grupa
2006.	<i>M. colombiense</i>	čovjek	3	MAC grupa
2006.	<i>M. monacense</i>	čovjek	4	
2006.	<i>M. brisbanense</i>	nepoznato	4	<i>M. fortuitum</i> grupa
2007.	<i>M. seoulense</i>	čovjek	2	

1.4. Izvori i putevi prijenosa netuberkuloznih mikobakterija

Rezervoari koji gaje velike koncentracije NTM-a uključuju velike vodovodne sisteme, vodovodne sustave kućanstava, tuševe i odvodne vode, tla bogata tresetom, područja estuarija, močvarna područja. Neki od navedenih izvora su i dokazano povezani s NTM infekcijom u ljudi (24,25,26,27).

Mogući putevi prijenosa NTM-a iz njihovih prirodnih rezervoara i infekcije u ljudi uključuju: ingestiju zemlje i/ili vode u male djece koja vodi do nastanka limfadenitisa; inhalaciju aerosola i/ili prašine koja vodi do plućne bolesti; aspiraciju (uslijed povrata želučane kiseline) NTM-a koje su u organizam ušle kroz probavni sustav i posljedičnu plućnu bolest te unos putem probavnog sustava i sistemske bolesti u imunokompromitiranih bolesnika sa značajnim poremećajem u funkciji barijere gastrointestinalnog sustava. Ipak, najznačajniji put prijenosa NTM jest putem aerosola, osobito za infekcije s *M. avium* i *M. intracellulare* (28).

1.5. Epidemiologija infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama

Već se desetljećima piše o porastu izolacije NTM-a i incidencije mikobakterioza, no unatoč porastu broja istraživanja i donošenju novih kriterija za dijagnostiku i liječenje (29), još uvijek se malo zna o epidemiologiji i prirodnom tijeku bolesti, odnosno prevenciji plućnih mikobakterioza (30).

Broj izoliranih NTM-a progresivno raste kroz zadnjih nekoliko desetljeća i nadilazi prevalenciju izoliranih *M. tuberculosis* u laboratorijima gotovo svih ekonomski razvijenih zemalja svijeta (31,32,33). Iako se navedeni trend dijelom može pripisati razvoju laboratorijskih tehnika i metodologije, povećanje broja plućnih mikobakterioza

nije isključivo laboratorijski fenomen. Opće je prihvaćeno da je rast prevalencije mikobakterioza posljedica demografskih promjena kao što je starenje populacije, koje sa sobom nosi slabljenje imunološkog sustava i pojavu niza predisponirajućih bolesti (34).

Van Ingen i suradnici su usporedili podatke Nizozemskog nacionalnog laboratorija s demografskim podacima, kako bi istražili da li se povećana stopa izolacije MAC može pripisati isključivo poboljšanju mikrobioloških laboratorijskih tehnika (35). Našli su da raste broj izolata plućnog porijekla u osoba starijih od 40 godina dok je broj izvan-plućnih izolata i limfadenitisa u djece ostao stabilan. Obzirom da se u istom periodu prati i porast populacije starije od 40 godina i porast KOPB-a u toj grupi, autori su zaključili da se porast stope izolacije ne može pripisati isključivo poboljšanju laboratorijskih tehnika.

Nekoliko je razloga zašto je epidemiologiju NTM-a znatno teže dokumentirati u usporedbi s njihovim poznatijim rođakom, MTB-om. Za razliku od MTB-a, NTM su okolišni patogeni, koji se nalaze u zemlji, prirodnim vodama i vodovodnim sistemima (36,37) i smatra se da do infekcije dolazi zbog izloženosti u okolišu uz rijetke iznimke dokumentiranog prijenosa s osobe na osobu (38). S obzirom na njihovu sveprisutnost u okolišu, izloženost ovim patogenima je uobičajena pojava te stoga NTM mogu kolonizirati dišni i probavni sustav bez uzrokovanja bolesti. Na kraju, u većini zemalja, mikobakterioze ne podliježu obveznoj prijavi javnozdravstvenoj službi što dodatno otežava određivanje točne incidencije i prevalencije ovih bolesti.

Najveći broj populacijskih studija dolazi s područja Sjeverne Amerike i zapadne Europe. Marras i suradnici su prvi nagovijestili porast incidencije mikobakterioza u Sjevernoj Americi pokazujući porast prevalencije izolacije NTM-a u Ontariju u Kanadi

(31). Iz te se studije, međutim, nije moglo zaključiti koji udio izolata predstavlja stvarnu bolest u odnosu na kolonizaciju te da li je porast izolacije NTM-a posljedica boljih i osjetljivijih laboratorijskih metoda korištenih u detekciji i identifikaciji NTM-a. Unatoč jasnom pokazatelju porasta prevalencije izolacije NTM-a, poteškoće u prikupljanju kompletnih radioloških i kliničkih podataka i dalje predstavljaju značajnu prepreku u procjeni prevalencije bolesti.

Ovaj su problem pokušali nadvladati Cassidy i suradnici koji su prikupili laboratorijske podatke svih osoba u državi Oregon, SAD, u kojih je izolirana jedna od vrsta NTM-a u periodu od dvije godine (39). Koristeći mikrobiološku komponentu dijagnostičkih kriterija Američkog torakalnog društva (ATS) i Američko društvo za zarazne bolesti (IDSA), procijenili su da prevalencija plućne bolesti u općoj populaciji iznosi 5,6 slučajeva na 100 000 stanovnika, a u dobnoj skupini starijoj od 50 godina, čak 15,5 slučajeva na 100 000 stanovnika. U nastavku tog istraživanja, Winthrop i suradnici pokazali su visoku prediktivnu vrijednost korištenja mikrobiološkog kriterija u procjeni prevalencije bolesti; 86% slučajeva koji su zadovoljavali mikrobiološke kriterije zadovoljilo je i ukupne dijagnostičke kriterije (40). Ova je studija dala uvid i u demografske i kliničke trendove plućne mikobakterioze (bolest češća u starije populacije, nešto češća u žena nego muškaraca, najčešći uzročnik MAC) te naglasila moguću vrijednost nadzora NTM bolesti temeljenog na laboratorijskim podacima u odsustvu prijavljivanja javnozdravstvenoj službi. Koristeći različite populacije odnosno izvore (različiti sustavi zdravstvenog osiguranja u SAD), u zadnjih je par godina objavljeno još nekoliko studija koje sve govore u prilog povećanja prevalencije plućne mikobakterioze u SAD-u (41,42,43).

Populacijske studije s područja Europe generalno bilježe niže stope izolacije NTM-a u odnosu na Sjevernu Ameriku, ali gotovo sve pokazuju stalan porast izolacije NTM-

a tijekom vremena. U Engleskoj, Velsu i Sjevernoj Irskoj prati se porast stope izolacije NTM-a s 0,9 na 2,9 izolata na 100 000 stanovnika u periodu između 1995. i 2006. godine. Većina izolata dobivena je u muškaraca (60%) i osoba starijih od 60 godina (53%), a najčešći izolat je bio MAC (44). Što se incidencije plućne mikobakterioze tiče, u Nizozemskoj je procijenjena na 1,7 slučajeva na 100 000 stanovnika 2008. godine (45), dok je u Danskoj iznosila 1,08 slučajeva na 100 000 stanovnika (33). Uz navedene populacijske studije, u zadnje je vrijeme objavljeno i nekoliko studija s ograničenog područja Grčke (46), Italije (47) i Turske (48), gdje se kao najčešći izolati opisuju MAC i *M. kansasii*, odnosno Hrvatske (49) i Francuske (50), gdje *M. xenopi* zauzima značajno mjesto kao uzročnik plućne mikobakterioze.

Još jedan primjer da pojava pojedinih vrsta NTM-a varira od regije do regije i ovisi o zemljopisnoj lokaciji odnosno lokalnim čimbenicima okoliša je veliki broj izolata *M. malmoense* u zemljama sjeverozapadne Europe u odnosu na rijetku pojavnost u ostalim regijama (51) te veća pojavnost *M. intracellulare* u Sjedinjenim Američkim Državama (29,52) u odnosu na *M. avium* u Europi (53). U nedavno objavljenoj studiji o zemljopisnim razlikama u izolaciji NTM-a iz plućnih uzoraka, pokazano je da izolacija pojedinih vrsta varira ne samo ovisno o kontinentu i različitim državama, već i unutar samih država (54). Ove bi razlike mogle u određenoj mjeri diktirati i razlike u pojavnosti i manifestaciji plućnih mikobakterioza u različitim zemljopisnim područjima, dok je većina dosadašnjih spoznaja o plućnim mikobakteriozama temeljena na istraživanjima *M. avium* complex-u (29).

1.6. Kliničke karakteristike bolesti uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama

Iako su općenito niskog patogenog potencijala, NTM mogu uzrokovati različiti spektar bolesti, od kojih je plućni oblik najčešći. Plućne mikobakterioze se poglavito manifestiraju kao sporo-progresivne, ali često teško izlječive bolesti i javljaju se u tri karakteristična oblika.

Kavitarni oblik nalikuje tuberkulozi, kako radiološki tako i klinički. Bolest najčešće zahvaća gornje režnjeve pluća i bolesnici često imaju simptome poput produktivnog kašlja, gubitka na težini i malaksalosti. Ovaj je tip bolesti najčešće prisutan u bolesnika s već postojećom plućnom bolesti, uključujući KOPB i ranije preboljenu tuberkulozu pluća (55,56). Među opisanim uzročnicima nalazimo veliki broj različitih vrsta NTM-a, a tipični je bolesnik muškarac u dobi između 50 i 60 godina (29).

Drugi oblik bolesti je retikulonodularni oblik, često udružen s bronhiektazijama. Ovaj tip je karakteriziran radiološkim nalazom malih nodularnih lezija i/ili bronhiektazija, a najčešće pogađa srednji režanj i lingulu. Kao najčešći uzročnici spominju se *M. avium* i *M. abscessus*, a tipični su bolesnici starije žene bez predisponirajućih plućnih bolesti (57,58). Ovaj oblik bolesti u tih se žena naziva i sindromom „Lady Windermere“ prema imenu glavnog lika iz poznatog romana Oscara Wildea, „Lady Windermere's Fan“ (59).

Treći je oblik bolesti vrlo sličan hipersenzitivnom pneumonitisu. Pretpostavlja se da su bolesnici izloženi NTM-u, najčešće MAC-u, putem aerosola proizvedenog u malim parnim kupeljima za osobnu uporabu (eng. hot tub). Stoga se ovaj oblik bolesti najčešće naziva „hot tub lung“. Klinički se bolesnici prezentiraju s kašljem, vrućicom i

nedostatkom zraka dok je najčešći radiološki nalaz infiltrat tipa mliječnog stakla i mozaički uzorak na snimkama kompjuterizirane tomografije visoke rezolucije (HRCT). Iako točna patogenezna ostaje kontroverzom, smatra se da je bolest posljedica kombinacije infekcije i imunološki posredovane upale provocirane antigenima NTM-a (60).

Izvanplućni oblici bolesti uzrokovani NTM-om su općenito rijetki, no važnu iznimku čini limfadenitis u dječjoj dobi te diseminirani oblici bolesti u imunokompromitiranih bolesnika kao što su bolesnici zaraženi HIV-om odnosno bolesnici na različitim imunosupresivnim terapijama. *M. avium* je najčešći uzročnik diseminirane bolesti u bolesnika zaraženih HIV-om, a glavni su simptomi vrućica, gubitak na težini i noćno znojenje (61). Diseminirani oblici bolesti uzrokovani s *M. chelonae*, *M. abscessus* i *M. kansasii* se poglavito javljaju u bolesnika s poremećajem imunološkog sustava uzrokovanog drugim čimbenicima, a ne HIV-om i uglavnom su karakterizirani s višestrukim potkožnim čvorićima ili apscesima (29,36). Opisane su i ograničene kožne bolesti, najčešće uzrokovane s *M. marinum* (36), a najviše upala oka i uha uzrokuju brzorastuće NTM, *M. chelonae* i *M. abscessus* i to uglavnom nakon kirurških procedura kao što su lasersko skidanje očne dipotrije (62) i timpanostomija s postavljanjem cjevčica (63). Obje infekcije su teško liječive i mogu rezultirati trajnim oštećenjem vida odnosno sluha. Široki spektar NTM-om uzrokovanih bolesti odražava i široki spektar uzoraka iz kojih se NTM mogu izolirati. U Hrvatskoj, plućni izolati čine preko 95% svih izolata (64).

1.7. Dijagnoza plućne mikobakterioze

Za razliku od vrsta MTB kompleksa, kod izolacije NTM-a, a u odustvu vidljivih znakova bolesti koristi se pojam kolonizacije i liječenje se u pravilu ne provodi. Postavljanje dijagnoze plućne mikobakterioze nije jednostavno. NTM su okolišni patogeni, prisutni u prirodnim vodama, zemlji i vodovodnom sistemu, otporni na uobičajena dezinfekcijska sredstva (36,65,66,67).

Stoga, pozitivna kultura iz uzorka nesterilnog podrijetla kao što je dišni ili probavni sustav ne znači nužno i bolest uzrokovanu NTM-om. Dapače, može se raditi o nedavnoj ekspoziciji u okolišu i posljedičnoj slučajnoj prisutnosti patogena u respiratornom traktu ili pak kontaminaciji prilikom uzimanja uzorka ili kasnije obrade u mikrobiološkom laboratoriju. Čak i ispiranje usta vodom, prije uzimanja uzorka, može dovesti do kontaminacije iskašljaja NTM-om prisutnim u vodovodnoj vodi, a najčešći su izvor pseudoepidemija kontaminirani medicinski instrumenti.

Slučaj pseudoepidemije je zabilježen i u Hrvatskoj. Nakon naglog porasta broja pozitivnih kultura *M. gordonae* iz iskašljaja bolesnika uzetih u jednom bolničkom centru, epidemiološka je istraga pokazala da se navedeni patogen nalazi u vodovodnoj vodi tog centra što je rezultiralo preporukom da bolesnici izbjegavaju ispirati usta vodom prije davanja uzorka i posljedičnim smanjenjem pozitivnih uzoraka (rad u postupku objave).

S obzirom na navedeno, klinička se značajnost kulture pozitivne na NTM mora promatrati kroz skup kliničkih i mikrobioloških podataka. Kako bi pomogli kliničarima u razlikovanju prave plućne bolesti i slučajnog nalaza pozitivne kulture iz respiratornog trakta, Britansko torakalno društvo (68) i Američko torakalno društvo

(29, 69) objavili su dijagnostičke kriterije koji kombiniraju mikrobiološke podatke, radiološku sliku i kliničke simptome u bolesnika. Najnovije ATS/IDSA (29) smjernice prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Kriterij za dijagnozu plućne mikobakterioze Američkog torakalnog društva (ATS) i Američkog društva za zarazne bolesti (IDSA) (29).

KLINIČKI	opći odnosno respiratorni simptomi <u>i</u>
	isključen drugi mogući/vjerojatni uzrok simptoma <u>i</u>
RADIOLOŠKI	nodularni crtež ili kaviteti na konvencionalnom RTG; ili HRCT prikaz multifokalnih bronhiektazija s multiplim centrilobularnim nodusima <u>i</u>
MIKROBIOLOŠKI	pozitivna kultura najmanje dva odvojeno uzeta sputuma <u>ili</u>
	pozitivna kultura najmanje jednog uzorka BAL/aspirata bronha <u>ili</u>
	histopatološki nalaz granulomatozne infekcije i pozitivna kultura iz bar jednog uzorka sputuma ili aspirata bronha.

BAL – bronhoalveolarni lavat; HRCT – kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije

1.8. Liječenje bolesti uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama

Nakon što je postavljena dijagnoza plućne mikobakterioze, ostaje pitanje da li bolesnika treba liječiti, kojim lijekovima te koliko dugo. U počecima, plućne su mikobakterioze liječene na jednak način kao i tuberkuloza, izoniazidom i para-aminosalicilnom kiselinom, što se ubrzo pokazalo neučinkovitim (70). Do razvoja novijih, učinkovitijih lijekova kao što su cikloserin, viomicin i etionamid, kirurška je resekcija bila terapija izbora u ovih bolesnika. Krajem 60-tih godina dvadesetog stoljeća, objavljen je pregledni članak u kojem je Selkon sažeo rezultate do tada korištenih režima liječenja. Uspješnost izlječenja *M. kansasii* uzrokovane bolesti iznosila je 56%, dok su rezultati liječenja MAC-om uzrokovane bolesti bili znatno slabiji i varirali su 17% i 43%, ovisno o studiji (71).

U narednim je desetljećima, daljnjim razvojem lijekova, isprobavan čitav niz različitih terapijskih režima. Hunter je 1981.g. objavio pregled svih do tada objavljenih rezultata liječenja plućne mikobakterioze uzrokovane s MAC-om (72). Korišteni su razni terapijski režimi no uspješnima su se pokazali samo oni koji su trajali 24 mjeseca, a u kombinaciji su sadržavali izoniazid, rifampicin te ili etambutol ili streptomycin. Od svih bolesnika liječenih ovim režimima, u 84% je postignuta konverzija kulture u negativnu, no u 14% bolesnika došlo je do relapsa bolesti unutar prve godine nakon liječenja. Terapijski režimi koji su koristili razne druge lijekove pokazali su se manje učinkovitim i značajno toksičnijim (72).

Korištenje terapijskog režima baziranog na kombinaciji rifampicina i etambutola postalo je znatno učestalije nakon *in vitro* studija koje su pokazale jasnu sinergiju tih dvaju lijekova (73). Prvo prospektivno istraživanje učinjeno je na 175 bolesnika s *M. kansasii* uzrokovanom plućnom mikobakteriozom, a korišten je režim s dva lijeka

(rifampicin i etambutol) tijekom 9 mjeseci. U svih bolesnika osim jednog došlo je do konverzije kulture u negativnu, no u 10% je došlo do relapsa bolesti u sljedeće 4 godine (74).

U istom periodu, sredinom 90-tih godina dvadesetog stoljeća, objavljene su i prve studije korištenja terapijskih režima na bazi makrolida u MAC-om uzrokovanj bolesti. Konverzija kulture u negativnu postignuta je u više od 90% bolesnika s plućnim oblikom bolesti (75), a visoka učinkovitost režima baziranih na makrolidu pokazana je u HIV bolesnika s diseminiranim oblikom MAC bolesti (76). Britansko torakalno društvo objavilo je 2001. godine sljedeću važnu studiju u kojoj je uspoređivan režim rifampicin + etambutol s ili bez izoniazida tijekom 24 mjeseca liječenja *M. avium*, *M. xenopi* i *M. malmoense* uzrokovanih plućnih mikobakterioza. Općenito, dodatak izoniazida donio je tek malo poboljšanje u liječenju, a rezultirao znatno većom pojavnošću neželjenih nuspojava (77). Nakon te studije, uslijedila je i usporedba dvojnog režima rifampicin + etambutol s dodatkom ciprofloksacina ili klaritromicina. Zanimljivo, navedena studija nije uspjela pokazati bolji učinak režima koji je sadržavao i makrolid odnosno florokinolon uz rifampicinom i etambutol (78). Nadalje, zbirni rezultati ovih dviju studija pokazuju stopu izlječenja od samo 28% nakon 5 godina praćenja bolesnika (77,78). Ti se rezultati kose s ranije objavljenim sjeverno američkim studijama o terapijskim režimima baziranim na makrolidima te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razjasnio uzrok ovih razlika.

Dodatak makrolida u liječenju plućnih mikobakterioza ostaje, dakle, donekle kontroverzom, dok su u HIV bolesnika s diseminiranim oblikom bolesti režimi temeljeni na makrolidu preporučena terapijska opcija (29,76). Unatoč navedenim dvojabama, trenutni je konsenzus većine stručnjaka da se bolesnici liječe terapijskim

režimima koji kombiniraju nekoliko lijekova, ovisno o vrsti NTM-a koja je uzrokovala bolest (29), u trajanju od najmanje 12 mjeseci nakon konverzije kulture u negativnu.

U odabranoj populaciji bolesnika, operativno liječenje u kombinaciji s lijekovima prije i poslije operacije mogu biti od značajne koristi (29).

Za izvan-plućne oblike bolesti postoji još manje podataka o učinkovitosti različitih terapijskih režima. Limfadenitis dječje dobi se obično dobro liječi kirurškom ekscizijom (29) dok je za druge oblike bolesti preporučena kombinacija kirurške ekscizije i konzervativnog liječenja (29).

1.9. Rastući interes za netuberkulozne mikobakterije u Hrvatskoj

U Odjelu za dijagnostiku tuberkuloze Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, od 1982. godine sustavno se prate i bilježe mikrobiološki izolati NTM-a. U periodu od 1982. do 2005 g., *M. xenopi* je bila najčešće izolirana NTM vrsta (49), no zadnjih je godina apsolutni primat preuzela saprofitna *M. gordonae* (64).

Marušić i suradnici objavili su 2009.g. prvu studiju o *M. xenopi* uzrokovanim mikobakteriozama u Hrvatskoj (49), a 2010.g. objavljena je i do sada jedina doktorska disertacija na temu značaja infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama. U njoj je iznesena i procijenjena incidencija plućne NTM bolesti od 0,06 slučajeva na 100 000 stanovnika za petogodišnji period koji je prethodio ovom istraživanju (79).

Uz iznimku navedenih radova, do sada u Hrvatskoj nije bilo sustavne epidemiološke analize NTM-a izoliranih iz dišnog sustava, utvrđivanja eventualnih zemljopisnih razlika unutar Hrvatske, procjene kliničke važnosti pojedinih vrsta NTM-a, kao niti procjene korisnosti mikrobioloških kriterija u određivanju prevalencije bolesti.

Mikrobiološki kriteriji nisu dostatni i sama izolacija NTM-a nije dovoljna za postavljanje dijagnoze mikobakterioze jer ne omogućuje razdvajanje kolonizacije od bolesti. To je razlogom da ne postoje relevantni epidemiološki podaci o incidenciji i prevalenciji mikobakterioza u Hrvatskoj. Potrebno je razdvojiti pravu infekciju od kolonizacije i odrediti kliničku značajnost plućnih izolata NTM-a koji se pojavljuju u Hrvatskoj.

Budući da su NTM to češće što je niža incidencija tuberkuloze (u Hrvatskoj u padu zadnjih pola stoljeća), starija populacija i veća izloženost raznim imunosupresivnim terapijama (29,80), za očekivati je daljnji porast pojavnosti NTM-om uzrokovanih bolesti. Stoga je važno nastaviti istraživanja na ovom polju i pobliže upoznati specijaliste pulmologe, ali i širu medicinsku javnost s ovim bolestima.

2. HIPOTEZE

- Broj izolata NTM-a i incidencija oboljelih raste tijekom vremena.
- Pojavnost određenih vrsta NTM-a razlikuje se u obalnom u odnosu na kontinentalni dio Hrvatske.
- Izračunavanje prevalencije i incidencije oboljelih, korištenjem isključivo mikrobioloških kriterija, ne daje točan uvid u stvaran broj bolesnika.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi ovoga rada su utvrditi broj izolata i stvarno oboljelih od plućnih mikobakterioza u Hrvatskoj u razdoblju od 2006. do 2012. godine i utvrditi razlike ovisno o zemljopisnoj lokaciji. Nadalje, cilj je utvrditi dob, spol i postojeće pridružene bolesti u bolesnika s plućnim mikobakteriozama, ishod njihova liječenja te, u konačnici, utvrditi klinički značaj plućnih mikobakterioza. Specifični ciljevi ovog rada obuhvaćaju analizu značaja pojedine pridružene bolesti za nastanak i tijek plućnih mikobakterioza, analizu terapijskih protokola korištenih u liječenju oboljelih, analizu kliničkog tijeka bolesti ovisno o vrsti NTM-a te analizu vrijednosti korištenja mikrobioloških kriterija u procjeni prevalencije i patogenog potencijala pojedine vrste NTM-a. Ovim se istraživanjem stječe uvid u epidemiologiju i kliničku značajnost plućnih mikobakterioza u Hrvatskoj, a metode i rezultati su usporedivi s drugim zemljama kako bi se utvrdile naše specifičnosti. Također, namjera je odgovoriti na pitanje o korisnosti mikrobioloških kriterija u prepoznavanju stvarno oboljelih i određivanju incidencije i prevalencije bolesti te pridonijeti boljem razumijevanju i liječenju plućnih mikobakterioza.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Koncept istraživanja

U ovom retrospektivno-prospektivnom populacijskom istraživanju prikupljeni su podaci o svim državljanima Hrvatske u kojih je, u periodu od 1. siječnja 2006. godine do 31. prosinca 2012. godine, mikrobiološkim metodama izolirana jedna od vrsta NTM-a. U ovom radu, ispitivani su isključivo izolati plućnog porijekla, dok su izolati drugog porijekla, uključujući i lavažu želuca, isključeni iz analize. Za računanje učestalosti izolacije, korišten je samo jedan izolat po osobi nazvan „epizodom“ NTM izolacije. Za računanje incidencije izolacije NTM-a odnosno incidencije bolesti, u obzir je uzet samo prvi izolat u pojedine osobe, odnosno prvi put kada su postignuti kriteriji za definiciju bolesti. U slučaju izolacije različitih vrsta NTM-a u iste osobe, svaka je vrsta brojana kao zasebni izolat odnosno epizoda. Nova epizoda u iste osobe definirana je kao ponovana izolacija iste i/ili druge NTM nakon što je postignuta negativizacija kulture, koja je trajala barem godinu dana.

4.2. Prikupljanje uzoraka

U Hrvatskoj se svi klinički uzorci uzeti u pacijenata sa sumnjom na infekcije uzrokovane s mikobakterijama šalju na mikrobiološku obradu u jedan od 13 laboratorija unutar mreže TBC laboratorija. Identifikacija NTM-a provodi se isključivo u Odsjeku za netuberkulozne mikobakterije Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ). Uvidom u podatke Odsjeka za dijagnostiku netuberkuloznih mikobakterija HZJZ-a, identificirane su sve osobe s područja Hrvatske kod kojih je kultivacijom

izolirana jedna od vrsta NTM-a u periodu trajanja istraživanja. Nakon toga su usmeno i pismeno kontaktirane ustanove iz kojih je uzorak ili izolat poslan u laboratorij Odsjeka za dijagnostiku NTM-a, kako bi se dobilo dopuštenje uvida u medicinsku dokumentaciju osoba uključenih u istraživanje.

U suradnji s liječnicima koji su skrbrili o navedenim osobama, prikupljeni su podaci potrebni za daljnju analizu: prebivalište i podatak o urbanoj/ruralnoj sredini, spol, dob u vrijeme oboljevanja, predisponirajući čimbenici (uzimana terapija, pridružene bolesti, podatak o preboljeloj tuberkulozi), dodatni mikrobiološki podaci, simptomi bolesti, nalazi slikovnih metoda prikaza te korišteni terapijski režimi i ishod liječenja. Prikupljeni podaci upisani su u registar osoba s izoliranom NTM, kreiran za potrebe ovog istraživanja.

Hrvatsku smo podijelili na dvije veće zemljopisne regije – kontinentalnu i obalnu, kao što je prikazano na slici 1 (81). Županije koje pripadaju kontinentalnoj regiji su: Zagrebačka, Krapinsko-zagorska, Varaždinska, Koprivničko-križevačka, Međimurska, Bjelovarsko-bilogorska, Virovitičko-podravska, Požeško-slavonska, Brodsko-posavska, Osječko-baranjska, Vukovarsko-srijemska, Karlovačka, Sisačko-moslavačka i Grad Zagreb. U obalnu regiju pripadaju županije: Primorsko-goranska, Ličko-senjska, Zadarska, Šibensko-kninska, Splitsko-dalmatinska, Istarska i Dubrovačko-neretvanska. Podatak o ukupnoj populaciji Hrvatske, kao i podaci o populaciji dviju regija, dobiveni su iz Statističkog ureda Europske zajednice (82) i korišteni za procjenu dobno standardiziranih stopa.



Slika 1. Kontinentalna i obalna regija Hrvatske (81).

4.3. Identifikacija netuberkuloznih mikobakterija

U svrhu otkrivanja mikobakterija iz respiratornog trakta koristile su se tzv. standardne metode (83). Primarno sterilni uzorci su se centrifugirali i direktno nasađivali na podloge. Svi klinički primarno nesterilni uzorci dostavljeni u mikobakteriološke laboratorije obrađivali su se s N- acetil-L-cistein-natrijevim hidroksidom (NALC-NaOH). U nesterilnim uzorcima bacili se nalaze u stanicama, detritusu ili su omotani sa sluzi i teže se kultiviraju, a istovremeno popratne bakterije ostaju zaštićene od toksičnog djelovanja sredstava za dekontaminaciju. Likvefakcijom takvih uzoraka pomoću mukolitika acetil-cisteina i NaOH, postiže se oslobađanje mikroorganizama i pun učinak obrade. Postupak sadrži mukolitik koji razgrađuje sluz i oslobađa mikobakterije iz stanica, a dodatak lužine onemogućuje rast ostalih bakterija koje se nalaze u nesterilnim uzorcima. Dodatnim postupcima koncentracije bacila (centrifugiranjem) povećava se mogućnost izolacije i malog broja mikobakterija.

Dekontaminirani uzorci su pregledani na prisustvo acidorezistentnih bacila (ARB) u mikroskopskom razmazu. Razmazi su bojani po Ziehl-Neelsenu (Z-N) ili fluorescentnom bojom auramin, a sediment nasađen na krute (Lowenstein-Jensen, Stonebrink) i tekuće (MGIT 960, BD Diagnostics) podloge. Uzorci se inkubiraju u aerobnim uvjetima na 37°C kroz 8 tjedana na krutim podlogama, a 6 tjedana u tekućoj MGIT podlozi. Ocjena rasta u tekućem hranilištu MGIT zasniva se na potrošnji kisika i praćenju indikatora pada parcijalnog tlaka kisika.

Za porasle sojeve, dokazana je pripadnost rodu *Mycobacterium* i učinjena diferencijacija netuberkuloznih mikobakterija i *M. tuberculosis* complex-a korištenjem fenotipskih i molekularnih metoda. Postupak razdvajanja uključivao je mikroskopski izgled bacila (crveni štapići bojani po Z-N), makroskopski izgled kolonija, stvaranje

pigmenta u mraku odnosno nakon izlaganja svjetlu, brzinu rasta i rast na različitim temperaturama (25°C, 31°C, 37°C i 45°C).

Biokemijska identifikacija je rutinski uključivala sekreciju i nakupljanje niacina, redukciju nitrata i telura, rast u prisutnosti 5% NaCl, izoniazida, PAS i TCH, testove hidrolize Tweena 80 nakon 5 i 10 dana, prisutnost arilsulfataze nakon 3 i 21 dana, prisutnost različitih amidaza, aktivnost semikvantitativne i termostabilne katalaze, te korištenje ugljika iz šećera (citrat, manitol, inositol).

Identifikacija vrste NTM-a molekularnim metodama, provodila se hibridizacijskim DNK testovima (GenoType[®] CM/AS; Hain Lifescience) izvođenim prema uputama proizvođača. Postupak obuhvaća izolaciju DNK, višestruko umnožavanje uz korištenje početnica označenih biotinom te reverznu hibridizaciju.

4.4. Definicija bolesti korištenjem mikrobioloških kriterija

U prvom dijelu analize prikupljenih podataka, za postavljanje definicije moguće i vjerojatne bolesti korišten je mikrobiološki kriterij ATS/IDSA (29) i modificirani mikrobiološki kriterij (64).

Moguća bolest određena je kao epizoda izolacije koja zadovoljava u tim smjernicama navedene mikrobiološke kriterije - minimalno dva pozitivna iskašljaja ili jedan pozitivni bronho-alveolarni lavat (BAL) odnosno aspirat bronha (29). Vjerojatna bolest određena je kao epizoda izolacije s više od dva pozitivna iskašljaja ili jednim pozitivnim iskašljajem u kombinaciji s pozitivnim BAL-om ili aspiratom bronha (64).

4.5. Definicija bolesti korištenjem cjelovitih kriterija

Kako bi se među epizodama izolacije identificirale stvarno obljele osobe, korišteni su kriteriji za dijagnozu i terapiju infekcija dišnog sustava uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama koje su postavili Američko i Britansko torakalno društvo krajem prošlog stoljeća s revizijom iz 2007. godine (29,68,69).

Epizode su svrstane u 4 grupe: 1) dokazana bolest - u potpunosti zadovoljeni svi ATS/IDSA kriteriji; 2) vjerojatna bolest - vrlo uvjerljivi nalazi u prilog plućne mikobakterioze no nedostaje neki od podataka kako bi u potpunosti bila zadovoljena sva tri ATS/IDSA kriterija; 3) moguća bolest - zadovoljena samo dva od tri potrebna kriterija ATS/IDSA za dijagnozu plućne NTM bolesti; 4) nema bolest – ne zadovoljava kriterije ATS/IDSA za plućnu NTM bolest.

4.6. Obrada podataka i zaštita identiteta ispitanika

Podaci o pacijentima prikupljeni su u bazu podataka oblikovanu u Microsoft Access-u. Microsoft Excel je korišten za obradu podataka, tablične i grafičke prikaze, kao i za opisne i deskriptivne statističke prikaze. χ -kvadrat i Fischerov test korišteni su za statističke usporedbe kategoričkih vrijednosti i u tu svrhu primjenjen je program Graph Pad Prism (verzija 5).

Spearmanov koeficijent korelacije korišten je za ispitivanje veze između dijagnoze temeljene na mikrobiološkim ili cjelovitim ATS kriterijima. Nakon što je utvrđen identitet osoba s pozitivnim izolatima NTM-a, svakoj je osobi dodijeljen broj pod kojim su podaci zabilježeni.

Daljnja obrada podataka provođena je bez osobnih identifikatora, koji bi eventualno otkrili identitet obrađivanih osoba kao što su ime, prezime, detaljna adresa, matični broj ili broj telefona. Iz podataka pripremljenih za analizu izbačene su i sve druge informacije koje bi, cjelovite ili djelomične, mogle otkriti identitet osobe. Isto tako, ni iz rezultata nije bila moguća identifikacija osoba obuhvaćenih ovim istraživanjem.

5. REZULTATI

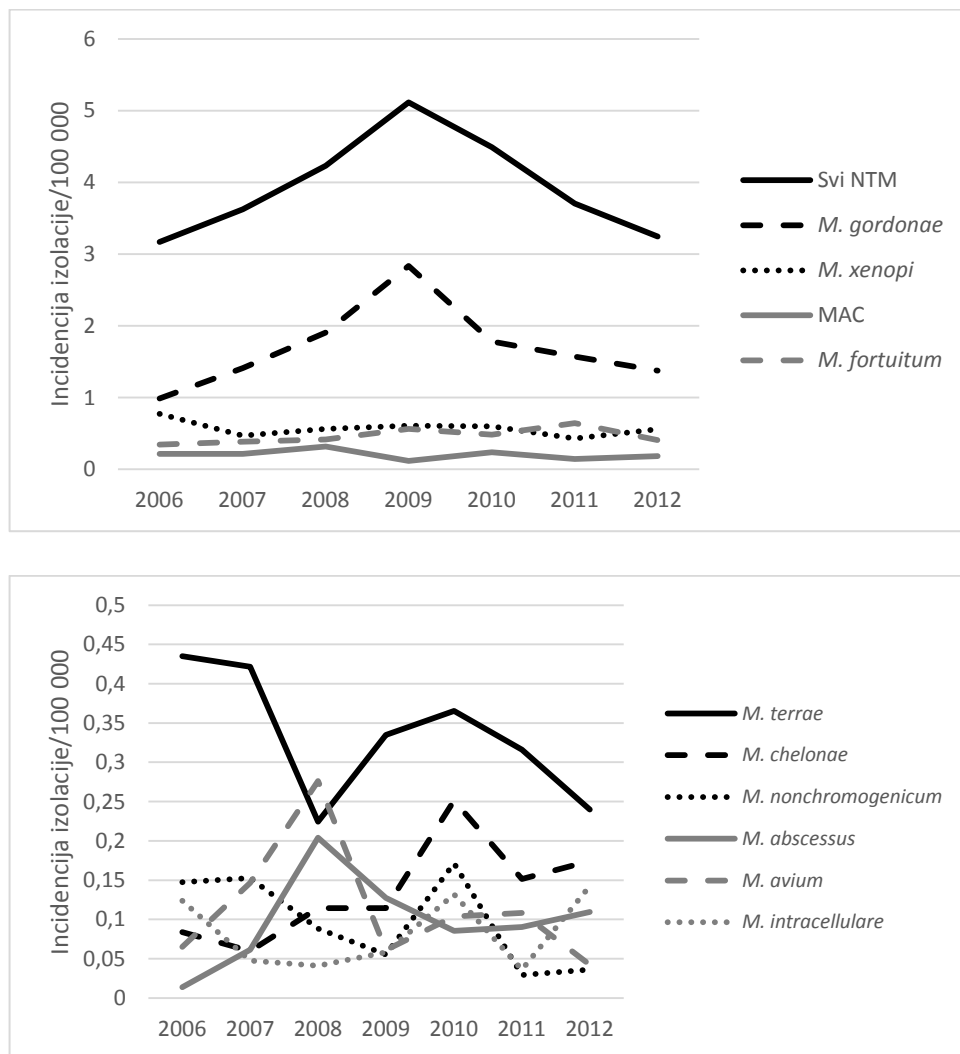
5.1. Izolati netuberkuloznih mikobakterija plućnog porijekla

U periodu od siječnja 2006.g. do prosinca 2012. g., u Hrvatskoj je identificirano 2221 izolata NTM-a iz različitih uzoraka ukupno 1672 osobe (tablica 5). Uzorci plućnog porijekla sačinjavali su više od 90% (2088) svih izolata. Izolirani su iz 1566 osoba i grupirani u ukupno 1613 epizoda izolacije NTM-a. Prosječna populacija Hrvatske tijekom navedenog perioda iznosila je 4,427,3738, a otprilike dvije trećine populacije (2,962,508) obitavalo je u kontinentalnoj regiji zemlje. Godišnja incidencija izolacije plućnih NTM-a u Hrvatskoj iznosila je ukupno 3,9 izolata na 100 000 stanovnika i razlikovala se u kontinentalnoj (4,3/100 000) u odnosu na obalnu regiju zemlje (2,2/100,000)

Tablica 5. Ukupni broj izolata netuberkuloznih mikobakterija (NTM) i udio izolata plućnog porijekla po godinama

Godina	Ukupno izolata NTM	Izolati plućnog porijekla
2006	201	192 (95,5%)
2007	293	271 (92,5%)
2008	348	322 (92,5%)
2009	408	347 (85%)
2010	362	347 (95,9%)
2011	328	304 (92,7%)
2012	281	274 (97,5%)

Godišnja incidencija izolacije najčešćih vrsta NTM-a prikazana je na slici 2. Tijekom promatranog razdoblja, bilježi se trend porasta incidencije izolacije svih NTM-a s vrhuncem 2009. godine. Porast je dominantno na račun *M. gordonae* dok je incidencija izolacije *M. xenopi* i MAC bez značajnijih promjena. Nadalje, navedeni je trend prisutan samo u populaciji kontinentalne regije Hrvatske.



Slika 2. Godišnja incidencija ukupne izolacije te izolacije najčešćih vrsta netuberkuloznih mikobakterija (NTM) na 100 000 stanovnika.

Tablica 7. Učestalost izolacije netuberkuloznih mikobakterija (NTM) plućnog porijekla ovisno o spolu, zemljopisnom području i mikrobiološkim kriterijima.

Vrsta NTM	Zemljopisno područje			Spol		Mikrobiološki kriterij		
	K	O	N	M	Ž	Kolonizacija	Moguća bolest	Vjerojatna bolest
<i>M. gordonae</i>	511	103	65	397	282	603 (88,8%)	66 (9,7%)	10 (1,5%)
<i>M. xenopi</i>	128	109	6	161	82	164 (67,5%)	58 (23,9%)	21 (8,6%)
<i>M. fortuitum</i>	152	36	9	122	75	169 (85,8%)	22 (11,2%)	6 (3%)
<i>M. terrae</i>	112	12	4	67	61	118 (92,2%)	9 (7%)	1 (0,8%)
<i>M. chelonae</i>	50	7	3	34	26	50 (83,3%)	7 (11,7%)	3 (5%)
<i>M. avium</i>	30	22	1	27	26	18 (33,9%)	25 (47,2%)	10 (18,9%)
<i>M. intracellulare</i>	24	9	1	19	15	13 (38,2%)	8 (23,5)	13 (38,3%)
<i>M. abscessus</i>	32	7	0	23	16	30 (76,9%)	4 (10,3%)	5 (12,8%)
<i>M. kansasii</i>	11	5	0	10	6	9 (56,2%)	4 (25%)	3 (18,8%)
<i>M. lentiflavum</i>	0	5	0	2	3	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)
Ostale NTM	124	27	4	85	70	139 (89,7%)	12 (7,7%)	4 (2,6%)
MAC*	58	31	2	46	45	34 (37,4%)	33 (36,3%)	24 (26,3%)
Ukupno	1178	342	93	947	666	1318 (81,7%)	216 (13,4%)	79 (4,9%)
	Kontinent		Obala		M		Ž	
Moguća bolest	128 (10,9%)		67 (19,6%)		138 (14,6%)		78 (11,7%)	
Vjerojatna bolest	48 (4,1%)		31 (9,1%)		48 (5%)		31 (4,7%)	
Kolonizacija	1002 (85%)		244 (71,3%)		765 (80,4%)		557 (83,6%)	

K – kontinent; O – obala; N – nepoznato; Moguća bolest: minimalno dva pozitivna iskašljaja ili jedan pozitivan bronho-alveolarni lavat (BAL) ili aspirat bronha; Vjerojatna bolest: više od dva pozitivna iskašljaja ili jedan pozitivni iskašljaj u kombinaciji s pozitivnim BAL-om ili aspiratom bronha

**M. avium*, *M. intracellulare* i ne tipizirani MAC izolati zajedno

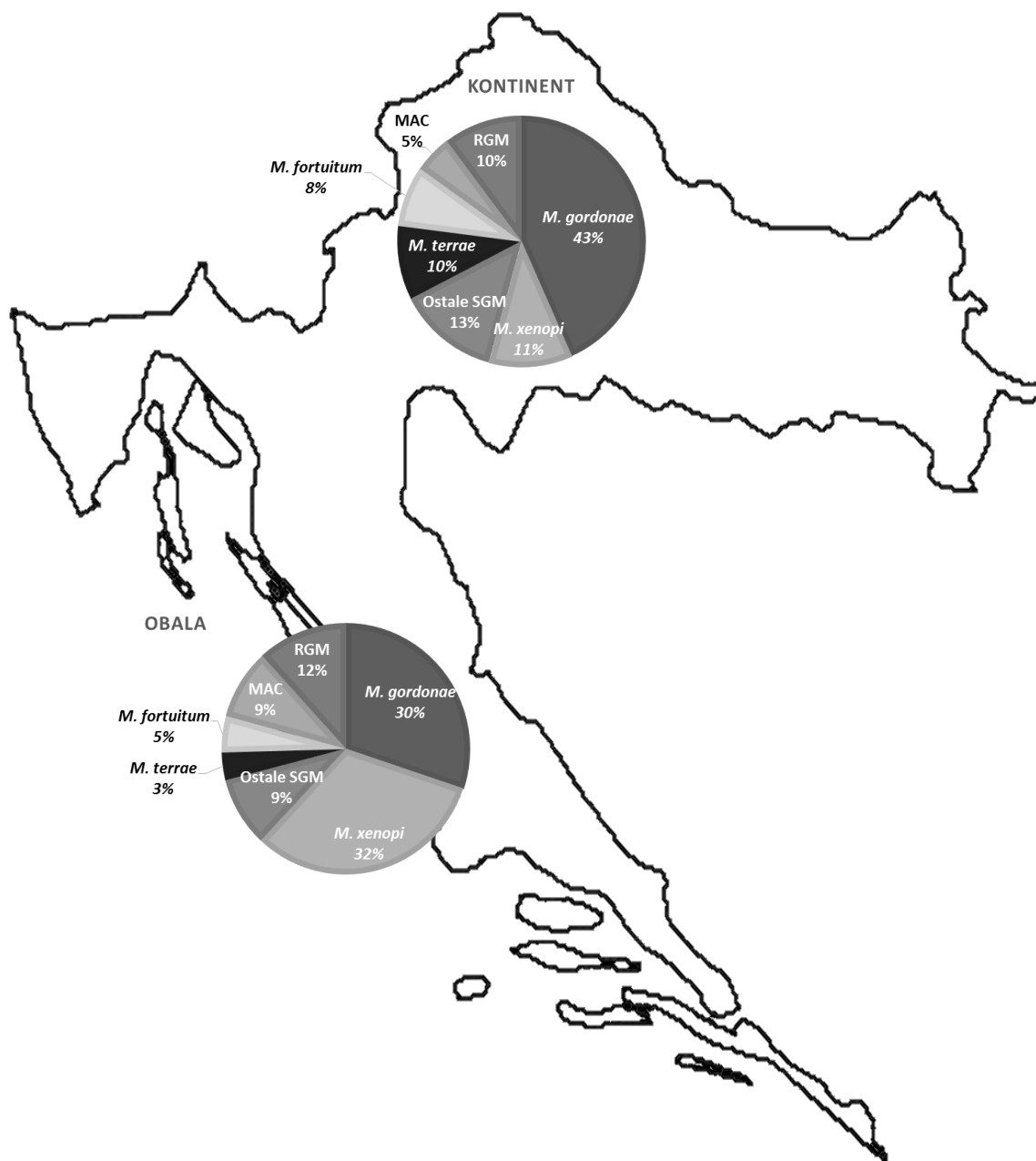
U 1613 epizoda izolacije NTM-a, *M. gordonae* je bila najčešća izolirana vrsta, a slijedile su je *M. xenopi*, *M. fortuitum* i *M. terrae* (tablica 6). Više od 70% svih izolata bilo je porijeklom iz kontinentale regije (tablica 6), a i sama distribucija vrsta značajno se razlikovala između kontinentalne i obalne regije Hrvatske.

M. avium (OR 0,38; 95%CI od 0,21 do 0,66; $p < 0,001$), *M. xenopi* ($p < 0,0001$) i *M. lentiflavum* (OR 0,02; 95%CI od 0,001 do 0,47; $p < 0,0001$) statistički se značajno češće pojavljuju u obalnoj, dok su *M. gordonae* (OR 1,76; 95% CI od 1,36 do 2,28; $p < 0,0001$) i *M. terrae* (OR 2,87; 95% CI od 1,56 do 5,28; $p < 0,0005$) češći u kontinentalnoj regiji Hrvatske (slika 3). Nije nađena statistički značajna razlika u zemljopisnoj raspodjeli skupine brzorastućih mikobakterija opažena u ranije objavljenom istraživanju, koje je obuhvaćalo kraći vremenski period (64).

Neovisno o zemljopisnom području, za 1232 (76,4%) epizode izolacije NTM-a prikupljeni su i podaci o sredini (urbana ili ruralna) u kojoj osobe žive (tablica 7). Za razliku od kontinentalne regije zemlje gdje je podjednak broj osoba s izolatima NTM-a živio u obje sredine, u obalnoj su regiji zemlje osobe statistički značajno češće živjele u urbanoj sredini (OR 1,87; $p < 0,0001$).

Tablica 7. Raspodjela epizoda izolacije netuberkuloznih mikobakterija (NTM) prema zemljopisnom području i tipu sredine u kojoj osoba obitava.

Sredina	Kontinent	Obala	Ukupno
Urbana	491 (50,2%)	159 (64,9%)	582 (52,8 %)
Ruralna	496 (49,8 %)	86 (35,1 %)	650 (47,2%)
Ukupno	987	245	1232



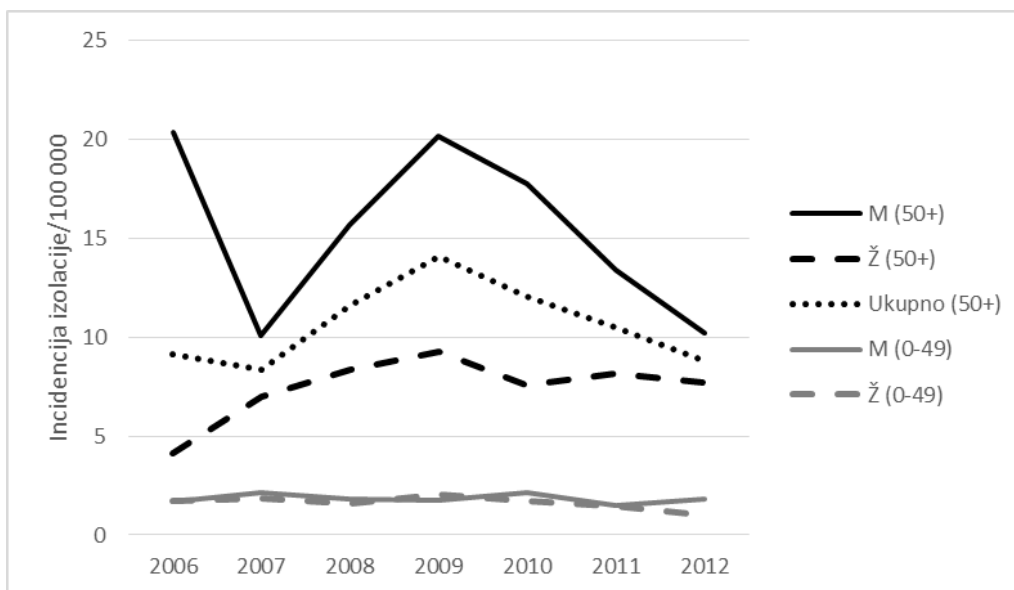
Slika 3. Raspodjela najčešćih vrsta netuberkuloznih mikobakterija (NTM) u kontinentalnom i obalnom dijelu Hrvatske. RGM – brzorastuće NTM; SGM – spororastuće NTM.

Od svih 1613 epizoda izolacije NTM-a, 58,7% je bilo u muškaraca (prosječna dob 61 godina, medijan 65), a 41,3% u žena (prosječna dob 60 godina, medijan 65). Nije nađeno statistički značajne razlike u izolaciji pojedine vrste ovisno o spolu osim za *M. xenopi* koja je nešto rjeđe izolirana u žena u odnosu na muškarce (OR 0,68; 95% CI od 0,51 do 0,91; $p < 0,01$).

Prevalencija izolacije NTM-a ovisno o dobi i spolu prikazana je u tablici 8. Stopa izolacije značajno raste u populaciji starijoj od 50 godina, a u dobnoj skupini iznad 70 godina prelazi 15 izolata na 100 000 stanovnika. Incidencija izolacije NTM-a u populaciji starijoj od 50 godina ima trend rasta i u muškoj i u ženskoj populaciji (slika 4), no statistički je značajno viša u muškaraca u odnosu na žene (omjer stope incidencije 1,87; 95%CI 1,66 do 2,09; $p < 0,001$).

Tablica 8. Prosječna godišnja prevalencija izolacije netuberkuloznih mikobakterija (NTM) na 100 000 stanovnika ovisno o dobi i spolu.

Dob	Muškarci	Žene	Ukupno
0-19	1,4	1,4	1,4
20-29	0,9	1,1	1
30-39	1,9	1,4	1,7
40-49	3,7	2,7	3,2
50-59	8,2	4,7	6,4
60-69	13,1	7,2	9,9
70-79	24,3	11	16,3
80+	33,4	11,1	17,6
50+	14,5	7,8	10,8



Slika 4. Godišnja incidencija izolacije netuberkuloznih mikobakterija (NTM) na 100 000 stanovnika ovisno o spolu i dobi.

5.2. Važnost pojedinih vrsta netuberkuloznih mikobakterija ovisno o mikrobiološkim kriterijima

U tablici 6 prikazane su najčešće izolirane vrste NTM-a i njihova raspodjela ovisno o zemljopisnom području, spolu i postotku zadovoljavanja mikrobioloških kriterija moguće i vjerojatne bolesti. Uzimajući u obzir sve izolate koji zadovoljavaju kriterije moguće odnosno vjerojatne bolesti, procijenjena godišnja incidencija iznosila bi 0,92 slučajeva plućne mikobakterioze na 100 000 stanovnika. Ukoliko se izračun ograniči samo na one koji zadovoljavaju kriterij vjerojatne bolesti, incidencija bi iznosila 0,23 slučaja na 100 000 stanovnika.

Od 1613 epizoda izolacije NTM-a, 216 (13,4%) je zadovoljavalo kriterije moguće, a 79 (4,9%) vjerojatne bolesti. Demografske karakteristike ovih dviju grupa prikazane

su u tablici 9. Iako je *M. xenopi* činila najveći udio u ukupnom broju slučajeva, potencijalna klinička važnost (postotak bolesnika koji su zadovoljali barem jedan od dva navedena mikrobiološka kriterija) bila je veća za *M. avium* (35/53; 66%), *M. intracellulare* (21/34; 61,8%) i *M. kansasii* (7/16; 43,8%). Od brzorastućih mikobakterija, *M. abscessus* je pokazao najveću potencijalnu kliničku važnost (9/39; 23,1%).

Gledajući samo kriterij za vjerojatnu bolest, najveću potencijalnu kliničku važnost imaju *M. intracellulare* (13/34; 38,2%), *M. avium* (10/53; 18,9%), *M. kansasii* (3/16; 18,8%) i *M. xenopi* (21/243; 8,6%). Nasuprot tome, klinička važnost najčešće izolirane NTM vrste – *M. gordonae* – je niska. Kriterij za vjerojatnu bolest zadovoljava samo oko 1,5% svih epizoda izolacije.

M. avium (OR 10,34, 95%CI od 4,6 do 23,2; $p < 0,0001$), *M. intracellulare* (OR 19,5, 95% CI od 8,7 do 43,7; $p < 0,0001$), *M. xenopi* (OR 2,42, 95% CI od 1,4 do 4,1, $p < 0,001$) i *M. lentiflavum* (OR 16,9, 95% CI od 2,4 do 121,8, $p = 0,018$) bile su i statistički značajno povezane s vjerojatnom bolesti.

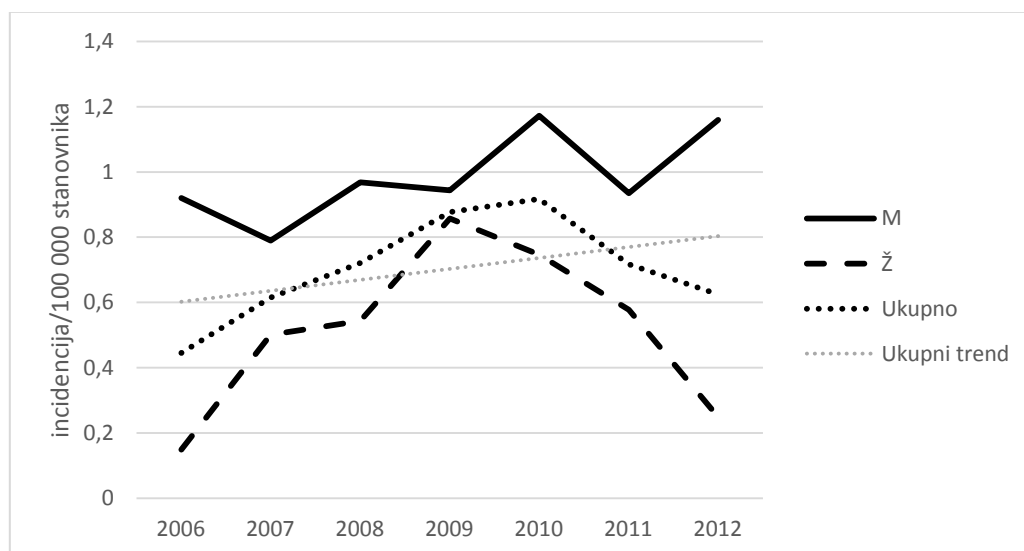
Tablica 9. Demografske karakteristike osoba s epizodom izolacije netuberkulozne mikobakterije (NTM) koje su zadovoljavale mikrobiološke kriterije moguće i vjerojatne bolesti.

Slučajevi	Vjerojatna bolest*			Moguća bolest*		
	Broj (%)	Medijan godina	Godišnja incidencija	Broj (%)	Medijan godina	Godišnja incidencija
Ukupno	79 (100)	65	0.25	216 (100)	68	0.70
Spol						
Ženski	32 (40.5)	67	0.20	78 (36.1)	66	0.49
Muški	47 (59.5)	63	0.31	138 (63.9)	69	0.92
Dob						
0-9	0 (0)		0.00	5 (2.3)	4.5	0.17
10-19	0 (0)		0.00	8 (3.7)	14	0.23
20-29	3 (3.8)	21	0.07	4 (1.9)	27	0.10
30-39	4 (5.1)	35.5	0.10	8 (3.7)	35	0.19
40-49	5 (6.3)	47	0.11	13 (6)	46	0.29
50-59	15 (19)	55	0.34	34 (15.7)	55	0.76
60-69	24 (30.4)	65	0.74	44 (20.4)	66.5	1.35
70-79	21 (26.6)	74	0.78	64 (29.6)	74	2.38
80+	6 (7.6)	81.5	0.57	30 (13.9)	82	2.85
Nepoznato	1 (1.3)			0 (0)		
50+	66 (83.5)	67.5	0.58	172 (79.6)	71	1.50
Zemljopisna regija						
Kontinent	48 (60.8)	63	0.23	128 (59.3)	68	0.62
Obala	31 (39.2)	66	0.30	67 (31)	70.5	0.65
Nepoznato	0 (0)			21 (9.7)		

* Moguća bolest: minimalno dva pozitivna iskašljaja ili jedan pozitivan bronho-alveolarni lavat (BAL) ili aspirat bronha; Vjerojatna bolest: više od dva pozitivna iskašljaja ili jedan pozitivan iskašljaj u kombinaciji s pozitivnim BAL-om ili aspiratom bronha.

Incidencija izolacije NTM-a razlikuje se između kontinentalne i obalne regije Hrvatske. Iako znatno veći broj izolata nalazimo u kontinentalnom dijelu, postotak izolata koji zadovoljavaju kriterije za moguću ili vjerojatnu bolest iznosi čak 28,7% u obalnoj, u odnosu na samo 15% u kontinentalnoj regiji zemlje. Štoviše i postotak izolata koji zadovoljavaju kriterij za vjerojatnu bolest dvostruko je veći u obalnoj (9,1%) u odnosu na kontinentalnu regiju (4,1%). Ova je razlika i statistički značajna te tako epizoda izolacije NTM-a u obalnoj regiji značajno češće zadovoljava mikrobiološki kriteriji vjerojatne bolesti u odnosu na epizodu izolacije u kontinentalnoj regiji zemlje (OR 2,84, 95% CI 1,77 do 4,56; $p < 0,0001$). Incidencija vjerojatne bolesti iznosi 0,3/100 000 u obalnoj, u odnosu na 0,2/100 000 u kontinentalnoj regiji zemlje.

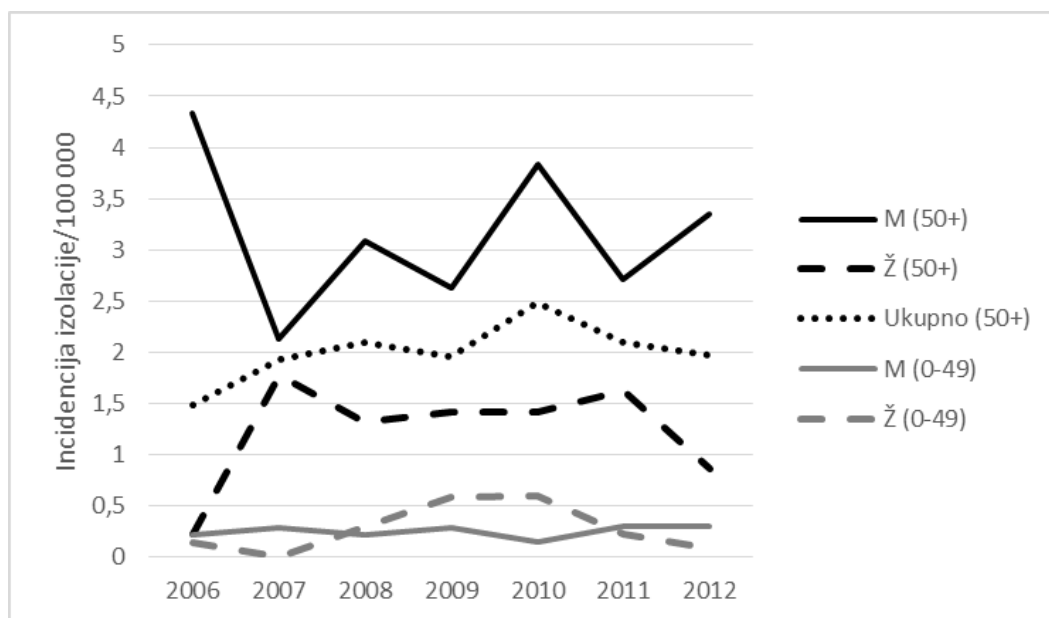
Ukupno gledano, ne postoji značajniji porast ili pad incidencije vjerojatne bolesti tijekom godina iako se bilježi blagi trend porasta incidencije onih epizoda koje zadovoljavaju mikrobiološke kriterije za moguću i/ili vjerojatnu bolest (slika 5).



Slika 5. Godišnja incidencija epizoda izolacije netuberkuloznih mikobakterija (NTM) koje zadovoljavaju mikrobiološki kriteriji moguće ili vjerojatne bolesti.

Od svih epizoda izolacije NTM-a koje su zadovoljile mikrobiološki kriteriji vjerojatne bolesti, 48 (60,8%) je bilo u muškaraca, a 31 (39,2%) u žena, iako ova razlika nije bila statistički značajna. Gotovo 80% svih epizoda koje su zadovoljile kriteriji za moguću bolest te 83% vjerojatnih bolesti javlja se u osoba starijih od 50 godina. Prosječna godišnja incidencija moguće i vjerojatne bolesti zajedno u ovoj je dobnoj skupini iznosi 1,5 slučajeva, a incidencija vjerojatne bolesti 0,6 slučajeva na 100 000 stanovnika (slika 6).

U ovoj dobnoj skupini, postotak muškaraca koji zadovoljavaju mikrobiološki kriterij moguće i/ili vjerojatne bolesti značajno je veći u odnosu na žene (OR 2,36; 95% CI 1,79 do 3,13; $p < 0,0001$). Ta se razlika zadržava i kad se promatraju samo oni slučajevi koji zadovoljavaju kriterij za vjerojatnu bolest, no statistički je granično značajna (OR 1,85; 95% CI 1,1 do 3,17; $p = 0,014$).



Slika 6. Godišnja incidencija izolata netuberkuloznih mikobakterija (NTM) koji zadovoljavaju mikrobiološki kriterij moguće ili vjerojatne bolesti na 100 000 stanovnika, ovisno o dobi i spolu.

5.3. Važnost pojedinih vrsta netuberkuloznih mikobakterija ovisno o cjelovitim kriterijima

Od ukupno 1613 epizoda izolacije NTM-a, za 426 (26,43%) je prikupljeno dovoljno kliničkih i/ili radioloških podataka za procjenu zadovoljavanja ATS/IDSA kriterija za postavljanje ili isključivanje dijagnoze plućne mikobakterioze.

Od 426 obrađenih epizoda, 260 je bilo iz kontinentalne regije Hrvatske (260/1178; 22,1 % svih epizoda), a 166 (166/342; 48,5% svih epizoda) iz obalne regije Hrvatske.

Uzimajući u obzir samo prvi put kad su zadovoljeni kriteriji za bolest, 67 (15,7%) epizoda je zadovoljilo kriterije za dokazanu, 23 (5,4%) za vjerojatnu, a 9 (2,1%) za moguću bolest.

Najčešće vrste NTM-a i raspodjela epizoda izolacije navedenih vrsta po grupama sukladno cjelovitim kriterijima za dijagnostiku plućnih mikobakterioza nalaze se u tablici 10.

Procijenjena godišnja incidencija iznosi 0,29 slučajeva na 100 000 stanovnika za dokazanu i vjerojatnu bolest zajedno, odnosno 0,22 slučaja na 100 000 stanovnika ukoliko izračun ograničimo samo na one koji zadovoljavaju kriterij dokazane bolesti. Demografske karakteristike osoba koje su zadovoljavale kriterije za dokazanu odnosno vjerojatnu bolest prikazane su u tablici 11.

Tablica 10. Udio epizoda izolacije pojedine vrste netuberkuloznih mikobakterija (NTM) s prikupljenim kliničkim/radiološkim podacima i raspodjela po grupama sukladno cjelovitim kriterijima za dijagnostiku plućnih mikobakterioza.

Vrsta NTM	Dokazana bolest	Vjerojatna bolest	Moguća bolest	Kolonizacija	Ukupno prikupljenih podataka
<i>M. gordonae</i>	1 (1 %)	1 (1 %)	0	94 (98 %)	96/679 (14,1 %)
<i>M. xenopi</i>	23 (17,3 %)	16 (12,3 %)	3 (2,3 %)	91 (68,1 %)	133/243 (54,7 %)
<i>M. fortuitum</i>	2 (2,9 %)	0	0	67 (97,1 %)	69/197 (35 %)
<i>M. terrae</i>	0	0	0	18 (100 %)	18/128 (14,1 %)
<i>M. chelonae</i>	0	0	0	12 (100 %)	12/60 (20 %)
<i>M. avium</i>	17 (53,1%)	4 (12,5 %)	3 (9,4%)	8 (25 %)	32/53 (60,4 %)
<i>M. abscessus</i>	1 (11,1%)	0	2 (22,2%)	6 (66,7 %)	9/39 (23,1 %)
<i>M. intracellulare</i>	14 (63,7%)	1 (4,5 %)	0	7 (31,8 %)	22/34 (64,7 %)
<i>M. kansasii</i>	3 (42,9%)	1 (14,3 %)	0	3 (42,8 %)	7/16 (43,8 %)

Uzimajući u obzir samo one epizode izolacije NTM-a koje zadovoljavaju kriterije dokazane bolesti, jedino su *M. avium* (OR 13,46, 95% CI 5,52 do 32,8; $p < 0,0001$), *M. intracellulare* (OR 10,94; 95% CI od 4,18 do 28,64, $p < 0,0001$) i *M. kansasii* (OR 5,05; 95% CI od 1 do 25,57, $p = 0,03$) značajno povezane s bolesti.

Nasuprot tome, najčešće izolirane NTM vrste – *M. gordonae* (OR 0,04; 95% CI 0,005 do 0,27, $p < 0,0001$), *M. fortuitum* (OR 0,12, 95% CI od 0,03 do 0,5, $p < 0,001$) i *M. terrae* (OR 0,12, 95% CI od 0,007 do 2,08, $p < 0,05$) značajno su povezane s odsustvom bolesti odnosno kolonizacijom, dok za *M. xenopi* nije bilo statistički značajne povezanosti niti s bolesti niti kolonizacijom.

Postotak epizoda koje zadovoljavaju kriterije za dokazanu bolest iznosi 19,9% u obalnom, u odnosu na 13,1% u kontinentalnom području zemlje. Ova je razlika granično statistički značajna te tako epizoda izolacije NTM-a u obalnoj regiji nešto češće zadovoljava kriterije za dokazanu bolest u odnosu na epizodu izolacije u kontinentalnoj regiji zemlje (OR 1,68, 95% CI 0,99 do 2,9; $p=0,0502$).

Iako je apsolutan broj bolesnika nešto veći u kontinentalnoj regiji zemlje, prosječna godišnja incidencija dokazane bolesti bila je dvostruko veća u obalnoj (0,32/100 000) u odnosu na kontinentalnu regiju zemlje (0,16/100 000). Incidencija dokazane i vjerojatne bolesti zajedno također je bila znatno veća u obalnoj regiji zemlje (0,42 naspram 0,22/100 000).

Od svih epizoda izolacije NTM-a koje su zadovoljile kriteriji dokazane bolesti, 36 (54,5 %) je bilo u muškaraca a 30 (45,5%) u žena. Osobe ženskog spola imale su nešto veću šansu (OR 1,71, 95% CI 1,009 do 2,913) imati dokazanu bolest no razlika je bila tek granično statistički značajna ($p=0,045$).

Preko 80 % svih epizoda koje su zadovoljile kriteriji za dokazanu bolest bilo je u osoba starijih od 50 godina (tablica 11). Prosječna godišnja incidencija u ovoj dobnoj skupini iznosi 0,5 za dokazanu bolest, odnosno 0,66 slučajeva na 100 000 stanovnika za dokazanu i vjerojatnu bolest zajedno.

Tablica 11. Demografske karakteristike osoba s epizodom izolacije netuberkulozne mikobakterije (NTM) koje su zadovoljavale kriterije za vjerojatnu ili dokazanu bolest.

Slučajevi	Dokazana bolest*			Dokazana + vjerojatna bolest*		
	Broj (%)	Medijana godina	Godišnja incidencija	Broj (%)	Medijan godina	Godišnja incidencija
Ukupno	67	63	0.22	90	65	0.29
Spol						
Ženski	30 (44,8)	67	0.19	41 (45,6)	65	0.26
Muški	37 (55,2)	60	0.24	49 (54,4)	65	0.33
Dob						
0-9	0 (0)			0 (0)		
10-19	0 (0)			0 (0)		
20-29	2 (3)	21	0.05	3 (3,3)	24.5	0.07
30-39	2 (3)	38	0.02	4 (4,4)	34	0.07
40-49	6 (9)	47	0.14	7 (7,8)	45	0.16
50-59	16 (23,9)	54.5	0.36	21 (23,3)	55	0.47
60-69	22 (32,8)	65	0.70	24 (26,7)	64	0.77
70-79	14 (20,9)	72	0.48	22 (24,4)	74	0.78
80+	4 (6)	80	0.47	8 (8,7)	82	0.85
Nepoznato	1 (1,4)			1 (1,1)		
50+	56 (83,6)	65	0.50	75 (83,3)	70	0.66
Zemljopisna regija						
Kontinent	35 (52,2)	60	0.16	46 (51,1)	64	0.22
Obala	32 (47,8)	65	0.32	44 (48,9)	67	0.42

*prema ATS/IDSA smjernicama (29)

5.4. Korelacija mikrobioloških i cjelovitih kriterija

U tablici 12 prikazane su epizode izolacije NTM-a s prikupljenim kliničkim podacima (n=426) i njihova raspodjela prema mikrobiološkom kriteriju moguće i vjerojatne odnosno grupama bolesti definiranim prema cjelovitim kriterijima.

Tablica 12. Raspodjela epizoda izolacije netuberkuloznih mikobakterija (NTM) prema mikrobiološkim odnosno cjelovitim kriterijima.

	Mikrobiološki kriterij	Vjerojatna bolest	Moguća bolest	Kolonizacija
	Bolest			
Sve NTM	Dokazana	44 (81,5%)	23 (26,4%)	0 (0%)
	Vjerojatna	2 (3,7%)	7 (8%)	14 (4,9%)
	Možda	3 (5,6%)	3 (3,5%)	3 (1,1%)
	Nema	5 (9,2%)	54 (62,1%)	268 (94%)
		54 (100%)	87 (100%)	285 (100%)
<i>M. xenopi</i>	Dokazana	14 (82,4%)	9 (25,7%)	0 (0%)
	Vjerojatna	0 (0%)	4 (11,4%)	12 (14,8%)
	Možda	1 (5,8%)	2 (5,8%)	0 (0%)
	Nema	2 (11,8%)	20 (57,1%)	69 (85,2%)
		17 (100%)	35 (100%)	81 (100%)
MAC	Dokazana	19 (90,6%)	11 (61,1%)	0 (0%)
	Vjerojatna	1 (4,7%)	3 (16,7%)	1 (7,1%)
	Možda	1 (4,7%)	0 (0%)	2 (14,3%)
	Nema	0 (0%)	4 (22,2%)	11 (78,6%)
		21 (100%)	18 (100%)	14 (100%)

MAC – *Mycobacterium avium* complex

Ukupno gledano za sve vrste NTM-a, preko 85% epizoda koje zadovoljavaju pojačani mikrobiološki kriterij vjerojatne bolesti, spada u kategoriju dokazane ili vjerojatne bolesti prema cjelovitim kriterijima. Nasuprot tome, 94% onih koje ne zadovoljavaju mikrobiološki kriteriji zaista nemaju bolest. U grupi onih koje zadovoljavaju minimalni mikrobiološki kriterij moguće bolesti, oko dvije trećine nema bolest dok jedna trećina otpada na dokazane ili vjerojatne bolesnike.

Što se najznačajnijih vrsta NTM-a tiče, za *M. xenopi* je situacija slična kao i za sve NTM, dok je kod MAC-a raspodjela nešto drugačija. Naime, preko 95% izolata koji zadovoljavaju pojačani mikrobiološki i preko 75% onih koji zadovoljavaju minimalni mikrobiološki kriterij moguće bolesti predstavlja dokazane ili vjerojatne bolesnike.

Usporedbom dijagnoza temeljenih na mikrobiološkim i cjelovitim kriterijima za epizode izolacije NTM-a s prikupljena oba podatka, pokazana je vrlo dobra povezanost odnosno korelacija navedenih kriterija. Spearmanov koeficijent korelacije (ρ) iznosi 0,678 (95%CI od 0,624 do 0,726) s visokom statističkom značajnošću ($p < 0,0001$). Dodatnom analizom nađena je i statistički značajna razlika između pooštrenih i minimalnih mikrobioloških kriterija (OR 4,86; 95%CI od 2,268 do 10,41; $p < 0,0001$) u „prepoznavanju“ bolesnika s dokazanom plućnom mikobakteriozom.

5.5. Klinički podaci

Kompletan pregled s podacima o svim simptomima prikupljen je za 290 epizoda izolacije NTM-a. Učestalost pojave pojedinog simptoma u različitim grupama bolesti prikazana je u tablici 13. Najčešći simptomi u onih s dokazanom bolesti bili su produktivan kašalj (68,7%), malaksalost (67,2%), gubitak apetita (43,3%), nedostatak zraka (41,8%), vrućica (37,3%), gubitak na težini (31,3%) i iskašljavanje krvi (23,9%), no samo su malaksalost (OR 3,36, 95% CI od 1,8 do 6,2; $p < 0,0001$) i iskašljavanje krvi (OR 2,97, 95% CI od 1,4 do 6,2; $p = 0,003$) bili značajno povezani s bolesti u odnosu na kolonizaciju.

Tablica 13. Simptomi i njihova pojavnost u pojedinoj grupi bolesti definiranoj prema cjelovitim kriterijima za dijagnozu plućne mikobakterioze (29).

Simptom	Dokazana bolest	Vjerojatna bolest	Moguća bolest	Kolonizacija
Malaksalost	45	14	4	73
Produktivan kašalj	46	14	3	113
Dispneja (nedostatak zraka)	28	7	5	82
Suhi kašalj	9	6	2	31
Vrućica	25	10	2	61
Pojačano znojenje	9	1	0	14
Bol u prsima	11	4	2	37
Gubitak apetita	29	11	4	64
Gubitak na težini	21	7	2	42
Iskašljavanje krvi	16	5	1	18

Čimbenici rizika zabilježeni u osoba s izoliranom NTM-om, prikazani su u tablici 14. Jedino je niska tjelesna težina, odnosno indeks tjelesne mase (BMI), bila značajno povezana s plućnom mikobakteriozom (OR 6,3; 95% CI od 3,1 do 12,8; $p < 0,0001$). Nije bilo statistički značajne razlike između dokazano bolesnih i zdravih ovisno o terapiji koju su bolesnici uzimali radi drugih pridruženih stanja ili bolesti. Također, nije nađeno statistički značajne razlike između bolesnih i zdravih ovisno o tipu sredine u kojoj žive.

Tablica 14. Čimbenici rizika i njihova pojavnost u pojedinoj grupi bolesti definiranoj prema cjelovitim kriterijima za dijagnozu plućne mikobakterioze (29).

Rizik	Dokazana bolest	Vjerojatna bolest	Moguća bolest	Kolonizacija
10% ispod idealnog BMI	19	10	1	19
Pozitivan PPD ili IGRA test u anamnezi	11	4	0	46
Primjena i.v. antibiotika u protekla tri mjeseca	5	0	1	20
Kemoterapija	1	0	0	21
Dugotrajna terapija sistemskim kortikosteroidima	3	1	1	10
Terapija inhalacijskim kortikosteroidima	17	4	1	42
Štićenik doma umirovljenika	1	1	0	9
Trenutni pušač	23	4	1	68
Bivši pušač	14	8	2	87
Nepušač	28	10	4	78
Imunosupresivna terapija	0	0	1	1
Ovisnost o opijatima u anamnezi	3	0	0	1

PPD – pročišćeni proteinski derivat; IGRA - test otpuštanja gama-interferona

Najčešće pridružene bolesti bile su KOPB (n=29; 43,3%), bronhiektazije (n=24; 35,8%) i ranije preboljena TBC (n=17; 25,4%) (tablica 15), no jedino su bronhiektazije statistički značajno udružene s dokazano bolesnima u odnosu na one koji sigurno nemaju bolest (OR 6,9; 95%CI od 3,6 do 13,3; p<0,0001)

Tablica 15. Najčešće pridružene bolesti i njihova učestalost u pojedinoj grupi definiranoj prema cjelovitim kriterijima za dijagnozu plućne mikobakterioze (29).

Pridružena bolest	Dokazana bolest	Vjerojatna bolest	Moguća bolest	Kolonizacija
KOPB	29	7	5	112
Bronhiektazije	24	2	1	24
Preboljena TBC u anamnezi	17	6	1	50
Aktivna TBC	0	1	0	98
Arterijska hipertenzija	16	5	1	63
Karcinom pluća	2	1	1	42
Astma	2	2	0	8
Sarkoidoza	2	0	1	2
Cistična fibroza	2	0	0	1
Silikoza	0	0	1	0
Fibroza pluća	1	0	1	5
Šećerna bolest	9	1	1	33
Srčano zatajivanje	5	2	0	25
Alkoholizam	4	3	0	25
GERB i/ili kronični gastritis	3	1	0	20
Reumatološke bolesti	1	2	0	3
Bubrežna bolest	2	0	0	8
Jetrena bolest	4	0	1	14
Hepatitis B i/ili C	5	0	0	3
HIV	0	0	0	3
Primarna imunodeficijencija	1	0	0	0
Transplantacija solidnog organa	0	0	0	1
Asplenija	2	0	0	2

TBC – tuberkuloza; HIV – virus humane imunodeficijencije

Radiološki nalazi (klasični rendgenogram i/ili CT) prikupljeni su za ukupno 328 epizoda izolacije NTM-a. Od 67 dokazanih plućnih mikobakterioza, u 18 (27,3 %) slučajeva se radiološki radilo o isključivo kavernoznom obliku bolesti, u dodatnih 5 (7,5%) o kombinaciji kavernoznog i retikulonodularnog radiološkog nalaza, a u dva je bolesnika (3%) dominantan radiološki nalaz bio pleuralni izljev.

Od 43 bolesnika u kojih je zabilježen retikulonodularni tip bolesti, u 22 (51,2%) je nalaz bio udružen s bronhiektazijama. U tablici 16 prikazan je nalaz klasičnog rengenograma za najčešće vrste netuberkuloznih mikobakterija, uzročnika plućnih mikobakterioza u Hrvatskoj.

Tablica 16. Radiološki nalaz u bolesnika s dokazanom ili vjerojatnom bolesti uzrokovanom najčešćim vrstama netuberkuloznih mikobakterija (NTM) u Hrvatskoj.

Vrsta NTM	<i>M. xenopi</i>		<i>M.avium</i>		<i>M. intracellulare</i>	
	Dokazana	Vjerojatna	Dokazana	Vjerojatna	Dokazana	Vjerojatna
RTG nalaz						
Kavernozni tip	8	3	3	0	4	0
Kavernozni + RN	1	1	2	0	1	0
RN	10	9	6	2	1	1
RN + bronhiektazije	4	1	5	0	8	0
Pleuralni izljev	0	1	1	1	0	0
Uredan nalaz	0	1	0	1	0	0
Ukupno	23	16	17	4	14	1

RN – retikulonodularni oblik bolesti

5.6. Liječenje plućnih mikobakterioza

U tablici 17 prikazani su podaci o provedenoj terapiji te ishodu liječenja u bolesnika s dokazanom ili vjerojatnom bolesti. Ukupno 30 (33,3%) bolesnika liječeno je prema ATS/IDSA smjernicama (29), što je rezultiralo izlječenjem odnosno negativizacijom mikrobiološkog nalaza u 24 (80%) bolesnika. Ukoliko u obzir uzmemo samo bolesnike s dokazanom bolesti, postotak izlječenja u grupi liječenoj prema smjernicama iznosi 73,1% (19/26).

Liječnici se nisu odlučili uvesti terapiju u 14 (15,6%) bolesnika, dok je u 34 (37,8%) bolesnika terapija provedena neadekvatno. Gledajući samo grupu bolesnika s dokazanom bolesti kod kojih terapija nije adekvatno provedena, u 8 (33,3%) je bolest ostala aktivna i nakon završetka liječenja.

Bez obzira na izbor terapije, u grupi bolesnika s dokazanom bolesti, u 35 (52,2%) je došlo do izlječenja bolesti odnosno negativizacije mikrobiološkog nalaza, a u 18 (26,9%) je bolest ostala aktivna. Pet je bolesnika (7,5%) umrlo za vrijeme liječenja, od čega su 4 smrti pripisane samoj NTM plućnoj bolesti. U tablici 18 prikazani su rezultati liječenja bolesnika s dokazanom ili vjerojatnom bolesti uzrokovanih najčešćim vrstama NTM-a u Hrvatskoj.

Tablica 17. Ishod liječenja dokazanih i vjerojatnih plućnih mikobakterioza ovisno o provedenoj terapiji.

Bolest	Terapija	Prema smjernicama	Neadekvatno provedena	Nije ponuđena	U tijeku	Nepoznato
	Ishod					
Dokazana (n=67)	Bolest aktivna	4 (15,4%)	8 (33,3%)	4 (50%)	2	0
	Izlječenje	19 (73,1%)	13 (54,2%)	1 (12,5%)	1	1
	Smrt uslijed NTM	2 (7,7%)	0	0	0	2
	Smrt uslijed druge bolesti	1 (3,8%)	0	0	0	0
	Nepoznat ishod	0	3 (12,5%)	3 (37,5%)	1	2
Vjerojatna (n=23)	Bolest aktivna	0	1 (10%)	1 (16,7%)	0	0
	Izlječenje	3 (75%)	6 (60%)	1 (16,7%)	0	0
	Smrt uslijed NTM	0	0	0	0	1
	Smrt uslijed druge bolesti	1 (25%)	1 (10%)	0	0	1
	Nepoznat ishod	0	2 (20%)	4 (66,6%)	0	1

NTM – netuberkulozne mikobakterije

Tablica 18. Ishod liječenja dokazanih i vjerojatnih plućnih mikobakterioza uzrokovanih s najčešćim vrstama netuberkuloznih mikobakterija (NTM) u Hrvatskoj ovisno o provedenoj terapiji.

	Terapija	Prema smjernicama	Neadekvatno provedena	Nije ponuđena	U tijeku	Nepoznato
Vrsta NTM	Ishod					
<i>M. xenopi</i>	Bolest aktivna		2 (5,1%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)	
	Izlječenje	11 (28,3%)	10 (25,6%)			
	Smrt uslijed NTM	1 (2,6%)				2 (5,1%)
	Smrt uslijed druge bolesti		1 (2,6%)			1 (2,6%)
	Nepoznat ishod		4 (10,2%)	3 (7,6%)		2 (5,1%)
<i>M. avium</i>	Bolest aktivna	1 (4,8%)	3 (14,3%)	2 (9,5%)		
	Izlječenje	3 (14,3%)	4 (19%)	2 (9,5%)		
	Smrt uslijed NTM					
	Smrt uslijed druge bolesti	2 (9,5%)				
	Nepoznat ishod		1 (4,8%)	3 (14,3%)		
<i>M. intracellulare</i>	Bolest aktivna	1 (6,2%)	2 (12,5%)	1 (6,2%)	1 (6,2%)	
	Izlječenje	3 (18,9%)	3 (18,9%)			
	Smrt uslijed NTM	1 (6,2%)				
	Smrt uslijed druge bolesti	2 (12,5%)				
	Nepoznat ishod			1 (6,2%)		1 (6,2%)
<i>M. kansasii</i>	Bolest aktivna		1 (25%)			
	Izlječenje	3 (75%)				
	Smrt uslijed NTM					
	Smrt uslijed druge bolesti					
	Nepoznat ishod					

5.7. Plućne mikobakterioze uzrokovane najčešćim patogenim vrstama netuberkuloznih mikobakterija u Hrvatskoj

5.7.1. M. xenopi

Izlječenje odnosno negativizacija mikrobiološkog nalaza postignuta je u 21 (53,9%) bolesnika s dokazanom ili vjerojatnom bolesti uzrokovanom s *M. xenopi*. Tek u nešto više od polovice tih bolesnika (n=11), terapija je provedena prema ATS/IDSA smjernicama dok je u ostalih 10 do izlječenja došlo unatoč neadekvatno provedenoj terapiji. S druge strane, u 3 bolesnika u kojih nije postignuto izlječenje, terapija nije adekvatno provedena ili nije niti ponuđena dok u skupini onih liječenih prema smjernicama (29) nije zabilježen neuspjeh terapije. U jednog je bolesnika došlo do smrtnog ishoda unatoč pravilno primijenjenoj terapiji zbog značajno uznapredovale bolesti i lošeg općeg stanja.

5.7.2. M. avium complex

Ukupno gledano, izlječenje bolesti postignuto je u 15 (40,5%) bolesnika s dokazanom ili vjerojatnom plućnom mikobakteriozom uzrokovanom s MAC-om. Od tih 15 bolesnika, 6 (40%) ih je liječeno prema smjernicama, u 7 (46,7%) je terapija provedena neadekvatno dok je u 2 bolesnika (13,3%) došlo do negativizacije mikrobiološkog nalaza unatoč tome što terapija nije niti ponuđena. Bolest je ostala aktivna u 11 (29,7%) bolesnika s MAC plućnom mikobakteriozom. Od toga je u 2 bolesnika (18,2%) terapija provedena prema smjernicama, u 5 (45,5%) neadekvatno, u 3 (27,3%) terapija nije ponuđena dok je u jednog bolesnika terapija još uvijek bila u tijeku u vrijeme završavanja ovog istraživanja.

5.7.3. *M. kansasii*

M. kansasii bila je uzročnikom plućne mikobakterioze u samo 4 bolesnika u vremenskom periodu obuhvaćenom istraživanjem. Tri (75%) bolesnika su liječena adekvatno i prema smjericama i u njih je postignuto izlječenje bolesti. U jednog se bolesnika, nakon neadekvatno provedene terapije i dalje prati aktivna bolest uz mikrobiološki pozitivan nalaz.

6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem obuhvaćeni su svi izolati NTM-a plućnog porijekla na području Hrvatske u periodu od siječnja 2006.g. do prosinca 2012. godine. Osim sveobuhvatne analize čimbenika bitnih za našu zemlju, dodatni je značaj ovog rada činjenica da je jedno od rijetkih populacijskih istraživanja incidencije plućne mikobakterioze u zemlji u kojoj tuberkuloza još uvijek predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Naime, incidencija tuberkuloze u Hrvatskoj 2006. godine iznosila je 26 slučajeva na 100 000 stanovnika (84).

6.1. Izolati netuberkuloznih mikobakterija iz uzoraka plućnog porijekla

Tijekom 7 godina trajanja istraživanja, izolirano je preko 1600 izolata 29 različitih vrsta NTM-a. Najčešće susretane vrste NTM-a bile su *M. gordonae*, *M. xenopi* i *M. fortuitum*, a više od 70% svih izolata potječe iz kontinentalne regije Hrvatske. Prosječna godišnja incidencija izolacije na razini čitave države iznosi 3,9 izolata na 100 000 stanovnika, a u kontinentalnoj je regiji gotovo dvostruko veća u odnosu na obalnu (4,3 vs. 2,2/100,000). Za usporedbu, incidencija izolacije NTM-a u danskoj populaciji iznosi 2,4 (33), a u populaciji Engleske, Velsa i Sjeverne Irske 2,9 na 100 000 stanovnika (44).

Ukupno gledano, uočen je blagi uzlazni trend godišnjeg broja izolata s vrhom incidencije zabilježenim 2009. godine. Za navedeni je porast najvećim dijelom zaslužan porast izolacije *M. gordonae* i, u manjoj mjeri, *M. fortuitum* dok se vršna incidencija 2009. godine može dijelom objasniti naknadno utvrđenom kontaminacijom

vodovodne vode (korištene od strane bolesnika prije davanja iskašljaja na analizu) s *M. gordonae* u jednom centru u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (rad u postupku objave). Porast se dakle odnosio uglavnom na klinički neznačajne vrste NTM-a i bio je značajnije izražen u kontinentalnoj u odnosu na obalnu regiju Hrvatske. Iako je gotovo 60% svih izolata NTM-a izolirano u osoba muškog spola, nije bilo značajnih razlika u pojavnosti određene vrste NTM-a ovisno o spolu.

Nekoliko je nedavnih studija s područja Sjeverne Amerike i Zapadne Europe pokazalo značajan porast ukupne izolacije NTM-a iz uzoraka plućnog porijekla (31,32,33,44,53). U studiji iz Nizozemske, porast je dominantno bio uzrokovan porastom izolacije *M. avium* i *M. gordonae* i bio je najaglašeniji u bolesnika starijih od 40 godina (53). Moore i suradnici pokazali su porast izolacije u osoba starijih od 60 godina u Engleskoj, Velsu i Sjevernoj Irskoj, s tim da je najveći porast zabilježen za *M. gordonae* (44). U Danskoj nije bilo značajnog porasta same izolacije NTM-a no zabilježen je porast incidencije plućne mikobakterioze u starijih osoba (33).

Što se naše zemlje tiče, stopa izolacije također raste i u muškoj i u ženskoj populaciji starijoj od 50 godina. Nadalje, umjerena dominacija muškog spola u općoj populaciji (gotovo 60% svih izolata NTM-a), još je izraženija u populaciji starijoj od 50 godina gdje postaje i statistički značajna. Uzrok navedene razlike nije moguće u potpunosti objasniti, no za pretpostaviti je da na njega utječe nejednoliki omjer muškaraca i žena u navedenoj populaciji, ali i veća pojavnost pridruženih bolesti poput KOPB-a u muškoj populaciji starijoj od 50 godina.

U ovom je istraživanju, uz opis opće epidemiološke slike distribucije vrsta NTM-a na području Hrvatske, nađena i zanimljiva zemljopisna razlika između dviju promatranih zemljopisnih regija. Iako je preko 70% svih izolata NTM-a izolirano u kontinentalnom

dijelu zemlje, većina klinički značajnih vrsta NTM (*M. avium*, *M. xenopi*, MAC kao grupa) statistički se značajno češće pojavljuje u obalnoj regiji. Nasuprot tome, vrste koje se smatraju dominantno saprofitima odnosno klinički neznačajnima (*M. gordonae*, *M. terrae*) češće se susreću u kontinentalnoj regiji zemlje. Razlika u distribuciji vrsta NTM-a ovisno o zemljopisnom području prikazana je na slici 3. Neki od čimbenika koji bi mogli utjecati na ove različitosti u Hrvatskoj su stopa urbanizacije i incidencija tuberkuloze (85).

Naime, u obalnoj su regiji zemlje osobe s izolatom NTM-a statistički značajno češće obitavale u urbanoj sredini u odnosu na ruralnu što je i u skladu s podacima Hrvatskog zavoda za statistiku o većem postotku urbanog stanovništva u obalnoj u odnosu na kontinentalnu regiju (86). U urbanim sredinama opskrba vodom dolazi uglavnom iz većih, općinskih ili gradskih, vodovodnih mreža dok u ruralnim područjima veći dio kućanstava ovisi o lokalnim mrežama distribucije vode odnosno bunarima što dijelom objašnjava različitosti u pojavnosti određenih vrsta NTM-a (36,37,87,88). Nadalje, incidencija tuberkuloze različita je u ove dvije regije te je 2006. godine iznosila 21,2 slučaja u obalnoj, u odnosu na 30,1 slučaj na 100 000 stanovnika u kontinentalnoj regiji (84). Prema dosadašnjim istraživanjima i podacima objavljenim u literaturi, incidencija plućne NTM bolesti i izolacije klinički značajnih vrsta (osobito MAC) raste s padom incidencije tuberkuloze na nekom području (29, 80).

Danas je poznato da se vrste NTM-a izolirane iz uzoraka plućnog porijekla značajno razlikuju s obzirom na zemljopisnu lokaciju (29,32,54,80). Nadalje, uz činjenicu da se vrste NTM-a razlikuju po svojoj kliničkoj važnosti (29,53), situacija se dodatno komplicira uslijed rastućeg znanja o tome da se i klinička značajnost pojedine vrste može razlikovati u različitim zemljopisnim regijama (32,89,90). Kako bi se izbjegla

kriva dijagnoza i spriječilo nepotrebno liječenje, od koristi bi moglo biti primjenjivanje pooštrenih kriterija za klinički neznčajne vrste odnosno umjerenijih kriterija za one vrste koje su od većeg kliničkog značaja u lokalnom okruženju (91).

S obzirom na navedeno, jasno je da je prvi korak u ovom stupnjevitom pristupu plućnim mikobakteriozama potreba za točnim poznavanjem lokalne distribucije vrsta i njihove kliničke značajnosti u pojedinoj zemlji (91).

6.2. Klinička važnost pojedinih vrsta netuberkuloznih mikobakterija u Hrvatskoj

Koristeći modificirane mikrobiološke kriterije za dijagnozu plućnih mikobakterioza (29,64) te modificirane cjelovite ATS/IDSA kriterije, pokušali smo odrediti patogeni potencijal, odnosno kliničku važnost najčešćih NTM vrsta u Hrvatskoj. Nadalje, procijenjena je godišnja incidencija plućne mikobakterioze temeljem mikrobioloških i cjelovitih kriterija i analizirana vrijednost primjene mikrobioloških kriterija u našim uvjetima.

Naime, nedavno je objavljeno istraživanje iz Sjedinjenih Američkih Država u kojem je pokazano da standardni mikrobiološki kriteriji ATS-a (29) imaju visoku prediktivnu vrijednost u predviđanju bolesti u državi Oregon (40). Međutim, na području SAD-a najčešće klinički značajne vrste NTM su MAC i *M. abscessus*. Nasuprot tome, u Hrvatskoj većinu izolata čine klinički manje značajne vrste i saprofiti zbog čega je bitno istražiti vrijednost korištenja mikrobioloških kriterija u lokalnom okruženju.

Za razliku od opsežnih mikrobioloških podataka koji se centralizirano prate u Odsjeku za netuberkulozne mikobakterije HZJZ-a, prikupljanje kliničkih podataka nije

sustavno, a plućne mikobakterioze ne podliježu prijavi epidemiološkoj službi te se ne zna točan teret ove bolesti u Hrvatskoj.

S obzirom na sveobuhvatnost mikrobioloških podataka, sve su epizode izolacije NTM-a podijeljene prema modificiranim mikrobiološkim kriterijima u tri grupe: grupa koja ne zadovoljava kriterije i smatra se kolonizacijom, grupa moguće bolesti u kojoj su zadovoljeni minimalni mikrobiološki ATS/IDSA kriteriji (29) te grupa vjerojatne bolesti u kojoj su epizode izolacije koje zadovoljavaju pooštrene mikrobiološke kriterije (64). Analizom udjela epizoda izolacije određene vrste NTM-a u ove tri grupe, procijenjena je njihova potencijalna klinička važnost.

Iako je *M. xenopi* i dalje najčešća klinički važna NTM vrsta i vodeći uzrok plućne mikobakterioze u Hrvatskoj, klinička važnost pojedinačne izolacije veća je za *M. avium*, *M. intracellulare* i *M. kansasii*. Točnost ovih rezultata, temeljenih na mikrobiološkim kriterijima, provjerena je prikupljanjem kliničkih podataka i procjenom važnosti epizode izolacije prema cjelovitim dijagnostičkim kriterijima (29).

Ukupno je obrađeno oko 25% svih epizoda izolacije, no važno je naglasiti da su prikupljeni podaci za više od 60% svih izolata *M. avium* i *M. intracellulare*, 55% izolata *M. xenopi* te gotovo 45% svih izolata *M. kansasii*. Dakle, fokus je bio na prikupljanju podataka za one vrste NTM-a s većom potencijalnom kliničkom važnosti, dok su od saprofitnih vrsta u validaciju uključene najčešće susretane vrste – *M. gordonae*, *M. fortuitum* i *M. terrae*.

Analizom epizoda s prikupljenim kliničkim podacima, potvrđena je pretpostavljena klinička važnost pojedinih vrsta NTM-a određena prema mikrobiološkim kriterijima. Dokazano je da preko 60% osoba s izolatima *M. avium* ili *M. intracellulare* spada u grupu potvrđenih i/ili vjerojatnih bolesnika s plućnom mikobakteriozom dok taj

postotak za *M. xenopi* iznosi samo oko 30%. Razlike su bile i statistički značajne te je tako izolacija *M. avium*, *M. intracellulare* i *M. kansasii* bila značajno povezana s dokazanom bolesti, dok je izolacija *M. gordonae*, *M. fortuitum* i *M. terrae* bila povezana s odsustvom prave bolesti, odnosno prolaznom kolonizacijom dišnog sustava. Za *M. xenopi* nije bilo statistički značajne povezanosti niti s pravom bolesti niti kolonizacijom.

Ovaj se nalaz razlikuje od podataka iz Nizozemske gdje su *M. xenopi* i *M. kansasii* bili značajnije povezani s bolesti u odnosu na *M. avium* i *M. intracellulare* (53). S druge strane, broj izolata *M. xenopi* obuhvaćen u studiji iz Nizozemske je znatno manji (n=5) u odnosu na ovo istraživanje pa kroz tu prizmu treba gledati i relativno visok postotak bolesnika (3/5; 60%) odnosno nađenu visoku kliničku važnost *M. xenopi* na tom području (53). Nadalje, ranije objavljeni podaci za Hrvatsku također navode veću kliničku značajnost *M. xenopi* (49). Međutim, u odnosu na vremenski period obuhvaćen u istraživanju Marušića i suradnika u kojem je detektirano ukupno 40 izolata tijekom 25 godina, došlo je do značajnog porasta godišnjeg broja izolata *M. xenopi*. Porast je najvjerojatnije uzrokovan poboljšanim laboratorijskim tehnikama (kako kultivacije mikobakterija tako i identifikacije NTM-a), ali i većom senzibilizacijom liječnika prema ovoj skupini bolesti, silaznom trendu tuberkuloze i starenju populacije. Navedeno rezultira detekcijom patogena i kod bolesnika s blažim kliničkim slikama bolesti odnosno kolonizacijom dišnog sustava i utječe na konačne rezultate kliničke značajnosti.

U još je jednoj velikoj retrospektivnoj studiji na 136 bolesnika s *M. xenopi* plućnom mikobakteriozom s područja sjeverno-istočne Francuske, pokazan viši postotak zadovoljavanja dijagnostičkih kriterija za bolest uz izrazito visoku smrtnost u tih bolesnika (50). Međutim, za naglasiti je da je u navedenoj grupi bolesnika značajan

broj bio na imunosupresivnoj terapiji (52%), imao pridruženu dijagnozu infekcije HIV-om (28%) odnosno istovremenu malignu bolest (20%). Nadalje, navedene razlike među zemljama govore u prilog ranije spomenutoj tezi o različitoj virulenciji unutar pojedine vrste NTM-a.

6.3. Incidencija plućne mikobakterioze u Hrvatskoj i korelacija mikrobioloških i cjelovitih kriterija

Iako u ovom radu nije zabilježen trend godišnjeg porasta incidencije bolesti u Hrvatskoj, prati se četverostruki porast prosječne godišnje incidencije bolesti u odnosu na petogodišnji vremenski period koji je prethodio ovom istraživanju (79). Uzimajući u obzir sve epizode izolacije koje zadovoljavaju minimalni odnosno pooštreni mikrobiološki kriterij, prosječna godišnja incidencija plućne mikobakterioze iznosila bi 0,92 odnosno 0,23 slučaja na 100 000 stanovnika. Analizom epizoda obrađenih prema cjelovitim kriterijima, incidencija dokazane bolesti iznosi 0,22 slučaja, dok je incidencija dokazane i vjerojatne bolesti zajedno tek nešto viša i iznosi 0,3 slučaja na 100 000 stanovnika.

Ove su brojke znatno niže u odnosu na Australiju i SAD gdje se incidencija odnosno prevalencija bolesti procjenjuju na 3,3/100 000 (92) te oko 5/100 000 stanovnika (34,35), premašujući incidenciju i značaj tuberkuloze u navedenim zemljama. S druge strane, u zemljama Europe bilježe se niže prosječne godišnje incidencije bolesti te je tako u Nizozemskoj (45) procijenjena na 1,7, a u Danskoj (33) 1,08 slučajeva na 100 000 stanovnika. Nedavno objavljena studija na populaciji središnje Grčke, procijenila je incidenciju klinički signifikantne infekcije pluća na oko 0,6/100 000 što je bilo oko 10 puta manje nego incidencija tuberkuloze u istoj regiji (93).

Incidencija tuberkuloze u Hrvatskoj je veća od one u zemljama Zapadne Europe odnosno SAD-a i Australije i, za razliku od tih zemalja, cijepljenje protiv tuberkuloze je još uvijek obavezno. Navedeno doprinosi objašnjenju niže incidencije izolacije NTM-a kao i plućne mikobakterioze obzirom da se pretpostavlja da infekcija s *M. tuberculosis* kao i samo cijepljenje mogu doprinijeti imunitetu protiv klinički značajne NTM infekcije (94).

Gledajući mikrobiološke, ali i cjelovite kriterije za dijagnostiku plućne mikobakterioze, postotak epizoda izolacije koje zadovoljavaju kriterije za dokazanu bolest statistički je značajno viši u obalnoj u odnosu na kontinentalnu regiju Hrvatske. Štoviše, prosječna godišnja incidencija dokazane bolesti dvostruko je veća u obalnoj regiji zemlje. Moguće je da je ovaj nalaz samo posljedica odnosno odraz ranije opisanih razlika u distribuciji vrsta NTM-a između ovih dviju regija, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razumjele i razjasnile uočene razlike. U nedavno objavljenoj studiji iz SAD-a pokazano je da su regionalni okolišni faktori poput vrste tla, postotka površine zemlje prekrivene vodom i razlike u količini dnevnog isparavanja povezani s razvojem plućne mikobakterioze, no za objašnjenje nastanka same bolesti, uz okolišne, u obzir se moraju uzeti i čimbenici vezani za prijemčljivost domaćina (95).

U našem istraživanju nije nađeno bitnih razlika u pojavnosti bolesti ovisno o spolu. Doduše, unatoč većoj apsolutnoj izolaciji NTM-a u muškaraca, nakon pregleda kliničkih podataka, žene su imale nešto veću vjerojatnost (OR 1,7) imati dokazanu plućnu bolest. Ta je razlika bila tek granično statistički značajna i trebala bi se potvrditi ili opovrgnuti u istraživanju koje će obuhvatiti duži period praćenja.

Iako se ranije navedene populacijske studije ponešto razlikuju u omjeru spolova među bolesnicima, učestalosti pojedinih vrsta NTM-a te učestalosti određenog radiološkog nalaza, u svim se studijama bilježi porast incidencije bolesti u starijih

osoba. I u Hrvatskoj je situacija slična te se preko 80% svih epizoda koje zadovoljavaju mikrobiološke kriterije bolesti javlja u osoba starijih od 50 godina. Prosječna godišnja incidencija vjerojatne bolesti u ovoj dobnoj skupini iznosi 0,6 slučajeva na 100 000 stanovnika, a sličnu je incidencija dokazane bolesti dobivena i analizom epizoda sukladno cjelovitim kriterijima (0,5/100 000).

Iz ovog se rezultata ponovno vidi da se procjena incidencije dokazane bolesti ne razlikuje bitno ako se koriste pooštreni mikrobiološki kriteriji ili cjeloviti kriteriji, dok je procijenjena incidencija moguće i vjerojatne bolesti zajedno (zadovoljeni minimalni mikrobiološki kriteriji) znatno veća od one procijenjene na temelju cjelovitih kriterija. Razlog tom odstupanju najvjerojatnije leži u činjenici da je znatan broj epizoda izolacije saprofitnih vrsta NTM-a zadovoljavao minimalni mikrobiološki kriterij bolesti, no ne i pooštrene mikrobiološke kriterije ili cjelovite kriterije za dijagnozu plućne mikobakterioze.

Unatoč navedenim razlikama, pretpostavljena je dobra općenita korelacija između mikrobioloških i cjelovitih kriterija, koja je i dokazana statističkom analizom (Spearmanov koeficijent korelacije $\rho=0,678$; $p<0,0001$). Nadalje, korištenje pooštrenih mikrobioloških kriterija statistički značajno češće određuje prave bolesnike u odnosu na korištenje minimalnih mikrobioloških kriterija (OR 4,86; $p<0,0001$).

Sumirajući sve navedene rezultate, u procjeni incidencije i prevalencije bolesti u Hrvatskoj najvjerojatnije bi trebalo koristiti pooštrene mikrobiološke kriterije. Ovo saznanje predstavlja važan korak u daljnjem praćenju pojavnosti ove bolesti, jer su mikrobiološki podaci u Hrvatskoj sveobuhvatni, lako dostupni i centralizirani na jednom mjestu.

6.4. Klinička slika plućnih mikobakterioza

Simptomi koji se javljaju u bolesnika s plućnom mikobakteriozom su nespecifični i pojavljuju se i u drugim, akutnim i kroničnim bolestima dišnog sustava. Unatoč navedenom, malaksalost (OR 3,36; $p < 0,0001$) i iskašljavanje krvi (OR 2,97, $p = 0,003$) bili su značajno povezani s bolesti u odnosu na kolonizaciju. Važno je napomenuti da su ove razlike bile statistički značajne unatoč činjenici da je među osobama s kolonizacijom odnosno onih koji su za potrebe ove studije smatrani „zdravima“ bio značajan broj bolesnika s raznim drugim bolestima dišnog sustava uključujući karcinom pluća i aktivnu tuberkulozu.

U gotovo dvije trećine bolesnika s dokazanom plućnom mikobakteriozom radiološki je opisan retikulonodularni tip bolesti, koji je u polovice slučajeva bio povezan s bronhiektazijama. U preostale trećine bolesnika opisan je kavernozi oblik bolesti. Retikulonodularni tip bolesti bio je i najčešći radiološki nalaz i za svaku od tri najčešće vrste NTM-a, uzročnike plućne bolesti u Hrvatskoj – *M. xenopi*, *M. avium* i *M. intracellulare*. U više od polovice bolesnika s dokazanom i dvije trećine onih s vjerojatnom bolesti uzrokovanom s *M. xenopi*, opisan je retikulonodularni oblik bolesti. Ovaj se nalaz razlikuje od prethodno opisane dominacije kavitarnog radiološkog nalaza u plućnoj bolesti uzrokovanoj s *M. xenopi* (49), no u toj su studiji opisane karakteristike značajno manjeg broja bolesnika (24 dokazana bolesnika tijekom perioda od 25 godina) u odnosu na period koji je obuhvaćen u ovom istraživanju. Danas se i kod bolesnika s dugotrajnim respiratornim tegobama, a bez upečatljivog radiološkog nalaza poput kaverne, sumnja na mikobakterije kao uzročnike bolesti te one postaju sve češći nalaz i kod bolesnika s blažim kliničkim slikama odnosno oblicima bolesti.

Kao što je već ranije navedeno, plućne mikobakterioze javljaju se primarno u dvije velike skupine bolesnika: onih s jasnom predležecom plućnom bolesti i onih bez očitih imunoloških ili plućnih poremećaja. U imunokompromitiranih bolesnika bolest je najčešće diseminiranog oblika ili izvanplućne lokacije iako su opisane i izolirane plućne mikobakterioze, osobito nakon transplantacije pluća (96,97,98,99,100,101).

Poznati čimbenici rizika za plućnu mikobakteriozu uključuju cističnu fibrozu (CF), poremećaje u kojima bronhiektazije čine značajnu komponentu bolesti kao što su primarna cilijarna diskinezija, KOPB, anomalije alfa-1-antitripsina, pneumokonioze, plućna alveolarna proteinoza itd. (102,103). Nadalje, i prethodno preboljena tuberkuloza može rezultirati nastankom bronhiektazija i predstavlja rizični čimbenik za naknadnu infekciju NTM-om i razvoj plućne mikobakterioze (104).

Unatoč čestoj udruženosti s bronhiektazijama, nije posve jasno da li infekcija NTM-om dovodi do stvaranja bronhiektazija ili NTM naseljavaju već postojeće bronhiektatične promjene. Pitanje je kompleksno i odgovor zahtjeva dodatna istraživanja, no s obzirom na širok spektar kliničke slike same bolesti, trenutno se smatra da je točno i jedno i drugo (101).

U naših bolesnika s dokazanom bolesti, KOPB je bio najčešće pridružena bolest (n=29; 43,3%), dok su bronhiektazije zabilježene u 24 (35,8%), a ranije preboljena TBC u 17 (25,4%) bolesnika. Bronhiektazije su bile i statistički značajno povezane s dokazanom plućnom mikobakteriozom u odnosu na one s kolonizacijom dišnog sustava. Osobe s izolatom NTM-a i pridruženim bronhiektazijama imale su gotovo 7 puta veću šansu imati dokazanu plućnu mikobakteriozu u odnosu na one bez bronhiektazija.

Iz literature je poznato da je i u svijetu KOPB najčešća pridružena bolest u bolesnika s plućnom mikobakteriozom. Pitanje koje se nameće jest zašto bolesnici s KOPB-om imaju povećan rizik za infekcije NTM-om. Iako nema sigurnog odgovora, činjenica je da NTM češće koloniziraju gornje plućne režnjeve, iste one koji su najčešće zahvaćeni i emfizematoznim promjenama. Možda kolonizaciji emfizematozno promijenjenih područja pogoduje reducirana opskrba krvlju što stvara relativno sigurno mjesto za razmnožavanje NTM-a u uvjetima smanjene opskrbe kisikom i hranjivim tvarima, ali i relativnog odsustva stanica imunološkog sustava (102).

Uz navedene anatomske predispozicije, moguće je i da dugotrajna primjena terapije inhalacijskim kortikosteroidima doprinese riziku nastanka kolonizacije dišnog sustava NTM-om pa i razvoju same bolesti. Istraživanja na ovom polju nisu jednoznačna. Tako su u studiji na danskoj populaciji, Andrejak i suradnici objavili da terapija inhalacijskim kortikosteroidima predstavlja dodatni rizik za razvoj plućne NTM bolesti u bolesnika s KOPB-om (105). S druge strane, u istraživanju provedenom u jednom bolničkom centru u Dallasu (Teksas, SAD) nije nađeno da terapija inhalacijskim kortikosteroidima povećava rizik NTM kolonizacije dišnog sustava u bolesnika s KOPB-om (106). Nadalje, u nedavno objavljenom studiji iz Tajvana pokazano je da infekcija NTM-om pridonosi pogoršanju plućne funkcije bolesnika s KOPB-om (107). Naime, KOPB bolesnici kolonizirani NTM-om imali su dva puta veću šansu egzacerbacije bolesti unutar godine dana, dok je u onih s višestrukim NTM izolatima došlo i do većeg pada plućne funkcije u odnosu na bolesnike s jednim izolatom NTM-a ili bez kolonizacije (107).

U ovom radu, nije nađena statistički značajna razlika između osoba s NTM kolonizacijom i dokazanom bolesti ovisno o terapiji inhalacijskim i/ili dugotrajnom primjenom sistemskih kortikosteroida. Ograničavanjem analize na osobe s

dijagnozom KOPB-a, opaženo je da oni na terapiji inhalacijskim kortikosteroidima značajno češće zadovoljavaju mikrobiološki kriterij moguće ili vjerojatne bolesti (OR 2,5; $p=0,008$). Ipak, navedena razlika nije potvrđena nakon revizije prema cjelovitim kriterijima. Od svih čimbenika rizika, uključujući i pušački status, jedino je niska tjelesna težina odnosno BMI bila značajno povezana s dokazanom bolesti (OR 6,3; $p<0,0001$).

Već je dugi niz godina poznato da se određeni oblik (retikulonodularni) plućne mikobakterioze često javlja u starijih, mršavih žena u post-menopauzalnoj dobi (104,108,109,110,111). Štoviše, i retikulonodularni tip udružen s bronhiektazijama značajno se češće javlja u mršavih žena starije životne dobi (57,109,112). Predominacija žena u ovom tipu bolesti, najčešće uzrokovanim MAC-om, dijelom je pripisivana većoj sklonosti žena za potiskivanjem kašlja (113,114), a u literaturi se naziva sindromom Lady Windermere prema glavnom liku iz romana Oscara Wilde, "Lady Windermere's Fan" (59).

Međutim, nedavno objavljena studija u kojoj su prospektivno obrađena 63 bolesnika s plućnom mikobakteriozom nije potvrdila tezu o namjernom susprezanju kašlja u anamnezi tih bolesnika (108). Pretpostavlja se da niže razine estrogena u žena u post-menopauzi ili vrlo mršavih žena predstavljaju čimbenik rizika za obolijevanje od plućne mikobakterioze (115).

Unatoč opisanoj dominaciji ženskog spola, neminovno se postavlja i pitanje da li mršavost sama po sebi predstavlja čimbenik rizika za plućnu mikobakteriozu. Hipoteza je da mršave osobe imaju niže vrijednosti (116) adipokina leptina. Leptin se, uz to što je tzv. hormon sitosti, ponaša i kao citokin s mogućnošću modulacije imunološkog odgovora, pobuđivanja naivnih T_0 stanica u smjeru TH_1 imunološkog

odgovora odnosno proizvodnje interferona-gama i pokretanja gladovanjem potisnutog imunološkog sustava (117,118). Nadalje, leptin potpomaže i aktivaciju urođenog imunološkog sustava pojačavanjem funkcije fagocitoze, kemotaksije i aktivacijom prirodnih stanica ubojica (NK stanice) (119,120,121).

Istraživanje na miševima s mutiranim genom za proizvodnju leptina pokazalo je da su osjetljiviji na infekcije s raznim bakterijama i parazitima uključujući i pojačanu sklonost infekciji pluća s *M. tuberculosis* i *M. abscessus* (122,123). Ipak, uz općenitu potrebu za većim brojem studija vezanih za dijagnostiku i liječenje plućnih mikobakterioza, i na ovom su području potrebna daljnja klinička istraživanja kako bi se hipoteza potvrdila u ljudi.

6.5. Liječenje plućnih mikobakterioza

S obzirom na različiti patogeni potencijal vrsta NTM-a, čak i kad su zadovoljeni svi kriteriji za postavljanje dijagnoze plućne mikobakterioze, ostaje pitanje da li u bolesnika treba odmah započeti s terapijom ili je bolje zauzeti ekspektativni stav. Ova se dilema osobito odnosi na bolesnike s blažim oblikom bolesti uzrokovanom vrstom NTM-a koja inače nema veliku kliničku važnost (124).

Trenutni je stav stručnjaka da bolesnicima s radiološki retikulonodularnim oblikom bolesti (sa ili bez bronhiektazija) i sumnjom na plućnu mikobakteriozu uzrokovanu inače slabo patogenom vrstom NTM-a, treba pristupiti s dozom sumnje čak i kad su zadovoljeni svi kriteriji za dijagnozu. S druge strane, u bolesnika s kavitarnim oblikom

bolesti pristup općenito treba biti agresivniji neovisno o izoliranoj NTM vrsti, a nakon što su isključene alternativne dijagnoze u podlozi kliničke slike (29).

Dakle, čak i u slučaju ispunjenja svih kriterija, dijagnoza plućne mikobakterioze ne zahtjeva nužno primjenu terapije. Odluku liječiti ili ne nije uvijek lagano donijeti kad znamo da je bolest često indolentna i sporo-progresivna, a terapija dugotrajna i zahtjevna. Zato je, osobito u starijih osoba, potrebno procijeniti tip bolesti, težinu pridruženih bolesti, očekivani životni vijek te potencijalnu koristi odnosno štetu liječenja same plućne mikobakterioze.

Nakon donesene odluke o započinjanju terapije, kliničarima dodatni problem zadaje općeniti nedostatak korelacije između in vitro osjetljivosti na antibiotike i in vivo odgovora na terapiju za gotovo sve vrste NTM-a, uključujući i MAC. Uz to, kombinacije antibiotika koji se koriste u raznim režimima liječenja skupe su i zahtijevaju dugotrajnu primjenu te su nuspojave više pravilo nego iznimka. Iz navedenog je jasno da je liječenje plućnih mikobakterioza znatno zahtjevnije od liječenja tuberkuloze ili nekih drugih upalnih bolesti dišnog sustava. Stoga je, nakon donesene odluke o započinjanju terapije, bitno da se ista provodi prema smjernicama, a bolesnicima objasni značaj redovitog uzimanja lijekova.

Za vrijeme trajanja ovog istraživanja, terapija plućne mikobakterioze provedena je do kraja u 50 od 67 bolesnika s dokazanom bolesti. Međutim, ista je provedena prema smjernicama u tek nešto više od polovice (n=26; 52%), što je rezultiralo izlječenjem u 19 (73%) bolesnika. U preostala 24 bolesnika terapija nije provedena adekvatno, što je najčešće podrazumijevalo kraći period liječenja od preporučenog ili terapijske režime inače korištene u liječenju tuberkuloze. Unatoč tome, do izlječenja je došlo u 13 (54,2%) bolesnika, ali je i postotak onih u kojih je bolest ostala aktivna bio

dvostruko veći u odnosu na grupu liječenu prema smjernicama. Liječnici se nisu odlučili primjeniti terapiju u 8 (11,9%) bolesnika s dokazanom plućnom mikobakteriozom. U polovice je bolest ostala aktivna, u jednog je bolesnika zabilježena negativizacija mikrobiološkog nalaza dok za preostale nije poznat ishod.

Ova značajna odstupanja od smjernica proizlaze dijelom iz slabijeg poznavanja bolesti čak i među pulmolozima, tvrdokornosti same bolesti i potrebe za dugotrajnim uzimanjem terapije, ali i činjenice da se liječenje plućnih mikobakterioza značajnim dijelom temelji dijelom na mišljenju stručnjaka i rijetkim kliničkim studijama. U nedavno objavljenom istraživanju s područja Sjeverne Amerike, pokazano je da se liječnici (uz iznimku stručnjaka u velikim centrima) uključeni u liječenje plućnih mikobakterioza uzrokovanih MAC-om i s *M. abscessus* prilično slabo pridržavaju smjernica te da se često propisuje sub-optimalna ili čak potencijalno štetna terapija odnosno kombinacija antibiotika (125).

Problem dodatno komplicira činjenica da je većina saznanja o terapijskim protokolima bazirana na liječenju *M. avium*, *M. intracellulare* i *M. kansasii* za koje postoji određen broj kliničkih ispitivanja (126). Liječenje bolesti uzrokovanih ostalim NTM, bazira se uglavnom na retrospektivnim istraživanjima, prikazu niza slučajeva (eng. case series) i iskustvu centara s većim brojem bolesnika. Trenutno dostupna literatura dakle nudi ograničene dokaze na kojima bi trebalo zasnovati donošenje odluke o izboru terapijskog režima koji bi vodio do izlječenja većine bolesnika s plućnom NTM bolesti.

Još jedan nedostatak podataka dobivenih iz niza slučajeva je što se odnose na bolesnike koji su uglavnom primali intenzivirane terapijske režime. Taj pristup zanemaruje najveću poteškoću u liječenju plućnih mikobakterioza, koju je još 1979.g.

artikulirao Emanuel Wolinsky, pionir istraživačkog rada u liječenju tuberkuloze i mikobakterioza: „pravilno vođenje terapije zahtijeva veće znanje no što je potrebno za liječenje tuberkuloze, prvo, kako bi se donijela odluka tko treba biti liječen i drugo, koji antibiotski režim izabrati“ (70).

Trenutno se, unatoč relativnom nedostatku znanja temeljenog na dokazima, preporuča slijediti smjernice (29,68,126) u liječenju bolesnika s plućnom NTM bolesti. Ipak postoji jasna potreba za kvalitetnim kliničkim ispitivanjima terapijskih režima, ali i biomarkera kojima bi se mogao predvidjeti ishod terapije u ranoj fazi liječenja.

7. ZAKLJUČAK

U ovom je radu potvrđen trend porasta ukupnog godišnjeg broja izolata NTM-a i četverostruki porast prosječne godišnje incidencije plućne mikobakterioze u odnosu na petogodišnji vremenski period koji je prethodio ovom istraživanju. Prosječna godišnja incidencija izolacija NTM-a u Hrvatskoj iznosi 3,9 izolata na 100 000 stanovnika, a dokazane plućne mikobakterioze 0,22 slučaja na 100 000 stanovnika.

Nadalje, uočena je i značajna raznolikost u pojavnosti određenih vrsta NTM-a ovisno o zemljopisnoj regiji te se tako klinički važne vrste statistički značajno češće susreću u obalnoj regiji Hrvatske, a prosječna godišnja incidencija dokazane plućne mikobakterioze dvostruko je veća u obalnoj (0,32/100 000) u odnosu na kontinentalnu regiju (0,16/100 000). Nema značajnijih razlika među spolovima, ali je incidencija bolesti značajno viša u osoba starijih od 50 godina.

Klinički najznačajnije vrste NTM-a u Hrvatskoj su *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* i *M. xenopi*. Mikrobiološki kriteriji dobro koreliraju s cjelovitim ATS/IDSA kriterijima te se mogu koristiti u procjeni incidencije i prevalencije bolesti. S obzirom na relativno veliki broj izolata klinički neznčajnih vrsta NTM-a koji zadovoljavaju minimalne mikrobiološke kriterije, u našem su okruženju u procjeni incidencije bolesti vredniji pooštreni mikrobiološki kriteriji.

Od svih čimbenika rizika i pridruženih bolesti, jedino su niski indeks tjelesne težine i bronhiektazije statistički značajno povezane s dokazanom bolesti u odnosu na kolonizaciju dišnog sustava NTM-om. Veliki dio bolesnika s dokazanom plućnom mikobakteriozom liječen je po protokolu za tuberkulozu pluća što pokazuje da znanje o ovoj bolesti još uvijek nije na zadovoljavajućoj razini.

Iako pojavnost odnosno teret plućnih mikobakterioza u Hrvatskoj raste, još uvijek je znatno manji od tereta tuberkuloze. Ipak, sukladno trendovima u razvijenim zemljama, za očekivati je daljnji porast značaja plućne NTM bolesti s padom incidencije tuberkuloze i starenjem populacije u Hrvatskoj.

8. SAŽETAK

Uvod: klinička važnost netuberkuloznih mikobakterija (NTM) izoliranih iz uzoraka plućnog porijekla u Hrvatskoj nije u potpunosti poznata.

Cilj: izračunati incidenciju izolacije NTM-a i plućne mikobakterioze, zabilježiti regionalne razlike i ocijeniti valjanost mikrobioloških kriterija pri postavljanju dijagnoze i praćenju pojavnosti bolesti.

Materijali i metode: u istraživanje su uključeni svi državljani Hrvatske kod kojih je izolirana NTM u razdoblju između 2006. i 2012. godine. Za definiciju plućne mikobakterioze korišteni su mikrobiološki te cjeloviti kriteriji Američkog torakalnog društva iz 2007. godine.

Rezultati: najčešće izolirane vrste NTM-a su *Mycobacterium gordonae* i *M. xenopi*, a klinički su najznačajnije *M. avium* complex, *M. kansasii* i *M. xenopi*. Prosječna godišnja incidencija izolacije NTM-a iznosi 3,9 na 100 000 stanovnika, no unutar Hrvatske zabilježene su značajne zemljopisne razlike u samoj distribuciji NTM vrsta. Također, prosječna godišnja incidencija plućne mikobakterioze dvostruko je veća u obalnom u odnosu na kontinentalni dio Hrvatske (0,32 naprema 0,16), dok ukupna incidencija u Hrvatskoj iznosi 0,22 slučaja na 100 000 stanovnika. Uvidom u medicinsku dokumentaciju i usporedbom valjanosti, nađena je dobra korelacija mikrobioloških i cjelovitih kriterija.

Zaključak: raste incidencija plućne mikobakterioze u Hrvatskoj. Postoje značajne zemljopisne razlike u distribuciji vrsta NTM-a i incidenciji bolesti između obalnog i kontinentalnog dijela Hrvatske. Mikrobiološki kriterij ima značajnu ulogu u procjeni godišnje incidencije plućne mikobakterioze i praćenju pojavnosti bolesti.

9. SUMMARY

Epidemiology and clinical relevance of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples in Croatia

Background: clinical relevance of nontuberculous mycobacteria (NTM) isolated from pulmonary samples in Croatia is largely unknown.

Objective: estimate the isolation rate of the NTM, record geographical differences, assess the clinical relevance of different NTM species and the burden of pulmonary NTM disease (PNTM).

Design: study included all Croatian residents with NTM isolated from pulmonary samples in the period from 2006 through 2012. Microbiological and full criteria of the American Thoracic Society (ATS) were used to establish a case definition of the PNTM.

Results: the most frequently isolated NTM species were *Mycobacterium gordonae* and *M. xenopi*. The average annual incidence of pulmonary NTM isolation was 3.9/100 000. Species distribution differed between coastal and continental Croatia. Clinically most relevant NTM species in Croatia were *M. avium* complex, *M. kansasii* and *M. xenopi*. We estimated annual incidence of the PNTM at 0.22/100 000. This estimated annual incidence was 0.32/100 000 in the coastal and 0.16/100 000 in the continental region. Good correlation between the microbiological and the full ATS criteria in the estimation of the disease burden was found.

Conclusion: Geography plays a role in the NTM species distribution, as well as the distribution of the PNTM. The incidence of the PNTM in Croatia is rising, but the overall burden of the disease is still low compared to tuberculosis.

LITERATURA

1. Buhler VB, Pollak A. Human infection with atypical acid-fast organisms; report of two cases with pathologic findings. *Am J Clin Pathol* 1953;23:363-74.
2. Timpe A, Runyon EH. The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease – a preliminary report. *J Lab Clin Med* 1954;44:202-9.
3. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* 1959;43:273-90.
4. Davidson PT. The diagnosis and management of disease caused by *M. avium complex*, *M. kansasii*, and other mycobacteria. *Clin Chest Med* 1989;10:431-3.
5. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) Website DSMZ: http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature.php
6. Falkinham JO III. Ecology of Nontuberculous Mycobacteria-Where do Human Infections Come from? *Semin Respir Crit Care med* 2013;34:95-102.
7. Daffe M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* 1998;39:131-203.
8. Steed KA, Falkinham JO III. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(6):4007-11.
9. Falkinham JO III. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol* 2007;56(Pt2):250-4.
10. Bercovier H, Kafri O, Sela S. Mycobacteria possesses a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;136(3):1136-41.
11. Schulze-Roebbecke R, Buchholtz K. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(6):1869-73.
12. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:323-30.
13. Dang NA, Kuijper S, Walters E, et al. Validation of biomarkers for distinguishing *Mycobacterium tuberculosis* from non-tuberculous mycobacteria using gas chromatography - mass spectrometry and chemometrics. *PLoS One* 2013; Oct 17;8(10): e76263. doi: 10.1371/journal.pone.0076263.
14. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):704-26.

15. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011;49(5):1790-4.
16. Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1):139-47.
17. McNabb A, Eisler D, Adie K, i sur. Assesment 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* 2004;42(7):3000-11.
18. Hale YM, Pfyffer E, Salfinger M. Laboratory Diagnosis of Mycobacterial Infections: New Tools and Lessons Learned. *Clin Infect Dis* 2001;33:834-46.
19. LPSN (List of Procaryotic names with Standing in Nomenclature) Website: <http://www.bacterio.net/m/mycobacterium.net>
20. Warren RM, van Pittius NC, Barnard M, i sur. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:818-22.
21. Butler WR, Thibert L, Kilburn JO. Identification of *Mycobacterium avium* complex strains and some similar species by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1992;30:2698-704
22. Wayne LG, Good RC, Tsang A, i sur. Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:482-9.
23. Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:254-60.
24. Falkinham JO III. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerg Infect Dis* 2011;17(3):419-24.
25. von Reyn CF, Maslow JN, Barber TW, Falkinham JO III, Arbeit RD. Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 1994;343(8906):1137-41.
26. De Groote MA, Pace NR, Fulton K, Falkinham JO III. Relationships between *Mycobacterium* isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soils. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(12):7602-6.
27. Falkinham JO III, iseman MD, de Haas P, van Soolingen D. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *J Water Health* 2008;6(2):209-13.

28. Parker BC, Ford MA, Gruft H, Falkinham JO III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. *Am Rev respir Dis* 1983;128(4):652-6.
29. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, i sur., for the ATS Mycobacterial Disease Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement. Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:367-416.
30. Winthrop KL. Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria: an epidemiologist's view. *Future Microbiol* 2010; 5(3):343-5.
31. Marras TK, Chedore P, Ying AM, Jamieson F. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. *Thorax* 2007;62:661-6.
32. Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, I sur. Spanish Group for Non-Tuberculosis Mycobacteria. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:1186-93.
33. Andrejak C, Vibeke O, Johansen IS, i sur. Nontuberculous Pulmonary Mycobacteriosis in Denmark; Incidence and Prognostic Factors. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:514-21.
34. Kennedy TP, Weber DJ. Nontuberculous mycobacteria an underappreciated cause of geriatric lung disease. *Am J Crit Care Med* 1994;149:1654-8.
35. van Ingen J, Hoefsloot W, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, van Soolingen D. The changing pattern of clinical *Mycobacterium avium* isolation in the Netherlands. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14(9):1176-80.
36. Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:177-215.
37. Falkinham JO. Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiol* 2010;5(6):951-60.
38. Aitken ML, Limaye A, Pottinger P, i sur. Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies *massiliense* in a Lung Transplant and Cystic Fibrosis Center. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(2):231-2.
39. Cassidy MP, Hedberg K, Saulson A, McNelly E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors; a changing epidemiology. *Clin Infect Dis* 2009;49:124-9.
40. Winthrop KL, McNelly E, Kendall B, i sur. Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Clinical features. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:977-82.
41. Prevots DR, Shaw PA, Strickland D, i sur. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence at four integrated health care delivery systems. *Am J respire Crit Care Med* 2010;182(7):970-6.

42. Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Holland SM, Prevots DR. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(8):881-6.
43. Winthrop KL, Baxter R, Liu L, i sur. Mycobacterial disease and antitumour necrosis factor therapy in USA. *Ann Rheum Dis* 2013;72(1):37-42.
44. Moore JE, Kruijshaar ME, Ormerod LP, Drobniowski F, Abubakar I. Increasing report of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Public Health* 2010;10:612.
45. van Ingen J. Nontuberculous mycobacteria; from gene sequences to clinical relevance. PhD Thesis. Radboud University Nijmegen, the Netherlands. 2009. Available from: http://webdoc.ubn.ru.nl/mono/i/ingen_j_van/nontmy.pdf
46. Gitti Z, Mantadakis E, Maraki S, Samonis G. Clinical significance and antibiotic susceptibilities of nontuberculous mycobacteria from patients in Crete, Greece. *Future Microbiol* 2011;6(9):1099-109.
47. del Giudice G, Iadevaia C, Santoro G, Moscariello E, Smeraglia R, Marzo C. Nontuberculous mycobacterial lung disease in patients without HIV infection: a retrospective analysis over 3 years. *Clin Respir J* 2011;5(4):203-10.
48. Bicmen C, Coskun M, Gunduz AT, Senol G, Cirak AK, Tibet G. Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not? *New Microbiol* 2010;33(4):399-403.
49. Marušić A, Katalinić-Janković V, Popović-Grle S, i sur. *Mycobacterium xenopi* pulmonary disease - epidemiology and clinical features in non-immunocompromised patients. *J Infect.* 2009;58(2):108-12.
50. Andrejak C, Lescure FX, Pukenyte, i sur. Xenopi Group. *Mycobacterium xenopi* pulmonary infections: a multicentric retrospective study of 136 cases in north-east France. *Thorax* 2009; 64(4):291-6.
51. Hoefsloot W, van Ingen J, de Lange WC, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, van Soolingen D. Clinical relevance of *Mycobacterium malmoense* isolation in the Netherlands. *Eur Respir J* 2009;34(4):926-31.
52. Han XY, Tarrand JJ, Infante R, Jacobson KL, Truong M. Clinical significance and epidemiologic analyses of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* among patients without AIDS. *J Clin Microbiol* 2005;43: 4407-12.
53. van Ingen J, Bendien S A, de Lange W C, i sur. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax* 2009; 64:502-6.
54. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, i sur. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: A NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J.* 2013; 42(6):1604-13.

55. Aksamit TR. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients with pre-existing lung disease. Clin Chest Med 2002;23:643-53.
56. Oliver LM, Weber DJ, Lee JH, i sur. Nontuberculous mycobacteria II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. Am J respir Crit Care Med 2003;167:835-40.
57. Prince DS, Peterson D.D., Steiner RM, i sur. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. N Engl J Med 1989;321:863-9.
58. Huang JH, Kao PN, Adi V, Ruoss SJ. *Mycobacterium avium-intracellulare* pulmonary infection in HIV-negative patients without pre-existing lung disease: diagnostic and management limitations. Chest 1999;115:1033-40.
59. Reich JM, Johnson RE. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease presenting as an isolated lingular or middle lobe pattern. The Lady Windermere syndrome. Chest 1992;101:1605-9.
60. Aksamit TR. Hot tub lung: infection, inflammation, or both? Semin Respir Infect 2003; 18:33-9.
61. Gordin FM, Cohn DL, Sullam PM, Schoenfelder JR, Wynne BA, Horsburgh CR Jr. Early manifestation of disseminated *Mycobacterium avium* complex disease: a prospective evaluation. J Infect Dis 1997;176:126-32.
62. Chandra NS, Torres MF, Winthrop KL, i sur. A cluster of *Mycobacterium chelonae* keratitis cases following laser-in-situ keratomileusis. Am J Ophthalmol 2001;132:819-30.
63. Franklin DJ, Starke JR, Brady MT, Brown BA, Wallace RJ, Jr. Chronic otitis media after tympanostomy tube placement caused by *Mycobacterium abscessus*: a new clinical entity? Am J Otol 1994;15:3131-20.
64. Jankovic M, Samarzija M, Sabol I, i sur. Geographical distribution and clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria in Croatia. IJTLD 2013;17(6):836-41.
65. Portales F. Epidemiology of mycobacterial diseases. Clin Dermatol 1995;13: 207:22.
66. van Klingeren B, Pullen W. Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers. J Hosp Infect 1993; 25:147-9.
67. Torvinen E, Lehtola MJ, Martikainen IT. Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilm as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature. Appl Environ Microbiol 2007;73:6201-7.
68. Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Management of opportunistic mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. Thorax 2000;55:210-18.

69. American Thoracic Society. Wallace RJ Jr, Glassroth J, Griffith DE, Olivier KN, Cook JL, Gordin F. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:S1-S25.
70. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am rev Respir Dis* 1979;119:107-59.
71. Selkon JB. „Atypical“ mycobacteria: a review. *Tubercle* 1969;50Suppl:70-8.
72. Hunter AM, Campbell IA, Jenkins PA, Smith AP. Treatment of pulmonary infections caused by the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Thorax* 1981;36:326-9.
73. Banks J, Jenkins PA. Combined versus single antituberculosis drugs on the in vitro sensitivity patterns of non-tuberculous mycobacteria. *Thorax* 1987;42:838-42.
74. British Thoracic Society. *Mycobacterium kansasii* pulmonary infection: a prospective study of the results of nine months of treatment with rifampicin and ethambutol. *Thorax* 1994;49:442-5.
75. Wallace RJ Jr, Brown BA, Griffith DE, Girard WM, Murphy DT. Clarithromycin regimens for pulmonary *Mycobacterium avium* complex. The first 50 patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1766-72.
76. Shafran SD, Singer J, Philips DP, i sur. A comparison of two regimens for the treatment of *Mycobacterium avium* complex bacteremia in AIDS: rifabutin, ethambutol, and clarithromycin versus rifampin, ethambutol, clofazemin and ciprofloksacin. *N Engl J Med* 1996;335:377-83.
77. Research Committee of the British Thoracic Society. First randomised trial of treatments for pulmonary disease caused by *M avium intracellulare*, *M. malmoense*, and *M. xenopi* in HIV negative patients: rifampicin, ethambutol and isoniazid versus rifampicin and ethambutol. *Thorax* 2001;56:167-72.
78. Research Committee of the British Thoracic Society. Clarithromycin vs ciprofloxacin as adjuncts to rifampicin and ethambutol in treating opportunist mycobacterial lung diseases and an assessment of *M. vaccae* immunotherapy. *Thorax* 2008;63:627-34.
79. Marušić A. Epidemiologija, slikovni prikaz i kliničko značenje infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama. Zagreb, Hrvatska: Sveučilište u Zagrebu, 2009. 32 str. Disertacija.
80. Marras TK, Daley CL. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med* 2002;23:553-67.
81. Hrvatski zavod za statistiku. Nacionalna klasifikacija prostornih jedinica za statistiku 2012. Narodne novine 96/2012. Pristupljeno: 30. listopada 2012. godine.
82. The Statistical Office of the European Communities (Eurostat). <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/>. Pristupljeno: 25. lipnja 2012. godine.

83. Cardoso Leao S, Martin A, Mejía GI, i sur. In: Vanden Broelle, editors. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of Mycobacteria. 1st Edn. Bruges, Belgium, 2004.
84. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2010. godinu. Zagreb 2011. Dostupno na: http://www.hzjz.hr/publikacije/hzs_ljetopis/Ljetopis_Yearbook_HR_2010.pdf.
85. Falkinham JO 3rd. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* 2009;107(2):356-67.
86. Hrvatski zavod za statistiku. Statistički podaci za 2005. Godinu. Dostupno na: <http://www.dzs.hr>. Pristupljeno: 12. lipnja 2012. godine
87. Falkinham JO III, Norton CD, LeChevallier MW. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:1225–31.
88. Falkinham JO III. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerg Infect Dis* 2011;17(3):419-24.
89. Taillard C, Greub G, Webber R, i sur. Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss National Survey. *J Clin Microbiol* 2003;41(3):1240-4.
90. Houben D, Demangel C, van Ingen J, i sur. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol* 2012;14(8):1287-98.
91. van Ingen J. Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2013;34:103-9.
92. Thomson RM; NTM working group at Queensland TB Control Centre and Queensland Mycobacterial Reference Laboratory. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerg Infect Dis* 2010;16(10):1576-83.
93. Georgianni I, Papala M, Kostikas K, Petinaki E, Gourgoulialis KI. Epidemiology and clinical significance of mycobacterial respiratory infections in central Greece. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12(7):807-12.
94. Trnka L, Danková D, Svandová E. Six years' experience with the discontinuation of BCG vaccination. 4. Protective effect of BCG vaccination against the *Mycobacterium avium intracellulare* complex. *Tuber Lung Dis* 1994;75(5):348-52.
95. Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Falkinham JO 3rd, Holland SM, Prevots DR. Spatial Clusters of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(6): 553-8.
96. Doucette K, Fishman JA. Nontuberculous mycobacterial infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2004;38(10):1428-1439.

97. Maimon N, Brunton J, Chan AK, Maras TK. Fatal pulmonary *Mycobacterium xenopi* in a patient with rheumatoid arthritis receiving etanercept. *Thorax* 2007;62(8):739-40.
98. Marie I, Heliot P, Roussel F, Herve F, Muir JF, Levesque H. Fatal *Mycobacterium peregrinum* pneumonia in refractory polymyositis treated with infliximab. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(9):1201-1202.
99. Marras TK, Daley CL. A systematic review of the clinical significance of pulmonary *Mycobacterium kansasii* isolates in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;36(4):883-9.
100. van Ingen J, Boeree M, Janssen M, et al. Pulmonary *Mycobacterium szulgai* infection and treatment in a patient receiving anti-tumor necrosis factor therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3(7):414-9.
101. Huang HC, Weigt SS, Derhovanessian A, et al. Non-tuberculous mycobacterium infection after lung transplantation is associated with increased mortality. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(7):790-8.
102. Chan ED, Iseman MD. Underlying Host Risk Factors for Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2013;34:110-23.
103. Chan ED, Kaminska AM, Gill W, et al. Alpha-1-antitrypsin (AAT) anomalies are associated with lung disease due to rapidly growing mycobacteria and AAT inhibits *Mycobacterium abscessus* infection of macrophages. *Scand J Infect Dis* 2007;39(8):690-6.
104. Lewis AG Jr, Dunbar FP, Lasche EM, et al. Chronic pulmonary disease due to atypical mycobacterial infections. *Am Rev Respir Dis* 1959;80:188-99.
105. Andrejak C, Nielsen R, Thomsen VO, Duhaut P, Sorensen HT, Thomsen RW. Chronic respiratory disease, inhaled corticosteroids and risk of non-tuberculous mycobacteriosis. *Thorax* 2013;68(3):256-62.
106. Arauco Brown R, Philey J, Newton C, Battaile J. Inhaled corticosteroid use in COPD patients is not associated with an increased likelihood of airway colonization with nontuberculous mycobacteria. *U American Thoracic Society International Conference Abstract Issue*. 2013; doi:10.1164/ajrccm-conference.2013. 187.1 Meeting Abstracts. A1491.
107. Huang CT, Tsai YJ, Wu HD, et al. Impact of non-tuberculous mycobacteria on pulmonary function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16(4):539-45.
108. Kim RD, Greenberg DE, Ehrmantraut ME, et al. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial disease: prospective study of a distinct pre-existing syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178(10):1066-74.
109. Tasaka S, Hasegawa N, Nishimura T, et al. Elevated serum adiponectin level in patients with *Mycobacterium avium-intracellulare* complex pulmonary disease. *Respiration* 2010;79(5):383-7.

110. Okumura M, Iwai K, Ogata H, et al. Clinical factors on cavitary and nodular bronchiectatic types in pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. Intern Med 2008;47(16):1465-1472.
111. Iseman MD. The Theodore E. Woodward Award. *Mycobacterium avium* and slender women: an unrequited affair. Trans Am Clin Climatol Assoc 1998;109:199-204.
112. Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ Jr. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: analysis of 154 patients. Am Rev Respir Dis 1993;147(5):1271-8.
113. Reich JM, Johnson RE. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease presenting as an isolated lingular or middle lobe pattern: the Lady Windermere syndrome. Chest 1992;101(6):1605-9.
114. Dhillon SS, Watanakunakorn C. Lady Windermere syndrome: middle lobe bronchiectasis and *Mycobacterium avium* complex infection due to voluntary cough suppression. Clin Infect Dis 2000;30(3):572-5.
115. Chan ED, Iseman MD. Slender, older woman appear to be more susceptible to nontuberculous mycobacterial lung disease. Gen Med 2010;7(1):5-18.
116. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and obRNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med 1995; 1(11):1155-61.
117. Flier JS. Lowered leptin slims immune response. Nat Med 1998;4(10):1124-5.
118. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature 1998;394(6696):897-901.
119. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. J Immunol 2005; 174(6): 3137-42.
120. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. J Allergy Clin Immunol 2005;115(5):911-9.
121. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. J Leukoc Biol 2000;68(4):437-46.
122. Ordway D, Henao-Tamayo M, Smith E, et al. Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. J Leukoc Biol 2008;83(6):1502-11.
123. Wieland CW, Florquin S, Chan ED, et al. Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in leptin-deficient ob/ob mice. Int Immunol 2005;17(11):1399-408.
124. Phillely JV, Griffith DE. Management of Nontuberculous Mycobacterial (NTM) Lung disease. Semin Respir Crit Care Med 2013;34:135-42.

125. Adjemian J, Prevots DR, Gallagher J, Heap K, Gupta R, Griffith D. Lack of Adherence to Evidence-based Treatment Guidelines for Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *AnnalsATS*. 2013; Article in press. Published on 15-November-2013 as 10.1513/ *AnnalsATS*.201304-085OC.
126. van Ingen J, Ferro BE, Hoefsloot W, Boeree MJ, van Soolingen D. Drug treatment of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in HIV-negative patients: the evidence. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11(10):1065–77.

Mateja Janković Makek, dr. med.
Klinika za plućne bolesti „Jordanovac“
KBC Zagreb
Jordanovac 104, Zagreb, Hrvatska
GSM: + 385 98 812 622
e-mail: mateja.jankovic@gmail.com

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 9.5.1980. godine u Zagrebu gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2004. godine s odličnim uspjehom. Za rad pod nazivom “Solubilni Fas i transformirajući faktor rasta Beta-2 u infekcijama virusnim i bakterijskim zoonozama“, dobila sam Rektorovu nagradu za najbolji studentski rad za područje biomedicinskih znanosti.

U razdoblju od rujna 2004. g. do prosinca 2006 .g., bila sam zaposlena kao znanstveni novak na projektu “Imunoreakcije na infekcije unutarstaničnim patogenima” (voditelj projekta i mentor: Doc. Dr. sci. Alemka Markotić) u Odjelu za Istraživanje i razvoj Imunološkog zavoda i u Znanstvenoj jedinici Klinike za infektivne bolesti «Dr. Fran Mihaljević». U tom sam periodu provela 4 mjeseca u Istraživačkom centru Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Nevadi (Reno, SAD). Moj rad na projektu "Mechanisms of apoptosis by pathogenic hantaviruses", bio je potpomognut i stipendijom Međunarodnog društva za zarazne bolesti (ISID, International Society for Infectious Diseases).

Državni ispit sam položila 2005. godine, a od prosinca 2006. godine do danas, zaposlena sam u Klinici za plućne bolesti “Jordanovac”, KBC-a Zagreb. Specijalistički sam ispit položila 2011. godine. Trenutno radim kao odjelni liječnik na Odjelu za bolesti plućne cirkulacije, a u tijeku je i subspecijalistički staž iz pulmologije.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog torakalnog društva I Europskog respiratornog društva. Objavila sam 14 znanstvenih radova, od kojih je 7 citirano u current contents-u. Tečno govorim engleski i njemački, a služim se i španjolskim jezikom.

ZNANSTVENI RADOVI

- 1) **Jankovic M**, Samarzija M, Sabol I, Jakopovic M, Katalinic-Jankovic V, Zmak L, Ticac B, Marusic A, Obrovac M, van Ingen J. Geographical distribution and clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria in Croatia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013; 17(6):836-41.
- 2) **Jankovic M**, Samarzija M, Jakopovic M, Kulis T, Znaor A. Trends in lung cancer incidence and mortality in Croatia, 1988-2008. *Croat Med J.* 2012; 53(2):93-9.
- 3) **Jankovic M**, Zmak L, Krajinovic V, Viskovic K, Crnek SS, Obrovac M, Haris V, Jankovic VK. A Fatal Mycobacterium chelonae infection in an immunosuppressed patient with systemic lupus erythematosus and concomitant Fahr's syndrome. *J Infect Chemother.* 2011; 17(2):264-7.
- 4) Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, i sur. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J.* 2013; 42(6):1604-13.
- 5) Zmak L, **Jankovic M**, Obrovac M, Katalinic-Jankovic V. Netuberkulozne mikobakterije. *Infektološki glasnik.* 2013; 33(2): 95-101.
- 6) Marusic A, Katalinic-Jankovic V, Popovic-Grle S, **Jankovic M**, Mazuranic I, Puljic I, Sertic Milic H. Mycobacterium xenopi pulmonary disease – epidemiology and clinical features in non-immunocompromised patients. *J Infect.* 2009; 58(2): 108-12.
- 7) Zmak L, **Jankovic M**, Katalinic Jankovic V. Evaluation of Xpert MTB/RIF assay for rapid molecular diagnosis of tuberculosis in a two-year period in Croatia. *IJMyco.* 2013; 2(3):179-82.
- 8) Jakopovic M, Pavicic F, Redzepi G, Plestina S, **Jankovic M**, Franic Z, Samija M, Samarzija M. Efficacy and safety of budesonide/formoterol combination therapy in asthma patients. *Coll Antropol.* 2009; 33(2):587-91.
- 9) Popovic-Grle S, Vrbica Z, **Jankovic M**, Klaric I. Different phenotypes of intermittent and persistent respiratory allergy in Zagreb, Croatia. *Ann Agric Environ Med.* 2009; 16(1):137-42.

- 10)Jakopovic M, Smojver-Jezek S, Chalfe N, Redzepi G, **Jankovic M**, Cucevic B, Mihelcic D, Stancic-Rokotov D, Samarzija M. Therapeutic implication of molecular profiling in patients with non-small cell lung cancer. *Periodicum Biologorum*. 2012; 114(4):539-548.
- 11)Markotic A, Krajinovic LC, Margaletic J, Turk N, Miletic-Medved M, Zmak L, **Jankovic M**, Kurolt IC, Soprek S, Dakovic Rode O, Milas Z, Puljiz I, Iedina D, Hukic M, Kuzman I. Zoonoses and vector-borne diseases in Croatia – a multidisciplinary approach. *Vet Ital*. 2009; 45(1): 55-66.
- 12)**Jankovic M**, Markotic A. Virusi i apoptoza. *Infektološki glasnik*. 2007; 27(2):63-70.
- 13)**Jankovic M**, Cebalo L, Dakovic Rode O, Milas Z, Turk N, Markotic A. Solubilni Fas i transformirajući faktor rasta beta 2 u infekcijama uzročnicima virusnih i bakterijskih zoonoza. *Infektološki glasnik*. 2006; 26(4):157-63.
- 14)Jankovic N, **Jankovic M**. Anaemia treatment in peritoneal dialysis patients. *Acta Medica Croatica*. 2009; 63 (Suppl 1):17-22.