

ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA NETUBERKULOZNIH VRSTA BAKTERIJA RODA MYCOBACTERIUM IZDVOJENIH IZ DOMAĆIH I DIVLJIH ŽIVOTINJA

Reil, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:471989>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

IRENA REIL

**ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA
NETUBERKULOZNIH VRSTA
BAKTERIJA RODA *MYCOBACTERIUM*
IZDVOJENIH IZ DOMAĆIH I DIVLJIH
ŽIVOTINJA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

IRENA REIL

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF NON-
TUBERCULOUS *MYCOBACTERIUM*
SPECIES ISOLATED FROM DOMESTIC
AND WILD ANIMALS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IRENA REIL

**ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA
NETUBERKULOZNIH VRSTA
BAKTERIJA RODA *MYCOBACTERIUM*
IZDVOJENIH IZ DOMAĆIH I DIVLJIH
ŽIVOTINJA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Ljubo Barbić

dr. sc. Silvio Špičić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

IRENA REIL

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF NON-
TUBERCULOUS *MYCOBACTERIUM*
SPECIES ISOLATED FROM DOMESTIC
AND WILD ANIMALS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Ljubo Barbić, Ph.D., Full Professor

Silvio Špičić, Ph.D.

Zagreb, 2021



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Irena Reil, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su navedeni u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2021.

Zahvaljujem se ravnatelju Hrvatskog veterinarskog instituta, Zagreb, izv. prof. dr. sc. Borisu Habrunu na potpori tijekom provedbe istraživanja i izrade same disertacije.

Veliku zahvalu upućujem mentorima dr. sc. Silviu Špičiću i prof. dr. sc. Ljubi Barbiću na pomoći tijekom osmišljanja, organizacije i provedbe istraživanja, kao i na primjedbama, sugestijama te stalnoj pomoći tijekom izrade disertacije.

Veliko hvala dr. sc. Sanji Duvnjak na pomoći tijekom analize i usporedbe sekvenci, kao i Dariji Jurković na pomoći oko mapiranja. Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Miroslavu Beniću na pomoći oko statističke obrade podataka.

Beskrajno sam zahvalna Anđeli Krčelić, tehničkoj suradnici Laboratorija za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti, Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb na pomoći u bakteriološkoj obradi uzoraka, kao i ostalim kolegama Laboratorija.

Također zahvaljujem akademiku Željku Cvetniću na potpori i nepresušnom izvoru inspiracije.

Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji na potpori i strpljenju tijekom izrade same disertacije.

SADRŽAJ

SAŽETAK

ABSTRACT

1	UVOD	1
2	PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	4
2.1	MORFOLOGIJA I METABOLIZAM MIKOBAKTERIJA	4
2.2	KLASIFIKACIJA MIKOBAKTERIJA	4
2.3	EPIDEMIOLOGIJA NETUBERKULOZNIH MIKOBAKTERIJA	6
2.4	OTPORNOST NTM-A NA ANTIMIKROBNE LIJEKOVE	7
2.4.1	UROĐENA OTPORNOST	7
2.4.1.1	Uloga stanične stijenke	7
2.4.1.2	Prijenos molekula putem porinskih kanala i efluksne pumpe	8
2.4.1.3	Biotransformacija unutar mikobakterijske stanice	8
2.4.1.4	Inducibilni mehanizmi otpornosti	9
2.4.2	STEČENA OTPORNOST	9
2.4.2.1	Genske mutacije	9
2.4.2.2	Uloga plazmida	10
2.5	MOLEKULARNE METODE U DIJAGNOSTICI NETUBERKULOZNIH MIKOBAKTERIJA	10
2.5.1	TIPIZACIJA IZOLATA KOMERCIJALNIM TESTOM "GENO TYPE MYCOBACTERIUM CM/AS"	10
2.5.2	DNK SEKVENCIRANJE ODREĐENOG GENA	11
2.5.2.1	Djelomično sekvenciranje 16S rRNK gena	11
2.5.2.2	Sekvenciranje <i>rpoB</i> gena	11
2.5.2.3	Sekvenciranje <i>hsp65</i> gena	12
2.5.2.4	Sekvenciranje ITS regije	12
2.5.3	SEKVENCIRANJE CIJELOG GENOMA	13
2.5.4	OSTALE MOLEKULARNE METODE	13
2.5.4.1	Metoda VNTR – MIRU tipizacije	13
2.5.4.2	Gel elektroforeza u pulsirajućem polju	14
2.5.4.3	Tipizacija sekvenciranjem na više lokusa	14
2.6	ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE OSJETLJIVOSTI NETUBERKULOZNIH MIKOBAKTERIJA	15
2.6.1	METODA MIKRODILUCIJE U BUJONU	16

2.6.1.1	Određivanje antimikrobne osjetljivosti spororastućih netuberkuloznih mikobakterija	17
2.6.1.1.1	<i>Mycobacterium avium</i> kompleks	17
2.6.1.1.2	<i>M. kansasii</i>	18
2.6.1.1.3	<i>M. marinum</i>	19
2.6.1.1.4	Druge spororastuće netuberkulozne mikobakterije	19
2.6.1.2	Određivanje antimikrobne osjetljivosti brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija	20
2.7	NETUBERKULOZNE MIKOBAKTERIJSKE INFEKCIJE U ŽIVOTINJA	22
2.7.1	ZASTUPLJENOST NETUBERKULOZNIH VRSTA MIKOBAKTERIJA U DOMAĆIH I DIVLJIH ŽIVOTINJA NA PODRUČJU EUROPE	23
2.8	NETUBERKULOZNE MIKOBAKTERIJSKE INFEKCIJE U LJUDI	24
2.8.1	ZASTUPLJENOST NETUBERKULOZNIH VRSTA MIKOBAKTERIJA U LJUDI NA PODRUČJU EUROPE	26
2.9	NETUBERKULOZNE MIKOBAKTERIJE U OKOLIŠU	27
2.9.1	NETUBERKULOZNE MIKOBAKTERIJE U ZEMLJI, PRAŠINI I VODI	27
2.9.2	ULOGA SLOBODNOŽIVUĆIH AMEBA U EKOLOGIJI NETUBERKULOZNIH MIKOBAKTERIJA	28
2.9.3	UTJECAJ TEMPERATURE NA NETUBERKULOZNE MIKOBAKTERIJE	28
2.9.4	IZVORI MIKOBAKTERIJA U OKOLIŠU	29
3	OBRAZLOŽENJE TEME	30
4	MATERIJAL I METODE	32
4.1	MATERIJAL	32
4.1.1	UZORKOVANJE MATERIJALA	32
4.1.2	UZORCI MATERIJALA ZA BAKTERIOLOŠKU PRETRAGU	33
4.1.3	UZORCI IZOLATA ZA MOLEKULARNU IDENTIFIKACIJU I ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE OSJETLJIVOSTI	43
4.2	METODE	44
4.2.1	BAKTERIOLOŠKA PRETRAGA	45
4.2.1.1	Obrada materijala za izdvajanje mikobakterija	45
4.2.1.2	Inkubacija	46
4.2.1.3	Analiza kolonija <i>Mycobacterium</i> sp. bojenjem po Ziehl-Neelsen-u	46
4.2.2	MOLEKULARNA ANALIZA <i>MYCOBACTERIUM</i> SP.	46
4.2.2.1	Izdvajanje genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNK) <i>Mycobacterium</i> sp.	46
4.2.2.2	Dokaz <i>Mycobacterium</i> sp. u izdvojenim izolatima	47
4.2.2.3	Analiza vrsta <i>Mycobacterium</i> sp. u izdvojenim izolatima (Geno Type® <i>Mycobacterium</i>)	48

4.2.2.4	Analiza podvrsta <i>Mycobacterium avium</i> kompleksa u izdvojenim izolatima	51
4.2.2.5	Analiza vrsta <i>Mycobacterium sp.</i> sekvenciranjem 16S rRNK, <i>rpoB</i> , <i>hsp65</i> gena i ITS regije	52
4.2.3	ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE OSJETLJIVOSTI	54
4.2.3.1	Određivanje antimikrobne osjetljivosti spororastućih netuberkuloznih mikobakterijskih vrsta	55
4.2.3.2	Određivanje antimikrobne osjetljivosti brzorastućih netuberkuloznih mikobakterijskih vrsta	56
4.2.3.3	Postupak provedbe metode mikrodulucije u bujonu	57
4.2.3.3.1	Priprema uzoraka za nacjepljivanje i njihovo nanošenje na mikrotitracijsku pločicu	57
4.2.3.3.2	Prosudba, tumačenje i izvještavanje rezultata	58
4.2.3.3.2.1	<i>M. avium</i> kompleks	58
4.2.3.3.2.2	<i>M. kansasii</i>	59
4.2.3.3.2.3	Ostale spororastuće netuberkulozne mikobakterije	60
4.2.3.3.2.4	Brzorastuće netuberkulozne mikobakterije	61
4.2.4	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	64
4.2.5	PRIKAZ GEOGRAFSKE RASPROSTRANJENOSTI POJEDINIHR VRSTA BRZO I SPORORASTUĆIH NEUBERKULOZNIHR MIKOBakterija S OBZIROM NA ANTIMIKROBNU OTPORNOST U REPUBLICI HRVATSKOJ	65
5	REZULTATI	66
5.1	REZULTATI BAKTERIOLOŠKIH PRETRAGA	66
5.2	REZULTATI MOLEKULARNE IDENTIFIKACIJE I TIPIZACIJE	80
5.2.1	REZULTATI DOKAZA PRIPADNOSTI RODU <i>MYCOBACTERIUM</i> U IZDVOJENIM IZOLATIMA	80
5.2.2	REZULTATI ANALIZE VRSTA <i>MYCOBACTERIUM SP.</i> U IZDVOJENIM IZOLATIMA (GENO TYPE® <i>MYCOBACTERIUM</i>)	81
5.2.3	REZULTATI ANALIZE PODVRSTA <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> KOMPLEKSA U IZDVOJENIM IZOLATIMA	83
5.2.4	REZULTATI ANALIZE VRSTA <i>MYCOBACTERIUM SP.</i> SEKVENCIRANJEM 16S rRNK, <i>rpoB</i> , <i>hsp65</i> GENA I ITS REGIJE	85
5.2.5	DISTRIBUCIJA DOKAZANIH VRSTA NETUBERKULOZNIHR MIKOBakterija PO ŽUPANIJAMA REPUBLIKE HRVATSKE	95
5.2.6	REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIMIKROBNE OSJETLJIVOSTI	98
5.2.6.1	Rezultati određivanja antimikrobne osjetljivosti spororastućih netuberkuloznih mikobakterija	98
5.2.6.1.1	Antimikrobna osjetljivost spororastućih netuberkuloznih mikobakterija prema županiji porijekla	110

5.2.6.1.2	Prikaz geografske rasprostranjenosti pojedinih vrsta spororastućih neuberkuloznih mikobakterija s obzirom na antimikrobnu otpornost u Republici Hrvatskoj	126
5.2.6.2	Rezultati određivanja antimikrobne osjetljivosti brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija	134
5.2.6.2.1	Antimikrobna osjetljivost brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija prema županiji porijekla	156
5.2.6.2.2	Prikaz geografske rasprostranjenosti pojedinih vrsta brzorastućih neuberkuloznih mikobakterija s obzirom na antimikrobnu otpornost u Republici Hrvatskoj	180
5.2.6.2.3	Usporedba osjetljivosti brzo i spororastućih mikobakterija prema antimikrobnim tvarima	189
6	RASPRAVA	191
7	ZAKLJUČCI	208
8	POPIS LITERATURE	210
9	ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA	250

SAŽETAK

U razdoblju od 2014. do 2016. godine na prisutnost *Mycobacterium* sp. bakteriološki smo pretražili ukupno 593 uzorka različitih organa i tkiva podrijetlom od 153 životinja iz 14 županija i Grada Zagreba. Pripadnike roda *Mycobacterium* izdvojili smo iz ukupno 80 životinja (52%), i to 29 (36,2%) domaćih i 51 (63,7%) divlje životinje, a izdvojili smo ukupno 84 izolata. U istraživanje je također bio uključen 71 arhivski izolat netuberkuloznih mikobakterija podrijetlom iz 22 (31%) domaće i 49 (69%) divljih životinja iz devet županija i Grada Zagreba. Od ukupno navedenih 155 izolata, 106 (68,4%) smo opisali kao pripadnike brzorastućih, a 49 (31,6%) kao pripadnike spororastućih mikobakterija.

Pripadnost rodu *Mycobacterium* izdvojenih izolata dokazali smo metodom lančane reakcije polimerazom umnožavanjem regije 16S rRNK gena i gena koji kodira 65 kD antigen prisutnih u svim mikobakterija. Dokazivanje vrsta navedenih izolata nastavili smo metodom specifične hibridizacije pomoću testova "Geno Type® *Mycobacterium* CM i AS" kojima smo uspješno tipizirali 61 (39,4%) izolat do razine vrste. Sve izdvojene izolate kojima je potvrđena pripadnost *M. avium* kompleksu (MAC) podvrgnuli smo amplifikaciji integriranog insercijskog slijeda IS901 radi određivanja podvrste. Kod preostala 94 izdvojena izolata umnožili smo dijelove DNK sekvenci najkonzerviranijih regija, 16S rRNK, *rpoB*, *hsp65* gena, te međugenske ITS regije. Međusobnom usporedbom rezultata dobivenih analizom navedena četiri gena, pripadnost vrsti uspješno smo odredili kod 72,3% (68/94) izolata. Devet izolata opisali smo kao "Najsličnije *Mycobacterium* + vrsta", dok kod preostalih 17 izolata vrstu nismo uspjeli odrediti. Navedenim metodama opisali smo ukupno 20 različitih vrsta netuberkuloznih mikobakterija (NTM) i šest "Najsličnijih" vrsta.

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti proveli smo tehnikom mikrodilucije u bujonu korištenjem VersaTREK kit-a za brzo i spororastuće mikobakterije. Ispitivanje je obuhvatilo ukupno 47 izolata pripadnika devet različitih spororastućih vrsta i jednu "Najsličniju", i to *M. avium* spp., *M. celatum*, *M. flavescens* i "Najsličnije *M. flavescens*", *M. gordonae*, *M. intermedium*, *M. kansasii*, *M. kumamotoense*, *M. nonchromogenicum* i *M. triviale*. Ispitani sojevi pokazali su najveći postotak otpornosti na fluorokinolone, i to na moksifloksacin (77,3%) i ciprofloksacin (65,4%), slijede doksiciklin (77%), trimetoprim – sulfametoksazol (65,4%), linezolid (61,4%) i amikacin (6,8%). Visoki postotak otpornih sojeva opisan je i na pripadnika rifamicina rifampin (76,9%), dok je na rifabutin postotak bio znatno niži (7,7%). Osjetljivost svih izolata opisana je samo na makrolid klaritromicin. Također, ispitali smo ukupno 91 izolat pripadnika 11 različitih brzorastućih vrsta i četiri "Najsličnije", i to *M. agri*,

M. arupense, *M. chitae* i "Najsličnije *M. chitae*", *M. elephantis*, *M. fortuitum*, *M. neoaurum* i "Najsličnije *M. neoaurum* ", *M. peregrinum*, *M. phocaicum*, *M. porcinum*, *M. pulveris*, *M. vaccae* i "Najsličnije *M. vaccae*", te "Najsličnije *M. septicum*". Ispitani sojevi pokazali su najveći postotak otpornosti na skupinu cefalosporina, i to na cefepim (57,5%) i cefriakson (47,2%), dok je na cefoksitin taj postotak bio znatno niži (3,5%). Slijede amoksicilin/klavulonska kiselina (31%), klaritromicin (23%), imipenem (3,5%), te linezolid (1,2%) i trimetoprim/sulfametoksazol (1,2%). Unutar skupine aminoglikozida postotak otpornih sojeva na tobramicin je iznosio 14,9%, dok su na amikacin svi bili osjetljivi. Na tetracikline, tj. na doksiciklin opisano je 10,4% otpornih izolata, te na minociklin 6,9%. Na skupinu fluorokinolona, opisano je 1,2% otpornih sojeva na ciprofloksacin, dok su na moksifloksacin svi bili osjetljivi.

Usporedbom osjetljivosti sporo i brzorastućih izolata NTM-a uočili smo značajne razlike u otpornosti na određene antibiotike, a otpornost je bila izraženija kod spororastućih vrsta. Među vrstama spororastućih mikobakterija otpornost je bila podjednaka, dok je među brzorastućim ona bila izraženija u vrsta *M. fortuitum*, *M. neoaurum*, *M. vaccae* i *M. porcinum*. Nismo uočili značajne razlike u pojavnosti otpornih sojeva izdvojenih iz domaćih i divljih životinja, kao niti razlike u različitim godinama promatranja. Također, razlike u pojavnosti otpornih sojeva porijeklom iz različitih županija nisu bile statistički značajne, a nisu uočene niti razlike u zastupljenosti opisanih vrsta po županijama RH.

Izdvojeni sojevi kako iz domaćih tako i divljih životinja pokazali su visoke postotke otpornosti na većinu antibiotika koji su preporučeni za liječenje u humanoj medicini što ukazuje na zoonotski potencijal i moguće izazove u liječenju infekcija uzrokovanih NTM-ama u ljudi, te indicira na moguću ulogu životinja kao rezervoara višestruko otpornih sojeva NTM-a.

Ključne riječi: *Mycobacterium*, netuberkulozne mikobakterija, brzorastuće, spororastuće, antimikrobna otpornost, zoonotski potencijal

ABSTRACT

INTRUDUCTION: The genus *Mycobacterium* includes more than 190 species that differ in terms of metabolism, growth rate, epidemiology, pathogenicity, geographical distribution and antimicrobial susceptibility. In addition to species that cause tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. africanum*), there are also species that act as opportunistic pathogens capable of causing lymphadenitis and infections of the lungs, skin, soft tissues, joints, tendons, bones and other organs in both animals and humans, and are common called non-tuberculous mycobacteria (NTM). NTM species, also called ecological mycobacteria, have been isolated from water, soil, dust and plants. According to cultural characteristics, they are divided toward the growth rate on the nutrient medium into fast-growing species in which colonies are visible within seven days (e.g. *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*) and slow-growing species (e.g. *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. avium* complex (MAC), *M. goodnae*) that require a longer incubation time. Growth rate affects sensitivity to antimicrobial drugs as well as clinical signs and pathological changes of the affected organism.

The identification of NTM disease is based on bacteriological and biochemical examination and lasts for several weeks. In the end, it often happens that it is not possible to determine the species with certainty. By additional application of commercially available molecular typing kits (Hain, Germany) it is possible to identify about 40 species. Furthermore, NTM are characterized by a very low evolutionary divergence of the genome, and therefore for identification of a particular species it is recommended to use only individual most conserved regions and not the entire genome.

One of the characteristics of NTM species is a high level of natural drug resistance, as well as inducible and mutational resistance acquired during suboptimal exposure and drug selection. For this reason, their treatment is much more challenging than treatment of classical tuberculosis, and so far no standardized antimicrobial therapy for NTM has been established. Different types of NTM have different profiles of antimicrobial susceptibility, but there are few publication that indicates those differences. There is currently only one standard for determining antimicrobial resistance for mycobacteria (M24-A2) prescribed by the Clinical and Laboratory Standards Institute.

In the territory of the Republic of Croatia, no research has been conducted so far in the form of antimicrobial susceptibility of non-tuberculous mycobacteria isolates in the field of veterinary medicine, and according to our knowledge and available data from the literature, such research has not been conducted in the world.

This research is focused on the determination of different types of NTM present in domestic and wild animals in the Republic of Croatia using molecular methods, as well as determination of antimicrobial resistance of NTM from different sources and geographical units using microdilution method. The results of the research will contribute to the routine identification of pathogens in both animals and humans, and a validated and standardized method will be acceptable and beneficial to health system in Croatia.

MATERIAL AND METHODS: In the period from 2012 to 2016, on the presence of *Mycobacterium* sp. we bacteriologically examined a total of 593 samples of various organs and tissues originating from 153 animals from 14 counties and the City of Zagreb. The research also included a examination of 71 archives isolates of non-tuberculous mycobacteria originating from 64 animals from nine counties and the City of Zagreb. Archival isolates that were identified only up to the level of the genus *Mycobacterium* by gene multiplication. which encodes a 65 kDa antigen, were stored at a temperature of - 80 °C until the beginning of the research. The study covered samples originating from cows, pigs, chickens, ducks, sheep, goats, wild boars and wild deer.

Bacteriological examination began with homogenization and decontamination of the material, followed by inoculation on three different nutrient media: Löwenstein-Jensen media supplemented with pyruvate or glycerol and Stonebrink media. The inoculated material were then incubated at 37°C. After 4-7 days of incubation, we controlled the growth of mycobacteria for the first time, a further at one-week intervals. The incubation lasted eight weeks, and if there was no colony growth on the nutrient medium, the incubation was extended to 12 weeks. In case of growth of the colony was transferred onto new nutrient media and stained according to Ziehl - Neelsen in order to determine the presence of acid-resistant rods.

A total of 155 isolates originating from domestic and wild animals were used for molecular identification. In all isolates, the amplification of 16S rRNA gen region and gen encoding 65 kDa antigen present in all mycobacteria was performed, which is reliable evidence that isolates belong to *Mycobacterium* sp. Further identification of mycobacterial isolates to the species level was performed by specific hybridization method using "Geno Type® Mycobacterium CM and AS kit", which allows the identification of about 40 species within the genus *Mycobacterium*. All isolates to which affiliation was confirmed as the *M. avium* complex, were underwent amplification of the integrated insertion sequence IS901 for determination of subspecies. Isolates in which the affiliation of the species could not be determined by the above mentioned methods, were subjected to sequencing of parts of the

16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* genes, and the ITS region. By comparing the resulting sequences with the data in the available databases we identified the species.

Antimicrobial susceptibility testing of slowly and rapidly-growing isolates of mycobacterial species was performed by broth microdilution method using Thermo Scientific™ Sensititre™ Myco SLOMYCO and RAPMYCO AST Plate commercial kit, using drug concentrations which are obtained from serial, double dilutions. When reading the results, we reported the values of the lowest concentration which interrupts growth (minimum inhibitory concentration, MIC) and interpretation of results as sensitive (S), intermediate (I) and resistant (R). During the test procedure and interpretations of the results we followed the recommendations of the standard published by Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. The testing was performed on a total of 138 isolates, of which 47 isolates are members of slowly-growing species and 91 isolates are members of rapidly-growing species.

The results were processed by the statistical program Stata 13.1. Descriptive data were presented as values of total number and percentage. Observed differences between the groups we tested by Hi-square test and the Fisher exact test, and the significance of the differences we presented with a P-value where we considered a P-value less than 0.05 statistically significant.

The geographical distribution of the obtained antimicrobial susceptibility results was presented by a program QGIS 3.10.

RESULTS: Members of the genus *Mycobacterium* were isolated from a total of 80 animals (52%), namely 29 (36,2%) domestic and 51 (63,7%) wild animals, and we isolated a total of 84 isolates. As earlier mentioned, the study also included 71 archival isolates of non-tuberculous mycobacteria originating from 22 (31%) domestic and 49 (69%) wild animals. Out of a total of 155 isolates, 106 (68,4%) were described as members of rapidly growing and 49 (31,6%) as members of slowly growing mycobacteria.

Affiliation of those 155 isolates to the genus *Mycobacterium* was proved by polymerase chain reaction by amplification of the 16S rRNA gene region and the gene encoding the 65 kD antigen present in all mycobacteria. Demonstration of the species of these isolates was continued by the method of specific hybridization using tests "Geno Type® Mycobacterium CM and AS" which successfully typed 61 (39,4%) isolates to the species level. Using this method we proved the following species: *M. avium* complex (11,6%), *M. fortuitum* (17,4%), *M. goodii* (1,9%), *M. celatum* (5,2%), *M. kansasii* (1,9%) and *M. intermedium* (1,3%). A total of 18 isolates to which affiliation has been confirmed as a *M.*

avium complex (MAC) were subjected to amplification of the integrated insertion sequence IS901 to determine the subspecies. Belonging to the subspecies *M. avium* subsp. *hominissuis* were found in 10 isolates and *M. avium* subsp. *avium* in eight isolates. In the remaining 94 isolates, we amplified parts of the DNA sequences of the most conserved regions, 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* genes, and intergenic ITS region. By comparing the results obtained by the analysis of these four genes, the affiliation of the species was successfully determined in 72,3% (68/94) of isolates. A total of 14 different species were described by sequencing: *M. agri*, *M. arupense*, *M. chitae*, *M. elephantis*, *M. flavescens*, *M. kumamotonense*, *M. neoaurum*, *M. nonchromogenicum*, *M. peregrinum*, *M. phocaicum*, *M. porcinum*, *M. pulveris*, *M. triviale* and *M. vaccae*. We described nine isolates as "Most similar to *Mycobacterium* + species", while for the remaining 17 isolates we were unable to determine the species. Obtained percentage of successful identification up to species level using the 16S rRNA gen was 42.3% (45/94 isolates), *hsp65* gen 19.7% (21/94 isolates), *rpoB* gen 18.9% (20/94 isolates) and ITS region 2.8% (3/94 isolates). Using these methods, we have described a total of 20 different species of non-tuberculous mycobacteria (NTM) and six "Most similar" species.

Antimicrobial susceptibility testing was performed by the broth microdilution technique using the VersaTREK kit for rapidly and slowly growing mycobacteria. The study included a total of 47 isolates belonging to nine different slowly growing species and one "Most similar", namely *M. avium* spp., *M. celatum*, *M. flavescens* and "Most similar *M. flavescens*", *M. gordonae*, *M. intermedium*, *M. kansasii*, *M. kumamotonense*, *M. nonchromogenicum* and *M. triviale*. The tested strains showed the highest percentage of resistance to fluoroquinolones, namely moxifloxacin (77,3%) and ciprofloxacin (65,4%), followed by doxycycline (77%), trimethoprim - sulfamethoxazole (65,4%), linezolid (61,4%) and amikacin (6,8%). A high percentage of resistant strains was also described for rifamycin members rifampin (76,9%), while for rifabutin the percentage was significantly lower (7,7%). The susceptibility of all isolates has only been described to the macrolide clarithromycin. Also, we examined a total of 91 isolates belonging to 11 different rapidly growing species and four "Most similar", namely *M. agri*, *M. arupense*, *M. chitae* and "Most similar *M. chitae*", *M. elephantis*, *M. fortuitum*, *M. neoaurum* and "Most similar *M. neoaurum*", *M. peregrinum*, *M. phocaicum*, *M. porcinum*, *M. pulveris*, *M. vaccae* and "Most similar to *M. vaccae*", and "Most similar to *M. septicum*". The tested strains showed the highest percentage of resistance to the cephalosporin group, namely to cefepime (57,5%) and ceftriaxone (47,2%), while to ceftazidime

this percentage was significantly lower (3,5%). Resistance was followed by amoxicillin/clavulanic acid (31%), clarithromycin (23%), imipenem (3,5%), and linezolid (1,2%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (1,2%). Within the aminoglycoside group, the percentage of tobramycin resistant strains was 14,9%, while all isolates were sensitive to amikacin. Among tetracyclines, 10,4% of resistant isolates were described for doxycycline and 6,9% for minocycline. Among fluoroquinolone group, 1,2% of ciprofloxacin resistant strains were described, while all isolates were susceptible to moxifloxacin.

CONCLUSION: During the five-year research period, a total of 155 non-tuberculous mycobacteria isolates originating from domestic and wild animals were collected. From the used molecular methods for the identification to the species level, by the method of specific hybridization using tests "Geno Type® Mycobacterium CM and AS" only 39.4% (61/155) of isolates were described, and by sequencing of the most conserved regions, 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* genes, and intergenic ITS region we described 72.3% (68/94) of isolates. From this we conclude that the method of sequencing and comparison of the most conserved regions of the genome is much more reliable for accurate identification of mycobacterial species.

We have described a total of 20 different species of non-tuberculous mycobacteria (NTM) and six "Most similar" species, from which we conclude that NTMs are widespread in both domestic and wild animals, making wild animals possible reservoirs of infection for domestic animals and humans. The most common species in our study were *M. fortuitum* (17.4%), *M. neoaurum* (16.1%), *M. avium* ssp. (11.6%) and *M. vaccae* (9%), as evidenced by previous studies conducted in the Republic of Croatia describing *M. avium* ssp. and *M. fortuitum* as one of the most common species, from which we conclude and confirm the largest presence of the most pathogenic mycobacterial species, namely *M. fortuitum* and *M. avium* ssp. in both veterinary and human medicine.

Comparing the susceptibility of slowly and rapidly growing NTM isolates, we observed significant differences in resistance to certain antibiotics, and resistance was more pronounced in slowly growers. Among the species of slowly growing mycobacteria, the resistance was equal, while among the rapidly growers it was more pronounced in the species *M. fortuitum*, *M. neoaurum*, *M. vaccae* and *M. porcinum*. We did not observe significant differences in the incidence of resistant strains isolated from domestic and wild animals, nor differences in different years of observation. Also, the differences in the occurrence of resistant strains originating from different counties were not statistically significant, and no differences in the representation of the described species by counties in the Republic of Croatia were observed. We also described 26 multi-resistant isolates that have shown

resistance to five or more antibiotics, and in the case of MAC isolates on three of the four antibiotics tested, of which 15 are members of slow-growing species and 11 are rapidly-growing species. From the above we conclude that multiple resistance is equally distributed between slow-growing and rapidly-growing species, and a large number of isolates is a worrying fact that indicates the need for further research in understanding the emergence of resistance in the so-called "wild isolates".

Isolated strains from both domestic and wild animals showed high percentages of resistance to most antibiotics recommended for therapy in human medicine indicating zoonotic potential with possible challenges in the treatment of NTM infections in humans, and also indicating the possible role of animals as reservoirs of multi-resistant strains of NTM. The adopted and validated method of both identification and antimicrobial susceptibility testing of non-tuberculous mycobacteria will be useful for the health system in the Republic of Croatia, taken into consideration that these methods have not been used so far.

Key words: Mycobacterium, non-tuberculous mycobacteria, rapidly growing, slowly growing, antimicrobial resistance, zoonotic potential

1 UVOD

Rod *Mycobacterium* obuhvaća više od 190 vrsta (PARTE, 2018.) koje se razlikuju s obzirom na metabolizam, brzinu rasta, epidemiologiju, patogenost, geografsku distribuciju i osjetljivost na antimikrobna sredstva. Osim vrsta koje uzrokuju tuberkulozu (*M. tuberculosis*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. africanum*), prisutne su i vrste koje djeluju kao oportunistički patogeni sposobni uzrokovati limfadenitis i infekcije pluća, kože, mekih tkiva, zglobova, tetiva, kostiju i drugih organa kako u životinja tako i u ljudi, a zajednički se nazivaju netuberkulozne mikobakterije (NTM). NTM vrste, također nazvane i ekološke mikobakterije, izolirane su iz vode, tla, prašine i biljaka (FALKINHAM, 1996.). Prema kulturnim osobinama dijele se s obzirom na brzinu rasta na hranjivoj podlozi na brzorastuće vrste kod kojih su kolonije vidljive unutar sedam dana (npr. *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*) i spororastuće vrste (npr. *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. avium* kompleks (MAC), *M. ulcerans*, *M. goodii*, *M. scrofulaceum*) koje zahtijevaju duže vrijeme inkubacije (TORTOLI, 2009.). Brzina rasta utječe na osjetljivost na antimikrobne lijekove kao i na kliničke znakove i patološke promjene zahvaćenog organizma (TORTOLI, 2003., CLSI, 2018b).

Netuberkulozne mikobakterije predstavljaju veliku i raznoliku populaciju mikobakterija koje su u velikoj mjeri podcijenjene i nedovoljno dijagnosticirane usprkos značajnom utjecaju kako na zdravlje životinja tako i ljudi. Taj utjecaj u veterinarskoj medicini može biti izravan uzrokujući manje ili više značajne infekcije i gubitak produktivnosti, ili neizravan ometajući dijagnozu i kontrolu goveđe tuberkuloze (HOPE i sur., 2005.). Studija provedena u Republici Hrvatskoj opisuje 183 izolata NTM-a izoliranih iz limfnih čvorova svinja, od kojih je MAC najčešći izolat, slijedi *M. fortuitum*, *M. chelonae* i *M. peregrinum* (CVETNIĆ i sur., 2007.). Slične rezultate također opisuje studija na svinjama gdje je izdvojeno 139 izolata od kojih je također najčešći MAC, slijede *M. fortuitum* i *M. peregrinum* (ŠPIČIĆ i sur., 2010.). Izolati MAC također su najčešće opisani i u divljih svinja, slijede *M. fortuitum* i *M. goodii* (CVETNIĆ i sur., 2011.). Također je provedeno testiranje hrane i raznih materijala iz okoliša na svinjogojским farmama gdje su opisani izolati MAC, *M. fortuitum*, *M. chelonae* i *M. terrae* kako u okolišu tako i svinjama, što ukazuje kako je najčešći izvor infekcije NTM vrstama upravo kontaminirani okoliš (CVETNIĆ i sur., 1998.).

Postotak infekcija uzrokovanih NTM-ama u ljudi također je u porastu u zadnje vrijeme, osobito među imunokompromitiranim bolesnicima. Vrste pripadnici MAC-a odgovorne su za najveći broj infekcija u svijetu, no regionalno se zastupljenost pojedinih vrsta NTM-a u ljudi značajno razlikuje (HOEFSLOOT i sur., 2013.). Tako je u pacijenata u

Europskoj Uniji opisano čak 99 različitih vrsta od kojih su *M. avium*, *M. goodii*, *M. xenopi*, *M. intracellulare* i *M. fortuitum* bile najčešće zastupljene, a gotovo 7% izolata nije bilo moguće identificirati kao službeno priznate vrste (VAN DER WERF i sur., 2014.). Studija provedena u hrvatskih građana na temelju dokazivanja NTM-a izdvojenih iz respiratornih uzoraka opisuje kako je *M. goodii* najčešći izolat, slijedi *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. terrae* i MAC (JANKOVIĆ i sur., 2013.).

Identifikacija uzročnika bolesti uzrokovane NTM-ama nije jednostavna. Postupak identifikacije izolata zasniva se na bakteriološkoj i biokemijskoj pretrazi i traje više tjedana. Na kraju se često događa da nije moguće sa sigurnošću utvrditi vrstu. Dodatnom primjenom komercijalno dostupnih kitova za molekularnu tipizaciju (Hain, Njemačka) moguće je identificirati svega 40-tak vrsta. Nadalje, za NTM karakteristična je vrlo niska evolucijska divergencija genoma, te se stoga smatra da je za identifikaciju pojedine vrste potrebno koristiti samo pojedine najkonzerviranije regije, a ne cijeli genom. Točna i brza identifikacija vrste uzročnika presudno je važna za pravovremeno liječenje bolesnika. Ciljanom analizom DNK sekvenci pojedinih regija, 16S rRNK, *rpoB*, *hsp65* i međugenske ITS regije, mogu se pojedinačno i skupno analizirati te omogućiti najbržu identifikaciju vrsta NTM-a (TELENTI i sur., 1993., ROTH i sur., 1998., ADÉKAMBI i DRANCOURT, 2004., DEVULDER i sur., 2005.).

Jedna od značajki NTM vrsta je visoka razina prirodne otpornosti na lijekove, kao i inducibilna i mutacijska otpornost stečena tijekom suboptimalne izloženosti i odabira lijeka (VAN INGEN i sur., 2012b). Iz tog razloga njihovo liječenje je mnogo izazovnije od liječenja klasične tuberkuloze, te do sada nije utvrđena standardizirana antimikrobna terapija NTM-a. Različite vrste NTM-a imaju različite profile antimikrobne osjetljivosti. Uloga određivanja antimikrobne osjetljivosti od velikog je značaja za odabir odgovarajućeg i učinkovitog liječenja s obzirom na povećanje broja pacijenata, međutim malo je podataka koji nam ukazuju na razlike u profilima antimikrobne osjetljivosti između NTM vrsta (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.). Trenutno postoji samo jedan standard za određivanje antimikrobne rezistencije za brzo i spororastuće mikobakterije (M24-A2) koji propisuje „Clinical and Laboratory Standards Institute“, SAD (CLSI, 2018a, CLSI, 2018b). Na području Republike Hrvatske do sada nisu provedena istraživanja u vidu određivanja antimikrobne osjetljivosti izolata netuberkuloznih mikobakterija u području veterinarske medicine, a prema našim saznanjima i dostupnim podacima iz literature takva istraživanja nisu provođena niti u svijetu. Rezultati istraživanja pridonijeti će rutinskoj identifikaciji uzročnika bolesti kako u životinja

tako i u ljudi, a validirana i standardizirana metoda biti će prihvatljiva i korisna za zdravstveni sustav u Hrvatskoj.

2 PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1 Morfologija i metabolizam mikobakterija

Mikobakterije su aerobne, štapičaste bakterije, ravnog ili blago zakrivljenog oblika široke između 0,2 i 0,6 μm i duge između 1,0 i 10 μm . Grčki predmetak miko- što znači "gljiva", ukazuje na način rasta i izgled kolonija mikobakterija na površini hranjive podloge (KERR i BARRETT, 2000.). Obično su nepokretne, osim vrste *Mycobacterium marinum* za koju se pokazalo da je pokretna unutar makrofaga. Otporne su na kiseline, te se ne boje po Gramu, već metodom po Ziehl-Neelsenu (RYAN i RAY, 2004.). Mikobakterije imaju vanjsku ovojnica, posjeduju kapsulu, ali ne tvore endospore (NIEDERWEIS i sur., 2010.). Prepoznatljiva značajka svih vrsta mikobakterija je stanična stijenka koja je deblja nego u mnogih drugih bakterija, hidrofobna je, voštana i bogata mikolnom kiselinom. Sastoji se od hidrofobnog sloja mikolatne kiseline i sloja peptidoglikana koje zajedno drži polisaharid arabinogalaktan, a biosintetski putevi upravo tih sastojaka moguća su meta novih lijekova za tuberkulozu (BHAMIDI, 2009.). Upravo takva građa stanične stijenke čini mikobakterije otpornima na teške metale, dezinficijense i antibiotike (JARLIER i NIKAIDO, 1994).

Mnoge vrste roda *Mycobacterium* lako se prilagođavaju rastu na vrlo jednostavnim hranjivim podlogama, koristeći amonijak ili aminokiseline kao izvor dušika, a glicerol kao izvor ugljika u prisutnosti mineralnih soli. Optimalne temperature rasta variraju ovisno o vrstama mikobakterija i kreću se od 25°C do preko 50°C. Većina vrsta uključujući i one klinički značajne, može se uzgojiti na krvnom agaru (LAGIER i sur., 2015.). Međutim, neke vrste rastu vrlo sporo zbog izuzetno dugih generacijskih ciklusa, te može proći i više od 20 dana dok prođe kroz jedan ciklus podjele (za usporedbu, kod sojeva *E. coli* generacijski ciklusi iznose oko 20 minuta), što bakteriološku pretragu čini dugotrajnim postupkom.

2.2 Klasifikacija mikobakterija

Mikobakterije pripadaju porodici *Mycobacteriaceae* unutar koje se nalazi samo jedan rod pod imenom *Mycobacterium*. Rod *Mycobacterium* dijeli se u tri glavne skupine: 1. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, u koju pripadaju vrste koje uzrokuju tuberkulozu u sisavaca (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. munghi*, *M. orygis*, *M. suricattae*); 2. *Mycobacterium leprae* - uzrokuje lepru u ljudi; 3. Netuberkulozne mikobakterije (NTM) - skupina koja uključuje sve druge vrste (više od 160 vrsta), a koje za razliku od prethodno navedenih nisu obligatni patogeni. Također

nazvane i ekološke mikobakterije, izolirane su iz vode, tla, prašine i biljaka, a većina NTM vrsta su saprofiti, simbionti i komenzali (FALKINHAM, 1996.). Određen broj je potencijalno (oportunistički) patogen za životinje i ljude, sposoban uzrokovati limfadenitis i infekcije pluća, kože, mekih tkiva, zglobova, tetiva, kostiju i drugih organa, a zaraziti se može izravnim dodiranjem ili aerosolom (VAN INGEN, 2013a).

Ime rodu predložili su LEHMAN i NEUMANN (1896.), a prvi opis temeljen je na morfološkim karakteristikama i posebnosti u tvorbi pigmenta. Iako su NTM identificirane prije više od jednog stoljeća njihova uloga kao patogena nije bila shvaćena tijekom većine tog vremena. Buhler i Pollack su 1953. godine otkrili plućnu bolest u ljudi vrlo sličnu tuberkulozi, a bila je uzrokovana *M. kansasii* (BUHLER i POLLAK, 1953.). Od tada je pažnja o patogenom potencijalu netuberkuloznih mikobakterija pojačana. Shvaćanje bolesti uzrokovanih NTM-ama kao subjekta ozbiljnog interesa započinje oko 1980. godine nakon objave dr. Emanuela Wolinskyja, kao prvog opsežnog pregleda bolesti o NTM-ama, te predstavlja jasan prijelomni trenutak u prepoznavanju i uvažavanju NTM bolesti (WOLINSKY, 1979.). U to vrijeme bilo je prepoznato oko 40 različitih NTM vrsta koje su identificirane na temelju fenotipskih i biokemijskih karakteristika, uključujući morfologiju kolonija i obrasce metabolizma hranjivih tvari (RUNYON, 1970., WOLINSKY, 1979.). Na temelju navedenih značajki podijeljene su u četiri skupine: spororastuće (nekromogene, fotokromogene, skotokromogene) i brzorastuće mikobakterije, te su upotrebljavani različiti nazivi poput "atipične mikobakterije", "mikobakterije iz okoliša" ili "mikobakterije drugačije od tuberkuloze". Široko usvojen rani sustav klasifikacije NTM temeljen na ovom pristupu bila je istoimeno nazvana Runyon-ova klasifikacija po dr. Ernestu H. Runyonu (RUNYON, 1965.). Također sredinom 1980-ih došlo je do velikog porasta bolesti uzrokovanih NTM-a, a uzrok tome bila je epidemija sindroma stečenog nedostatka imuniteta (AIDS) i pojava vrsta *Mycobacterium avium* kompleksa (MAC) kao smrtonosnog patogena što je NTM-e učinilo još značajnijim (HAWKINS i sur., 1986.). Brzina i točnost identifikacije mikobakterijskih vrsta poboljšala se primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), a uskoro slijedi i uvođenje molekularnih laboratorijskih metoda, uključujući DNK sonde i tehnike sekvenciranja gena (JOST i sur., 1995., LOURO i sur., 2001., PAULS i sur., 2003., CLOUD i sur., 2005., GRIFFITH i sur., 2015.). Identifikacija mikobakterijskih vrsta velikom brzinom se proširila sekvenciranjem gena 16S rRNK, koji je visoko konzerviran unutar NTM vrsta (GRIFFITH i sur., 2015.). Uporabom ove i drugih molekularnih metoda broj priznatih NTM vrsta kontinuirano je rastao i danas iznosi oko 200 (PARTE, 2018.). Rod nije razdijeljen u podrodove već u dvije skupine koje se razlikuju po kulturnim osobinama, tj. brzini rasta na

hranjivoj podlozi, i to na brzorastuće vrste (engl. rapidly growing mycobacteria - RGM) kod kojih su kolonije vidljive unutar sedam dana (npr. *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*) i spororastuće vrste (engl. slowly growing mycobacteria - SGM) (npr. *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. avium* kompleks (MAC), *M. ulcerans*, *M. goodnae*, *M. scrofulaceum*) koje zahtjevaju duže vrijeme inkubacije (TORTOLI, 2009.). Brzina rasta utječe na osjetljivost na antimikrobne lijekove kao i na kliničke znakove i patološke promjene zahvaćenog organizma (TORTOLI, 2003., CLSI, 2018b). Na temelju kliničke važnosti podijeljene su na uvjetno patogene, oportunističke mikobakterije i čiste saprofite (DAVIDSON, 1989.).

Najnovija istraživanja temeljena na međusobnim usporedbama genoma dosad poznatih vrsta mikobakterija i sveobuhvatnim filogenomskim analizama predlažu podjelu roda *Mycobacterium* na pet različitih monofiletskih grupa koje su opisane kao „*Tuberculosis – Simiae*“ grupa koja obuhvaća sve najvažnije ljudske patogene vrste, te četiri nova roda: *Mycolicibacterium* gen. nov., *Mycolicibacter* gen. nov., *Mycolicibacillus* gen. nov. i *Mycobacteroides* gen. nov. koji odgovara grupama „*Fortuitum - Vaccae*“, „*Terrae*“, „*Triviale*“ i „*Abscessus - Chelonae*“ (GUPTA i sur., 2018.). O novoj predloženoj klasifikaciji još se raspravlja, te znanstvenici i dalje prate podjelu na sporo i brzorastuće mikobakterije, što je slučaj i u našem istraživanju.

2.3 Epidemiologija netuberkuloznih mikobakterija

Infekcije uzrokovane netuberkuloznim mikobakterijama (NTM) razlikuju se u nekoliko točaka od epidemiologije klasične tuberkuloze. U prvom redu klasična tuberkuloza raširena je širom svijeta, dok NTM infekcije karakterizira endemska pojava. Izvor zaraze za ljude kod klasične tuberkuloze su bolesne osobe ili zaražene životinje, dok su rezervoari NTM-a prisutni u okolišu. Nadalje, mehanizmi prijenosa infekcije klasične tuberkuloze su poznati, a širi se najčešće izravnim putem preko izvora zaraze, a rijede neizravnim putem preko kontaminirane hrane. Putevi prijenosa većine infekcija uzrokovanih NTM-ama nisu u potpunosti poznati, a njihovi mehanizmi do danas još nisu objašnjeni (PORVAZNIK i sur., 2017.). Sve je više dokaza o incidenciji plućnih bolesti uzrokovanih NTM-ama u humanoj medicini i posljedičnom povećanom hospitalizacijom, a infekcije su uglavnom zastupljene u područjima s malom prevalencijom klasične tuberkuloze (WINTHROP i sur., 2010.). U nekim industrijski razvijenim zemljama novi slučajevi bolesti uzrokovani NTM-ama dostižu ili čak premašuju one uzrokovane klasičnom tuberkulozom (ISEMAN i MARRAS, 2008.). Temeljni čimbenici ove promjenjive epidemiologije obuhvaćaju porast prevalencije osjetljivih domaćina. Čimbenici uključuju pacijente koji zahtijevaju sistemsku terapiju zbog kroničnih

bolesti, npr. HIV infekcije i uporaba imunosupresivnih lijekova (WINTHROP i sur., 2009.), sustavna ili inhalacijska terapija kortikosteroidima (ANDREJCAK i sur., 2013.), već postojeća plućna bolest poput cistične fibroze ili kronične opstruktivske plućne bolesti (VAN INGEN i sur., 2012c).

U veterinarskoj medicini nalaz NTM-a također je u porastu, što je detaljnije opisano kasnije u tekstu.

2.4 Otpornost NTM-a na antimikrobne lijekove

Većina NTM vrsta ima širok spektar mehanizama koji im pružaju prirodnu otpornost i slabu osjetljivost na uobičajenu primjenu antibiotika u usporedbi s drugim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama, čak i na agense koji se koriste u liječenju NTM bolesti. Nadalje, otpornost u NTM može biti prirodna i stečena (mutacijska), a obje su važne odrednice ishoda liječenja (GRIFFITH i sur., 2007.). Malo je dostupnih podataka o povezanosti rezultata određivanja osjetljivosti na lijekove i kliničkih rezultata za ove mikobakterije (VAN INGEN i sur., 2012b). Iz još nepoznatih razloga, *in vitro* osjetljivost na antibiotike za više NTM vrsta neće predvidjeti uspjeh ili neuspjeh liječenja sa specifičnim antibiotikom (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012., BROWN-ELLIOTT i sur., 2013.). Na primjer, za MAC jedini antimikrobni lijekovi kod kojih *in vitro* osjetljivost predviđa *in vivo* odgovor su makrolidi i amikacin (GRIFFITH i sur., 2007., BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.).

2.4.1 Urođena otpornost

2.4.1.1 Uloga stanične stijenke

Prirodnu otpornost mikobakterija na antimikrobne lijekove pružaju razni mehanizmi koji djeluju na sam unos lijekova, omogućavajući njihovu biotransformaciju u stanici ili smanjujući njihovu sklonost prema određenom cilju djelovanja. Prva fizička barijera je mikobakterijska stanična stijenka. Prirodna otpornost na lijekove u velikoj je mjeri povezana s mehanizmima koji utječu na građu, hidrofobnost, a time i propusnost stanične stijenke. Stanična stijenka mikobakterija bogata je lipidima i tvori važnu prepreku prodiranju antimikrobnih lijekova (LAMBERT, 2002.). Također određeni geni i mehanizmi koji su uključeni u održavanje stanične stijenke odgovorni su za fenotipsko obilježje višestruke otpornosti na antimikrobne lijekove; oni uključuju protein kinazu G, *fbpA* (kodirajući takozvani antigen kompleksa 85) i *asnB* u *M. smegmatis*, vrste koji služi kao model istraživanja roda *Mycobacterium*; *mtrAB* sustav u *M. smegmatis* i *M. avium*, *kasB* u *M.*

marinum, te *Maa2520* i *pks12* u *M. avium*. Inaktivacija navedenih gena vodi smanjenju hidrofobnosti stanične stijenke i povećava osjetljivost na lipofilne antibiotike, uključujući rifampicin, makrolide, ciprofloksacin, vankomicin i β -laktamske antibiotike, uključujući imipenem (GAO i sur., 2003., PHILALAY i sur., 2004., NGUYEN i sur., 2005., CANGELOSI i sur., 2006., REN i LIU, 2006., WOLFF i sur., 2009., NGUYEN i sur., 2010.).

2.4.1.2 Prijenos molekula putem porinskih kanala i efluksne pumpe

Prijenos molekula kroz membranu mikobakterijske stanice djelomično je kontroliran porinima, proteinima koji tvore kanale duž membrane, a mikobakterije ih koriste za prikupljanje hranjivih sastojaka. Njihov je broj kod mikobakterija znatno manji nego u gram negativnih bakterija što pridonosi otpornosti na antimikrobne lijekove (VAN INGEN i sur., 2012b). Dosad je istražen samo porin *mspA* u *M. smegmatis*, a njegova aktivnost određuje osjetljivost na hidrofilne antibiotike, uključujući norfloksacin, kloramfenikol i β -laktamske antibiotike, te hidrofobne vankomicin, eritromicin i rifampicin (STEPHAN i sur., 2004., DANILCHANKA i sur., 2008.). Dok porini ograničavaju ulazak molekula u stanicu, efluksne pumpe izbacuju potencijalno štetne tvari iz mikobakterijske stanice. U novije vrijeme uloženi efluksnih pumpi pridana je značajna pažnja kao mogućeg cilja za pomoćnu terapiju (VAN INGEN i sur., 2013b). Efluksna pumpa P55 vjerojatno je prisutna u svih vrsta roda *Mycobacterium*, a dosad je opisano da je odgovorna za otpornost na tetracikline i aminoglikozide (SILVA i sur., 2001.). Najznačajnije efluksne pumpe u NTM su *tap* (RAMOM-GARCIA i sur., 2006.), *tetV* (DE ROSSI i sur., 1998.) *lfrA* (SANDER i sur., 2000.) i *efpA* (LI i sur., 2004.), koje su odgovorne za otpornost na tetracikline, aminoglikozide, β -laktame, fluorokinolone, rifampicin i izoniazid kod *M. fortuitum* i *M. smegmatis*.

2.4.1.3 Biotransformacija unutar mikobakterijske stanice

Biotransformacija antimikrobnih spojeva u mikobakterija opisana je za β -laktame, kinolone, aminoglikozide i rifampicin. β -laktamski antibiotici, točnije imipenem i cefoksitin, koriste se samo u liječenju infekcija uzrokovanih brzorastućim mikobakterijama, kao što su *M. abscessus*, *M. chelonae* i *M. fortuitum* (GRIFFITH i sur., 2007.). Njihova uporaba je ograničena zbog moćnih β -laktamaza - uglavnom cefalosporinaze - prisutne u svih mikobakterija (NASH i sur., 1986., FLORES i sur., 2005.). Na osjetljivost na aminoglikozide utječu enzimi koji su također opisani u mikobakterija, i to fosfotransferaza odgovorna za otpornost na streptomycin u *M. fortuitum* te *M. abscessus* (RIPOLL i sur., 2009., RAMIREZ i

TOLMASKY, 2010.). Nadalje, enzimi N-acetiltransferaze odgovorni su za otpornost na amikacin i gentamicin, a opisani su u vrsta *M. tuberculosis* kompleksa, *M. kansasii* i MAC (HO i sur., 2000.), kao i u brzorastućih *M. fortuitum*, *M. smegmatis* i *M. abscessus*. Njihova podudarnost sa sličnim enzimima u drugih rodova upućuje na to da su stečeni horizontalnim prijenosom gena (RIPOLL i sur., 2009., RAMIREZ i TOLMASKY, 2010.).

2.4.1.4 Inducibilni mehanizmi otpornosti

Najpoznatiji inducibilni mehanizam otpornosti u mikobakterija je skupina *erm* (engl. erythromycin resistance methylase) gena odgovornih za otpornost na makrolide do koje dolazi metiliranjem 23S ribosomalne RNK što narušava vezivanje makrolida za ribosom (NASH i sur., 2009.). Te metilaze prisutne su u nekoliko, ali ne u svih, klinički važnih brzorastućih NTM, i to u *M. abscessus* i *M. fortuitum* (NASH i sur., 2009., BROWN-ELLIOTT i sur., 2015.).

Manje poznati inducibilni mehanizam otpornosti je RNK polimeraza - vezujući protein A (RbpA), povećava toleranciju na rifampicin kod *M. tuberculosis* i *M. smegmatis*; ovaj se protein veže na RNK polimerazu, gdje ometa vezivanje rifampicina (DEY i sur., 2010.). Njegova distribucija i klinička važnost u ostalih spororastućih NTM do sada nije poznata.

2.4.2 Stečena otpornost

2.4.2.1 Genske mutacije

Sve veći broj bolesnika liječenih od NTM bolesti doveo je do porasta broja izvještaja koji opisuju stečenu mutacijsku otpornost prema većini ključnih antimikobakterijskih lijekova. Budući da makrolidni antibiotici igraju ključnu ulogu u liječenju NTM bolesti, mutacijska otpornost na ovu skupinu privukla je najviše pozornosti. Pa se tako mutacijska otpornost na makrolide u vrsta MAC može spriječiti uporabom protokola liječenja s više lijekova koji uključuju rifampicin i etambutol, dok monoterapija makrolidima ili protokol koji uključuje samo kinolone i makrolide povećava rizik za razvoj otpornosti na makrolide kod MAC-a (GRIFFITH i sur., 2006.). Mutacije u kodonu 2058 ili 2059 23S ribosomalnog RNK gena (*rrl*) povezane su s otpornošću na makrolide u MAC-u i *M. abscessus* (MEIER i sur., 1996., BASTIAN i sur., 2011.). U bolesnika liječenih od infekcije MAC s protokolom koji sadrži amikacin opisana je mutacijska otpornost na amikacin temeljena na mutacijama kodona 1408 16S ribosomalnog RNK gena (*rrs*) (BROWN-ELLIOTT i sur., 2013., OLIVIER i sur., 2017.). Slične mutacije odgovorne za otpornost na aminoglikozide opisane su i u *M. abscessus* i *M.*

chelonae (PRAMMANANAN i sur., 1998., OLIVIER i sur., 2017.). Stečena otpornost na rifampicin s mutacijama kodona 513, 526 i 531 *rpoB* gena opažena je kod *M. kansasii*, a one su identične onima koje su opisane u rifampicin otpornim izolatima *M. tuberculosis* kompleksa (KLEIN i sur., 2001.).

2.4.2.2 Uloga plazmida

Otpornost na antimikrobne lijekove u NTM nije vezana za dijeljenje plazmida koji posjeduju različite gene odgovorne za osjetljivost na antibiotike. NTM sadrže plazmide, a oni su tipični za pojedinu vrstu i do sada nema dokaza o prijenosu s jedne vrste na drugu. Nedavna studija opisuje pet plazmida u izolatima *M. chimaera* koji se razlikuju među izolatima (VAN INGEN i sur., 2017.). U *M. abscessus* opisan je pMAB01 plazmid, odgovoran za otpornost na sulfonamide (MATSUMOTO i sur., 2014.).

2.5 Molekularne metode u dijagnostici netuberkuloznih mikobakterija

2.5.1 Tipizacija izolata komercijalnim testom "Geno Type Mycobacterium CM/AS"

Metoda hibridizacije temelji se na otkrivanju slijedova sekvence 23S rRNK gena karakterističnih za određenu vrstu. Ovaj sustav koristi dvije vrste hibridizacijskih trakica (CM, za "zajedničke mikobakterije", i AS, "za dodatne vrste") te omogućava razlikovanje različitih vrsta NTM-a, uključujući uobičajene spororastuće vrste kao što su *M. avium*, *M. gordonae*, *M. interjectum* i *M. kansasii*, dok slijedeće vrste nije moguće razlikovati: *M. intracellulare*/*M. chimaera*, *M. scrofulaceum*/*M. paraffinicum*/*M. parascrofulaceum*, *M. malmoense*/*M. haemophilum*/*M. palustre*/*M. nebraskense*, MTBC/*M. xenopi* i *M. marinum*/*M. ulcerans*. Vrste dokazane AS testom, uključujući *M. simiae* i *M. celatum* trebaju se prijaviti samo ako su uzgojene na čvrstim hranjivim podlogama s tipičnom morfologijom i brzinom rasta kolonije (SIMNER i sur., 2015.). Nedavna studija također opisuje da vrsta *M. intracellulare* unakrižno hibridizira s nekoliko drugih NTM-a, uključujući *M. arosiense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. mantanii* i *M. saskatchewanense* (TORTOLI i sur., 2010.).

2.5.2 DNK sekvenciranje određenog gena

2.5.2.1 Djelomično sekvenciranje 16S rRNK gena

Za NTM identifikacija se bazira na dvije važne hipervarijabilne regije poznate kao regija A i regija B, koje se nalaze na 5' kraju 16S rRNK gena. Regiju A posjeduje većina vrsta roda *Mycobacterium* (TORTOLI, 2003.). Ti fragmenti veličine su oko 500 baznih parova (bp) te omogućuju taksonomsku identifikaciju mnogih brzo i spororastućih NTM vrsta. Glavno ograničenje metode djelomičnog (500 bp) sekvenciranja je nemogućnost razlikovanja vrsta koje imaju identična hipervarijabilna područja A i B ili identičan cjeloviti slijed 16S rRNK gena kao što je slučaj u spororastućih NTM vrsta: *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. kansasii*/*M. gastri* i *M. genavense*/*M. simiae*. Također je zanimljivo da je kompletna sekvenca, otprilike veličine 1500 bp, među brzorastućim identična za tri vrste *M. abscessus*, *M. chelonae* i *M. franklinii*. Nadalje, prilikom uporabe javnih baza podataka treba biti oprezan s obzirom da često mogu sadržavati pogreške. Za preciznu identifikaciju vrsta s istim slijedom 16S rRNK gena primjenom djelomičnog sekvenciranja, potrebno je sekvencirati dio regije 16S rRNK gena izvan prve 500 bp regije, kao npr. za *M. chelonae* - *M. abscessus* koje se razlikuju na 3' kraju ili odabrati drugi dio gena za sekvenciranje. Kako bi se osigurala točnost, treba usporediti najmanje 300 bp dobivene sekvence sa onom dostupnom u bazi podataka. Iz tog razloga, većina kliničkih laboratorija sekvencira slijedove veličine između 450 i 480 bp. Prilikom usporedbe sekvenci potrebno je slijediti objavljene smjernice Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI), no one predlažu interpretacijske kriterije za procjenu identiteta samo za 16S rRNK gen (CLSI, 2008a).

2.5.2.2 Sekvenciranje *rpoB* gena

Sekvenciranje *rpoB* gena koji kodira *B*-podjedinicu RNK polimeraze predloženo je kao sekundarna ciljna sekvenca za identifikaciju NTM-a, uključujući brzo i spororastuće NTM (ADÉKAMBI i sur., 2003., SALAH i sur., 2008.). Naime ne postoje utvrđene granične vrijednosti definirane standardom CLSI, kao niti smjernice za gene koji nisu 16S rRNK gen. Nekoliko različitih regija *rpoB* gena predloženo je za sekvenciranje među NTM vrstama. KIM i sur. (1999.) koristili su fragment veličine 306 bp (Regija III), dok su Lee i sur. (LEE i sur., 2003.) koristili fragment od 360 bp za NTM-e. Suprotno tome, Adékambi i sur. (ADÉKAMBI i sur., 2003.) koristili su fragment veličine približno 760 bp (Regija V) uglavnom za identifikaciju brzorastućih mikobakterija, uključujući dvije novije vrste *M. phocaicum* i *M. aubagnense*. Također je opisano da ako se *rpoB* gen koristi sam prilikom identifikacije,

postoji mogućnost pogrešne identifikacije podvrste *M. abscessus* uzrokovane horizontalnim prijenosom gena (MACHERAS i sur., 2011.). Nadalje, slijedeća studija opisuje identifikaciju mnogih manje učestalih vrsta NTM-a, te uvelike dokazuje korisnost sekvenciranja *rpoB* gena za identifikaciju i brzo i spororastući NTM-a (DE ZWAAN i sur., 2014.).

2.5.2.3 Sekvenciranje *hsp65* gena

65 kDA *hsp* gen (engl. "heat shock protein") manje je konzerviran među mikobakterijskim vrstama i time pokazuje više međuvrskih i unutarvrskih polimorfizama u usporedbi sa sekvencama 16S rRNK gena (RINGUET i sur., 1999.). Ova je varijabilnost iskorištena za identifikaciju blisko povezanih vrsta NTM-a pomoću fragmenta veličine 441-bp poznatog kao Telenti-jev fragment (TELENTI i sur., 1993.). Ovim genom moguće je razlikovati nekoliko vrsta brzorastućih mikobakterija koje se ne mogu razlikovati analizom 16S rRNK gena, a to su *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. houstonense*, *M. fortuitum*, *M. porcinum* i *M. senegalense*. Također za razliku od djelomičnog sekvenciranja 16S rRNK gena, *hsp65* genom mogu se lako razlikovati *M. chelonae* i *M. abscessus* na temelju razlika u 30 bp fragmenta veličine od 441 bp, kao i tri podvrste *M. abscessus*. Nadalje, među spororastućim NTM-ama moguće je razlikovati *M. marinum* od *M. ulcerans*, *M. kansasii* od *M. gastri*, a koristeći varijabilniju 3' regiju mogu se također razlikovati podvrste MAC-a uključujući *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* i *M. avium* subsp. *hominissuis* (TURENNE i sur., 2006.).

2.5.2.4 Sekvenciranje ITS regije

Ostali ciljni geni, uključujući regiju 16S-23S rRNK unutarnjeg prepisanog razmaka (engl. internal transcribed spacer - ITS), predloženi su za taksonomsku identifikaciju NTM-a (PARK i sur., 2000.). Međutim, većina dosadašnjih istraživanja opisuje da je ove regija varijabilnija od *hsp65* gena, pa se stoga nije široko koristila. Također nedostaju ažurirane i točne baze podataka za navedenu regiju, a posebno za novije vrste mikobakterija. Trenutno većina studija predlaže analizu više ciljnih gena za identifikaciju NTM-a koje nisu identificirane djelomičnim sekvenciranjem gena 16S rRNK (MACHERAS i sur., 2009.). Regija ITS 1 ciljno je područje koje razdvaja 16S i 23S rRNK gene, a opisano je više dijelova pogodnih za sekvenciranje (ROTH i sur., 2000.). Navedena regija ima veliku varijabilnost koja se može koristiti za diskriminaciju vrsta posebno među brzorastućim, dok se neke spororastuće vrste poput *M. simiae* i *M. xenopi* ne mogu razlikovati pomoću ove metode

(MOHAMED i sur., 2005.). Međutim, ITS regija može biti korisna za identifikaciju drugih spororastućih vrsta, uključujući MAC (FROTHINGHAM i WILSON, 1993.).

2.5.3 Sekvenciranje cijelog genoma

Sekvenciranje cijelog genoma (engl. Whole Genome Sequencing - WGS) dosad se koristilo u svrhu usporedbe izolata izdvojenih iz pacijenata i izolata iz okoliša u nedavnim izbojima diseminirane infekcije *M. chimaera* nakon operacija srca (KOHLENER i sur., 2015.). Iako još nije korišten u ovu svrhu, WGS za dokazivanje in vitro osjetljivosti na lijekove NTM-a koje su uključene u epidemije mogao bi biti potencijalna metoda za uspješno liječenje. Također, u usporedbi s tradicionalnim metodama tipiziranja sojeva kao što su VNTR (engl. variable number tandem repeat) i gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE), može pružiti više informacija i dublje znanje o pojedinačnim sojevima pa time i o epidemijama (JAGIELSKI i sur., 2016.). Informacije dobivene sekvenciranjem cijelog genoma trebale bi rasvijetliti aspekte raznolikosti vrsta i svojstava specifičnih za soj, uključujući preživljavanje u okolišu (NGEOW i sur., 2012a), otpornost na antibiotike i dezinficijense (CHAN i sur., 2012.), te genetske odrednice povezane s patogenošću soja/vrste (NGEOW i sur., 2012b). Nadalje, u nedavnoj studiji metoda WGS je korištena kao podrška razdvajanju podvrsta unutar kompleksa *M. abscessus*, i to na *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* i *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Diferencijacija na razini podvrste pomaže u rješavanju kontroverze taksonomskog položaja ove glavne skupine RGM-a, ističući tako još jednu primjenu WGS-a (TORTOLI i sur., 2016.).

2.5.4 Ostale molekularne metode

2.5.4.1 Metoda VNTR – MIRU tipizacije

Genom *Mycobacterium* sadrži mjesta uzastopnih ponavljanja sljedova nukleotida, takozvanih VNTR koji se među izolatima razlikuju u broju ponavljanja, a poznato je da su široko distribuirani među pripadnicima MTBC kompleksa i NTM-a, uključujući MAC, *M. goodii*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai* i *M. ulcerans*. Tipizacija soja pomoću VNTR (engl. Variable Number Tandem Repeat) - MIRU (engl. Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) metode postiže se procjenom broja i duljine ponavljajućih sljedova na svakom određenom mjestu u genomu svakog izolata. VNTR-MIRU tipizacija se zasniva na metodi lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction - PCR), a rezultati tipizacije se izražavaju numerički, lako se uspoređuju i primjenjivi su (JAGIELSKI i sur.,

2016.). Nedavna studija opisuje primjenu navedene metode u svrhu tipiziranja sojeva pripadnika MAC-a (INAGAKI i sur., 2009.). Primjena VNTR-MIRU tipizacije za druge vrste uključujući *M. abscessus* nedavno je opisana koristeći 18 uzastopnih ponavljanja u genomskom slijedu *M. abscessus*, sa 100% specifičnošću, 100% stabilnošću i 100% ponovljivošću (WONG i sur., 2012.).

2.5.4.2 Gel elektroforeza u pulsirajućem polju

Najčešće korištena metoda općenito za tipiziranje molekularnih sojeva je gel elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE). Temelji se na načelu da periodično izmjenično električno polje uzrokuje promjenu smjera DNK fragmenata i omogućuje odvajanje velikih molekula. Pomoću restrikcijskih enzima, mogu se odvojiti DNK fragmenti > 50 kb. Iako metoda nikada nije standardizirana za brzo ili spororastuće NTM-e, većina istražitelja koristi poznate kriterije s nekim izmjenama za mikobakterijske vrste (TENOVER i sur., 1995., WALLACE i sur., 2002.). Nadalje, opisani su izmjenjeni postupci provedbe PFGE kako bi se omogućili pouzdaniji rezultati, i to za one vrste (posebno izolati *M. abscessus*) koje su izvorno bile pogođene razgradnjom DNK (ZHANG i sur., 2004.). Primjena metode opisana je kod bolesnika s kroničnom MAC bolesti pluća gdje je cilj bio utvrditi da li se radi o novoj infekcija ili o remisiji (WALLACE i sur., 2002., GRIFFITH i sur., 2006.).

2.5.4.3 Tipizacija sekvenciranjem na više lokusa

Metodom tipizacije sekvenciranjem na više lokusa (engl. Multi-locus Sequence Typing – MLST) analiziraju se međugenske sekvence koje mogu pokazati visoku varijabilnost, a na osnovu slijeda nukleotida unutar tzv. "housekeeping" gena mogu se definirati sojevi. U nedavnoj studiji MLST uspoređivan je s PFGE u svrhu tipizacije sojeva 93 izolata *M. abscessus* kompleksa. U ovoj studiji sekvencirano je više gena, a svakom izolatu dodijeljen je alelni profil ili ST (engl. *Sequence Type*), pa je tako opisano 33 ST i 49 jedinstvenih PFGE profila. Međutim, utvrđeno je da je MLST manje diskriminatorna metoda od PFGE, posebno za *M. abscessus* subsp. *abscessus*, a otkriveni su i neki sojevi s istim MLST profilom kod pacijenata koji nisu imali epidemiološku povezanost (MACHADO i sur., 2014.).

2.6 Određivanje antimikrobne osjetljivosti netuberkuloznih mikobakterija

Nakon objavljenog standarda Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) iz 2003. godine s početnim preporukama za laboratorijsko ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. antimicrobial susceptibility testing - AST) (WOODS i sur., 2003.), donesene su smjernice za dijagnostiku i liječenje NTM-a u humanoj medicini koje se najbolje primjenjuju na nekoliko vrsta ili kompleksa koji se često susreću, uključujući MAC, *M. kansasii*, *M. marinum* i neke brzorastuće mikobakterije. Nema dostupnih podataka o ostalim manje zastupljenim NTM vrstama (GRIFFITH i sur., 2007.). U tablici 1. su prikazane preporuke za liječenje nekih od najčešćih NTM-a na temelju *in vitro* rezultata ispitivanja antimikrobne osjetljivosti (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.). Nadalje, 2011. godine početne smjernice su nadopunjene novim saznanjima te se metoda mikrodilucije u bujonu počinje smatrati zlatnim standardom za AST NTM-a (CLSI, 2011.). Primjenom AST pokušava se predvidjeti klinička učinkovitost određenih antimikrobnih sredstava, te unatoč njihovoj indikaciji za protokole liječenja, za pojedine antibiotike (izoniazid, rifampin, etambutol, rifabutin i streptomycin) *in vitro* osjetljivost ne predviđa klinički odgovor kod nekih vrsta kao što je *M. avium* kompleks (VAN INGEN i sur., 2012c). Štoviše, takvi rezultati mogu dovesti i do pogrešnih protokola liječenja što dovodi do nepovratne genetske mutacije, koja bi eliminirala upotrebu specijaliziranih antimikrobnih sredstava. Stoga se preporuča da se ta sredstva ne prijavljuju kod izolata MAC-a (GRIFFITH i sur., 2007., CLSI, 2011.). Navedeni CLSI standard do danas je jedini objavljeni standard koji opisuje postupke i preporuke ispitivanja antimikrobne osjetljivosti NTM-a.

Tablica 1. Antimikrobna sredstva koja se koriste za liječenje nekih od najčešćih NTM vrsta u humanoj medicini (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.)

VRSTA	LIJEK IZBORA (na temelju rezultata AST)
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Linezolid, klaritromicin-azitromicin, amikacin, tigeciklin, cefoksitin, imipenem
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	Klaritromicin-azitromicin, linezolid, amikacin, tigeciklin, cefoksitin, imipenem

<i>M. chelonae</i>	Klaritromicin-azitromicin, linezolid, moksifloksacin, ciprofloksacin, doksiciklin, tobramicin, linezolid, amikacin, imipenem, tigeciklin
<i>M. fortuitum</i>	Ciprofloksacin, levofloksacin, moksifloksacin, trimetoprim-sulfametoksazol, linezolid, doksiciklin, klaritromicin-azitromicin, imipenem, tigeciklin, linezolid, amikacin, cefoksitin
<i>M. neoaurum</i>	Ciprofloksacin, levofloksacin, moksifloksacin, doksiciklin, linezolid, trimetoprim-sulfametoksazol, klaritromicin-azitromicin, amikacin, tobramicin, linezolid, imipenem, tigeciklin, cefoksitin
<i>M. marinum</i>	Klaritromicin-azitromicin, rifampin-rifabutin, ciprofloksacin, trimetoprim-sulfametoksazol, moksifloksacin, linezolid, doksiciklin, amikacin, linezolid
<i>M. avium</i> kompleks	Klaritromicin-azitromicin, rifampin-rifabutin, etambutol, moksifloksacin, ciprofloksacin, amikacin, streptomycin, linezolid
<i>M. kansasii</i>	Klaritromicin-azitromicin, rifampin-rifabutin, trimetoprim-sulfametoksazol, etambutol, izoniazid, moksifloksacin, ciprofloksacin, linezolid, amikacin
<i>M. malmoense</i>	Klaritromicin-azitromicin, rifabutin, rifampin
<i>M. simiae</i>	Klaritromicin-azitromicin, moksifloksacin, trimetoprim-sulfametoksazol, amikacin
<i>M. xenopii</i>	Klaritromicin-azitromicin, rifampin-rifabutin, etambutol, moksifloksacin, amikacin, streptomycin

2.6.1 Metoda mikrodilucije u bujonu

Metoda mikrodilucije u bujonu jedina je metoda koja se preporučuje za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti kod NTM-a (WOODS i sur., 1999., CLSI, 2011.). Temelji se na dvostrukom razrjeđenju pripremljenom u prilagođenom Mueller Hinton bujonu, a rezultat se

izražava kao minimalna inhibicijska koncentracija (engl. minimum inhibitory concentration – MIC) koja zaustavlja rast mikobakterija. Metoda omogućuje mjerenje točnih MIC-a inokulacijom malih (obično 100 µl) volumena bujona sa standardiziranim inokulumom od 5×10^5 CFU (engl. colony forming units) obično u formatu ploče s 96 jažica. Iako je MIC postavljena kao dvostruko razrjeđenje, MIC izolata ne predstavlja apsolutnu vrijednost, već se nalazi između najniže koncentracije koja inhibira rast (prijavljeni MIC rezultat) i sljedeće najniže koncentracije (CLSI, 2018b).

2.6.1.1 Određivanje antimikrobne osjetljivosti spororastućih netuberkuloznih mikobakterija

2.6.1.1.1 *Mycobacterium avium* kompleks

Antimikrobna terapija koja se koristi u humanoj medicini za bolest uzrokovanu pripadnicima spororastućih netuberkuloznih mikobakterija (engl. slowly growing mycobacteria - SGM), točnije pripadnicima *Mycobacterium avium* kompleksa (MAC) uključuje rifamicin (ili rifabutin), etambutol i makrolide (klaritromicin ili azitromicin), sa ili bez injekcijske aplikacije streptomicina ili amikacina. Klaritromicin i amikacin koriste se kao lijekovi prve linije, dok se u slučaju pojave otpornih sojeva koriste moksifloksacin i linezolid kao lijekovi druge linije (CLSI, 2018a, CLSI, 2018b). Makrolidi su jedina antimikrobna sredstva za koja je u kontroliranim kliničkim ispitivanjima dokazana povezanost između *in vitro* testiranja i kliničkog odgovora. Nedavni rezultati ispitivanja pokazuju da su vrijednosti *in vitro* testiranja amikacina također povezani s kliničkim odgovorom. Stoga su makrolidi i amikacin lijekovi prve linije testiranja za MAC izolate (GRIFFITH i sur., 2007., BROWN-ELLIOTT i sur., 2013.). Najniža koncentracija koja prekida rast (eng. minimum inhibitory concentration, MIC) za klaritromicin dijelom se temelji na pokusu monoterapije s makrolidima diseminirane MAC bolesti kod ljudi (CHAISSON i sur., 1994.). Izolati divljeg tipa MAC-a podjednako su osjetljivi na makrolide, ali njihova otpornost se u slučaju monoterapije razvija unutar nekoliko mjeseci, a može se također razviti i s kombiniranom terapijom. Molekularna analiza MAC izolata koji su razvili otpornost na makrolide *in vitro* pokazala je da je više od 95% izolata steklo mutacije u V domeni gena 23S rRNK (MEIER i sur., 1994., NASH i INDERLIED, 1995., MEIER i sur., 1996.). *In vitro* ispitivanje AMR ovih izolata pokazalo je vrijednosti MIC-a za klaritromicin od 32 µg/mL. Zbog toga su ove koncentracije odabrane kako bi definirale klinički značajnu otpornost. Sojevi divljeg tipa MAC-a koji nisu liječeni vjerojatno neće pokazati umjerenu osjetljivost ili otpornost na

makrolide. Potvrđena umjerena osjetljivost može ukazivati na miješanu infekciju vrstama MAC-a, te je takve slučajeve potrebno pratiti zbog pojave rezistencije (CLSI, 2018b). Stečeni mehanizam mutacijske otpornosti MAC izolata (tj. mutacija gena 23S rRNK) isti je i za klaritromicin i za azitromicin (PRAMMANANAN i sur., 1998.). Stoga treba testirati samo jedan makrolid. Zbog tehničkih poteškoća povezanih s ispitivanjem azitromicina, točnije slabe topljivosti u visokim koncentracijama lijeka koje je potrebno testirati, klaritromicin je najprikladniji lijek za ispitivanje makrolida. Nedavna istraživanja pokazala su da je otpornost na amikacin kod MAC-a i *M. abscessus*-a povezana s jednom ili više mutacija 16S rRNK (*rrs*) gena (BROWN-ELLIOTT i sur., 2013.). Stoga se potvrđivanje rezistencije na amikacin u ovim NTM vrstama može postići sekvenciranjem gena 16S rRNK kao bi se otkrila mutacija na poziciji 1408, 1409 ili 1411. Ako se *rrs* mutacija otkrije, izolat se može prijaviti kao rezistentan na amikacin. Međutim, ako jedna od gore spomenutih mutacija nije otkrivena, ne može se pretpostaviti da je izolat osjetljiv, jer može postojati neki drugi još uvijek neopisani mehanizam otpornosti. Za MAC izolate kod kojih je potvrđena otpornost na makrolide potrebno je provesti određivanje osjetljivosti na antituberkulotike druge linije, i to na moksifloksacin i linezolid. Međutim, njihova *in vivo* učinkovitost nije dokazana. Budući da su mogućnosti za liječenje infekcija otpornih na makrolide ograničene, pojavljuje se potreba za lijekovima koji sadrže klofazimin (VAN INGEN i sur., 2012a). Međutim, točke određivanja koje razdvajaju osjetljive od otpornih sojeva za klofazimin nisu određene. Stoga, ako se testira ovaj lijek treba navesti samo vrijednost MIC-a (CLSI, 2018b).

Nadalje, iako su etambutol, rifampin i rifabutin klinički učinkoviti, krajnje točke koje određuju da li je soj osjetljiv ili otporan još nisu određene, a nedavne studije opisuju kako nema povezanosti između *in vitro* testiranja i kliničkog odgovora kod pacijenata oboljelih od MAC infekcije (THE RESEARCH COMMITTEE OF THE BRITISH THORACIC SOCIETY, 2002., KOBASHI i sur., 2006.). Također streptomycin se može koristiti umjesto amikacina, no do sada nije opisana povezanost MIC vrijednosti i kliničkog odgovora, te se za streptomycin (ukoliko je testiran) prijavljuju samo MIC vrijednosti bez tumačenja rezultata (CLSI, 2018b).

2.6.1.1.2 *M. kansasii*

Lijekovi koji su klinički aktivni i koji se mogu koristiti u terapiji infekcija uzrokovanih vrstom *M. kansasii* uključuju izoniazid, rifampin i etambutol. Alternativni, tri puta tjedni protokol liječenja s rifampinom, etambutolom i klaritromicinom također se pokazao učinkovitim (GRIFFITH i sur., 2003.). Rifampin i klaritromicin preporučeni su kod testiranja

antimikrobne osjetljivosti lijekova prve linije. Iako su izoniazid i etambutol učinkoviti u liječenju infekcije *M. kansasii*, vrijednosti MIC-ova za ove agense loše su povezani s kliničkim odgovorom i ne bi se trebali prijavljivati (STEADHAM i sur., 1985.). Rezultati MIC-ova kod testiranja etambutola metodom mikrodilucije nisu ponovljivi, stoga mogu dovesti do pogrešno usmjerenog liječenja nepotrebno eliminirajući učinkovit lijek iz protokola liječenja. Određivanje antimikrobne osjetljivosti lijekova druge linije provodi se za izolate otporne na rifampin i / ili klaritromicin. Predloženi lijekovi su amikacin, ciprofloksacin, doksiciklin, linezolid, minociklin, moksifloksacin, rifabutin i trimetoprim-sulfametoksazol (CLSI, 2018a). Iako se streptomycin koristiti u kliničkoj praksi, do sada još nema objavljenih preporuka za krajnje točke kod ispitivanja antimikrobne osjetljivosti (CLSI, 2011.).

2.6.1.1.3 *M. marinum*

Objavljene smjernice preporučuju liječenje infekcije kože i mekih tkiva uzrokovane vrstom *M. marinum* s dva aktivna sredstva od jednog do dva mjeseca nakon što se simptomi povuku, ukupno oko tri do četiri mjeseca (GRIFFITH i sur., 2007.). Uspješne kombinacije antimikrobnih sredstava uključuju klaritromicin i rifampin, te klaritromicin i etambutol. U oba protokola, azitromicin može zamijeniti klaritromicin. Budući da je stečena mutacijska otpornost rijetka, a bolest uzrokovana vrstom *M. marinum* obično lokalizirana s malim brojem bakterija, terapija s jednim antibiotikom na koji je izolat osjetljiv (npr. klaritromicin, rifampin ili trimetoprim-sulfametoksazol) može biti učinkovita. Kao i u slučaju *M. kansasii*, etambutol se ne testira, jer rezultati MIC-a mikrodilucijom nisu ponovljivi i mogu dovesti do pogrešno usmjerenog liječenja (CLSI, 2018b).

2.6.1.1.4 Druge spororastuće netuberkulozne mikobakterije

Postoje brojne druge SGM koje mogu uzrokovati bolest i za koje su zabilježeni rezultati određivanja antimikrobne osjetljivosti (npr. *M. terrae* kompleks, *M. xenopi* (TORTOLI i SIMONETTI, 1995.), *M. malmoense* (BANKS i JENKINS, 1987.)). Za te se vrste trebaju testirati isti lijekovi prvog i drugog reda koji su ranije navedeni za *M. kansasii* koristeći iste vrijednosti. *M. gordonae* je rijetko klinički značajan, pa je ispitivanje antimikrobne osjetljivosti rijetko potrebno raditi. Postoje određene vrste SGM-a koje zahtijevaju točno određene uvjete za rast i također su povezane s kliničkom bolešću, npr. *M. haemophilum* za rast na hranjivim podlogama zahtjeva amonijev citrat ili hemin, dok kod *M. genavense* inkubacija traje dulje od šest tjedana (CARLSON i sur., 1998.). O tim vrstama se

malo zna i malo je objavljenih podataka da bi se mogla preporučiti standardna metoda određivanja antimikrobne osjetljivosti (CLSI, 2018b).

2.6.1.2 Određivanje antimikrobne osjetljivosti brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija

Kod određivanja antimikrobne osjetljivosti brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija (engl. rapidly growing mycobacteria - RGM), preporučena su slijedeća antimikrobna sredstva: amikacin, cefoksitin, ciprofloksacin, klaritromicin, doksiciklin/minociklin, imipenem/meropenem, linezolid, moksifloksacin, tobramicin i trimetoprim-sulfametoksazol (CLSI, 2018b). Dodatno se preporučuje testiranje tigecklina i/ili klofazimina, posebno ako je bolest uzrokovana *M. abscessus* subsp. *abscessus* izolatom. Međutim, nema dovoljno podataka o tigecklinu i klofaziminu da se uvidi povezanost *in vitro* i kliničkog odgovora, što onemogućuje određivanje točaka koje odvajaju osjetljive od otpornih sojeva. Stoga se za tigecklin i klofazimin trebaju prijaviti samo MIC-e bez tumačenja rezultata (BROWN i sur., 1996., WOODS i sur., 1999., FERNANDEZ-ROBLAS i sur., 2008., CLSI, 2018b).

Prilikom određivanja osjetljivosti na klaritromicin, vrijednosti MIC-a treba ispitati nakon 72 sata inkubacije, te ukoliko su izolati osjetljivi inkubacija se produljuje do 14 dana radi utvrđivanja inducibilne rezistencije na makrolide uzrokovane prisutnošću ribosomalne metilaze (eritromicin ribosomalna rezistentna metilaza - *erm* gen) (CLSI, 2018b). Većina izolata *M. abscessus* subsp. *abscessus* i *M. abscessus* subsp. *bolletii* sadrži funkcionalni *erm* gen (BROWN-ELLIOTT i sur., 2015.). Suprotno tome, RGM bez funkcionalnog *erm* gena uključuju *M. chelonae*, *M. mucogenicum* kompleks (*M. mucogenicum*, *M. phocaicum*, *M. aubagnense*), *M. immunogenum*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. peregrinum* i *M. senegalensis*, stoga se za njih očekuje da su osjetljivi na klaritromicin (NASH i sur., 2006., NASH i sur., 2009., BROWN-ELLIOTT i sur., 2015a i b). Za ove vrste i / ili podvrste, rezultati testa osjetljivosti na klaritromicin (samo tumačenje, bez MIC-a) mogu se prijaviti s ostalim rezultatima nakon tri do pet dana inkubacije. Za nekoliko drugih vrsta RGM, uključujući *M. fortuitum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. porcinum*, *M. goodii*, *M. smegmatis*, *M. mageritense* i *M. wolinskyi* poznato je da posjeduju *erm* gen i stoga bi trebali biti otporni na klaritromicin. Međutim, nema dovoljno podataka koji bi opravdali molekularnu procjenu osjetljivosti na klaritromicin. Stoga je za sve vrste RGM potrebna proširena (do 14 dana) inkubacija prilikom određivanja osjetljivosti na klaritromicin, uz izuzetak onih ranije navedenih vrsta s odsutnim ili nefunkcionalnim *erm* genom (CLSI, 2018b).

Analiza sekvenci sve se češće koristi za identificiranje RGM-a do razine vrste i za bolje razumijevanje molekularne osnove otpornosti na makrolide. Analiza sekvenci *rpoB* gena posebno je korisna za identificiranje utvrđenih vrsta, uključujući one koje se ne mogu razlikovati sekvenciranjem 16S rRNK ili *hsp65* gena te za prepoznavanje prethodno nepoznatih vrsta. Sekvenciranjem *erm* gena može se predvidjeti inducibilna rezistencija na makrolide (HANSON i sur., 2014., BROWN-ELLIOTT i sur., 2015b, NASH i sur., 2006.). Da bi se genotipski utvrdila inducibilna osjetljivost na klaritromicin, prvi korak je identifikacija vrste sekvenciranjem *rpoB* gena (ADÉKAMBI i sur., 2003.). Kako je već prije navedeno, za *M. abscessus* subsp. *bolletii* je poznato da ima funkcionalni *erm* gen. Za ovu podvrstu, rezultat za klaritromicin tumači se kao rezistentan (samo tumačenje, bez MIC-a), a prijavljuje se zajedno s ostalim testiranim lijekovima na ploči i to nakon tri do pet dana inkubacije, neovisno o vrijednostima MIC-a. Ako je izolat identificiran kao *M. abscessus* subsp. *abscessus* analizom sekvence *rpoB* gena, mora se provesti sekvenciranje *erm* gena da bi se precizno procijenila osjetljivost na klaritromicin (CLSI, 2018b). Skupine I, VI i VII unutar *M. abscessus* kompleksa, koji čine oko 80% izolata, otporne su na klaritromicin i mogu se prijaviti kao takvi (samo tumačenje, bez MIC-a) s drugim lijekovima nakon tri do pet dana inkubacije. Skupina II (Mab30) ima nefunkcionalni *erm* gen. Stoga su ovi izolati osjetljivi na klaritromicin i mogu se prijaviti kao takvi (samo interpretacija, bez MIC-a) s ostatkom ploče. U novije vrijeme često se javljaju *M. abscessus* subsp. *abscessus* izolati sa skraćenom sekvencom *erm* gena. Teoretski, takvi bi izolati trebali biti osjetljivi na klaritromicin, ali do danas nema dovoljno podataka koji bi potvrdili ovu pretpostavku. Stoga za ove izolate konačno očitavanje rezultata za klaritromicin treba biti nakon 14 dana, osim ako vrijednost MIC-a nije <16 µg/ml ranije. Ako je 14. dana MIC 8µg/ml, ispitivanje treba ponoviti (CLSI, 2018b).

Nadalje, prilikom određivanja osjetljivosti na imipenem kod pripadnika *M. fortuitum* grupe (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. senegalense*, *M. setense*, *M. septicum*, *M. porcinum*, *M. houstonense*, *M. boenickei*, *M. brisbanense*, *M. neworleansense*), *M. smegmatis* grupe (*M. smegmatis*, *M. goodii*) i *M. mucogenicum* grupe (*M. mucogenicum*, *M. aubagnense*, *M. phocaicum*) u slučaju da je MIC vrijednost > 8µg/ml testiranje je potrebno ponoviti uz inkubaciju ne dulje od tri dana. Ako je vrijednost MIC-e ponovljenog testa > 8µg/ml, MIC se ne prijavljuje zbog nestabilnosti antibiotika. Za sve izolate *M. fortuitum*, *M. smegmatis* i *M. mucogenicum* grupe smatra se da su osjetljivi na imipenem na temelju opisanog kliničkog odgovora (CLSI, 2018b).

2.7 Netuberkulozne mikobakterijske infekcije u životinja

Mnoge vrste netuberkuloznih mikobakterija djeluju kao oportunistički patogeni u životinja te mogu uzrokovati promjene poput limfadenitisa, infekcije pluća, kože, mekih tkiva, tetiva, zglobova i kostiju (FALKINHAM, 1999.). Poznato je da različite vrste patogenih mikobakterija imaju svoje odabrane domaćine, ali povremeno mogu izazvati infekciju i u drugih vrsta (QUINN i sur., 2011.). Infekcije uzrokovane NTM vrstama uglavnom su vezane za probavni sustav, što se dokazalo izolacijom uzročnika iz crijevnog sadržaja i mezenterijalnih limfnih čvorova (KANKYA i sur., 2011.). Ostali opisani načini prijenosa su kožni i respiratorni putevi prilikom udisanja prašine tijekom ispaše (COURTENAY i sur., 2006.). Na sjevernoj hemisferi izloženost životinja na pašnjacima postaje očita tijekom sezonske ispaše. Naime, tijekom jeseni kvaliteta trave se smanjuje kako biljke ulaze u razdoblje vegetativne neaktivnosti, te u tom razdoblju dolazi do najraširenije infekcije životinja mikobakterijama iz tla. Pritom su nespecifični odgovori na kožne testove tuberkulinizacijom česti u ranu zimu (BIET i BOSCHIROLI, 2014.). Potencijalni čimbenici koji dovode ne samo do lažno pozitivnih nego i do lažno negativnih odgovora na test tuberkulinizacije mogu se povezati s NTM infekcijama koje su često podcijenjene (HOPE i sur., 2005.).

Pripadnici *M. avium* kompleksa (MAC) u goveda obično uzrokuju vidljive neprogresivne lezije. Međutim, ponekad mogu izazvati neznatnu prolaznu hiperplaziju limfnih čvorova, posebno u probavnom traktu (LUCAS i GAYOT, 1967.), a kod pojedinih životinja i tuberkulozne lezije u limfnim čvorovima (DVORSKA i sur., 2004.). Povremeno su opisani i mastitis, metritis, infekcija testisa i upala pluća, kao i sistemske infekcije (THOEN i sur., 1981., THOREL i sur., 2001., DVORSKA i sur., 2004.). *M. avium* subsp. *hominissuis* često je izdvojen iz svinja s lezijama u limfnim čvorovima probavnog sustava (MATLOVA i sur., 2005.). Također je oportunistički patogen za druge sisavce i ljude s oslabljenim imunološkim sustavom, otuda i naziv "hominissuis" (MIJS i sur., 2002.). Nadalje, *M. avium* subsp. *hominissuis* i subsp. *avium* često su izdvojeni iz goveda koji su pokazali nespecifične reakcije prilikom testa tuberkulinizacije (DVORSKA i sur., 2004.). Više mikobakterijskih vrsta može izazvati tuberkulozu u ptica, a najčešći uzrok ptičje tuberkuloze je *M. avium* subsp. *avium*, slijedi *M. genavense*, te rjeđe *M. intarcellulare*, *M. scrofulaceum* i *M. fortuitum* (DHAMA i sur., 2011.).

M. kansasii u goveda je povremeno povezan s lezijama u limfnim čvorovima dišnog sustava (WATERS i sur., 2010.), a izdvojen je iz tkiva goveda koja su pokazala pozitivnu reakciju na test tuberkulinizacije.

M. fortuitum izdvojen je kod mastitisa (PETERSON, 1965.), a lezije uzrokovane ovim uzročnikom potvrđene su i u svinja (CADMUS i sur., 2010.).

M. nonchromogenicum izdvojen je iz goveda koja su pokazala pozitivnu ili negativnu reakciju na test tuberkulinizacije, obično bez vidljivih lezija (HUGHES i sur., 2005., MCCORRY i sur., 2004.).

Mnoge manje poznate vrste NTM-a do sada su izdvojene iz domaćih i divljih životinja, ali njihova uloga u tim domaćinima, posebno u nedostatku kliničkih znakova i patomorfoloških promjena, još nije razjašnjena (DHAMA i sur., 2011.).

2.7.1 Zastupljenost netuberkuloznih vrsta mikobakterija u domaćih i divljih životinja na području Europe

Studija provedena u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2000. do 2004. godine opisuje 183 izolata NTM-a izoliranih iz limfnih čvorova svinja, od kojih je MAC najčešći izolat (175 izolata, 95,7%) i to *M. avium* subsp. *avium* (37 izolata, 21.1%) i *M. avium* subsp. *hominissuis* (138 izolata, 78.9%), slijedi *M. fortuitum* (6 izolata, 3.3%), *M. chelonae* (1 izolat, 0.5%) i *M. peregrinum* (1 izolat, 0.5%) (CVETNIĆ i sur., 2007.). Slične rezultate također opisuje studija provedena na svinjama u razdoblju od 2001. do 2006. godine gdje je izdvojeno 139 izolata od kojih su također najčešći MAC (124 izolata), a dokazane vrste su *M. avium* subsp. *hominissuis* u većini izolata (118 izolata) i *M. avium* subsp. *avium* (3 izolata), slijede izolati pripadnici *M. tuberculosis* kompleksa (7 izolata), zatim *M. fortuitum* (5 izolata) i *M. peregrinum* (1 izolat), dok za dva izolata identifikacija vrste nije uspjela. Ista studija opisuje i izolate *M. avium* subsp. *hominissuis* u divlje svinje (1 izolat), jelena (1 izolat) i čovjeka (3 izolata) (ŠPIČIĆ i sur., 2010.). U razdoblju od 2001. do 2005. godine opisano je 15 izolata NTM-a i u divljih svinja od kojih je MAC najčešći izolat (11 izolata, 8,9%) i to *M. avium* subsp. *hominissuis* u svih izolata, slijedi *M. fortuitum* (2 izolata, 1,6%) i *M. gordonae* (2 izolata, 1,6%). Kao i u svinja iz intenzivnog uzgoja, *M. avium* subsp. *hominissuis* predstavlja dominantnu vrstu mikobakterija u divljih svinja u Hrvatskoj (CVETNIĆ i sur., 2011.). Također je provedeno pretraživanje hrane i raznih materijala iz okoliša na deset svinjogojskih farmi, gdje su opisani izolati MAC i to *M. intracellulare*, zatim *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. vaccae*, *M. gordonae*, *M. phlei* i *M. triviale*. U isto vrijeme pretraživane su i svinje iz istih farmi iz kojih su izdvojeni izolati MAC i to *M. intracellulare* kao najčešći izolat (89,29%), zatim *M. fortuitum* (8,33%), *M. chelonae* (1,19%) i *M. terrae* (1,19%), iz čega se može zaključiti kako je najčešći izvor infekcije NTM vrstama upravo kontaminirani okoliš (CVETNIĆ i sur., 1998.).

Nedavna studija provedena u Francuskoj opisuje 38 različitih vrsta NTM-a izdvojenih iz goveda od kojih je MAC najčešći izolat (41%) gdje je *M. avium* subsp. *hominissuis* također zastupljeniji od *M. avium* subsp. *avium*, zatim slijedi *M. nonchromogenicum* (26,13%), *M. monacense* (2,26%), *M. vaccae* (1,94%), *M. terrae* (1,29%), *M. kansasii* (1,29%) i ostale, dok kod 10,97% izolata identifikacija vrste nije uspjela (BIET i BOSCHIROLI, 2014.). U Irskoj autori opisuju u goveda najveću zastupljenost vrste *M. nonchromogenicum*, slijedi MAC, *M. malmoense* i *M. kansasii* (HUGHES i sur., 2005.). Studija provedena u Sloveniji opisuje zastupljenost MAC u svinja od 47,3%, od čega 60,9% pripada *M. avium* subsp. *hominissuis* i 33,8% *M. avium* subsp. *avium* (PATE i sur., 2004.). *M. celatum* opisan je u svinje i jelena u Sloveniji, te je također utvrđena infekcija istim uzročnikom u čovjeka (PATE i sur., 2011.). U Švicarskoj su opisani izolati MAC kao jedini izdvojeni u domaće peradi i to *M. avium* subsp. *avium*, dok je *M. fortuitum* opisan kao najčešći izolat u svinja, slijede *M. avium* subsp. *avium*, *M. intracellulare*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. xenopi* i jedna neidentificirana NTM u svinja. Budući da su izolati *M. avium* izdvojeni iz svinja pokazali zajedničke genetske karakteristike sa *M. avium* izdvojenih iz ljudi, smatra se da su svinje potencijalni izvor zaraze za ljude (BONO i sur., 1995.). Studija provedena u Španjolskoj opisuje 14 različitih vrsta NTM u divljih svinja, od kojih je najčešći *M. chelonae* (133 izolata, 60,7%), slijedi MAC (24 izolata, 11%), *M. intracellulare* (11 izolata, 5%), *M. nebraskense* (11 izolata, 5%) i ostale (GARCIA-JIMENEZ i sur., 2015.).

2.8 Netuberkulozne mikobakterijske infekcije u ljudi

Opisano je oko 25 različitih vrsta NTM kao uzročnika mikobakterioza u ljudi, dok kod ostalih vrsta (njih > 170) koje su većinom okolišni mikroorganizmi do sada nije utvrđeno da uzrokuju bolest u ljudi (VAN INGEN, 2013a). Netuberkulozne mikobakterijske (NTM) infekcije u ljudi mogu se svrstati u tri glavne skupine: (i) infekcije kože i mekih tkiva, (ii) izolirane plućne mikobakterioze i (iii) ekstrapulmonalne visceralne infekcije/diseminirane infekcije.

Infekcije kože i mekih tkiva gotovo su uvijek posljedica slučajnih/jatrogenih ozljeda. Očituju se tvorbom potkožnih čvorića, apscesa, čireva, a češće su uzrokovane brzorastućim mikobakterijskim vrstama, uključujući *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum* i *M. neoaurum* (EL HELOU i sur., 2013.). *M. marinum* ili *M. fortuitum* često uzrokuju i granulomatozne upale na rukama i nogama. *M. marinum* smatra se najčešćom netuberkuloznom mikobakterijom koja uzrokuje izvan plućne infekcije u ljudi, a izvor su

inficirane ribe i kontaminirana voda (AUBRY i sur., 2017.). Također vrste *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, te novije vrste poput *M. arupense*, *M. virginense* i *M. heraklionense*, često uzrokuju infekcije kože, mekih tkiva i kostiju (GRIFFITH i sur., 2007., VASIREDDY i sur., 2016.).

Izolirane plućne mikobakterioze obično se pojavljuju u pacijenata s već postojećim plućnim bolestima, najčešće emfizemom ili bronhiektazijom, a mogu biti i posljedica genetskih/nasljednih poremećaja koji rezultiraju promjenama u građi pluća i/ili poremećajima imunološkog sustava (SONNENBERG i sur., 2000.). Najčešće se očituju kao sporo progresivne i vrlo teško izlječive bolesti, a najčešće ih uzrokuju vrste *M. avium* kompleksa i *M. abscessus*. Nedavna istraživanja također dokazuju povećan rizik od plućne NTM bolesti kod primjene imunosupresivnih lijekova (ANDREJAK i sur., 2013.). Ekstrapulmonalne visceralne infekcije/obično diseminirane infekcije pojavljuju se u imunokompromitiranih pacijenata koji boluju od sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS), malignih bolesti i osoba nakon transplantacije, a najčešće ih uzrokuju vrste *M. avium* kompleksa i *M. simiae* (VAN INGEN i SOOLINGEN, 2011., VAN INGEN, 2013a, ŽMAK i sur., 2013.). Ostale važne spororastuće vrste uključuju *M. kansasii*, drugi najčešći uzrok diseminirane infekcije NTM-a u bolesnika s AIDS-om (JONES i HAVLIR, 2002.).

Zbog prisutnosti NTM-a u okolišu (tlo i voda), određivanje kliničkog značaj izolata nije uvijek dobro razjašnjeno. Klasičan primjer je izdvajanje pripadnika *M. mucogenicum* skupine (skupina RGM-a koja se često susreće u vodi iz slavine) iz respiratornog uzorka koji obično ukazuje na okolišnu kontaminaciju, dok se isti mikroorganizam također izdvojio iz krvnih kultura ili mjesta središnjeg venskog katetera što ukazuje na sepsu uzrokovanu mikobakterijama. Nalaz bilo koje NTM vrste na obično sterilnim mjestima u tijelu kao što su krv, tkivo, cerebrospinalna tekućina, pleuralna tekućina, mozak itd., gotovo je uvijek klinički značajan. Također, izolacija NTM-a u imunološki oslabljenih domaćina, povećava mogućnost kliničkog značaja organizma uključujući i tipično nepatogene vrste. Za respiratorne uzorke, broj pozitivnih kultura i broj poraslih kolonija također su važne za određivanje kliničke važnosti NTM-a. Izolati dobiveni iz više uzoraka i s velikim brojem kolonija su gotovo uvijek klinički značajni, dok oni s malim brojem kolonija u pojedinom uzorku vjerojatno nisu (CLSI, 2008b).

2.8.1 Zastupljenost netuberkuloznih vrsta mikobakterija u ljudi na području Europe

Vrste pripadnici MAC-a odgovorne su za najveći broj infekcija u svijetu, no regionalno se zastupljenost pojedinih vrsta NTM-a u ljudi značajno razlikuje. Tako je otkriveno da *M. xenopi* dominira u Mađarskoj gdje obuhvaća 49% svih NTM-a, *M. kansasii* prevladava u Poljskoj i Slovačkoj. Brzo rastuće mikobakterije obuhvaćaju 10–20% svih NTM izolata širom svijeta, ali 50% svih NTM plućnih izolata u Tajvanu. Među vrstama MAC, *M. avium* najčešći je u Sjevernoj i Južna Americi te Europi, dok je *M. intracellulare* najčešći u Južnoj Africi i Australiju (HOEFSLOOT i sur., 2013.).

U pacijenata u Europskoj Uniji opisano je čak 99 različitih vrsta od kojih su *M. avium*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. intracellulare* i *M. fortuitum* najčešće zastupljene, a gotovo 7% izolata nije bilo moguće identificirati kao službeno priznate vrste (VAN DER WERF i sur., 2014.). U Engleskoj, Walesu i Sjevernoj Irskoj zabilježeno je povećanje infekcija uzrokovanih NTM-a, gdje je najzastupljenija vrsta *M. intracellulare*, zatim slijedi *M. malmoense* i *M. kansasii*. *M. gordonae* pokazao je najveći porast tijekom razdoblja ispitivanja s porastom od jednog opisanog slučaja u 1995. na 153 slučaja u 2006. godini (MOORE i sur., 2014.). Studija provedena u Španjolskoj opisuje 805 izolata NTM u ljudi, od kojih su najzastupljenije vrste MAC, slijede *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. abscessus* i *M. kansasii* (HOEFSLOOT i sur., 2013.). U Grčkoj su opisane vrste MAC kao najzastupljenije, slijedi *M. abscessus*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*, a 17% je ostalo neidentificirano (PANAGIOTOU i sur., 2014.). U Italiji je opisano 16 različitih vrsta, od kojih je najzastupljenija *M. avium*, slijedi *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* i *M. celatum* (RINDI i GARZELLI, 2016.). Studija provedena u Nizozemskoj također opisuje MAC kao najzastupljenije, slijede *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. celatum* i *M. malmoense* (VAN INGEN i sur., 2009.). U Portugalu kao najzastupljenije su opisane vrste MAC (*M. intracellulare* 16% i *M. avium* 7%), zatim slijedi *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. peregrinum*, *M. triplex*, *M. szulgai*, *M. mucogenicum*, *M. lentiflavum* i *M. simiae* (AMORIM i sur., 2010.).

U Republici Hrvatskoj studija provedena u razdoblju od 2006. do 2010. u hrvatskih građana na temelju izdvajanja NTM-a izoliranih iz respiratornih uzoraka opisuje kako je *M. gordonae* najčešći izolat, slijedi *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, MAC, *M. abscessus*, *M. intracellulare* i *M. kansasii* (JANKOVIĆ i sur., 2013.). Nadalje, još jedna studija provedena

u Republici Hrvatskoj također opisuje *M. gordonae* kao najčešći izolat, zatim slijedi *M. fortuitum*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae* i *M. xenopi* (ZLOJTRO i sur., 2015.).

2.9 Netuberkulozne mikobakterije u okolišu

Učestalost plućnih infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama (NTM) posljednjih godina raste u cijelom svijetu (ADJEMIAN i sur., 2012., STROLLO i sur., 2015.). U zapadnim zemljama je dokazano da padom broja infekcija vrstom *M. tuberculosis* raste učestalost infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama (HOEFSLOOT i sur., 2013.). Taj porast posljedica je napretka u dijagnostici i detekciji uzročnika, evoluirajućih faktora domaćina poput povećanja broja imunokompetentnih osoba, te porasta izloženosti ljudi NTM-ama u okolišu. NTM su sveprisutne u okolišu i dokazane su u više različitih prirodnih i umjetnih izvora vode i tla. One su saprofiti, simbionti ili komenzali i također su izdvojene i iz domaćih i divljih životinja, mlijeka i mliječnih proizvoda, kao i manje poznatih izvora poput biofilma, beskralježnjaka i protozoa. Pri tomu važnu ulogu imaju građa stanične stijenke i njihova velika sposobnost prilagodbe (BIET i sur., 2005., FALKINHAM, 2009., FARIA i sur., 2015.). Jedna od najvažnijih značajki mikobakterija je hidrofobna, vanjska membrana bogata lipidima koja im omogućuje širenje aerosolom, površinsko prijanjanje, stvaranje biofilma i otpornost na dezinficijense i antibiotike. NTM su oligotrofi, imaju sposobnost rasta pri niskim razinama ugljika, što ih čini vrlo otpornima u sredinama s niskim hranjivim tvarima i dezinficiranoj sredini, poput vode (FALKINHAM, 2009.).

2.9.1 Netuberkulozne mikobakterije u zemlji, prašini i vodi

Netuberkulozne mikobakterije (NTM) izdvojene su iz kućne prašine, kao i iz zemlje u prirodi ili komercijalno dostupne (ICHIYAMA i sur., 1988., TORVINEN i sur., 2010.). Budući da se prašina i zemlja lako suspendiraju u zrak, udisanje NTM-a iz ovih izvora predstavlja značajan izvor infekcije (DAWSON, 1971.). Nadalje, opisani su identični genotipovi između kliničkih izolata MAC-a i izolata iz tla u pojedinaca koji su se bavili vrtlarstvom (FUJITA i sur., 2013.). Iz prašine usisavača izdojeno je 120 sojeva NTM-a, uključujući 50 sojeva *M. intracellulare*, od kojih su 44% serotipovi koji mogu uzrokovati bolest u ljudi (DAWSON, 1971., TORVINEN i sur., 2010.).

NTM izdvojene su iz riječnih voda (ICHIYAMA i sur., 1988.), kao i iz komunalnih vodnih sustava s obzirom da su otporne na većinu dezinficijensa i sredstava za čišćenje, uključujući klor i kloramin (FALKINHAM i sur., 2008.). Također su opisane u obliku

biofilmova kolonizirajući unutarnje površine vodovodnih cijevi i slavina (BENDINGER i sur., 1993., STELMACK i sur., 1999.).

2.9.2 Uloga slobodnoživućih ameba u ekologiji netuberkuloznih mikobakterija

Slobodnoživuće amebe su protozoe sveprisutne u vodenim sustavima. Uglavnom se hrane bakterijama fagocitozom, a opisano je da fagocitiraju i mikobakterije koje opstanu unutar amebe dulje vrijeme bez ikakvih štetnih učinaka (STRAHL i sur., 2001.). Ameba predstavlja velik i važan rezervoar NTM-a u vodenim sustavima, gdje ih NTM koriste kao sredstvo zaštite pa čak i za replikaciju (OVRUTSKY i sur., 2013.). U cjelogodišnjem istraživanju mreže pitke vode, opisan je visok broj NTM-a u 87,6% izdvojenih kultura ameba (DELAFONT i sur., 2014.). Pokazalo se da su ciste *Acanthamoeba* otporne na inaktivaciju klorom i drugim sredstvima koja se koriste za dezinfekciju pitke vode (COULON i sur., 2010.). Encistirana ameba tako štiti NTM od inaktivacije tijekom različitih procesa dezinfekcije (THOMAS i sur., 2004.). Uvaženo je mišljenje da je sposobnost NTM-a da raste u ljudskim makrofazima posljedica "treninga" u protozoama i amebama. Nadalje, opisano je da su se *M. avium* uzgajane u amebama pokazale virulentnijima (CIRILLO i sur., 1997.).

2.9.3 Utjecaj temperature na netuberkulozne mikobakterije

NTM su relativno otporne na visoke temperature, s optimalnim rastom između 28 i 37°C (FALKINHAM i sur., 2001.). Zbog svoje sklonosti toploj vodi, NTM su opisane u zraku ili vodi na 72% testirana mjesta s vrućom kupkom ili bazenom za terapiju (GLAZER i sur., 2007.). Ova toplinska otpornost NTM u odnosu na ostale mikroorganizme koje nalazimo u pitkoj vodi doprinosi velikom broju NTM u zgradama ili bolnicama s cirkulacijskim sustavima tople vode (DU MOULIN i sur., 1988., TICHENOR i sur., 2012.). Različite vrste NTM različito su osjetljive na više temperature, pa se tako broj kolonija *M. avium* smanjuje na 52–55°C, dok *M. chelonae* i *M. xenopi* zahtijevaju temperature veće od 60°C za smanjenje broja kolonija (SCHULZE-RÖBBECKE i BUCHHOLTZ, 1992.). U studiji pasterizacije mlijeka pokazalo se da su *M. avium*, *M. intracellulare* i *M. kansasii* preživjele izloženost temperaturi od 63°C u trajanju od 30 minuta (GRANT i sur., 1996.). Nadalje, opisano je da zagrijavanje pri temperaturi od 100°C kroz najmanje pet minuta bilo u kipućoj vodi ili u pećnici inaktivira mikobakterije (ZWADYK i sur., 1994.).

2.9.4 Izvori mikobakterija u okolišu

Različite vrste NTM-a mogu imati različite tendencije za različite okolišne niše. Tako su *M. avium* i *M. chimaera* opisane u vodi (WALLACE i sur., 2013., LANDE i sur., 2015.), dok je *M. intracellulare* opisana samo u tlu, prašini, zemlji i tresetu (REZNIKOV i sur., 1971., DE GROOTE i sur., 2006., CAYER i sur., 2007.). *M. fortuitum*, *M. chelonae* i *M. abscessus* široko su rasprostranjeni u okolišu u relativno velikom broju. Izolirani su iz slatkovodnih rijeka i jezera, morske i otpadne vode iz bolnica i korita za piće životinja (FALKINHAM, 1996.). Prisutnost *M. kansasii* opisana je u uzorcima vode (POWELL i STEADHAM, 1981.), ali i u zemlji i humusu (THOREL i sur., 2004.). Također je provedeno testiranje hrane i raznih materijala iz okoliša na 10 svinjogojskih farmi gdje je izdvojeno više vrsta NTM-a (CVETNIĆ i sur., 1998.). *M. chimaera* je vrsta odgovorna za nedavno zagađenje instrumenata koji se koriste za vrijeme operacija srčanih bolesti (PERKINS i sur., 2016.). Nadalje, distribucija NTM vrsta koje su izolirane iz kliničkih uzoraka razlikuje se po regijama (HOEFSLOOT i sur., 2013.). Razlozi za to su nejasni, a mogu biti vezani za tendenciju pojedine vrste na različite faktore u okolišu kao što su sastav tla, izvor vode, temperatura, vlaga, aktivnosti i industrije koje rezultiraju stvaranjem aerosola. Druga studija opisuje kako geografska područja visokog rizika za infekciju MAC-om imaju veći udio površinskih voda, veće razine vlage, te veći postotak bakra i natrija, a manji mangana u tlu (ADJEMIAN i sur., 2012.).

3 OBRAZLOŽENJE TEME

Postotak infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama u ljudi u stalnom je porastu osobito među imunokompromitiranim bolesnicima, a identifikacija uzročnika bolesti je kompleksna i traje više tjedana. U veterinarskoj medicini nalaz netuberkuloznih mikobakterija također je u porastu, a rezultati određivanja antimikrobne otpornosti takvih izolata dosada nisu opisani u literaturi. Do sada je opisano oko 200-tinjak različitih vrsta netuberkuloznih mikobakterija od kojih je određeni broj potencijalno patogen za životinje i ljude, sposoban uzrokovati limfadenitis i infekcije pluća, kože, mekih tkiva, zglobova, tetiva, kostiju i drugih organa, a zaraziti se može izravnim dodirrom ili aerosolom. Našim istraživanjem obuhvaćeno je pretraživanje ukupno 593 uzorka različitih organa i tkiva podrijetlom iz domaćih i divljih životinja, koje smo bakteriološki pretražili na prisutnost *Mycobacterium* sp. Uz to dodatno je pretraživan i 71 arhivski izolat netuberkuloznih mikobakterija podrijetlom iz domaćih i divljih životinja. Pripadnost rodu izdvojenih i arhivskih izolata odredili smo umnažanjem regije 16S rRNK gena i gena koji kodira 65 kDa antigen, a identifikaciju do razine vrste metodom hibridizacije komercijalnim testom. Izolate potvrđene kao podvrstu *M. avium* podvrgnuli smo amplifikaciji integriranog insercijskog slijeda IS901 radi određivanja podvrste. Kod neidentificiranih izolata sekvencirali smo slijedeće gene: *hsp65*, *rpoB*, 16S rRNK i ITS sekvenca, a rezultate usporedili s izolatima iz baza podataka radi određivanja vrste. Kod svih izolata ispitali smo osjetljivost na antibiotike tehnikom mikrodilucije u bujonu, te smo mapirali zone u Republici Hrvatskoj u kojima smo utvrdili sojeve otporne na testirane antibiotike i time prosudili mogući zoonotski potencijal na temelju usporedbe izdvojenih vrsta netuberkuloznih mikobakterija iz domaćih i divljih životinja s izolatima iz ljudi. Statističkom analizom usporedili smo pojavnost otpornih sojeva s obzirom na vrstu mikobakterije, vrstu životinje iz koje je izdvojen, te mjesto i godinu izolacije, kao i razlike u otpornosti na različite antibiotike između brzo i spororastućih mikobakterija.

U Republici Hrvatskoj se ovakav način identifikacije vrsta netuberkuloznih mikobakterija kao niti određivanje antimikrobne otpornosti dosada nije provodilo, te će naši rezultati pridonijeti rutinskoj identifikaciji uzročnika bolesti kako u veterinarskoj tako i u humanoj medicini. Brza i točna identifikacija do razine vrste neophodna je za kasnije određivanje antimikrobne otpornosti i odabir etiološke terapije u liječenju infekcija netuberkuloznim mikobakterijama u humanoj i veterinarskoj medicini, čemu će naši rezultati i uvedene metode uvelike pomoći. Rasprostranjenost vrsta netuberkuloznih mikobakterija je uvelike geografski specifična te će

uz rezultate istraživanja antimikrobne otpornosti ukazati na distribuciju, značaj i razlike u otpornosti na pojedine antibiotike u divljih i domaćih životinja na području Republike Hrvatske. Validirana i standardizirana metoda bila bi prihvatljiva i korisna za naš zdravstveni sustav, te će u konačnici dobiveni rezultati omogućiti procjenu zoonotskog potencijala, kao i dati stvarni uvid u stanje proširenosti netuberkuloznih mikobakterija i njihove antimikrobne otpornosti u ekosustavu Republike Hrvatske.

Glavni ciljevi bili su:

- identificirati vrste NTM-a izdvojenih iz domaćih i divljih životinja
- utvrditi nove postupke identifikacije vrsta brzo i spororastućih mikobakterija temeljenih na molekularnim metodama
- utvrditi antimikrobnu osjetljivost izdvojenih brzo i spororastućih mikobakterija metodom mikrodilucije u bujonu
- odrediti geografsku raširenost i zastupljenost brzo i spororastućih vrsta NTM-a u domaćih i divljih životinja na području Republike Hrvatske
- prosuditi razlike antimikrobne rezistencije pojedinih vrsta mikobakterija prema životinjskoj vrsti
- utvrditi geografsku rasprostranjenost pojedinih vrsta NTM-a s obzirom na antimikrobnu otpornost u Republici Hrvatskoj
- prosuditi mogući zoonotski potencijal na temelju usporedbe izdvojenih vrsta NTM-a iz domaćih i divljih životinja s izolatima iz ljudi

4 MATERIJAL I METODE

4.1 Materijal

4.1.1 Uzorkovanje materijala

U svrhu provođenja istraživanja koristili smo arhivske uzorke organa i tkiva za izdvajanja mikobakterija, te arhivske izolate netuberkuloznih mikobakterija podrijetlom iz domaćih i divljih životinja koji su prikupljeni u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti (Nacionalni referentni laboratorij za tuberkulozu), Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu u razdoblju od 2012. do 2016. godine. Uzorke su tijekom navedenog razdoblja dostavljali djelatnici veterinarskih organizacija, klinika ili zavoda s područja 14 županija i Grada Zagreba u Republici Hrvatskoj u sklopu programa nadziranja bolesti propisanih od strane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske:

- Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2012., 2013., 2014. i 2015. godini (NN 17/2012, NN 3/2013, NN 160/2013, NN 3/2015)
- Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju od 1. siječnja do 31. ožujka 2016. godine (NN 141/ 2015)
- Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju od 1. travnja do 31. prosinca 2016. godine (NN 31/2016)
- Naputci o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih Naredbama o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2012., 2013., 2014., 2015. i 2016. godini (NN 30/2012, NN 26/13, NN 18/2014, NN 35/2015, NN 47/2016)
- Naputak o izmjeni naputka o načinu provođenja mjera kontrole zdravlja životinja propisanih naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2012. godini (NN 126/2012)
- Pravilnik o mjerama za suzbijanje i iskorjenjivanje tuberkuloze goveda (NN 34/13)
- Programi iskorjenjivanja i nadziranja tuberkuloze goveda u Republici Hrvatskoj u 2014., 2015. i 2016. godini (KLASA: 322-02/13-01/191 URBROJ: 525-10/1288-13-1, KLASA: 322-01/14-01/1898 URBROJ: 525-10/1288-14-1, KLASA: 322-01/15-01/1078 URBROJ: 525-10/1288-16-1)

- Programi utvrđivanja prisutnosti uzročnika *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa u divljih životinja 2013., 2014. i 2015. godine (KLASA: 322-02/12-01/114 URBROJ: 525-10/1288-13-1, KLASA: 322-02/13-01/188 URBROJ: 525-10/1288-13-1, KLASA: 322-01/14-01/1900 URBROJ: 525-10/1288-15-2

U sklopu navedenih programa dostavljani su uzorci podrijetlom od goveda, svinja, divljih svinja i srna. Sva goveda u kojih su utvrđene pozitivne reakcije na tuberkulin privedene su klanju, a u slučaju nalaza patoanatomskih promjena na liniji klanja koje upućuju na tuberkulozu službeni ili ovlašteni veterinar dostavio je promijenjene limfne čvorove ili promijenjene parenhimske organe (slezena, pluća, jetra) radi potvrde ili isključivanja tuberkuloze u službeni laboratorij. U slučaju kada na trupovima nije bilo vidljivih patoanatomskih promjena, na laboratorijsku pretragu dostavljeni su uzorci sljedećih limfnih čvorova/organa: retrofaringealni, bronhijalni, medijastinalni, supramamarni, mandibularni, mezenterijalni i uzorak tkiva jetre. Osim redovitim provođenjem tuberkulinizacije, nadzor tuberkuloze goveda provodi se i *post mortem* pregledom goveđih trupova na liniji klanja pri redovitom klanju zdravih goveda, te uslijed uočenih promjena dostavljeni su promijenjeni limfni čvorovi ili/i parenhimski organi. Također, navedeni materijal je dostavljen i u slučaju nalaza patoanatomskih promjena u svinja na liniji klanja. Materijal podrijetlom od divljih svinja i srna dostavljen je nakon odstrijela divljači prilikom provođenja gore navedenog programa. Nadalje, dio uzoraka uključenih u naše istraživanje podrijetlom od kokoši, pataka, ovaca i koze vlasništvo su Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI), a dostavljeni su u Laboratorij za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti nakon provedene razudbe na patologiji HVI-a pod sumnjom na tuberkulozu.

4.1.2 Uzorci materijala za bakteriološku pretragu

Istraživanje smo proveli na ukupno 217 životinja i to krava, svinja, kokoši, pataka, ovaca, koza, divljih svinja i srna, a istraživanjem je obuhvaćena i pretraga 71 arhivskog izolata netuberkuloznih mikobakterija podrijetlom iz 64 životinje tijekom istraživnog razdoblja od 2012. do 2013. godine s područja devet županija i Grada Zagreba (Tablica 2.) te pretraga 593 arhivskih uzoraka podrijetlom iz 153 životinje tijekom razdoblja od 2014. do 2016. godine s područja 14 županija i Grada Zagreba (Tablica 3. i 5.).

Arhivske izolate do početka pretrage čuvali smo pri temperaturi – 80°C koristeći CryoBank metodu skladištenja, a arhivke uzorke u zamrzivaču pri temperaturi – 20°C. Arhivski izolati prije skladištenja bili su identificirani samo do razine roda *Mycobacterium* umnažanjem gena koji kodira 65 kDa antigen.

Tijekom istraživanog petogodišnjeg razdoblja obradili smo 12 arhivskih izolata podrijetlom od 12 životinja (11 izolata iz 11 goveda i 1 izolat iz svinje) iz 2012. godine s područja sedam županija; 59 arhivskih izolata podrijetlom od 52 životinje (3 izolata iz 3 goveda, 4 izolata iz 4 svinje, 3 izolata iz 3 kokoši i 49 izolata iz 42 divlje svinje) iz 2013. godine s područja šest županija; 261 arhivski uzorak podrijetlom od 78 životinja (42 uzorka iz 23 goveda, 12 uzorka iz 12 svinja, 5 uzorka iz 3 kokoši, 2 uzorka iz 1 patke i 200 uzorka iz 39 srna) iz 2014. godine s područja 11 županija; 117 arhivskih uzoraka podrijetlom od 48 životinja (84 uzorka iz 17 goveda, 1 uzorak iz 1 svinje, 2 uzorka iz 1 kokoši, 3 uzorka iz 2 ovce i 117 uzorka iz 27 srna) iz 2015. godine s područja šest županija; te 125 arhivskih uzoraka podrijetlom od 27 životinja (57 uzorka iz 9 goveda, 1 uzorak iz 1 koze, 2 uzorka iz 2 ovce, 1 uzorak iz 1 patke i 64 uzorka iz 14 srna) iz 2016. godine s područja devet županija (Tablica 4. i 5.).

Tablica 2. Broj obrađenih životinja tijekom istraživanog razdoblja (od 2012. do 2013.)

ŽUPANIJA	VRSTA ŽIVOTINJE I GODINA								
	GOVEDA		SVINJE		KOKOŠI		DIVLJE SVINJE		UKUPNO
	2012.	2013.	2012.	2013.	2012.	2013.	2012.	2013.	
Bjelovarsko - bilogorska	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Brodsko - posavska	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Grad Zagreb	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Ličko - senjska	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Međimurska	-	-	1	2	-	-	-	-	3
Osječko - baranjska	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Požeško - slavonska	1	1	-	-	-	-	-	-	2
Sisačko - moslavačka	4	1	-	-	-	-	-	31	36
Vukovarsko - srijemska	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Zagrebačka	2	-	-	1	-	2	-	11	16
Ukupan br. životinja	11	3	1	4	-	3	-	42	64
Ukupan br. izolata	11	3	1	4		3		49	71

Tablica 3. Broj obrađenih životinja tijekom istraživanog razdoblja (od 2014. do 2016. godine)

ŽUPANIJA	VRSTA ŽIVOTINJE I GODINA												UKUPNO
	GOVEDO			SVINJA			OSTALE*			SRNA			
	2014.	2015.	2016.	2014.	2015.	2016.	2014.	2015.	2016.	2014.	2015.	2016.	
Bjelovarsko - bilogorska	1	1	1	1	-	-	-	1	1	39	27	14	86
Brodsko - posavska	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Grad Zagreb	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	4
Istarska	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
Karlovačka	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Koprivničko - križevačka	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Ličko - senjska	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Međimurska	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Osječko - baranjska	6	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	8
Požeško - slavonska	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Sisačko - moslavačka	2	10	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
Splitsko - dalmatinska	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Vukovarsko - srijemska	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
Zadarska	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Zagrebačka	5	2	3	9	1	-	2	-	-	-	-	-	22
Ukupan br. životinja	23	17	9	12	1	-	4	3	4	39	27	14	153

*ostale domaće životinje: ovca, koza, kokoš, patka

Tablica 4. Popis arhivskih izolata prikupljenih tijekom istraživanog razdoblja (od 2012. do 2013. godine)

Broj uzorka	Arhivski broj uzorka	Vrsta životinje	Županija	Godina	Dokaz roda
1	16499	govedo	Bjelovarsko - bilogorska	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
2	51003	govedo	Brodsko - posavska	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
3	5081	govedo	Osječko - baranjska	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
4	21571	govedo	Osječko - baranjska	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
5	71097	govedo	Požeško - slavonska	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
6	44635/6-44	govedo	Sisačko - moslavačka	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
7	44635/5-43	govedo	Sisačko - moslavačka	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
8	44645	govedo	Sisačko - moslavačka	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
9	66845	govedo	Sisačko - moslavačka	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
10	4711	govedo	Zagrebačka	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
11	47206	govedo	Zagrebačka	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
12	50850/1	svinja	Međimurska	2012.	<i>Mycobacterium sp.</i>
13	63230	govedo	Ličko - senjska	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
14	40928	govedo	Požeško - slavonska	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
15	65154	govedo	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
16	17320	svinja	Međimurska	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
17	36252	svinja	Međimurska	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
18	21488	svinja	Vukovarsko - srijemska	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
19	2092	svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
20	4529	kokoš	Grad Zagreb	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
21	4066	kokoš	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
22	7726	kokoš	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
23	54236/21672	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
24	54238/21674	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
25	54239/21675	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
26	54234/21670	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
27	58968/26708	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
28	58968/26709	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
29	54235/21671	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
30	58967/26706	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
31	58970/26711	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
32	58972/26702	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
33	58973/26697	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
34	58973/26697	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>

35	59154/3320	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
36	54545/2335	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
37	62198/2371	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
38	54541/2344	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
39	54541/2344	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
40	57536/2219	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
41	57536/2219	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
42	57539/2223	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
43	57541/222	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
44	57543/2220	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
45	57535/2254	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
46	57528/2252	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
47	55933/3184	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
48	55933/3184	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
49	65250/3187	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
50	65250/3187	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
51	62019	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
52	62020	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
53	62025	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
54	62027	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
55	63453	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
56	63457	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
57	63457	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
58	63477	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
59	63480	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
60	63491	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
61	63476	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
62	63476	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
63	63695	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
64	63689	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>

65	62141	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
66	62146	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
67	62147	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
68	63587	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
69	63588	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
70	63592	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>
71	63590	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	<i>Mycobacterium sp.</i>

Tablica 5. Popis arhivskih uzoraka prikupljenih tijekom istraživanog razdoblja (od 2014. do 2016. godine) po vrstama životinja

Broj uzorka	Arhivski broj uzorka	Vrsta životinje	Županija	Godina	Vrsta uzorka	Patološke promjene	Količina uzorka
1	851	govedo	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	1, 2	bez promjena	7
2	52112	govedo	Koprivničko - križevačka	2014.	pluća, medijastinalni l.č.	bez promjena	2
3	49587	govedo	Koprivničko - križevačka	2014.	pluća	granulomatozna promjena	1
4	44960	govedo	Koprivničko - križevačka	2014.	pluća	granulomatozna promjena	1
5	42102	govedo	Ličko - senjska	2014.	pluća, medijastinalni l.č.	granulomatozna promjena pluća	2
6	69289	govedo	Ličko - senjska	2014.	pluća, medijastinalni l.č.	granulomatozna promjena pluća, povećani l.č.	2
7	6920	govedo	Ličko - senjska	2014.	1, 2	bez promjena	7
8	42643	govedo	Osječko - baranjska	2014.	pluća	granulomatozna promjena	1
9	44601	govedo	Osječko - baranjska	2014.	pluća	granulomatozna promjena	1
10	52113	govedo	Osječko - baranjska	2014.	pluća, medijastinalni l.č.	krvarenja po l.č.	2
11	52110	govedo	Osječko - baranjska	2014.	pluća, medijastinalni l.č.	bez promjena	2
12	51663	govedo	Osječko - baranjska	2014.	pluća, medijastinalni l.č.	granulomatozna promjena pluća	2
13	42946	govedo	Osječko - baranjska	2014.	pluća	granulomatozna promjena	1
14	42101	govedo	Požeško - slavonska	2014.	pluća	granulomatozna promjena	1
15	42100	govedo	Požeško - slavonska	2014.	pluća	bez promjena	1
16	43529	govedo	Sisačko - moslavačka	2014.	pluća	bez promjena	1
17	43528	govedo	Sisačko - moslavačka	2014.	pluća i jetra	granulomatozna promjena pluća	2
18	65844	govedo	Zadarska	2014.	jetra	granulomi na jetri	1
19	66325	govedo	Zagrebačka	2014.	pluća	granulomatozna promjena	1
20	64892	govedo	Zagrebačka	2014.	pluća	granulomatozna promjena	1
21	52111	govedo	Zagrebačka	2014.	jetra	granulomi na jetri	1
22	42984	govedo	Zagrebačka	2014.	jetra	bez promjena	1
23	42203	govedo	Zagrebačka	2014.	pluća	granulomatozna promjena	1
UKUPNO	23		8				42
24	8640	svinja	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	mandibularni l.č.	granulomi na l.č.	1

25	44959	svinja	Brodsko - posavska	2014.	pluća	granulomatozna promjena pluća	1
26	50621	svinja	Osječko - baranjska	2014.	mandibularni l.č.	granulomi po l.č.	1
27	4908	svinja	Zagrebačka	2014.	mandibularni l.č.	granulomi na l.č.	1
28	11974/174	svinja	Zagrebačka	2014.	mandibularni l.č.	granulomi na l.č.	1
29	11974/192	svinja	Zagrebačka	2014.	mandibularni l.č.	bez promjena	1
30	19270	svinja	Zagrebačka	2014.	mandibularni l.č.	granulomi na l.č.	1
31	21099	svinja	Zagrebačka	2014.	mandibularni l.č.	granulomi na l.č.	1
32	20632/74	svinja	Zagrebačka	2014.	mandibularni l.č.	granulomi na l.č.	1
33	20632/158	svinja	Zagrebačka	2014.	mandibularni l.č.	granulomi na l.č.	1
34	19713	svinja	Zagrebačka	2014.	mandibularni l.č.	granulomi na l.č.	1
35	18647	svinja	Zagrebačka	2014.	mandibularni l.č.	granulomi na l.č.	1
UKUPNO	12		4				12
36	68601	kokoš	Istarska	2014.	jetra, slezena	granulomi na jetri i slezeni	2
37	19239	kokoš	Zagrebačka	2014.	jetra, slezena	granulomi na jetri i slezeni	2
38	57031	kokoš	Zagrebačka	2014.	jetra	granulomi na jetri	1
UKUPNO	3		2				5
39	15323	patka	Vukovarsko - srijemska	2014.	jetra, slezena	granulomi na jetri i slezeni	2
UKUPNO	1		1				2
40	61437/1486	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4
41	64261/1481	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
42	64261/1492	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4
43	64501/1493	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4
44	64501/1496	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4
45	65058/1501	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
46	66529/13589	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	granulomi na plućima	4
47	66868/13587	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4
48	66868/13588	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
49	65418/13726	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
50	65629/13728	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
51	65633/13724	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4
52	65444/641	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	granulomi na plućima	4
53	65455/13672	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	slezena, jetra	bez promjena	2
54	66307/13956	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4
55	66307/13958	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
56	64901/13580	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
57	64901/13582	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
58	66307/13962	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
59	66310/13936	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
60	70052/13941	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4

61	70052/13938	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
62	70052/13939	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	submandibularni, retrofaringealni l.č.	bez promjena	2
63	68632/5061	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
64	70030/13000	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
65	69905/12951	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4
66	69520/540	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
67	69520/542	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	II	bez promjena	4
68	69523/13748	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	granulomi na plućima	4
69	70074/13749	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I	bez promjena	4
70	65446/640	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
71	65452/13671	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
72	70349/13443	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
73	70338/643	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
74	70068/13434	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
75	69903/5072	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
76	69773/13445	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
77	67398/13673	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
78	67319/13583	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	I, II	bez promjena	8
UKUPNO	39		1				200
79	23142	govedo	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	1, 2	bez promjena	7
80	36412	govedo	Požeško - slavonska	2015.	pluća, slezena, jetra i mezenterijalni l.č.	bez promjena	4
81	34191	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	1, 2	bez promjena	7
82	38560	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	1, 2	bez promjena	7
83	38561	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	1, 2	bez promjena	7
84	57873	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	l.č., jetra	krvarenje po l.č.	2
85	57872	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	l.č., jetra	krvarenje po l.č.	2
86	9277	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	1, 2	promjene po l.č.	7
87	34808	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	1, 2	bez promjena	7
88	34807	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	1, 2	bez promjena	7
89	34800/1	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	1, 2	bez promjena	7
90	34800/2	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	1, 2	bez promjena	7
91	7995	govedo	Splitsko - dalmatinska	2015.	1, 2	granulomi po svim l.č.	7
92	44243	govedo	Splitsko - dalmatinska	2015.	l.č., jetra	bez promjena	2
93	44242	govedo	Splitsko - dalmatinska	2015.	l.č., jetra	bez promjena	2
94	111/1	govedo	Zagrebačka	2015.	sekret vimena (govedo s mastitisom)	tvrdi vime	1

95	5373	govedo	Zagrebačka	2015.	sekret vimena (govedo s mastitisom)	tvrdno vime	1
UKUPNO	17		5				84
96	17726	svinja	Zagrebačka	2015.	mandibularni l.č.	sa promjenama	1
UKUPNO	1		1				1
97	13422	ovca	Grad Zagreb	2015.	bronhijalni l.č.	granulomatozna promjena	1
98	14566	ovca	Grad Zagreb	2015.	slezena, mezenterijalni l.č.	granulomatozna promjena	2
UKUPNO	2		1				3
99	64293	kokoš	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	jetra, slezena	granulomatozna promjena	2
UKUPNO	1		1				2
100	1645/13752	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	II	bez promjena	4
101	1645/13753	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	II	bez promjena	4
102	1645/13754	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I	granulomi na gastrointestinalnim l.č.	4
103	2276/13758	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I	bez promjena	4
104	1207/12952	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	mezenterijalni l.č., jetra, slezena	bez promjena	3
105	1207/12954	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	mezenterijalni l.č., jetra, slezena	bez promjena	3
106	1207/12955	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I	bez promjena	4
107	2753/14005	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	gastrointestinalni, mezenterijalni l.č., jetra	bez promjena	3
108	2753/14006	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	retrofaringealni l.č., pluća	bez promjena	2
109	2337/13038	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	mezenterijalni l.č., jetra, slezena	bez promjena	3
110	414/13001	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	II	bez promjena	4
111	414/13002	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	II	bez promjena	4
112	414/13005	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I	bez promjena	4
113	3237/14011	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	slezena, jetra, portalni l.č.	bez promjena	3
114	3625/13009	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I, II	bez promjena	8
115	64422/11588	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I	bez promjena	4
116	62660/20045	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	II	bez promjena	4
117	62662/20043	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	II	bez promjena	4
118	63495/10952	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I	granulomatozna promjena pluća	4
119	772/13750	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	II	bez promjena	4
120	778/13576	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I, II	bez promjena	8
121	778/13577	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I	granulomatozna promjena pluća	4
122	778/13578	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	II	bez promjena	4
123	854/13006	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I	bez promjena	4
124	3625/13009	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I, II	bez promjena	8
125	1625/13007	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	I, II	bez promjena	8
126	854/13006	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	II	bez promjena	4
UKUPNO	27		1				117

127	8675	govedo	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	1, 2	bez promjena	7
128	20792	govedo	Osječko - baranjska	2016.	1, 2	granulomatozna promjena pluća	7
129	22715	govedo	Sisačko - moslavačka	2016.	1, 2	bez promjena	7
130	29544	govedo	Sisačko - moslavačka	2016.	1, 2	bez promjena	7
131	32080	govedo	Splitsko - dalmatinska	2016.	1, 2	bez promjena	7
132	7114	govedo	Zagrebačka	2016.	1, 2	bez promjena	7
133	38906	govedo	Zagrebačka	2016.	1, 2	krvarenje po l.č.	7
134	39912	govedo	Zagrebačka	2016.	pluća	granulomatozna promjena	1
135	40702	govedo	Požeško - slavonska	2016.	1,2	bez promjena	7
UKUPNO	9		6				57
136	49573	ovca	Karlovačka	2016.	pluća	granulomatozna promjena	1
137	12275	ovca	Međimurska	2016.	pluća	granulomatozna promjena	1
UKUPNO	2		2				2
138	48680	koza	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	pluća	granulomatozna promjena	1
UKUPNO	1		1				1
139	39705	patka	Grad Zagreb	2016.	jetra	granulomatozna promjena	1
UKUPNO	1		1				1
140	3092/12024	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	mezenterijalni l.č., jetra	bez promjena	2
141	2492/10966	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	I	granulomatozna promjena pluća	4
142	2492/10967	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	I	bez promjena	4
143	1627/11051	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	pluća	bez promjena	1
144	1627/11053	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	pluća	bez promjena	1
145	183/10958	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	I, II	bez promjena	8
146	183/10960	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	II	bez promjena	4
147	3678/12025	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	I	bez promjena	4
148	2664/12021	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	I, II	bez promjena	8
149	2540/10962	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	I	bez promjena	4
150	2540/10963	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	I, II	bez promjena	8
151	1041/4254	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	I	granulomatozna promjena pluća	4
152	751/11050	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	II	bez promjena	4
153	221/10998	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	I, II	bez promjena	8
UKUPNO	14		1				64
Σ							593

l.č. - limfni čvor

I (tkivo prsne šupljine, glave i vrata) – submandibularni, retrofaringealni, traheobronhalni l.č., kardijalni ili apikalni režanj plućnog krila

II (tkivo trbušne šupljine) - gastrični l.č., slezena, portalni l.č. zajedno s tkivom jetre, mezenterijalni l.č.

1 - retrofaringealni, bronhijalni, madijastinalni i mandibularni l.č.

2 - jetra, supramamarni i mezenterijalni l.č.

4.1.3 Uzorci izolata za molekularnu identifikaciju i određivanje antimikrobne osjetljivosti

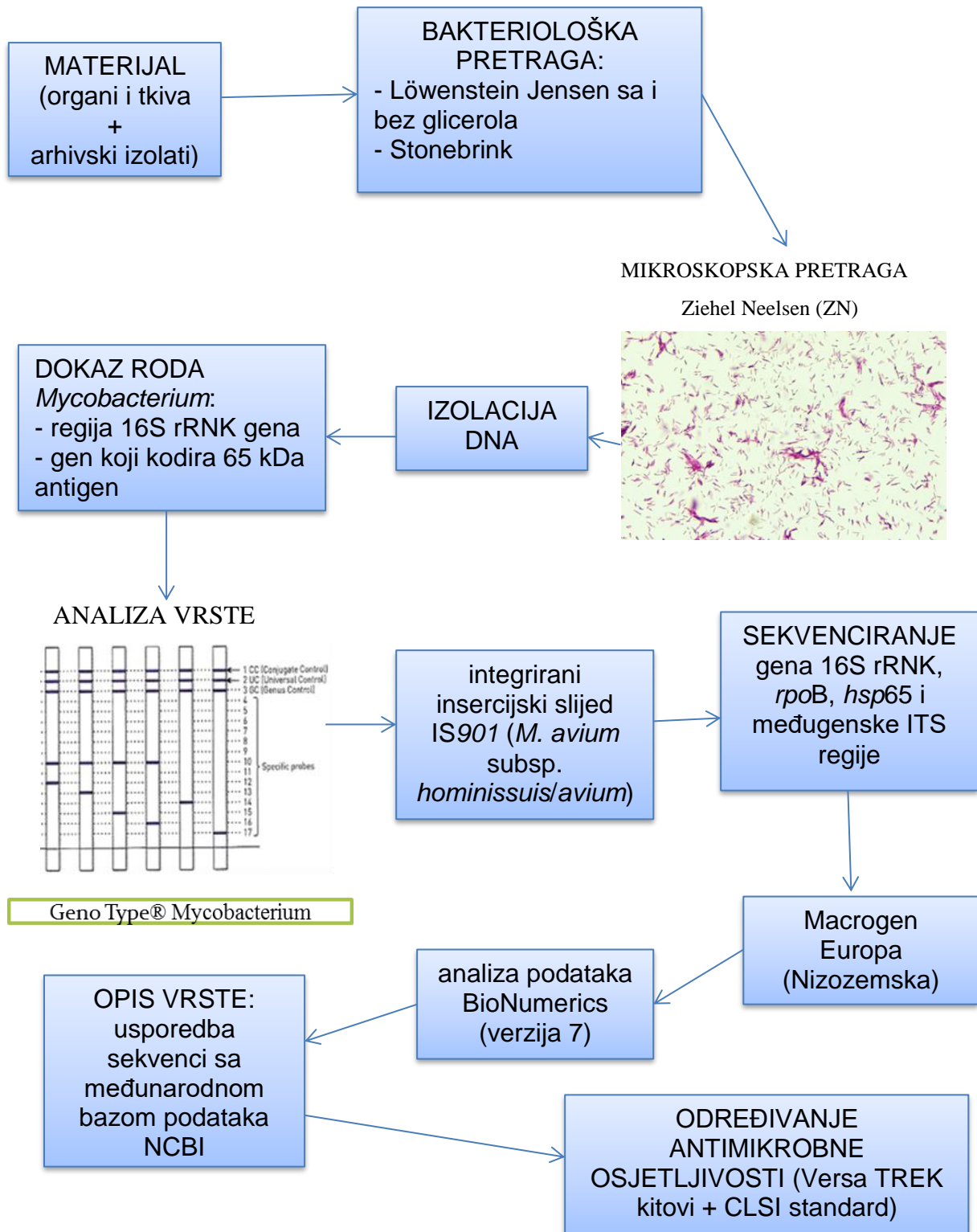
Ukupno smo za molekularnu identifikaciju koristili 155 izdvojena izolata podrijetlom iz domaćih i divljih životinja. U svih 155 izolata izvršeno je umnožavanje regije 16S rRNK gena i gena koji kodira 65 kDa antigen prisutnih u svih mikobakterija što je siguran dokaz da izolati pripadaju *Mycobacterium* sp. Zatim smo izolate mikobakterija identificirali do razine vrste metodom specifične hibridizacije pomoću „Geno Type® Mycobacterium CM i AS kita“ koja omogućava identifikaciju 40-tak vrsta unutar roda *Mycobacterium*. Sve izdvojene izolate kojima je potvrđena pripadnost *M. avium* kompleksu prethodno navedenom metodom podvrgnuli smo amplifikaciji integriranog insercijskog slijeda IS901 radi određivanja podvrste. Kod izolata kod kojih pripadnost vrsti nismo mogli odrediti prethodno navedenim metodama sekvencirali smo dijelove 16S rRNK, *rpoB*, *hsp65* gena i ITS regije, te smo uspoređujući s podacima u dostupnim bazama podataka identificirali vrstu.

Tijekom istraživanja ukupno smo identificirali 138 izolata do razine vrste, i to 47 izolata pripadnika spororastućih vrsta podrijetlom iz goveda (18 izolata), svinja (8 izolata), kokoši (4 izolata), pataka (2 izolata), divljih svinja (9 izolata) i srna (6 izolata), te 91 izolat brzorastućih vrsta netuberkuloznih mikobakterija podrijetlom iz goveda (12 izolata), svinje (1 izolat), ovce (1 izolat), kokoši (1 izolat), divljih svinja (34 izolata) i srne (42 izolata), dok kod 17 izolata podrijetlom iz goveda (1 izolat), svinje (1 izolat), ovce (1 izolat), koze (1 izolat), divljih svinja (6 izolata) i srna (7 izolata) vrstu nismo uspjeli odrediti niti jednom prethodno navedenom metodom.

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti uspješno smo proveli kod ukupno 44 izolata pripadnika spororastućih vrsta, i to kod 31 izolata podrijetlom iz domaćih (17 goveda, 8 svinja, 4 kokoši, 2 patke), a 13 iz divljih životinja (7 divljih svinja, 6 srna), te kod ukupno 87 izolata pripadnika brzorastućih vrsta, i to kod 15 izolata podrijetlom iz domaćih (12 goveda, 1 svinja, 1 ovca, 1 kokoš), a 72 izolata iz divljih životinja (32 divlje svinje, 40 srna).

4.2 Metode

Na slici 1. prikazan je shematski prikaz koji opisuje redosljed svih metoda korištenih u našem istraživanju.



Slika 1. Shematski prikaz redosljeda metoda korištenih u istraživanju

4.2.1 Bakteriološka pretraga

4.2.1.1 Obrada materijala za izdvajanje mikobakterija

Dostavljeni materijal prvo smo rasporedili u dvije skupine, i to u skupinu I kojoj pripadaju limfni čvorovi (l.č.) i tkivo prsne šupljine, glave i vrata (submandibularni l.č., retrofaringealni l.č., traheobronhalni l.č., granulomatozna promjena pluća ako je prisutna, a ako nije kardijalni ili apikalni režanj plućnog krila), te u skupinu II kojoj pripadaju l.č. i tkivo trbušne šupljine (gastrointestinalni l.č., uzorak tkiva slezene, portalni l.č. zajedno s tkivom jetre (portalni dio), mezenterijalni l.č.).

Materijal smo zatim obradili tako da smo oko pet grama uzorka smjestili u plastične vrećice, usitnili škarama te dodali 10 ml sterilne fiziološke otopine nakon čega je slijedila homogenizacija jednu minutu u homogenizatoru sa stopom. Tekući dio homogeniziranog materijala (oko 3ml) zatim smo prebacili u epruvetu, dodali smo osam ml 5% oksalne kiseline ($C_2H_2O_4$) i uz povremeno miješanje inkubirali na sobnoj temperaturi 10-20 minuta. Materijal smo zatim koncentrirali centrifugiranjem pet minuta na 2500 okretaja nakon čega smo nadtalog neškodljivo uklonili, a sediment otopili s 1,5 ml sterilne fiziološke otopine i nacijepili po 200 μ l na šest hranjivih podloga (2 Löwenstein - Jensen bez glicerola, 2 Löwenstein - Jensen sa glicerolom i 1 Stonebrink) (KENT i KUBICA, 1985.). Ostatak sedimenta zamrznuli smo na $-20^{\circ}C$ u slučaju potrebe za ponovnom pretragom.

Priprema hranjivih podloga provedena je na slijedeći način:

- Löwenstein Jensen s glicerolom ili piruvatom

U 600ml destilirane vode otopili smo 37,2 g „Löwenstein Medium Base“ (Difco, New Jersey, SAD) te smo kuhali uz neprestano miješanje. Dobivenu otopinu sterilizirali smo na $121-124^{\circ}C$ tijekom 15 minuta nakon čega se hladila do temperature $45-60^{\circ}C$, te smo joj dodali 11 suspenzije svježih jaja, dobro promiješali i rastočili u sterilne bočice. Koso nagnute bočice s hranilištem koagulirale su se na $85^{\circ}C$ kroz 45 minuta. Podlogama s glicerolom dodali smo 12 ml glicerola, a podlogama s piruvatom 8 g piruvata.

- Stonebrink

Otopinu soli (natrijev piruvat (Merck, Darmstadt, Njemačka) - 5 g, monokalijev fosfat (Kemika, Ovada, Italija) - 2 g i destilirana voda - 300 ml) miješali smo dok nije postala bistra, a zatim smo joj dodali natrijev difosfat sve dok pH vrijednost otopine nije bila 6,5. Dobivenoj

otopini dodali smo otopinu boja (kristal violet (Kemika, Ovada, Italija) – 0,1 g, malahitno zelenilo (Kemika, Ovada, Italija) – 0,8 g, destilirana voda – 100 ml) i autoklavirali na 121°C kroz 20 minuta. Otopinu smo ohladili do sobne temperature i dodali homogeniziranu suspenziju jaja (800ml). Suspenziju smo zatim izlili u sterilne bočice koje se nakose i koaguliraju na 85°C kroz 40 minuta.

4.2.1.2 Inkubacija

Bočice s materijalom nacijepljenim na hranjivu podlogu ostavili smo 24 sata na 37°C u kosom položaju kako bi se suspenzija upila u podlogu, nakon čega se inkubacija nastavila u okomitom položaju. Nakon 4-7 dana po prvi puta smo kontrolirali porast mikobakterija, a nadalje u jednotjednim razmacima. Inkubacija je trajala osam tjedana, a ako niti tada na hranjivoj podlozi nije bilo rasta kolonija, inkubacija se produljila do 12 tjedana. U slučaju rasta kolonije smo precijepili na nove hranjive podloge te ih bojili po Ziehl - Neelsenu ne bi li utvrdili prisutnost acidorezistentnih štapića.

4.2.1.3 Analiza kolonija *Mycobacterium* sp. bojenjem po Ziehl-Neelsen-u

Izrasle kolonije bakteriološkom ušicom razvukli smo po predmetnom stakalcu te smo preparat učvrstili plamenom kojim se zagrije donja strana stakalca. Preparat smo zatim prelili fenol-fuksinom (karbol-fuksinom) po Ziehl-Neelsen-u, te smo predmetnicu potom s donje strane grijali nad plamenikom na način da boja ne zavrije. Postupak smo ponovili tri puta. Predmetnicu smo zatim ohladili, a boju odlili bez ispiranja. Postupak odbojavanja 20%-tnom sumpornom kiselinom ponovili smo po potrebi 2-3 puta u trajanju 1-2 minute do prestanka otpuštanja boje iz preparata. Predmetnicu smo zatim isprali destiliranom vodom, te je prelili metilenskim modrilom i ostavili pod bojom 20-30 sekundi. Uslijedilo je zadnje ispranje destiliranom vodom te smo predmetnicu osušili i mikroskopski pregledali. Acidorezistentne bakterije (*Mycobacterium* sp.) ovom metodom se oboje crveno, dok se ostale bakterije i tkivo oboje plavo.

4.2.2 Molekularna analiza *Mycobacterium* sp.

4.2.2.1 Izdvajanje genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNK)

***Mycobacterium* sp.**

Iz dobivenih bakterijskih kultura izdvojili smo DNK potrebnu za molekularne pretrage na način da smo ušicu kulture razmutili u 100 µl destilirane vode (AccuGENE®, Lonza,

Belgija) u Eppendorfovoj epruveti od 2 ml. Suspenziju smo zagrijavali tijekom 20 minuta na 95°C u termomikseru (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) uz tresenje. Epruvete smo zatim centrifugirali na 14000 g kroz 1 minutu. Nakon hlađenja do sobne temperature za potrebe pretraga koristili smo 2 ili 5 µl nadtaloga. Dobivenu DNK zatim smo pohranila na -20 °C.

Izdvajanje DNK namijenjene za potrebe sekvenciranja proveli smo komercijalno dostupnim kitom QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Ušicu bakterijske kulture razmutili smo u 180 µl ALT pufera u Eppendorfovoj epruveti od 2 ml i dodali 20 µl proteinaze K, nakon čega je uslijedila inkubacija na 56°C/1h u termomikseru uz tresenje. Nadalje, tako pripremljene i lizirane uzorke obradili smo u uređaju za automatiziranu izolaciju DNK QIAcube (QIAGEN, Hilden, Njemačka). Daljnji koraci koji su se proveli u prethodno spomenutom uređaju su kako slijedi. Dobivenoj otopini dodalo se 200 µl AL pufera te se inkubiralo na 70°C/10 min. Tada se dodalo 200 µl etanola (96-100%) (Ethanol absolute for analysis, Merck, Njemačka) i kratko centrifugiralo. Sadržaj epruvete prenio se u epruvetu za filtriranje te centrifugirao pri 6000g/1 min. Zatim se dodalo 500 µl AW1 pufera i centrifugiralo pri 6000g/1 minutu. Postupak se ponovio i s AW2 puferom uz centrifugiranje pri punoj brzini 3 minute. Epruveta za filtriranje zatim se prebacila u novu čistu epruvetu od 1,5 ml, dodalo se 200 µl AE pufera, inkubiralo 1 minutu pri sobnoj temperaturi te centrifugiralo pri brzini od 6000g/1 min. Dobio se krajnji volumen od 200 µl izolirane DNK koji smo nadalje pohranili na -20°C.

4.2.2.2 Dokaz *Mycobacterium* sp. u izdvojenim izolatima

Kao dokaz pripadnosti rodu *Mycobacterium* upotrijebili smo specifične početnice pod nazivom 16SRNAF (5' ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C 3') i 16SRNAR (5' TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A 3') za umnažanje regije 16S rRNK gena, gdje je veličina dobivenog produkta 543 baznih parova (bp) (HUARD i sur., 2003.) i početnice TB1 (5' GAG ATC GAG CTG GAG GAT CC 3') i TB2 (5' AGC TGC AGC CCA AAG GTG TT 3') za gen koji kodira 65 kDa antigen, gdje je veličina dobivenog produkta 383 bp (HANCE i sur., 1989.). Navedeni geni zajednički su za sve mikobakterije.

Reakcijska mješavina za svaki uzorak sastojala se od 10 µl otopine Hot Start Master Mix (QIAGEN, Hilden, Njemačka) čiji su osnovni sastojci (2,5 U polimeraze; 1,5 mM Mg; 800 µM dNTP-a) u koncentracijama propisanim od proizvođača. U ovu otopinu dodali smo po 6 µl RNAase i DNAase-slobodne vode (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 1 µl svake od početnica (100 µM/µl) te 2 µl istraživanog DNK izolata. Ukupna količina reakcijske

mješavine tako je iznosila 20 µl. Umnažanje je provedeno pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) prema programu: aktivacija polimeraze pri 95°C 15 minuta, 35 ciklusa (razdvajanje lanca pri 94°C 1 minutu, vezanje početnica pri 60°C 1 minutu, produžavanje lanca 72°C 1 minuta), te konačno produžavanje pri 72°C 10 minuta i zaustavljanje reakcije pri 4°C.

Proizvode umnožavanja analizirali smo kapilarnom elektroforezom na uređaju QIAxcel (QIAGEN, Hilden, Njemačka) uz biljeg veličine 100 – 3000 bp (QIAGEN, Hilden, Njemačka).

4.2.2.3 Analiza vrsta *Mycobacterium* sp. u izdvojenim izolatima (Geno Type® *Mycobacterium*)

Nakon utvrđivanja pripadnosti rodu *Mycobacterium* u izdvojenim izolatima, za daljnju identifikaciju mikobakterija do razine vrste primijenili smo metodu hibridizacije s Geno Type® *Mycobacterium* CM i AS (Hain Lifescience, Nehren, Njemačka) komercijalnim testovima prema uputi proizvođača. Navedena metoda zasniva se na DNA•STRIP® tehnologiji i omogućava identifikaciju 40-tak vrsta unutar roda *Mycobacterium*.

Izolate smo prvo pretražili Geno Type® *Mycobacterium* CM kompletom koji omogućava identifikaciju sljedećih vrsta mikobakterija: *M. avium* ssp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. tuberculosis* kompleks i *M. xenopi* (Slika 1.).

Sve ostale izdvojene izolate kojima vrstu nije bilo moguće odrediti prethodno navedenom metodom, pretražili smo pomoću Geno Type® *Mycobacterium* AS kompleta koji omogućava identifikaciju sljedećih vrsta: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* i *M. shimoidei* (Slika 2.).

Postupak izvođenja pretrage metodom specifične hibridizacije:

Izdvajanje i umnožavanje DNK mikobakterija

Izdvajanje DNK proveli smo na način da smo ušicu kulture razmutila u 100 µl destilirane vode (AccuGENE®, Lonza, Belgija) u Eppendorfovoj epruveti od 2 ml. Suspenziju smo zagrijavali tijekom 20 minuta na 95°C u termomikseru (Thermomixer

comfort, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) uz tresenje. Epruvete smo zatim centrifugirali na 14000 g kroz 1 minutu. Nakon hlađenja do sobne temperature za potrebe pretraga koristili smo 5 μ l nadtaloga.

Reakcijska mješavina za svaki uzorak sastojala se od 35 μ l PN mixa (PNM – mješavina početnica koja je uključena u kit), 5 μ l 10x PCR Rxn pufera (Invitrogen, Carlsbad, California, SAD), 1,5 μ l otopine 50 mM MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, California, SAD), 0,25 μ l Platinum *Taq* polimeraze (Invitrogen, Carlsbad, California, SAD), 3,5 μ l Rnase- i Dnase-slobodne vode (QIAGEN, Hilden, Njemačka), te 5 μ l DNK uzorka. Ukupna količina reakcijske mješavine tako je iznosila 50 μ l.

Konačna koncentracija Mg u reakcijskoj mješavini mora biti u granicama od 1,5- 2,5 mM. Kod svake pretrage potrebno je napraviti i negativnu kontrolu u koju se umjesto DNK stavlja 5 μ l vode.

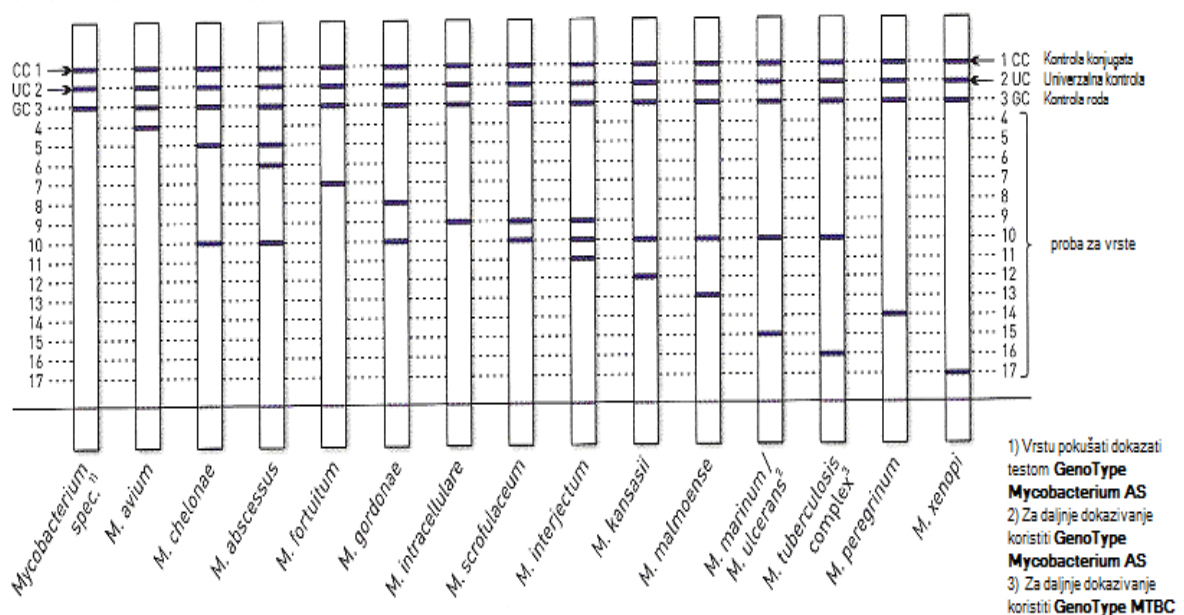
Umnažanje je provedeno pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) prema programu: prvi ciklus 95°C 5 minute, sljedećih 10 ciklusa 95°C 30 sekundi i 58°C 2 minute, zatim 20 ciklusa 95°C 25 sekundi, 53°C 40 sekundi i 70°C 40 sekundi te posljednji ciklus 70°C 8 minuta i zaustavljanje reakcije na 4 °C.

Postupak hibidizacije

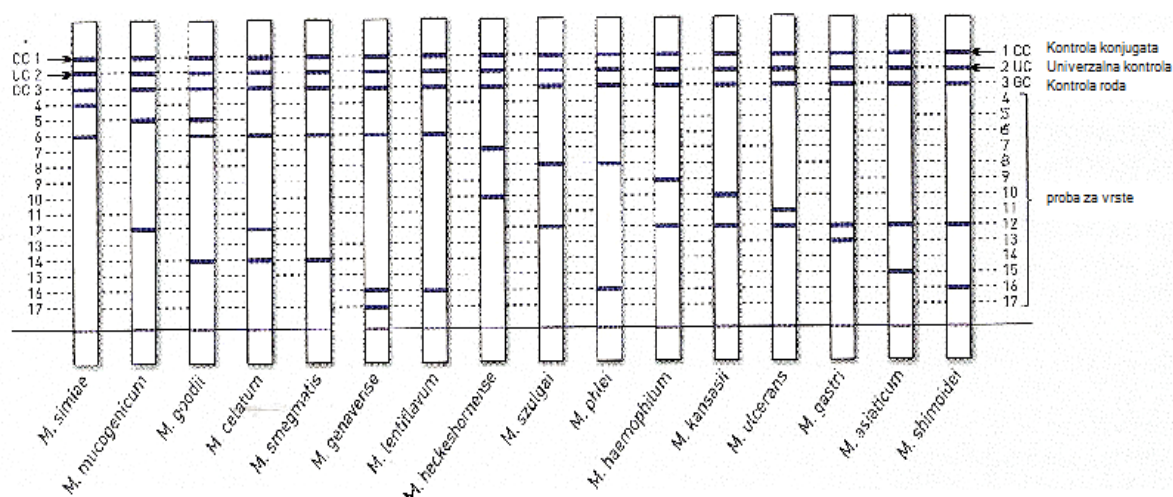
Ultrazvučnu kupelj zagrijali smo na 45°C (dozvoljeno odstupanje +/- 1°C). Otopine HYB i STR prije upotrebe zagrijali smo na 37-45°C i promiješali. Ostale reagense uključene u komplet zagrijali smo na sobnu temperaturu uz izuzetak CON-C i SUB-C koje je potrebno čuvati u hladnjaku. Koncentrirani konjugat (CON-C) razrijedili smo s CON-D u razrijeđenju 1:100 u potrebnoj količini (10 μ l koncentrata u 1 ml pufera), te zagrijali na sobnu temperaturu. Koncentrirani supstrat (SUB-C) razrijedili smo s SUB-D u razrijeđenju 1:100 u potrebnoj količini, te zagrijali na sobnu temperaturu.

U kut svake kadice odpipetirali smo 20 μ l otopine za denaturaciju (DEN), te dodali 20 μ l uzorka (produkta umnožavanja) u DEN, dobro promiješali i inkubirali 5 minuta na sobnoj temperaturi. U svaku kadicu zatim smo pažljivo dodali 1 ml prethodno zagrijanog pufera za hibridizaciju (HYB), promiješali te uronili trakicu. Kadicu smo zatim inkubirali u vodenoj kupelji na 45°C kroz 30 min. Frekvenciju tresenja vodene kupelji potrebno je namjestiti tako da se osigura dobro miješanje reagenasa. Nakon inkubacije pipetom smo izvukli hibridizacijski pufer iz kadice, te dodali 1 ml zagrijanog STR pufera u svaku kadicu, i inkubirali 15 minuta na 45°C u vodenoj kupelji uz tresenje. Od ovog koraka na dalje radili

smo na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u potpunosti smo uklonili STR pufer, a kadice smo okrenuli naopačke i otresli ostatak pufera na staničevinu (radnja se ponavljala na kraju svakog slijedećeg koraka). Nadalje, svaku trakicu isprali smo s 1 ml RIN otopine kroz 1 minutu uz tresenje, nakon čega smo RIN otopinu izbacili iz kadice. Dodali smo 1 ml razrijeđenog konjugata i inkubirali 30 min uz tresenje. Otopinu smo uklonili a svaku trakicu isprali 2 puta s 1 ml RIN otopine kroz 1 min i 1 put s 1ml destilirane vode, sve uz tresenje. Svu vodu uklonili smo iz kadice i dodali 1 ml razrijeđenog supstrata po trakici, te inkubirali u mraku. Vrijeme inkubacije kreće se od 3-20 minuta što ovisi o temperaturi. Zatim smo trakice isprali 2 puta s destiliranom vodom, te smo ih uz upotrebu pincete izvadili iz kadice i osušili između dva sloja papira. Interpretacija rezultata određivanja vrste temelji se na kombinaciji odsječaka mikobakterija, a koji su karakteristični za svaku vrstu mikobakterija (Slika 2. i 3.).



Slika 2. Prikaz odsječaka različitih vrsta mikobakterija (Hibridizacijske zone Geno Type® Mycobacterium CM kita).



Slika 3. Prikaz odsječaka različitih vrsta mikobakterija (Hibridizacijske zone Geno Type® Mycobacterium AS kita).

4.2.2.4 Analiza podvrsta *Mycobacterium avium* kompleksa u izdvojenim izolatima

Nakon tipizacije pomoću hibridizacijske metode Geno Type® Mycobacterium CM kompletom (Hain Lifescience, Nehren, Njemačka), sve izdvojene izolate kojima je potvrđena pripadnost *M. avium* kompleksu podvrgnuli smo amplifikaciji integriranog insercijskog slijeda IS901 radi određivanja podvrste. Veličina produkta amplifikacije ovisi o prisutnosti ili odsutnosti insercijskog slijeda IS901, tako da za *M. avium* subsp. *hominissuis* veličina umnoženog produkta iznosi 300 bp (nema ugrađenog IS901) a za *M. avium* subsp. *avium* 1742 bp (IS901 se nalazi na tome mjestu). U tu svrhu koristili smo početnice P1 FR300 (5' CAG CCA GCC GAA TGT CAT CC 3') i P2 FR300 (5' CAA CTC GCG ACA CGT TCA CC 3'). (KUNZE i sur., 1992.).

Reakcijska mješavina za svaki uzorak sastojala se od 10 µl otopine Hot Start Master Mix (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 6 µl RNAase i DNAase-slobodne vode (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 1 µl svake od početnica (100 µM/µl) te 2 µl istraživanog DNK izolata. Ukupna količina reakcijske mješavine tako je iznosila 20 µl. Umnažanje je provedeno pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) prema programu: aktivacija polimeraze pri 95 °C 15 minuta, sljedećih 5 ciklusa 94 °C 60 sekundi, 65 °C 60 sekundi i 72 °C 60 sekundi, zatim 27 ciklusa 94 °C 30 sekundi, 63 °C 30 sekundi i 72 °C 30 sekundi te posljednji ciklus 72 °C 5 minuta i zaustavljanje reakcije na 4 °C.

Proizvode umnožavanja analizirali smo kapilarnom elektroforezom na uređaju QIAxcel (QIAGEN, Hilden, Njemačka) uz biljeg veličine 100 – 3000 bp (QIAGEN, Hilden, Njemačka).

4.2.2.5 Analiza vrsta *Mycobacterium* sp. sekvenciranjem 16S rRNK, *rpoB*, *hsp65* gena i ITS regije

Za NTM vrste karakteristično je vrlo nisko evolucijsko odstupanje genoma te se stoga smatra da je za identifikaciju pojedine vrste potrebno koristiti samo pojedine regije, a ne cijeli genom. Ciljanom analizom DNK sekvenci najkonzerviranijih regija, *hsp65*, *rpoB*, 16S rRNK gena, te međugenske ITS regije, mogu se pojedinačno i skupno analizirati te brzo identificirati vrste NTM-a. Kod izolata kod kojih se pripadnost vrsti nije mogla odrediti prethodno opisanim metodama umnožili smo upravo te navedene regije. Od navedenih najčešće je korišten gen 16S rRNK, a njegovu regiju veličine 564 bp umnožili smo uporabom početnica 16MycF (5' CGT GCT TAA CAC ATG CAA GTC G 3') i 16MycR (5' GTG AGA TTT CAC GAA CAA CGC 3') (DEVULDER i sur., 2005.). Umnažanje *rpoB* kromosomskog gena (veličina produkta 711 bp) s jednom kopijom koja kodira β – podjedinicu bakterijske RNK polimeraze proveli smo uporabom početnica Myco-F (5' GGC AAG GTC ACC CCG AAG GG 3') i Myco-R (5' AGC GGC TGC TGG GGT GAT CAT C 3') (ADÉKAMBI i DRANCOURT, 2004.). Gen koji kodira *hsp65* protein toplinskog šoka (eng. heat shock protein, HSP) veličine produkta 439 bp umnožili smo uporabom početnica Tb11 (5' ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT 3') i Tb12 (5' CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT 3') (TELENTI i sur., 1993., ADÉKAMBI i DRANCOURT, 2004.). Međugensku ITS regiju koja je izvedena iz susjednih 16S rDNK i 23S rDNK regija gena s očekivanom veličinom produkta 480 bp umnožili smo uporabom početnica Ec16S.1390b (5' TTG TAC ACA CCG CCC GTC 3') i Mb23S.44n (5' TCT CGA TGC CAA GGC ATC CAC C 3') (ROTH i sur., 1998.). Reakcijska mješavina za sve navedene gene po uzorku se sastojala od 10 μ l otopine Hot Start Master Mix (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 7 μ l RNAase i DNAase-slobodne vode (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 0,5 μ l svake od početnica (100 μ M/ μ l) te 2 μ l istraživanog DNK izolata. Ukupna količina reakcijske mješavine tako je iznosila 20 μ l.

Umnažanje je provedeno pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) prema sljedećim programima:

16S rRNK gen: aktivacija polimeraze pri 95 °C 15 minuta, sljedećih 40 ciklusa 94 °C 25 sekundi, 60 °C 30 sekundi i 72 °C 45 sekundi, te posljednji ciklus 72 °C 10 minuta i zaustavljanje reakcije na 4 °C.

rpoB gen: aktivacija polimeraze pri 95 °C 15 minuta, sljedećih 35 ciklusa 94 °C 30 sekundi, 64 °C 30 sekundi i 72 °C 2 minute, te posljednji ciklus 72 °C 5 minuta i zaustavljanje reakcije na 4 °C.

gen za hsp65 protein: aktivacija polimeraze pri 95 °C 15 minuta, sljedećih 45 ciklusa 94 °C 1 minuta, 60 °C 1 minuta i 72 °C 1 minuta, te posljednji ciklus 72 °C 10 minuta i zaustavljanje reakcije na 4 °C.

ITS regija: aktivacija polimeraze pri 95 °C 15 minuta, sljedećih 38 ciklusa 94 °C 1 minuta, 62 °C 1 minuta i 72 °C 1 minuta, te posljednji ciklus 72 °C 10 minuta i zaustavljanje reakcije na 4 °C.

Kvalitetu i veličinu proizvoda umnožavanja utvrdili smo kapilarnom elektroforezom na uređaju QIAxcel (QIAGEN, Hilden, Njemačka) uz biljeg veličine 100 – 3000 bp (QIAGEN, Hilden, Njemačka).

Umnožene odsječke gena zatim smo pročistili koristeći ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio, SAD) kako bi se uklonio višak nukletida i početnica koje se nisu vezale u reakciji, i to na način da smo u svaki proizvod umnažanja dodali po 8 µl navedenog reagensa. Postupak je proveden pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) prema slijedećem programu: 1 ciklus pri 37 °C 15 minuta, te 1 ciklus pri 80 °C 15 minuta.

Pročišćene proizvode umnažanja poslali smo na sekvenciranje u komercijalnu tvrtku MacroGen Europe, Amsterdam, Nizozemska, gdje se primijenjuje metoda sekvenciranja po Sangeru. Dobivene slijedove uredili smo, provjerili i usporedili pomoću program za analizu podataka BioNumerics (verzija 7.6.3) (Applied Maths, Gent, Belgija). Točnu vrstu izdvojenih sojeva odredili smo usporedbom sekvenciranih slijedova s podacima dostupnim u međunarodnoj bazi podataka GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) koja je i najčešće korištena javna baza podataka (CLOUD i sur., 2002.). Prilikom usporedbe sekvenci slijedili smo objavljene smjernice Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI), no one predlažu interpretacijske kriterije za procjenu identiteta samo za 16S rRNK gen kako je već ranije opisano. Naime ne postoje utvrđene granične vrijednosti definirane standardom CLSI, kao niti smjernice za gene koji nisu 16S rRNK gen. U našem istraživanju koristili smo navedene smjernice prilikom usporedbe svih pretraženih gena, tj. također i za usporedbu sekvenci *rpoB*, *hsp65* gena i ITS regije. U tablici 6. su prikazane smjernice kojih se potrebno pridržavati prilikom usporedbe sekvenci (CLSI, 2008a).

Tablica 6. Smjernice za usporedbu sekvence 16S rRNK gena^a

% SLIČNOSTI SEKVENCE	TUMAČENJE	PRIMJER
100	" <i>Mycobacterium</i> + vrsta"	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
99-99,9	"Najsličnije <i>Mycobacterium</i> + vrsta"	Najsličnije <i>Mycobacterium fortuitum</i>
95-98,9	"Nije moguća identifikacija pomoću 16S rRNK gena; najsličnije <i>Mycobacterium</i> sp."	Identifikacija nije moguća; najsličnije <i>Mycobacterium</i> sp.

^a preuzeto iz CLSI MM18-A, 2008. (CLSI, 2008a)

4.2.3 Određivanje antimikrobne osjetljivosti

U svrhu određivanja antimikrobne osjetljivosti NTM-a koristili smo preporučeni standard za NTM, a to je postupak mikrodilucije u bujonu koristeći koncentracije lijekova koji se dobivaju iz serijskih, dvostrukih razrjeđenja indeksiranih na bazu 2 (npr. 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml). Prilikom očitavanja rezultata prijavili smo vrijednosti najniže koncentracije koja prekida rast (eng. minimum inhibitory concentration, MIC) i tumačenje rezultata u vidu osjetljivo (S), umjereno osjetljivo (I) i otporno (R). Prilikom postupka izvođenja testa i tumačenja rezultata pratili smo preporuke standarda objavljenog od strane Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) (CLSI, 2018a i b). MIC dobiven postupkom testa mikrodilucije ukazuje na koncentraciju antimikrobnog sredstva potrebnu za inhibiranje infektivnog mikroorganizma na mjestu infekcije. Međutim, MIC ne predstavlja jedinstvenu vrijednost. Pravi MIC se nalazi negdje između najniže ispitne koncentracije koja inhibira rast mikroorganizma (tj. očitavanja MIC-a) i prvog nižeg razrjeđenja. Na primjer, ako se upotrijebe dvostruka razrjeđenja, a MIC se odredi kao 16 µg/ml, pravi MIC bi bio između 16 i 8 µg/mL. Čak i pod najbolje kontroliranim uvjetima, test mikrodilucije ne može dati istu krajnju točku svaki put kad se provede. Općenito, prihvatljiva obnovljivost testa nalazi se unutar dvostrukog razrjeđivanja stvarne krajnje točke. Nadalje, odgovarajući inokulum presudan je za točnost interpretacije MIC-ova. Inokulum prevelike gustoće može rezultirati lažnom otpornosti, dok onaj premale gustoće može rezultirati lažnom osjetljivošću očitavanja MIC-e zbog neadekvatnog rasta mikroorganizama u kulturi bujona (CLSI, 2018b). Malo je dostupnih podataka o povezanosti rezultata *in vitro* ispitivanja antimikrobne osjetljivosti i kliničkih rezultata za ove

mikobakterije. Detaljne smjernice date su za MAC, *M. kansasii* i RGM, jer postoji dovoljno podataka na kojima se temelje opće preporuke, te su u nastavku teksta i opisane.

4.2.3.1 Određivanje antimikrobne osjetljivosti spororastućih netuberkuloznih mikobakterijskih vrsta

Određivanje antimikrobne osjetljivosti izolata pripadnika spororastućih mikobakterijskih vrsta (SGM) proveli smo postupkom mikrodilucije u bujonu pomoću Thermo Scientific™ Sensititre™ Myco SLOMYCO AST Plate komercijalnog kompleta (TREK Diagnostic System, East Grinstead, UK). Sastoji se od mikrotitracijskih pločica sa 96 jažica unutar kojih se nalazi 13 različitih antibiotika, a njihov raspored i koncentracije unutar pločice su prikazani na slici 4. Sve izolate za koje je prethodno dokazana pripadnost SGM testirali smo na svih 13 antibiotika, uz dvije iznimke. Naime, prilikom ispitivanja *M. kansasii* izolata lijekove izoniazid i etambutol nismo testirali iz razloga što su u humanoj medicini vrijednosti MIC-a ovih antibiotika loše povezani s kliničkim odgovorom te njihove prijava nije preporučljiva (STEADHAM i sur., 1985.). Također rezultati MIC-a prilikom testiranja etambutola metodom mikrodilucije nisu ponovljivi. Također, prilikom ispitivanja izolata MAC-a osjetljivost na lijekove etambutol, rifampin i rifabutin nismo testirali iz istog gore navedenog razloga. Važno je napomenuti da smo kod MAC izolata odabirali starije, prozirne kolonije ako su bile prisutne iz razloga što pigmentirani sojevi obično predstavljaju osjetljiviji fenotip (CLSI, 2018b). Prilikom provođenja navedenog ispitivanja kao pozitivnu kontrolu koristili smo soj *M. avium* ATCC 700898 sa poznatim MIC vrijednostima prema preporuci proizvođača kita.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CLA 0.06	CLA 0.12	CLA 0.25	CLA 0.5	CLA 1	CLA 2	CLA 4	CLA 8	CIP 16	STR 64	DOX 16	ETH 20
CLA 16	CLA 32	CLA 64	MXF 8	RIF 8	SXT 8/152	AMI 64	LZD 64	CIP 8	STR 32	DOX 8	ETH 10
RFB 8	EMB 16	INH 8	MXF 4	RIF 4	SXT 4/76	AMI 32	LZD 32	CIP 4	STR 16	DOX 4	ETH 5
RFB 4	EMB 8	INH 4	MXF 2	RIF 2	SXT 2/38	AMI 16	LZD 16	CIP 2	STR 8	DOX 2	ETH 2.5
RFB 2	EMB 4	INH 2	MXF 1	RIF 1	SXT 1/19	AMI 8	LZD 8	CIP 1	STR 4	DOX 1	ETH 1.2
RFB 1	EMB 2	INH 1	MXF 0.5	RIF 0.5	SXT 0.5/9.5	AMI 4	LZD 4	CIP 0.5	STR 2	DOX 0.5	ETH 0.6
RFB 0.5	EMB 1	INH 0.5	MXF 0.25	RIF 0.25	SXT 0.25/4.75	AMI 2	LZD 2	CIP 0.25	STR 1	DOX 0.25	ETH 0.3
RFB 0.25	EMB 0.5	INH 0.25	MXF 0.12	RIF 0.12	SXT 0.12/2.38	AMI 1	LZD 1	CIP 0.12	STR 0.5	DOX 0.12	POS

AMI -- Amikacin
CIP -- Ciprofloksacin
CLA -- Klaritromicin
DOX -- Doksiciklin
EMB -- Etambutol
ETH -- Etionamid
INH -- Isoniazid
LZD -- Linezolid
MXF -- Moksifloksacin
RFB -- Rifabutin
RIF -- Rifampicin
STR -- Streptomycin
SXT -- Trimetoprim/sulfametazol
POS -- Pozitivna kontrola

Slika 4. Raspored i koncentracije antibiotika mikrotitracijske pločice Thermo Scientific™ Sensititre™ Myco SLOMYCO AST kompleta

4.2.3.2 Određivanje antimikrobne osjetljivosti brzorastućih netuberkulozih mikobakterijskih vrsta

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti izolata pripadnika brzorastućih netuberkulozih mikobakterija (RGM) proveli smo postupkom mikrodilucije u bujonu pomoću Thermo Scientific™ Sensititre™ Myco RAPMYCO AST Plate komercijalnih kompleta (TREK Diagnostic System, East Grinstead, UK). Sastoje se od mikrotitracijskih pločica sa 96 jažica unutar kojih se nalazi 15 različitih antibiotika, a njihov raspored i koncentracije unutar pločice su prikazani na slici 5. Budući da se rezultati ispitivanja osjetljivosti za neke od testiranih lijekova odnose na određene vrste ili grupe, prije samog testiranja identificirali smo izolate do razine vrste, te smo ih testirali na svih 15 antibiotika. Prilikom provođenja navedenog ispitivanja kao pozitivnu kontrolu koristili smo soj *M. smegmatis* ATCC 19420 sa poznatim MIC vrijednostima prema preporuci proizvođača kita.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

SXT 0.25/4.75	SXT 0.5/9.5	SXT 1/19	SXT 2/38	SXT 4/76	SXT 8/152	LZD 1	LZD 2	LZD 4	LZD 8	LZD 16	LZD 32
CIP 0.12	CIP 0.25	CIP 0.5	CIP 1	CIP 2	CIP 4	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	IMI 32	IMI 64
MXF 0.25	MXF 0.5	MXF 1	MXF 2	MXF 4	MXF 8	FEP 1	FEP 2	FEP 4	FEP 8	FEP 16	FEP 32
FOX 4	FOX 8	FOX 16	FOX 32	FOX 64	FOX 128	AUG2 2/1	AUG2 4/2	AUG2 8/4	AUG2 16/8	AUG2 32/16	AUG2 64/32
AMI 1	AMI 2	AMI 4	AMI 8	AMI 16	AMI 32	AMI 64	AXO 4	AXO 8	AXO 16	AXO 32	AXO 64
DOX 0.12	DOX 0.25	DOX 0.5	DOX 1	DOX 2	DOX 4	DOX 8	DOX 16	MIN 1	MIN 2	MIN 4	MIN 8
TGC 0.015	TGC 0.03	TGC 0.06	TGC 0.12	TGC 0.25	TGC 0.5	TGC 1	TGC 2	TGC 4	TOB 1	TOB 2	TOB 4
CLA 0.06	CLA 0.12	CLA 0.25	CLA 0.5	CLA 1	CLA 2	CLA 4	CLA 8	CLA 16	TOB 8	TOB 16	POS

AMI -- Amikacin

AUG2 -- Amoksicilin/klavulonska
kiselina

FEP -- Cefepim

FOX -- Cefoksitin

AXO -- Ceftriakson

CIP -- Cipprofloksacin

CLA -- Klaritromicin

DOX -- Doksiciklin

IMI -- Imipenem

LZD -- Linezolid

MIN -- Minociklin

MXF -- Moksifloksacin

TGC -- Tigeciklin

TOB -- Tobramicin

SXT -- Trimetoprim/sulfametoksazol

POS -- Pozitivna kontrola

Slika 5. Raspored i koncentracije antibiotika mikrotitracijske pločice Thermo Scientific™ Sensititre™ Myco RAPMYCO AST kita

4.2.3.3 Postupak provedbe metode mikrodulucije u bujonu

4.2.3.3.1 Priprema uzoraka za nacjepljivanje i njihovo nanošenje na mikrotitracijsku pločicu

Da bi se standardizirala gustoća uzoraka za nacjepljivanje prilikom ispitivanja antimikrobne osjetljivosti, koristi smo standard zamućenosti jednak 0,5 po McFarland standardu. Nekoliko izraslih kolonija iste morfologije sterilnom bakteriološkom ušicom prenijeli smo u 4,5 ml sterilne destilirane vode u koju smo prethodno stavili sterilne staklene kuglice (7-10 komada kuglica promjera 3 mm) dok se nije postigla zadana gustoća. Prilikom odabira kolonija vodili smo računa da se uzimaju one koje rastu pojedinačno na podlozi, pritom zaobilazeći spojene kolonije. U slučaju MAC kompleksa uzimali smo kolonije koje su prozirnog izgleda, ukoliko su takve i bile prisutne. Dobivenu suspenziju zatim smo izmiješali pomoću mješalice kroz 15–20 sekundi, te je kratko odložili kako bi se preostali veći dijelovi spustili na dno. Dobiveni supernatant koristili smo za nacjepljivanje. U slučaju pojave velike nakupine kolonija ranije smo ih usitniti koristeći sterilan štapić i mikrotubicu. Konačnu koncentraciju za nacjepljivanje (gustoća $\approx 5 \times 10^5$ CFU/ml) dobili smo prijenosom 50 μ l suspenzije od 0,5 po McFarland standardu u 10 ml kationski prilagođen Mueller-Hinton bujon

(engl. cation-adjusted Mueller-Hinton broth, CAMHB) (Thermo Scientific, Lenexa, SAD) sa ili bez dodatka 5% oleinske kiseline-albumin-dekstroza-katalaze (engl. oleic acid–albumin–dextrose–catalase, OADC) (Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD). Prilikom ispitivanja RGM koristili smo samo CAMHB, dok smo kod SGM koristili CAMHB sa dodatkom OADC-a tako da smo u 11 ml CAMHB dodali 550 µl OADC-a. Epruvete smo zatim okrenuli 8–10 puta kako bi se sadržaj temeljito izmiješao. Dobivenu suspenziju zatim smo ulili u sterilnu plastičnu posudu i koristeći višekanalnu pipetu prenijeli volumen od 100 µl u svaku jažicu mikrodilucijske pločice s 96 jažica. Pločice smo zatim prekrili ljepljivim pokrovom i inkubirali na određenoj temperaturi. Tako smo vrste pripadnike RGM inkubirali na $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pripadnike MAC-a i ostale SGM inkubirali smo na $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon postavljanja u inkubator, inokulirane ploče ne smiju biti složene više od 3 komada jedna na drugu. Ploče smo također stavili u plastičnu vrećicu koja se može zatvoriti kako bi se spriječila dehidracija.

4.2.3.3.2 Prosudba, tumačenje i izvještavanje rezultata

4.2.3.3.2.1 *M. avium* kompleks

Za sva antimikrobna sredstva koja se testiraju prilikom ispitivanja pripadnika MAC-a, MIC je najniža koncentracija lijeka koja inhibira vidljivi rast (npr. jažica 4A ako je 1E kontrola rasta, kao što je prikazano na slici 6.). Testne ploče na koje smo nacijepili vrste pripadnike MAC-a prvi puta smo pregledali sedmog dana inkubacije. Ako je rast (koji se pojavljuje kao zamućenost ili taloženje stanica na dnu jažice) u jažici za kontrolu rasta dovoljan (tj. najmanje 2+ na temelju ljestvice prikazane na slici 6.), vrijednosti MIC-a smo zabilježili. Drugačije, ploču smo nastavili inkubirati i očitavali je 10. dana. Ako rast niti tada nije bio dovoljan u jažici za kontrolu rasta, ploču smo ponovno očitavali 14. dan. Ako je porast ostao nedovoljan i 14. dana, test smo ponovili. Za sva testirana antimikrobna sredstva zabilježili smo vrijednosti MIC-a, a tumačenje rezultata za one antibiotike koji su opisani u smjernicama od strane CLSI-a kako je prikazano u tablici 7. Kako je već prije navedeno, osjetljivost na antibiotike etambutol, rifampin i rifabutin nismo testirali.

Tablica 7. Antimikrobna sredstva i njihove krajnje točke osjetljivosti za MAC (CLSI, 2018a)

Antimikrobno sredstvo	MIC, µg/ml		
LIJEK PRVE LINIJE			
Klaritromicin	≤8	16	≥32
Amikacin	≤16	32	≥64
LIJEK DRUGE LINIJE			
Moksifloksacin	≤1	2	≥4
Linezolid	≤8	16	≥32
Tumačenje rezultata	S	I	R

MIC (engl. minimal inhibitory concentration) – najniža koncentracija koja prekida rast

S (engl. susceptible) – osjetljiv, I (engl. intermediate) – umjereno osjetljiv, R (engl. resistant) - otporan

4.2.3.3.2.2 *M. kansasii*

Za sve osim jednog od antimikrobnih sredstava, MIC je najniža koncentracija lijeka koja inhibira vidljivi rast. Izuzetak je trimetoprim-sulfametoksazol, za koji je krajnja koncentracija jažica koja pokazuje približno 80% inhibicije rasta u usporedbi s rastom u kontrolnoj jažici bez lijeka (npr. jažica 1B ako je 1E kontrola rasta, kao što je prikazano na slici 6.). Testne ploče prvi puta smo pregledali sedmog dana inkubacije. Ako je porast bio nedovoljan, ploče smo nastavili inkubirati i ponovno smo ih pregledali nakon 10 do 14 dana. Za sva testirana antimikrobna sredstva zabilježili smo vrijednosti MIC-a, a tumačenje rezultata za one antibiotike koji su opisani u smjernicama od strane CLSI-a kako je prikazano u tablici 8. Kako je već prije napomenuto osjetljivost na lijekove izoniazid i etambutol nismo testirali.

Tablica 8. Antimikrobna sredstva i njihove krajnje točke osjetljivosti za *M. kansasii* (CLSI, 2018a)

Antimikrobno sredstvo	MIC, µg/ml		
LIJEK PRVE LINIJE			
Klaritromicin	≤ 8	16	≥ 32
Rifampin	≤ 1	-	≥ 2
LIJEK DRUGE LIJNIJE			
Amikacin	≤ 16	32	≥ 64
Ciprofloksacin	≤ 1	2	≥ 4
Doksiciklin	≤ 1	2-4	≥ 8
Linezolid	≤ 8	16	≥ 32
Moksifloksacin	≤ 1	2	≥ 4
Rifabutin	≤ 2	-	≥ 4
Trimetoprim - Sulfametoksazol	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Tumačenje rezultata	S	I	R

MIC (engl. minimal inhibitory concentration) – najniža koncentracija koja prekida rast

S (engl. susceptible) – osjetljiv, I (engl. intermediate) – umjeren osjetljiv, R (engl. resistant) - otporan

4.2.3.3.2.3 Ostale spororastuće netruberkuozne mikobakterije

Za sve osim jednog od antimikrobnih sredstava, MIC je najniža koncentracija lijeka koja inhibira vidljivi rast. Izuzetak je trimetoprim-sulfametoksazol, za koji je krajnja koncentracija jažica koja pokazuje približno 80% inhibicije rasta u usporedbi s rastom u kontrolnoj jažici bez lijeka kako je već prije opisano (npr. jažica 1B ako je 1E kontrola rasta, kao što je prikazano na slici 6.). Testne ploče pregledavali smo u razdoblju od sedmog do 14. dana inkubacije. Za sva testirana antimikrobna sredstva također smo zabilježili vrijednosti MIC-a, a tumačenje rezultata za one antibiotike koji su opisani u smjernicama od strane CLSI-a kako je prikazano u tablici 9.

Tablica 9. Antimikrobna sredstva i njihove krajnje točke osjetljivosti za ostale spororastuće netuberkulozne mikobakterije osim MAC i *M. kansasii* (CLSI, 2018a)

Antimikrobno Sredstvo	MIC, µg/ml		
	Amikacin	≤ 16	32
Ciprofloksacin	≤ 1	2	≥ 4
Klaritromicin	≤ 8	16	≥ 32
Doksiciklin	≤ 1	2-4	≥ 8
Linezolid	≤ 8	16	≥ 32
Moksifloksacin	≤ 1	2	≥ 4
Rifabutin	≤ 2	-	≥ 4
Rifampin	≤ 1	-	≥ 2
Trimetoprim - Sulfametoksazol	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Tumačenje rezultata	S	I	R

MIC (engl. minimal inhibitory concentration) – najniža koncentracija koja prekida rast

S (engl. susceptible) – osjetljiv, I (engl. intermediate) – umjereno osjetljiv, R (engl. resistant) – otporan

4.2.3.3.2.4 Brzorastuće netuberkulozne mikobakterije

Za sve osim jednog od antimikrobnih sredstava, MIC je najniža koncentracija lijeka koja zaustavlja vidljivi rast, a izuzetak je trimetoprim-sulfametoksazol za koji se krajnja koncentracija u jažici prosuđuje na približno 80% inhibicije, kao što je opisano i za SGM. Testne ploče na koje smo nacijepili vrste pripadnike RGM prvi puta smo pregledali nakon 48 sati. Prosudba inhibicije rasta nakon 48 sati posebno je od koristi za *M. fortuitum* skupinu, *M. mucogenicum* skupinu i *M. smegmatis* skupinu, što je kasnije detaljnije objašnjeno. Ako je rast (koji se pojavljuje kao замуćenost ili taloženje stanica na dnu jažice) u jažici za kontrolu rasta bio dovoljan (tj. najmanje 2+ na temelju ljestvice prikazane na slici 6.), vrijednosti MIC-a smo zabilježili. Drugačije, ploču smo nastavili inkubirati i očitavali je treći dan inkubacije. Ako rast niti tada nije bio dovoljan u jažici za kontrolu rasta, ploču smo ponovno očitavali četvrti dan inkubacije. Ako i petoga dana nije bilo moguće zabilježiti rast, test smo ponovili. Prilikom ispitivanja pripadnika vrsta *M. phocaicum* i *M. peregrinum* rezultate testa osjetljivosti na klaritromicin (samo tumačenje, bez MIC-a) očitavali smo s ostalim rezultatima

nakon tri do pet dana inkubacije, pošto je za navedene vrste dokazano da imaju nefunkcionalni ili odsutni *erm* gen i stoga se očekuje da su osjetljivi na klaritromicin. Za sve ostale vrste pripadnike RGM rezultate testa osjetljivosti na klaritromicin očitali smo i 14. dana inkubacije, u svrhu fenotipske detekcije inducibilne otpornosti na makrolide uzrokovane prisutnošću *erm* gena, osim ako vrijednost MIC-a nije iznosila ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ ranije kada smo konačni rezultat i očitali.

Nadalje, prilikom očitavanja osjetljivosti na imipenem kod pripadnika *M. fortuitum* grupe (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. porcinum*) i *M. mucogenicum* grupe (*M. phocaicum*) u slučaju da je MIC vrijednost iznosila $> 8\mu\text{g/ml}$ petoga dana očitavanja, testiranje smo ponovili uz inkubaciju ne dulju od tri dana. Ako je vrijednost MIC-a ponovljenog testa opet iznosila $> 8\mu\text{g/ml}$, vrijednost MIC-a nismo prijavili zbog nestabilnosti antibiotika. Nadalje, za tigeciklin smo zabilježili samo vrijednosti MIC-a bez tumačenja rezultata, pošto do sada nije opisana povezanost između *in vitro* rezultata i kliničkog odgovora, pa time nisu određene niti krajnje točke koje razdvajaju osjetljive od otpornih izolata. Za sva ostala testirana antimikrobna sredstva zabilježili smo i vrijednosti MIC-a i tumačenje rezultata, prateći smjernice opisane od strane CLSI-a kako je prikazano u tablici 10. Za antibiotike cefepim, cefriakson, amoksicilin – klavulonsku kiselinu i minociklin smjernice za tumačenje rezultata za brzorastuće mikobakterije do sada nisu utvrđene od strane CLSI-a, te smo rezultate tumačili prema smjernicama CLSI-a za nokardije i ostale aktinomicete kako je opisano u nedavnom istraživanju (BRODA i sur., 2013.).

Tablica 10. Antimikrobna sredstva i njihove krajnje točke osjetljivosti za brzorastuće netuberkulozne mikobakterije

Antimikrobno Sredstvo	MIC, µg/ml		
	Amikacin ¹	≤ 16	32
Cefoksitin ¹	≤ 16	32 - 64	≥ 128
Ciprofloksacin ¹	≤ 1	2	≥ 4
Klaritromicin ¹	≤ 2	4	≥ 8
Doksiciklin ¹	≤ 1	2 - 4	≥ 8
Imipenem ¹	≤ 4	8 - 16	≥ 32
Linezolid ¹	≤ 8	16	≥ 32
Moksifloksacin ¹	≤ 1	2	≥ 4
Trimetoprim - Sulfametoksazol ¹	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Tigeciklin ¹	-	-	-
Tobramicin ¹	≤ 2	4	≥ 8
Cefepim ³	≤ 8	16	≥ 32
Amoksicilin – klavulonska kiselina omjer 2:1 ²	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
Cefriakson ²	≤ 8	16 - 32	≥ 64
Minociklin ²	≤ 1	2 - 4	≥ 8
Tumačenje rezultata	S	I	R

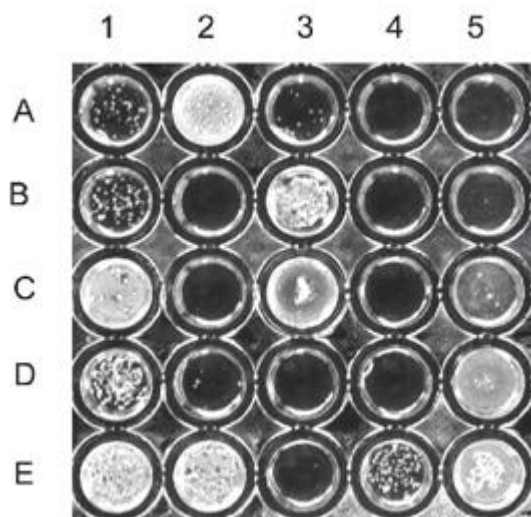
MIC (engl. minimal inhibitory concentration) – najniža koncentracija koja prekida rast

S (engl. susceptible) – osjetljiv, I (engl. intermediate) – umjereno osjetljiv, R (engl. resistant) – otporan

¹ Antimikrobna sredstva i njihove krajnje točke osjetljivosti prema preporukama CLSI za RGM (CLSI, 2018a)

² Antimikrobna sredstva i njihove krajnje točke osjetljivosti prema preporukama CLSI za nokardije i ostale aktinomicete (CLSI, 2018a)

³ Antimikrobna sredstva i njihove krajnje točke osjetljivosti prema preporukama CLSI za nokardije i ostale aktinomicete (CLSI, 2011.)



1E	Kontrola rasta (4+)
3A	± Malo kolonija, nema zamućenosti
5C	± Malo kolonija, blaga zamućenost
5D	1+ Vidljiva zamućenost
5E	2+ Vidljiva zamućenost i “nepravilan rast kolonija”
1B	2+ Umjeren rast kolonija, blaga zamućenost
1D	3+ Opsežan rast kolonija
4E	3+ Opsežan rast kolonija, zamućenost
1C	4+ Opsežan rast kolonija usporediv sa kontrolom (također jažice 2A i 2E su 4+)

Slika 6. Smjernice za tumačenje krajnjih točaka minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) metodom mikrodilucije pri testiranju netuberkuloznih mikobakterija (CLSI, 2018b)

± znak označava jednu do pet brojivih kolonija i / ili blagu, ali definitivnu zamućenost. Poznate negativne jažice treba pažljivo pročitati, jer se može vidjeti blagi talog povezan s naciepljivanjem. Rezultati se čitaju kao što je prikazano u tablici. Jažice 4A, 5A, 2B, 4B, 5B, 2C, 4C, 2D, 3D, 4D i 3E su negativne.

4.2.4 Statistička obrada rezultata

Rezultate smo obradili statističkim programom Stata 13.1 (Stata Corp. SAD). Deskriptivne podatke prikazali smo kao vrijednosti ukupnog broja i postotka. Opažene razlike između skupina testirali smo Hi-kvadrat testom i Fisher exact testom, a značajnost razlika prikazali smo P-vrijednošću pri čemu smo P-vrijednost manju od 0.05 smatrali statistički značajnom.

4.2.5 Prikaz geografske rasprostranjenosti pojedinih vrsta brzo i spororastućih neuberkuloznih mikobakterija s obzirom na antimikrobnu otpornost u Republici Hrvatskoj

Geografsku rasprostranjenost dobivenih rezultata antimikrobne osjetljivosti prikazali smo pomoću računalnog programa QGIS 3.10 (Open Source Geographic Information System, <https://qgis.org/en/site/>). Na mapama smo prikazali izdvojene sojeve brzo i spororastućih netuberkuloznih mikobakterija koji su pokazali otpornost na pojedine antibiotike, te smo ih razdvojili prema vrstama mikobakterija.

5 REZULTATI

5.1 Rezultati bakterioloških pretraga

Tijekom promatranog razdoblja od 2014. do 2016. godine ukupno smo bakteriološki pretražili 593 arhivskih uzoraka organa i tkiva podrijetlom iz 153 životinja iz 14 županija i Grada Zagreba. Pripadnike roda *Mycobacterium* izdvojili smo iz ukupno 80 životinja (52%), i to 29 (36,2%) domaćih životinja (17 goveda, 5 svinja, 2 ovce, 1 koza, 2 kokoši, 2 patke) i 51 (63,7%) divlje životinje (51 srna), a izdvojili smo ukupno 84 izolata. Godine 2014. mikobakterije su izdvojene iz 6 od 23 goveda (26%), 5 od 12 svinja (42%), 2 (kokoš i patka) od 4 ostalih domaćih životinja (50%) i 28 od 39 srna (72%). Godine 2015. mikobakterije su izdvojene iz 6 od 17 goveda (35%), 2 (kokoš i ovca) od 3 ostale domaće životinje i 16 od 27 srna (59%), dok je jedna pretražena svinja dala negativan rezultat. Godine 2016. mikobakterije su izdvojene iz 5 od 9 goveda (56%), 3 (koza, patka i ovca) od 4 ostalih domaćih životinja (75%) i 7 od 14 srna (50%). Mikobakterije smo iz goveda izdvojili u ukupno 8 županija i to u Bjelovarsko – bilogorskoj (1 izolat), Koprivničko – križevačkoj (1 izolat), Ličko – senjskoj (1 izolat), Osječko – baranjskoj (4 izolata), Požeško – slavonskoj (1 izolat), Sisačko – moslavačkoj (5 izolata), Splitsko – dalmatinskoj (2 izolata) i Zagrebačkoj županiji (2 izolata). Mikobakterije iz svinja smo izdvojili u ukupno 2 županije i to Bjelovarsko – bilogorskoj (1 izolat) i Zagrebačkoj županiji (4 izolata). Iz ostalih domaćih životinja mikobakterije smo izdvojili u ukupno 5 županija i to Bjelovarsko – bilogorskoj (1 izolat iz kokoši i 1 iz koze), Karlovačkoj (1 izolat iz ovce), Vukovarsko – srijemskoj (1 izolat iz patke), Zagrebačkoj županiji (1 izolat iz kokoši) i Gradu Zagrebu (1 izolat iz ovce i 1 iz patke). Mikobakterije smo iz divljih životinja, tj. srna izdvojili u jednoj županiji i to Bjelovarsko – bilogorskoj (55 izolata) (Tablica 11.).

Tablica 11. Broj bakteriološki obrađenih životinja te broj izdvojenih izolata

ŽUPANIJA	VRSTA ŽIVOTINJE I GODINA													UKUPNO
	GOVEDA			SVINJE			OSTALE*			SRNE				
	2014.	2015.	2016.	2014.	2015.	2016.	2014.	2015.	2016.	2014.	2015.	2016.		
	Pretraženo/pozitivno			Pretraženo/pozitivno			Pretraženo/pozitivno			Pretraženo/pozitivno			Pretraženo/pozitivno	
Bjelovarsko - bilogorska	1/1	1/-	1/-	1/1	-/-	-/-	-/-	1/1 kokoš	1/1 koza	39/28	27/16	14/7	86/55	
Brodsko - posavska	-/-	-/-	-/-	1/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1/-	
Grad Zagreb	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	2/1 ovca	1/1 patka	-/-	-/-	-/-	4/2	
Istarska	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1/- kokoš	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1/-	
Karlovačka	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1/1 ovca	-/-	-/-	-/-	1/1	
Koprivničko - križevačka	3/1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	3/1	
Ličko - senjska	3/1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	3/1	
Međimurska	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1/- ovca	-/-	-/-	-/-	1/-	
Osječko - baranjska	6/3	-/-	1/1	1/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	8/4	
Požeško - slavonska	2/-	1/-	1/1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	3/1	

Sisačko - moslavačka	2/-	10/3	2/2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	14/5
Splitsko - dalmatinska	-/-	3/1	1/1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	4/2
Vukovarsko - srijemska	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1/1 patka	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1/1
Zadarska	1/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1/-
Zagrebačka	5/-	2/2	3/-	9/4	1/-	-/-	2/1 kokoš	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	22/7
UKUPAN BROJ	23/6	17/6	9/5	12/5	1/-	-/-	4/2	3/2	4/3	39/28	27/16	14/7	153/80
% POZITIVNIH	26	35	56	42	-	-	50	67	75	72	59	50	52
BROJ IZOLATA	6	6	5	5	-	-	2	2	3	30	18	7	84

* ostale domaće životinje: ovca, koza, kokoš, patka

S obzirom da su arhivski izolati prethodno opisani samo do razine roda, također smo njih ukupno 71 nasadili na hranjive podloge u svrhu daljnje klasifikacije i određivanja vrste. Navedeni arhivski izolati podrijetlom su od 22 (31%) domaće životinje (14 goveda, 5 svinja i 3 kokoši) i 49 (69%) divljih životinja (49 divljih svinja) iz 9 županija i Grada Zagreba kako je već ranije opisano.

Tako je dobiven ukupan broj od 155 izolata koji uključuje arhivske i izdvojene izolate podrijetlom od 51 (32,9%) domaće (31 govedo, 10 svinja, 2 ovce, 1 koza, 5 kokoši, 2 patke) i 104 (67,1%) divlje (49 divljih svinja i 55 srna) životinje (Tablica 12.).

U svrhu provođenja daljnjih pretraga izdvojene izolate smo podijelili s obzirom na brzinu rasta na hranjivoj podlozi na brzorastuće kod kojih su kolonije bile vidljive unutar sedam dana i spororastuće kod kojih je bilo potrebno dulje vrijeme inkubacije.

Na pojedinim hranjivim podlogama na koje smo nacijepili arhivski materijal/ izolat podrijetlom od iste divlje životinje (srne ili divlje svinje) uočili smo kolonije različitih morfoloških obilježja, te smo ih razdvojili kao zasebne izolate pod pretpostavkom da se radi o različitim mikobakterijskim vrstama (Slika 7. – 10.). Od ukupno 155 izolata, 71 izolat je arhivski iz promatranog razdoblja od 2012. do 2013. godine, dok je ostalih 84 izolata podrijetlom od arhivskih uzoraka iz razdoblja od 2014. do 2016. godine. Od navedenih izolata 106 (68,4%) je pripadnika brzorastućih mikobakterija, a 49 (31,6%) je spororastućih mikobakterija. U domaćih životinja izdvojili smo ukupno 18 (17%) izolata brzorastućih mikobakterija (13 izolata iz goveda, 1 izolat iz svinje, 2 izolata iz ovaca, 1 izolat iz koze, 1 izolat iz kokoši), dok smo iz divljih životinja izdvojili njih ukupno 88 (83%) (40 izolata iz divljih svinja, 48 iz srna). Nadalje, iz domaćih životinja izdvojili smo ukupno 33 (67,3%) izolata spororastućih mikobakterija (18 izolata iz goveda, 9 izolata iz svinja, 4 izolata iz kokoši, 2 izolata iz pataka), dok smo iz divljih životinja izdvojili njih ukupno 16 (32,7%) (9 izolata iz divljih svinja, 7 izolata iz srna) (Tablica 12.).

Svih navedenih 155 izolata nakon porasta vidljivih kolonija na hranjivim podlogama mikroskopski smo pretražili na prisutnost acidorezistentnih štapića bojenjem po Ziehl - Neelsenu, te su svi pokazali pozitivan rezultat. Izolate smo označili rednim brojevima od 1. do 155., te smo ih dalje u tekstu navodili pod upravo tim brojevima.

Tablica 12. Popis ukupnog broja izolata brzo i spororastućih NTM-a uključenih u istraživanje

Redni broj izolata	Arhivski broj izolata ili uzorka*	Vrsta životinje	Županija	Godina	Klasifikacija	Rast kolonija na podlozi	Vidljivi rast
1.	851	govedo	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	7. dan
2.	44960	govedo	Koprivničko - križevačka	2014.	brzorastuće	G	5. dan
3.	6920	govedo	Ličko - senjska	2014.	brzorastuće	S, G	7. dan
4.	44601	govedo	Osječko - baranjska	2014.	brzorastuće	S	7. dan
5.	34191	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	brzorastuće	G	7. dan
6.	38560	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	brzorastuće	G	7. dan
7.	7995	govedo	Splitsko - dalmatinska	2015.	brzorastuće	G, P	7. dan
8.	111/1	govedo	Zagrebačka	2015.	brzorastuće	S, P	7. dan
9.	5373	govedo	Zagrebačka	2015.	brzorastuće	S, P	7. dan
10.	7114	govedo	Grad Zagreb	2016.	brzorastuće	G, P	7. dan
11.	20792	govedo	Osječko - baranjska	2016.	brzorastuće	G, P	7. dan
12.	29544	govedo	Sisačko - moslavačka	2016.	brzorastuće	S, G, P	7. dan
13.	32080	govedo	Splitsko - dalmatinska	2016.	brzorastuće	S, G, P	7. dan
14.	8640	svinja	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	14. dan
15.	14566	ovca	Grad Zagreb	2015.	brzorastuće	G	14. dan
16.	49573	ovca	Karlovačka	2016.	brzorastuće	S, G, P	7. dan
17.	48680	koza	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	brzorastuće	S, G, P	7. dan
18.	64293	kokoš	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S, G, P	14. dan
19.	54545/2335	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
20.	54541/2344	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	G	5. dan

21.	54541/2344	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	G	7. dan
22.	57536/2219	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	P, G	5. dan
23.	57536/2219	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S	5. dan
24.	57539/2223	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S, P	7. dan
25.	57541/222	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S, G	7. dan
26.	57543/2220	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
27.	57535/2254	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	G	5. dan
28.	57528/2252	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S, P	7. dan
29.	55933/3184	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
30.	65250/3187	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
31.	65250/3187	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S, G	7. dan
32.	62019/24459	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	G	7. dan
33.	62020/24461	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S, G	7. dan
34.	63453/2324	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	G	7. dan
35.	63457/2322	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	G	7. dan
36.	63457/2322	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S, P, G	7. dan
37.	63477/2281	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	P, G	7. dan
38.	63480/2283	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
39.	63476/2282	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	G	7. dan

40.	63476/2282	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	P	7. dan
41.	63695/2325	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	G, P	7. dan
42.	62141/3308	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	J	7. dan
43.	62147	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
44.	63587/3319	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
45.	63588/3296	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S, G	7. dan
46.	63590/3318	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
47.	54236/21672	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
48.	54238/21674	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S,G	7. dan
49.	54239/21675	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S, G, P	7. dan
50.	54234/21670	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S, G	7. dan
51.	58968/26708	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S, G	7. dan
52.	58968/26708	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	G	7. dan
53.	54235/21671	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S, P	7. dan
54.	58967/26706	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	G	7. dan
55.	58970/26711	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
56.	58972/26702	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
57.	58973/26697	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan
58.	58973/26697	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	brzorastuće	S	7. dan

59.	61437/1486	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S,G	7. dan
60.	64261/1481	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	P	7. dan
61.	64261/1492	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G, P	5. dan
62.	64501/1493	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G	7. dan
63.	64501/1496	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G	7. dan
64.	65058/1501	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	5. dan
65.	66529/13589	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	5. dan
66.	66868/13587	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	7. dan
67.	65629/13728	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	P	7. dan
68.	65633/13724	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S, G	7. dan
69.	65444/641	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G	7. dan
70.	65455/13672	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	7. dan
71.	66307/13956	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S, G	5. dan
72.	66307/13956	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	7. dan
73.	66307/13958	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	7. dan
74.	66307/13958	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S, G	5. dan
75.	66307/13962	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G	7. dan
76.	66310/13963	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G	7. dan
77.	70052/13941	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G	7. dan

78.	70052/13938	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S, G	5. dan
79.	70052/13939	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	7. dan
80.	1645/13752	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S	7. dan
81.	1645/13753	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S, G	7. dan
82.	1645/13754	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S	7. dan
83.	70030/13000	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S	7. dan
84.	1207/12952	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S	7. dan
85.	1207/12954	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S	7. dan
86.	1207/12955	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S, G, P	7. dan
87.	69905/12951	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G, P	5. dan
88.	69520/540	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G	7. dan
89.	69520/542	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	G	7. dan
90.	2753/14005	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S	7. dan
91.	2753/14006	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	P	7. dan
92.	2337/13038	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S, G	5. dan
93.	414/13005	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	P	7. dan
94.	3237/14011	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S, G	7. dan
95.	3237/14011	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S	7. dan
96.	64422/11588	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S	7. dan

97.	64422/11588	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	S, G	5. dan
98.	62660/20045	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	P	7. dan
99.	62662/20043	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	P, G	7. dan
100.	63495/10952	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	brzorastuće	G	5. dan
101.	70074/13749	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	brzorastuće	S, G	7. dan
102.	2492/10967	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	brzorastuće	P	7. dan
103.	1627/11051	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	brzorastuće	S, G	7. dan
104.	1627/11053	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	brzorastuće	G	7. dan
105.	183/10958	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	brzorastuće	S	7. dan
106.	183/10960	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	brzorastuće	S	5. dan
107.	16499	govedo	Bjelovarsko - bilogorska	2012.	spororastuće	S, G	35.dan
108.	51003	govedo	Brodsko - posavska	2012.	spororastuće	S, P	21. dan
109.	5081	govedo	Osječko - baranjska	2012.	spororastuće	S	21. dan
110.	21571	govedo	Osječko - baranjska	2012.	spororastuće	S	21. dan
111.	71097	govedo	Požeško - slavonska	2012.	spororastuće	S	21.dan
112.	44635/6-44	govedo	Sisačko - moslavačka	2012.	spororastuće	G	28.dan
113.	44635/5-43	govedo	Sisačko - moslavačka	2012.	spororastuće	S	49. dan
114.	44645	govedo	Sisačko - moslavačka	2012.	spororastuće	G	28.dan
115.	66845	govedo	Sisačko - moslavačka	2012.	spororastuće	S, G	42.dan
116.	4711	govedo	Zagrebačka	2012.	spororastuće	S, G	21. dan

117.	47206	govedo	Zagrebačka	2012.	spororastuće	P	28.dan
118.	63230	govedo	Ličko - senjska	2013.	spororastuće	S	35. dan
119.	40928	govedo	Požeško - slavonska	2013.	spororastuće	G	35. dan
120.	65154	govedo	Sisačko - moslavačka	2013.	spororastuće	S	56. dan
121.	42643	govedo	Osječko - baranjska	2014.	spororastuće	P	42. dan
122.	52113	govedo	Osječko - baranjska	2014.	spororastuće	S, P	21. dan
123.	38561	govedo	Sisačko - moslavačka	2015.	spororastuće	P	49. dan
124.	22715	govedo	Sisačko - moslavačka	2016.	spororastuće	S, G, P	42. dan
125.	50850/1	svinja	Međimurska	2012.	spororastuće	S	21. dan
126.	17320	svinja	Međimurska	2013.	spororastuće	S, P	21. dan
127.	36252	svinja	Međimurska	2013.	spororastuće	S	28.dan
128.	21488	svinja	Vukovarsko - srijemska	2013.	spororastuće	S	42. dan
129.	2092	svinja	Zagrebačka	2013.	spororastuće	P	39. dan
130.	4908	svinja	Zagrebačka	2014.	spororastuće	S, P	28.dan
131.	11974/174	svinja	Zagrebačka	2014.	spororastuće	S, P	21. dan
132.	11974/192	svinja	Zagrebačka	2014.	spororastuće	P	21. dan
133.	19270	svinja	Zagrebačka	2014.	spororastuće	S,P	21. dan
134.	4529	kokoš	Grad Zagreb	2013.	spororastuće	S, P	63. dan
135.	4066	kokoš	Zagrebačka	2013.	spororastuće	P	42. dan
136.	7726	kokoš	Zagrebačka	2013.	spororastuće	S, P	28. dan
137.	19239	kokoš	Zagrebačka	2014.	spororastuće	S	28. dan
138.	15323	patka	Vukovarsko - srijemska	2014.	spororastuće	S	42. dan
139.	39705	patka	Grad Zagreb	2016.	spororastuće	S, P	49. dan
140.	59154/3320	divlja svinja	Zagrebačka	2013.	spororastuće	G	28. dan
141.	62198/2371	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	spororastuće	S	14.dan
142.	55933/3184	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	spororastuće	G, P	21. dan
143.	62025/24465	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	spororastuće	P, G	35. dan

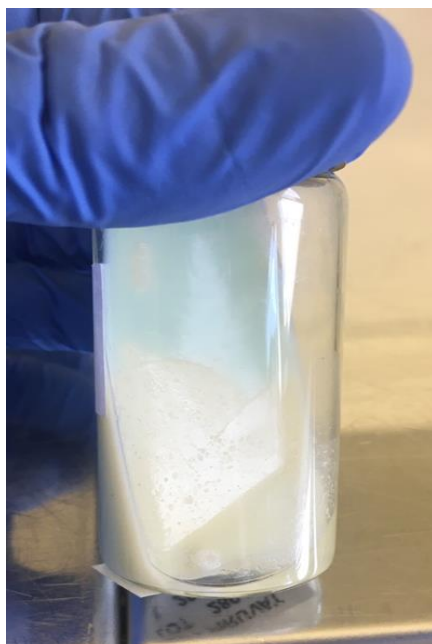
144.	62027/24460	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	spororastuće	S, P, G	35. dan
145.	63491/5236	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	spororastuće	P	21. dan
146.	63689/2323	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	spororastuće	S	28. dan
147.	62146/3347	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	spororastuće	G, P	35. dan
148.	63592	divlja svinja	Sisačko - moslavačka	2013.	spororastuće	G	35. dan
149.	66868/13588	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	spororastuće	S	28. dan
150.	65418/13726	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	spororastuće	P	28. dan
151.	68632/5061	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	spororastuće	P	21. dan
152.	2276/13758	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2015.	spororastuće	P	28. dan
153.	69523/13748	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2014.	spororastuće	S, G	14. dan
154.	3092/12024	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	spororastuće	S	21. dan
155.	2492/10966	srna	Bjelovarsko - bilogorska	2016.	spororastuće	S	35. dan

* arhivski izolati su iz promatranog razdoblja od 2012. do 2013. godine, a arhivski uzorci od 2014. do 2016. godine

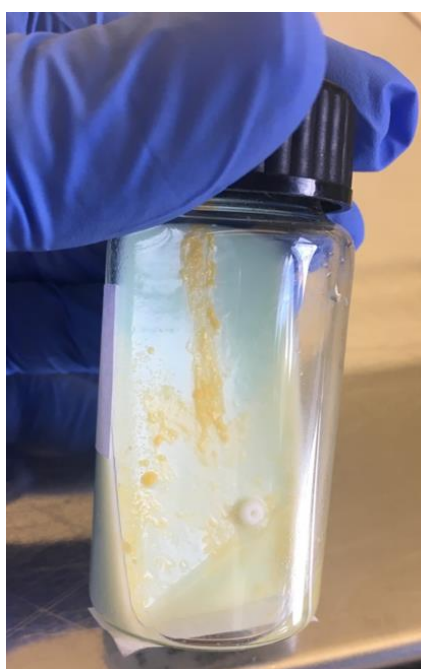
S - Stonebrink

G - Löwenstein Jensen s glicerolom

P - Löwenstein Jensen s piruvatom



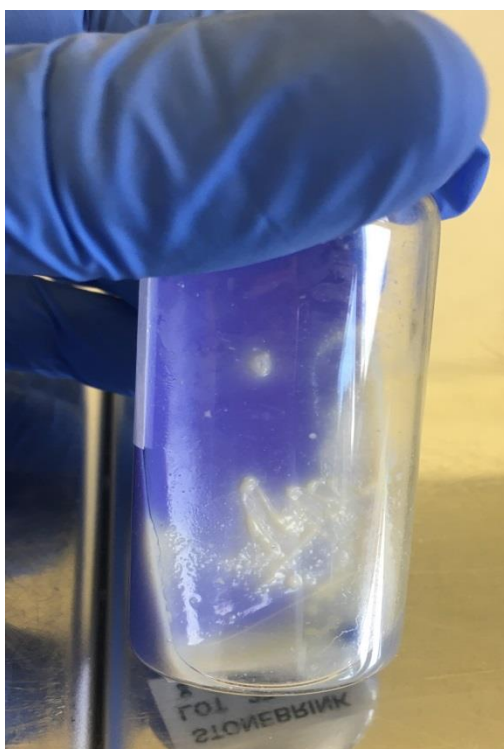
Slika 7. Prikaz kolonija brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija pripadnika vrste *M. neoaurum* izdvojenih iz srne pod rednim brojem izolata 86. dobivenih na hranjivoj podlozi Löwenstein Jensen s piruvatom



Slika 8. Prikaz kolonija brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija pripadnika vrste *M. neoaurum* izdvojenih iz srne pod rednim brojem izolata 89. dobivenih na hranjivoj podlozi Löwenstein Jensen s glicerolom



Slika 9. Prikaz kolonija spororastućih netuberkuloznih mikobakterija pripadnika vrste *M. triviale* izdvojenih iz svinje pod rednim brojem izolata 128. dobivenih na hranjivoj podlozi Stonebrink

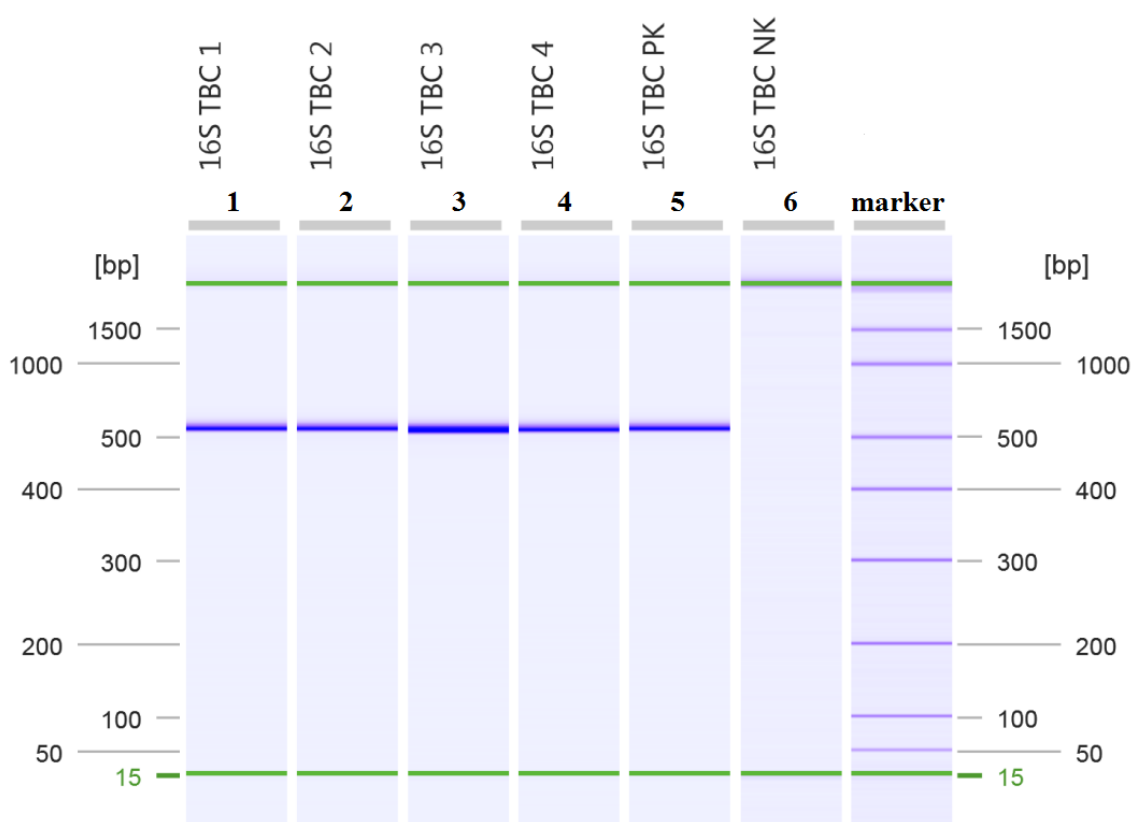


Slika 10. Prikaz kolonija spororastućih netuberkuloznih mikobakterija pripadnika vrste *M. gordonae* izdvojenih iz goveda pod rednim brojem izolata 113. dobivenih na hranjivoj podlozi Stonebrink

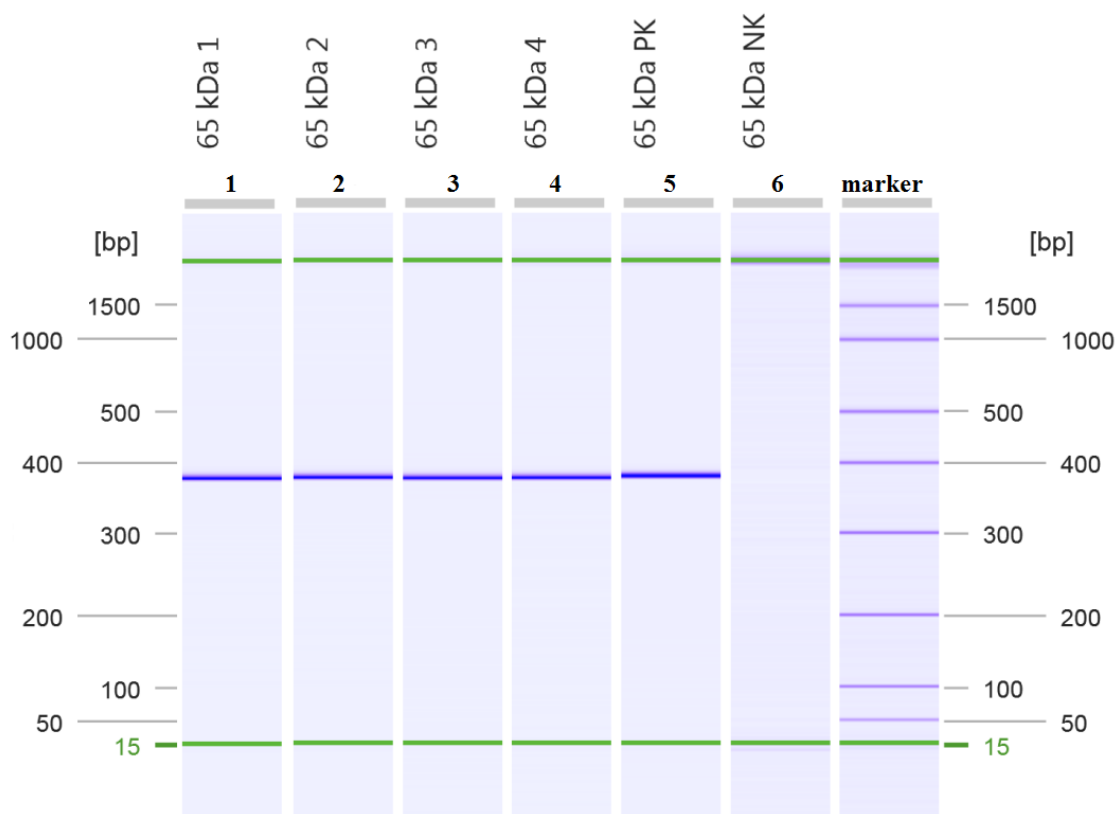
5.2 Rezultati molekularne identifikacije i tipizacije

5.2.1 Rezultati dokaza pripadnosti rodu *Mycobacterium* u izdvojenim izolatima

Postupkom umnažanja regije 16S rRNK gena i gena koji kodira 65 kD antigen, prisutnih u svih mikobakterija, sigurno dokazujemo pripadnost rodu *Mycobacterium*. Tijekom našeg istraživanja ukupno su izdvojena 155 izolata podrijetlom iz goveda (31 izolat), svinja (10 izolata), ovaca (2 izolata), koze (1 izolat), kokoši (5 izolata), pataka (2 izolata), divljih svinja (49 izolata) i srna (55 izolata). U svih 155 izolata utvrđeni su produkti umnožavanja veličine 543 baznih parova (bp) i 383 bp što je siguran dokaz da izolati pripadaju rodu *Mycobacterium* (Slika 11. i 12.).



Slika 11. Prikaz rezultata utvrđivanja pripadnosti rodu *Mycobacterium* izolata iz goveda, svinje, divlje svinje i srne na osnovu veličine produkta umnožavanja od 543 bazna para (bp). Pretraživani izolati označeni su brojevima 1 (govedo – izolat redni broj (r.b.) 110.), 2 (svinja – izolat r.b. 125.), 3 (divlja svinja – izolat r.b. 141.) i 4 (izolat r.b. 149.). Pozitivna kontrola označena je brojem 5 (*M. avium* subsp. *avium*), a negativna kontrola brojem 6.



Slika 12. Prikaz rezultata utvrđivanja pripadnosti rodu *Mycobacterium* izolata iz goveda, svinje, divlje svinje i srne na osnovu veličine produkta umnožavanja od 383 bazna para (bp). Pretraživani izolati označeni su brojevima 1 (govedo – izolat redni broj (r.b.) 110.), 2 (svinja – izolat r.b. 125.), 3 (divlja svinja – izolat r.b. 141.) i 4 (izolat r.b. 149.). Pozitivna kontrola označena je brojem 5 (*M. avium* subsp. *avium*), a negativna kontrola brojem 6.

5.2.2 Rezultati analize vrsta *Mycobacterium* sp. u izdvojenim izolatima (Geno Type® *Mycobacterium*)

Nakon što smo u izdvojenim izolatima dokazali pripadnost rodu *Mycobacterium*, pristupili smo dokazivanju klinički značajnih mikobakterija pomoću testa “Geno Type® *Mycobacterium* CM”. Test nam omogućava identifikaciju sljedećih vrsta mikobakterija: *M. avium* ssp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoeense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. tuberculosis* kompleks i *M. xenopi*. Specifičnom hibridizacijom testirali smo svih 155 izolata. Pripadnost vrsti uspješno smo odredili za 48 izdvojenih izolata. Pripadnost *M. avium* ssp. utvrdili smo u 18 (11,6%) izolata u ukupno 8 županija, i to u Bjelovarsko – bilogorskoj (2 izolata – 2 srne), Ličko – senjskoj (1 izolat iz goveda), Međimurskoj (3 izolata

– 3 svinje), Osječko – baranjskoj (1 izolat iz goveda), Požeško – slavonskoj (1 izolat iz goveda), Vukovarsko – srijemska (1 izolat iz patke), Zagrebačkoj županiji (ukupno 7 izolata – 1 govedo, 3 svinje i 3 kokoši) i Gradu Zagrebu (2 izolata – 1 kokoš, 1 patka).

Pripadnost *M. fortuitum* utvrdili smo u 27 (17,4%) izolata u ukupno 5 županija, i to Bjelovarsko – bilogorskoj (17 izolata – 1 govedo, 1 svinja, 15 srna), Ličko – senjskoj (1 izolat iz goveda), Osječko – baranjskoj (1 izolat iz goveda), Sisačko – moslavačkoj (4 izolata – 4 divlje svinje) i Zagrebačkoj županiji (4 izolata – 2 goveda, 2 divlje svinje). Pripadnost *M. gordonae* utvrdili smo u 3 (1,9%) izolata u ukupno 2 županije, i to Osječko – baranjskoj (1 izolat iz goveda) i Sisačko – moslavačkoj županiji (2 izolata iz goveda) (Tablica 13.).

Ostalim izdvojenim izolatima nije bilo moguće odrediti pripadnost vrsti prethodno navedenom metodom, pa smo analizu nastavili pomoću testa “Geno Type® Mycobacterium AS” koji omogućava identifikaciju sljedećih vrsta: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai/M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* i *M. shimoidei*.

Specifičnom hibridizacijom testirali smo preostalih 107 izolata. Pripadnost vrsti uspješno smo odredili kod 13 izolata. Pripadnost *M. celatum* utvrdili smo u 8 (5,2%) izolata u ukupno 2 županije, i to Osječko – baranjskoj (2 izolata iz goveda) i Sisačko – moslavačkoj županiji (6 izolata – 1 iz goveda, 5 iz divljih svinja).

Pripadnost *M. kansasii* utvrdili smo u 3 (1,9%) izolata u ukupno 2 županije, i to Bjelovarsko – bilogorskoj (2 izolata iz srna) i Sisačko – moslavačkoj županiji (1 izolat iz goveda). Pripadnost *M. intermedium* utvrdili smo u 2 (1,3%) izolata u ukupno 2 županije, i to u Bjelovarsko – bilogorskoj (1 izolat iz goveda) i Sisačko – moslavačkoj županiji (1 izolat iz divlje svinje). Navedenim testom “Geno Type® Mycobacterium AS” ne možemo razdvojiti vrste *M. szulgai/M. intermedium*, te smo za daljnju identifikaciju upotrijebili test “Geno Type® Mycobacterium CM“, kojim se za vrstu *M. szulgai* javljaju hibridizacijske zone na položajima 1, 2, 3, 10 i 11, a za *M. intermedium* na položajima 1, 2, 3 i 10 što je bio slučaj kod naših izolata (Tablica 13.).

Navedenim testovima uspješno smo tipizirali ukupno 61 (39,4%) izolat do razine vrste, dok je za preostalih 94 izolata samo potvrđena pripadnost rodu *Mycobacterium*.

Tablica 13. Prikaz rezultata analize vrsta specifičnom hibridizacijom pomoću testa “Geno Type® Mycobacterium CM i AS”

Vrsta životinje	Ukupan broj izolata	Geno Type® Mycobacterium CM			Geno Type® Mycobacterium AS			Nisu tipizirani
		broj dokazanih izolata (redni broj izolata)			broj dokazanih izolata/redni broj izolata			
		<i>M. avium</i> ssp.	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. intermedium</i>	
Govedo	31	4 (110., 111., 116., 118.)	5 (1., 3., 8., 9., 11.)	3 (113., 115., 121.)	3 (109., 120., 122.)	1 (112.)	1 (107.)	14
Svinja	10	6 (125., 126, 127., 131., 132, 133.)	1 (14.)	0	0	0	0	3
Ovca	2	0	0	0	0	0	0	2
Koza	1	0	0	0	0	0	0	1
Kokoš	5	4 (134.-137.)	0	0	0	0	0	1
Patka	2	2 (138., 139.)	0	0	0	0	0	0
Divlja svinja	49	0	6 (30., 42., 43., 45., 49., 57.)	0	5 (141.-145.)	0	1 (148.)	37
Srna	55	2 (149., 150.)	15 (66., 71., 73., 80., 82., 83., 85., 95., 98.-102., 104., 106.)	0	0	2 (153., 154.)	0	36
Ukupno	155	18	27	3	8	3	2	94
% od ukupnog broja		11,6	17,4	1,9	5,2	1,9	1,3	60,6

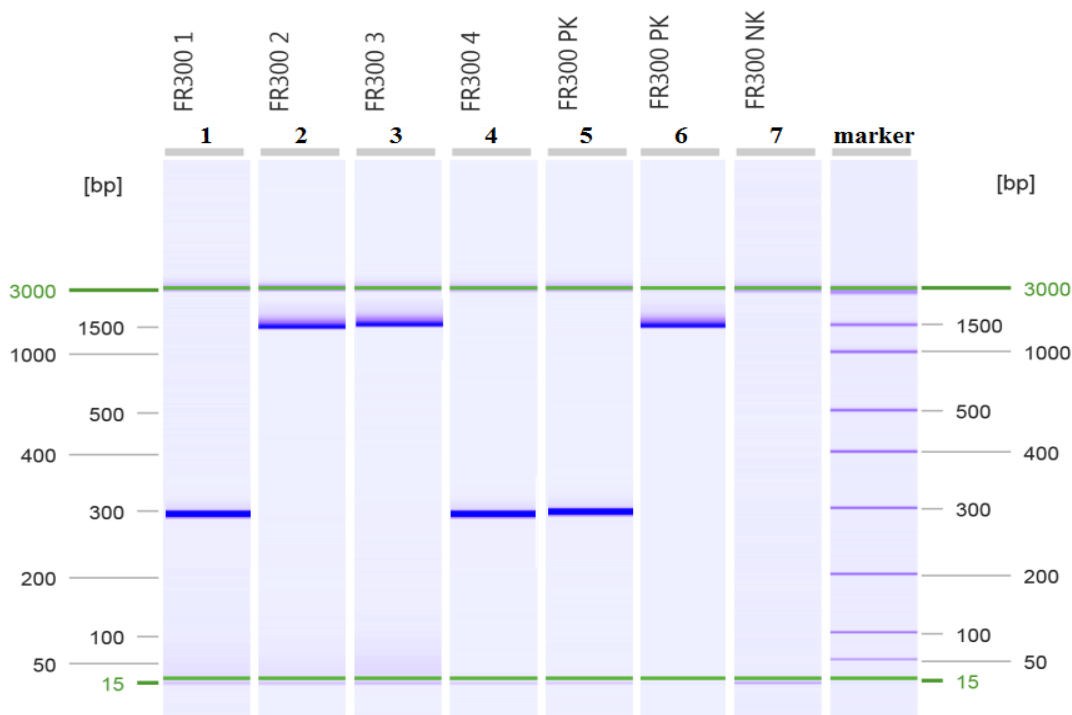
5.2.3 Rezultati analize podvrsta *Mycobacterium avium* kompleksa u izdvojenim izolatima

Nakon što smo dokazali pripadnost *M. avium* spp. pomoću testa "Geno Type® Mycobacterium CM" sve pripadajuće izolate (18 izolata) podvrgnuli smo amplifikaciji integriranog insercijskog slijeda IS901 radi određivanja podvrste. Veličina produkta amplifikacije ovisi o prisutnosti ili odsutnosti insercijskog slijeda IS901, tako da za podvrstu

M. avium subsp. *hominissuis* veličina umnoženog produkta iznosi 300 bp (nema ugrađenog IS901), a za *M. avium* subsp. *avium* iznosi 1742 bp (IS901 se nalazi na tome mjestu) (Slika 13.). Pripadnost *M. avium* kompleksu dokazali smo u 18 (11,6%) od ukupno 155 izdvojena izolata. Pripadnost podvrsti *M. avium* subsp. *hominissuis* utvrdili smo u 10 izolata izdvojenih iz svinja (6 izolata – 3 iz Međimurske i 3 iz Zagrebačke županije), goveda (2 izolata – 1 iz Osječko – baranjske i 1 iz Požeško – slavonske županije) i srna (2 izolata iz Bjelovarsko – bilogorske županije). Pripadnost podvrsti *M. avium* subsp. *avium* utvrdili smo u 8 izolata izdvojenih iz goveda (2 izolata – 1 Ličko – senjska i 1 Zagrebačka županija), kokoši (4 izolata – 1 iz Grada Zagreba i 3 iz Zagrebačke županije) i pataka (2 izolata – 1 iz Grada Zagreba i 1 iz Vukovarsko – srijemske županije) (Tablica 14.).

Tablica 14. Prikaz izdvojenih podvrsta unutar *M. avium* kompleksa

Vrsta životinje	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
	broj dokazanih izolata (redni broj izolata)	broj dokazanih izolata/redni broj izolata
Govedo	2 (110., 111.)	2 (116., 118.)
Svinja	6 (125. - 127., 131. - 133.)	0
Ovca	0	0
Koza	0	0
Kokoš	0	4 (134. - 137.)
Patka	0	2 (138., 139.)
Divlja svinja	0	0
Srna	2 (149., 150.)	0
Ukupno	10	8
% unutar <i>M. avium</i> kompleksa	55,5	44,5



Slika 13. Prikaz rezultata utvrđivanja podvrsta unutar *Mycobacterium avium* kompleksa izolata iz goveda, kokoši, patke i srne na osnovu veličine produkta umnožavanja od 300 i 1742 bazna para (bp). Pretraživani izolati označeni su brojevima 1 (govedo – izolat redni broj (r.b.) 110.), 2 (kokoš – izolat r.b. 134.), 3 (patka – r.b. 139.) i 4 (srna – r.b. 149.). Pozitivne kontrole označene su brojevima 5 (*M. avium* subsp. *hominissuis*) i 6 (*M. avium* subsp. *avium*), a negativna kontrola brojem 7.

5.2.4 Rezultati analize vrsta *Mycobacterium* sp. sekvenciranjem 16S rRNK, *rpoB*, *hsp65* gena i ITS regije

Kod preostala 94 izdvojena izolata kod kojih se pripadnost vrsti nije mogla odrediti prethodno navedenim metodama umnožili smo dijelove DNK sekvenci najkonzerviranijih regija, 16S rRNK, *rpoB*, *hsp65* gena, te međugenske ITS regije, čijom se analizom mogu pojedinačno i skupno analizirati i identificirati vrste NTM-a.

Od navedenih najčešće je korišten gen 16S rRNK, a njegovu regiju veličine 564 baznih parova (bp) umnožili smo uporabom početnica 16MycF i 16MycR. Umnažanje *rpoB* kromosomskog gena s jednom kopijom koja kodira β – podjedinicu bakterijske RNK polimeraze, čija veličina produkta iznosi 711 bp, proveli smo uporabom početnica Myco-F i Myco-R. Gen koji kodira *hsp65* protein toplinskog šoka (eng. heat shock protein, HSP) veličine produkta 439 bp umnožili smo uporabom početnica Tb11 i Tb12. Međugensku ITS

regiju koja je izvedena iz susjednih 16S rDNK i 23S rDNK regija gena s očekivanom veličinom produkta 480 bp umnožili smo uporabom početnica Ec16S.1390b i Mb23S.44n.

Ispitivani gen 16S rRNK postupkom amplifikacije uspješno se umnožio u svih 94 izolata, a dobivene sekvence smo analizirali i usporedili s sekvencama dostupnim u međunarodnoj bazi podataka GenBank. Postotak sličnosti dobivenih sekvenci s onima iz baze podataka kretao se u rasponu od minimalno 98,18% do maksimalno 100% (srednja vrijednost 99,84%). Postotak sličnosti od 100% odredili smo kod 45 ispitana izolata, dok je kod 49 izolata on bio <100%, te za te izolate nismo sa sigurnošću mogli odrediti vrstu na temelju navedenog gena. Stoga dobiveni postotak uspješne identifikacije do razine vrste pomoću određivanja nukleotidnog slijeda gena 16S rRNK iznosio je 42,3% (45/94 izolata).

Postupkom amplifikacije *rpoB* gen uspješno se umnožio u svih 94 izolata, a nakon usporedbe dobivenih sekvenci s onima dostupnim u međunarodnoj bazi podataka odredili smo postotak sličnosti sekvenci koji se kretao u rasponu od minimalno 97,53% do maksimalno 100% (srednja vrijednost 99,67%). Postotak sličnosti od 100% odredili smo kod 20 ispitanih izolata, dok je kod 74 izolata postotak bio <100% te za te izolate nismo sa sigurnošću mogli odrediti vrstu na temelju usporedbe samo *rpoB* gena. Postotak uspješne identifikacije do razine vrste dobiven pomoću *rpoB* gena iznosio je 18,9% (20/94 izolata).

Istraživani *hsp65* gen se postupkom amplifikacije također uspješno umnožio u svih 94 izolata, a nakon usporedbe dobivenih sekvenci s onima dostupnim u međunarodnoj bazi podataka odredili smo postotak sličnosti sekvenci koji se kretao u rasponu od minimalno 95,16% do maksimalno 100% (srednja vrijednost 99,46%). Postotak sličnosti od 100% odredili smo kod 21 istraživanog izolata, dok je u 73 izolata postotak bio <100% te za te izolate nismo sa sigurnošću mogli odrediti vrstu na temelju usporedbe samo *hsp65* gena. Postotak uspješne identifikacije do razine vrste dobiven pomoću *hsp65* gena iznosio je 19,7% (21/94 izolata).

Međugenska ITS regija postupkom amplifikacije uspješno se umnožila u 52 testirana izolata, dok se kod njih 42 nije umnožila niti nakon dvije ponovljene amplifikacije. Nakon usporedbe dobivenih sekvenci s onima dostupnim u međunarodnoj bazi podataka odredili smo postotak sličnosti sekvenci koji se kretao u rasponu od minimalno 80,57% do maksimalno 100% (srednja vrijednost 96,81%). Postotak sličnosti od 100% odredili smo kod svega 3 ispitana izolata, dok je kod 49 izolata postotak bio <100%, te za njih nismo sa sigurnošću mogli odrediti vrstu na temelju navedenog gena. Postotak uspješne identifikacije do razine vrste dobiven pomoću međugenska ITS regije tako je iznosio 2,8% (3/94 izolata).

Međusobnom usporedbom rezultata dobivenih analizom navedena četiri gena, pripadnost vrsti uspješno smo odredili kod 68 testirana izolata što od ukupnog broja na ovaj način pretraženih izolata (94 izolata) iznosi 72,3%. Kod 27 testiranih izolata opisali smo postotak sličnosti od 100% samo za ispitivani 16S rRNK gen, dok je postotak sličnosti za druge gene bio <100%. Isto tako, kod 13 izolata opisali smo postotak sličnosti od 100% samo za ispitivani *rpoB* gen, a kod 9 izolata samo za *hsp65* gen, dok je postotak sličnosti drugih gena bio manji. Nadalje postotak sličnosti od 100% istovremeno za 2 gena, tj. za 16S rRNK i *rpoB* gen opisali smo kod 6 izolata, za 16S rRNK i *hsp65* gen kod 9 izolata, za 16S rRNK gen i ITS regiju kod 1 izolata, te za *hsp65* gen i ITS regiju kod 1 izolata. Istovremeni 100% postotak sličnosti za 3 gena, tj. za 16S rRNK, *hsp65* gen i ITS regiju opisali smo kod 1 izolata, te za 16S rRNK, *hsp65* i *rpoB* gen također kod 1 izolata. Kod 9 izolata postotak sličnosti za sva navedena 4 gena bio je <100%, ali barem za jedan od navedenih gena postotak sličnosti se kretao u rasponu 99-99,9%, pa smo te uzorke opisali kao "Najsličnije *Mycobacterium* + vrsta". Dobivene postotke sličnosti zajedno s nazivom soja dostupnim u međunarodnoj bazi podataka NCBI s kojim naš ispitivani izolat dijeli najviši postotak sličnosti s određenim genima prikazali smo u tablici 15. Kod preostalih 17 izolata vrstu nismo uspjeli odrediti niti nakon ponovljenog sekvenciranja, a svaki pojedini 16S rRNK, *hsp65* i *rpoB* gen pokazao je određeni postotak sličnosti u rasponu 98-99,5% za različitu vrstu roda *Mycobacterium*, dok se ITS regija nije niti umnožila.

Navedenom metodom opisali smo ukupno 14 različitih vrsta pripadnika roda *Mycobacterium* u domaćih i divljih životinja u ispitivanom razdoblju od 2012. do 2016. godine, i to *Mycobacterium agri* (*M. agri*), *M. arupense*, *M. chitae*, *M. elephantis*, *M. flavescens*, *M. kumamotonense*, *M. neoaurum*, *M. nonchromogenicum*, *M. peregrinum*, *M. phocaicum*, *M. porcinum*, *M. pulveris*, *M. triviale* i *M. vaccae*.

Također smo opisali i vrstu "najsličniju *M. septicum*", te "najsličnije *M. chitae*, *M. flavescens*, *M. neoaurum*, *M. nonchromogenicum* i *M. vaccae*".

Pripadnost vrsti *M. agri* utvrdili smo u 1 (0,6% od ukupno 155 izolata) izolatu u Sisačko – moslavačkoj županiji (iz divlje svinje), dok smo *M. arupense* utvrdili u 2 (1,3%) izolata u Zagrebačkoj županiji (iz divljih svinja). Pripadnost *M. chitae* utvrdili smo u 4 (2,6%) izolata u ukupno 3 županije, i to u Sisačkoj – moslavačkoj (2 izolata iz goveda), Splitsko – dalmatinskoj (1 izolat iz goveda) i Gradu Zagrebu (1 izolat iz goveda). Vrstu "najsličniju *M. chitae*" utvrdili smo u 2 (1,3%) izolata u Bjelovarsko – bilogorskoj županiji (2 izolata iz srna). Pripadnost *M. elephantis* utvrdili smo u 1 (0,6%) izolatu u Sisačko – moslavačkoj županiji (iz goveda), a vrstu *M. flavescens* u 2 (1,3%) izolata u ukupno 2 županije, i to u Požeško –

slavonskoj (1 izolat iz goveda) i Sisačko – moslavačkoj (1 izolat iz divlje svinje). Vrstu "najsličniju *M. flavescens*" utvrdili smo u 1 (0,6%) izolatu u Zagrebačkoj županiji (1 izolat iz divlje svinje). Pripadnost *M. kumamotonense* utvrdili smo u 1 (0,6%) izolatu u Sisačko – moslavačkoj županiji (iz goveda). Nadalje, pripadnost *M. neoaurum* utvrdili smo u 25 (16,1%) izolata u ukupno 3 županije, i to u Bjelovarsko – bilogorskoj (22 izolata – 1 kokoš, 21 srne), Sisačko – moslavačkoj (2 izolata iz divljih svinja) i Zagrebačkoj županiji (1 izolat iz divlje svinje). Vrstu "najsličniju *M. neoaurum*" utvrdili smo u 2 izolata (1,3%) u Bjelovarsko – bilogorskoj (1 izolat iz srne) i Gradu Zagrebu (1 izolat iz ovce). Pripadnost *M. nonchromogenicum* utvrdili smo u 4 (2,6%) izolata u ukupno 3 županija, i to u Bjelovarsko – bilogorskoj (1 izolat iz srne), Brodsko – posavskoj (1 izolat iz goveda) i Sisačko – moslavačkoj (2 izolata iz goveda), a pripadnost *M. peregrinum* u 1 (0,6%) izolatu u Bjelovarskoj – bilogorskoj županiji (iz srne). Vrstu "najsličniju *M. nonchromogenicum*" utvrdili smo u 2 (1,3%) izolata u Sisačko – moslavačkoj (1 izolat iz divlje svinje) i Zagrebačkoj županiji (1 izolat iz goveda).

Pripadnost *M. phocaicum* utvrdili smo u 7 (4,5%) izolata u ukupno 2 županije, u Sisačko – moslavačkoj (5 izolata iz divljih svinja) i Zagrebačkoj županiji (2 izolata iz divljih svinja). Pripadnost *M. porcinum* utvrdili smo u 2 (1,3%) izolata (iz divljih svinja), dok smo *M. pulveris* utvrdili u 1 (0,6%) izolatu (iz divlje svinje), sve u Sisačko – moslavačkoj županiji. Vrstu "najsličniju *M. septicum*" utvrdili smo u 1 (0,6%) izolatu u Bjelovarsko – bilogorskoj županiji (iz srne). Pripadnost *M. triviale* utvrdili smo u 3 (1,9%) izolata u ukupno 3 županije, i to Bjelovarsko – bilogorskoj (1 izolat iz srne), Vukovarsko – srijemskoj (1 izolat iz svinje) i Zagrebačkoj županiji (1 izolat iz svinje). I konačno, *M. vaccae* utvrdili smo u 14 (9 %) izolata u ukupno 5 županija, i to Bjelovarsko – bilogorskoj (1 izolat iz srne), Koprivničko – križevačkoj (1 izolat iz goveda), Osječko – baranjskoj (1 izolat iz goveda), Sisačko – moslavačkoj (9 izolata iz divljih svinja) i Zagrebačkoj županiji (2 izolata iz divljih svinja). Vrstu "najsličniju *M. vaccae*" utvrdili smo u 1 (0,6%) izolatu u Sisačko – moslavačkoj županiji (1 izolat iz divlje svinje) (Tablica 15.).

Navedenih 17 izolata (11% od ukupno 155 izolata) kod kojih vrstu nismo uspjeli odrediti, podrijetlom su od goveda iz Splitsko – dalmatinske (1 izolat pod rednim brojem – r.b.13.), svinje iz Zagrebačke (1 izolat – r.b.130.), ovce iz Karlovačke (1 izolat – r.b.16.) i koze iz Bjelovarsko – bilogorske županije (1 izolat – r.b.17), te divljih svinja iz Sisačko – moslavačke (3 izolata – r.b.31., 33. i 36.) i Zagrebačke županije (3 izolata – r.b.48., 51. i 54.) i srna iz Bjelovarsko – bilogorske županije (7 izolata – r.b.59., 76., 78., 90., 103., 105. i 155.).

Tablica 15. Rezultati analize vrsta *Mycobacterium sp.* sekvenciranjem 16S rRNK, *rpoB*, *hsp65* gena i ITS regije

Vrsta životinje	Županija	Dokazana vrsta izolata	16S rRNK % sličnosti (naziv soja*)	<i>rpoB</i> % sličnosti (naziv soja*)	<i>hsp65</i> % sličnosti (naziv soja*)	ITS % sličnosti (naziv soja*)	Redni broj izolata
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. agri</i>	100 (CIP105391)	99,89 (DSM44515)	99,87 (DSM44515)	/	25.
divlja svinja	Zagrebačka	<i>M. arupense</i>	99,86 (ATCC BAA-1242)	100 (ATCC BAA-1242)	99,46 (ASCW-1,2)	98,64 (FI-09099)	52.
divlja svinja	Zagrebačka	<i>M. arupense</i>	100 (ATCC BAA-1242)	99,84 (FI-06239)	98,70 (FI-01269)	/	53.
govedo	Splitsko - dalmatinska	<i>M. chitae</i>	99,22 (CIP 105383)	99,31 (NCTC10485)	100 (NCTC10485)	/	7.
govedo	Sisačko - moslavačka	<i>M. chitae</i>	99,60 (FMUNAM62)	100 (NCTC10485)	99,52 (NCTC10485)	95,29 (NCTC10485)	5.
govedo	Sisačko - moslavačka	<i>M. chitae</i>	100 (NCTC10485)	100 (NCTC10485)	99,25 (NCTC10485)	97,68 (NCTC10485)	6.
govedo	Grad Zagreb	<i>M. chitae</i>	100 (NCTC10485)	99,86 (NCTC10485)	100 (NCTC10485)	/	10.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	"Najsličnije <i>M. chitae</i> "	99,98 (NCTC10485)	99,40 (2505)	98,60 (NCTC10485)	/	70.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	"Najsličnije <i>M. chitae</i> "	99,82 (CIP105383)	99,75 (NCTC10485)	99,15 (NCTC10485)	85,21 (NCTC10485)	67.
govedo	Sisačko - moslavačka	<i>M. elephantis</i>	99,81 (M202)	100 (NTM393)	99,69 (M202)	/	12.
govedo	Požeško - slavonska	<i>M. flavescens</i>	100 (NCTC10271)	99,56 (NCTC10271)	100 (DSM43991)	96,86 (DSM43991)	119.
divlja svinja	Zagrebačka	"Najsličnije <i>M. flavescens</i> "	99,93 (NCTC10271)	99,98 (JCM 12274)	99,95 (NCTC10271)	99,38 (NCTC10271)	140.

divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. flavescens</i>	100 (DSM43991)	100 (DSM43991)	99,93 (NCTC10271)	98,97 (NCTC10271)	147.
govedo	Sisačko - moslavačka	<i>M. kumamotonense</i>	99,95 (DSM45093)	99,35 (FI-07065)	100 (DSM45093)	98,62 (DSM45093)	123.
divlja svinja	Zagrebačka	<i>M. neoaurum</i>	99,82 (HGMS2)	100 (HGMS2)	99,77 (HGMS2)	96,47 (HGMS2)	55.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,86 (HGMS2)	99,35 (HGMS2)	99,47 (HGMS2)	22.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,58 (HGMS2)	100 (HGMS2)	99,62 (HGMS2)	41.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,86 (HGMS2)	99,54 (HGMS2)	100 (HGMS2)	60.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,45 (HGMS2)	99,30 (HGMS2)	99,31 (HGMS2)	61.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,45 (HGMS2)	100 (HGMS2)	99,83 (HGMS2)	62.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	99,42 (HGMS2)	99,73 (HGMS2)	100 (HGMS2)	/	63.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,86 (HGMS2)	99,77 (HGMS2)	99,83 (HGMS2)	64.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,86 (HGMS2)	99,77 (HGMS2)	99,14 (HGMS2)	65.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,60 (HGMS2)	100 (HGMS2)	100 (HGMS2)	68.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	98,91 (HGMS2)	100 (HGMS2)	/	69.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,64 (VKM AC18155)	100 (HGMS2)	99,36 (HGMS2)	72.

srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,86 (HGMS2)	99,10 (HGMS2)	99,48 (HGMS2)	74.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,86 (HGMS2)	100 (HGMS2)	99,64 (HGMS2)	75.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,86 (HGMS2)	100 (HGMS2)	98,27 (HGMS2)	77.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,86 (HGMS2)	99,53 (HGMS2)	98,66 (HGMS2)	79.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	99,92 (HGMS2)	99,73 (HGMS2)	100 (HGMS2)	100 (HGMS2)	81.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,59 (HGMS2)	99,77 (HGMS2)	99,14 (HGMS2)	84.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,73 (HGMS2)	99,76 (HGMS2)	/	86.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,45 (HGMS2)	99,54 (HGMS2)	98,82 (HGMS2)	87.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	"Najsličnije <i>M. neoaurum</i> "	99,81 (HGMS2)	99,45 (HGMS2)	99,30 (HGMS2)	/	88.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,45 (HGMS2)	99,77 (HGMS2)	99,15 (HGMS2)	89.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,86 (HGMS2)	99,53 (HGMS2)	99,83 (HGMS2)	91.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	99,94 (HGMS2)	99,64 (HGMS2)	100 (HGMS2)	98,13 (HGMS2)	92.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	99,73 (HGMS2)	99,48 (HGMS2)	100 (HGMS2)	99,27 (HGMS2)	96.
ovca	Grad Zagreb	"Najsličnije <i>M. neoaurum</i> "	98,18 (HGMS2)	99,90 (HGMS2)	95,16 (HGMS2)	/	15.

kokoš	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. neoaurum</i>	100 (HGMS2)	99,59 (ATCC25795)	99,54 (F1672-RJ)	80,57 (HGMS2)	18.
govedo	Sisačko - moslavačka	<i>M. nonchromogenicum</i>	100 (DSM44164-100)	99,14 (ATCC19530)	99,77 (DSM44164-100)	96,59 (AFP00074)	114.
govedo	Zagrebačka	"Najsličnije <i>M. nonchromogenicum</i> "	99,81 (AFP00074)	99,98 (ATCC19530)	99,76 (DSM44164-100)	94,36 (AFP00074)	117.
govedo	Brodsko - posavska	<i>M. nonchromogenicum</i>	100 (DSM44164-100)	99,81 (ATCC19530)	99,12 (ATCC19530)	/	108.
govedo	Sisačko - moslavačka	<i>M. nonchromogenicum</i>	100 (DSM44164-100)	100 (FT-10225)	96,98 (FMUNAM36)	/	124.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	"Najsličnije <i>M. nonchromogenicum</i> "	99,79 (AFP00074)	99,50 (ATCC19530)	96,98 (ATCC19530)	/	146.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. nonchromogenicum</i>	100 (DSM44164-100)	100 (QIA-35)	100 (DSM44164-100)	92,43 (AFP00074)	151.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. peregrinum</i>	100 (JNBP03577)	99,51 (ATCC14467)	98,06 (03/423)	93,15 (DSM43271T)	93.
divlja svinja	Zagrebačka	<i>M. phocaicum</i>	99,89 (MYC148)	100 (CIP108542)	99,93 (CIP108542)	96,35 (T31)	47.
divlja svinja	Zagrebačka	<i>M. phocaicum</i>	100 (CIP108542)	100 (CIP108542)	99,89 (MYC148)	/	56.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. phocaicum</i>	99,74 (MYC148)	99,38 (T31)	100 (MYC148)	99,84 (CIP108542)	19.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. phocaicum</i>	100 (MYC148)	98,56 (CIP108542)	100 (CIP108542)	96,48 (T9)	20.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. phocaicum</i>	99,35 (MYC148)	97,53 (T31)	100 (CIP108542)	/	34.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. phocaicum</i>	100 (CIP108542)	99,89 (T9)	98,97 (CIP108542)	94,32 (T9)	35.

divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. phocaicum</i>	100 (CIP108542)	99,95 (MYC148)	99,12 (MYC148)	98,84 (T9)	44.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. porcinum</i>	99,99 (CIP105392)	100 (ATCC49939)	99,64 (CIP105392)	93,54 (MF-3176)	40.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. porcinum</i>	100 (CIP105392)	99,16 (CIP105392)	99,85 (NTM335)	94,56 (NTM335)	46.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. pulveris</i>	99,98 (DSM44222)	100 (ATCC35154)	99,58 (DSM44222)	99,16 (DSM44223)	32.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	"Najsličnije <i>M. septicum</i> "	99,16 (ATCC700731T)	99,30 (R-52752)	98,56 (R-52604)	/	94.
svinja	Zagrebačka	<i>M. triviale</i>	99,32 (DSM44153)	99,79 (TMC1453)	100 (DSM44153)	/	129.
svinja	Vukovarsko - srijemska	<i>M. triviale</i>	99,86 (ATCC23292)	100 (IP140330001)	99,12 (IP140330001)	/	128.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. triviale</i>	98,46 (ATCC23292)	99,38 (IP140330001)	100 (DSM44153)	98,55 (TMC1453)	152.
govedo	Osječko - baranjska	<i>M. vaccae</i>	100 (JNBPO3730)	100 (JNBPO3730)	99,67 (95051)	93,38 (CIP105934)	4.
govedo	Koprivničko - križevačka	<i>M. vaccae</i>	100 (JNBPO3730)	99,84 (JNBPO3730)	99,24 (95051)	/	2.
divlja svinja	Zagrebačka	<i>M. vaccae</i>	99,89 (95051)	100 (JNBPO3730)	99,56 (95051)	96,47 (95051)	50.
divlja svinja	Zagrebačka	<i>M. vaccae</i>	100 (CIP105934)	100 (JNBPO3730)	99,87 (JNBPO3730)	94,42 (CIP105934)	58.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. vaccae</i>	100 (CIP105934)	99,24 (95051)	99,23 (95051)	91,46 (95051)	21.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. vaccae</i>	99,89 (95051)	100 (JNBPO3730)	99,21 (95051)	95,38 (CIP105934)	23.

divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. vaccae</i>	100 (CIP105934)	99,23 (95051)	99,19 (95051)	/	24.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	"Najsličnije <i>M. vaccae</i> "	99,29 (95051)	99,98 (JNBPO3730)	99,24 (95051)	/	26.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. vaccae</i>	99,57 (95051)	100 (CIP105934)	99,48 (95051)	/	27.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. vaccae</i>	100 (CIP105934)	99,24 (95051)	99,96 (95051)	98,84 (95051)	28.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. vaccae</i>	100 (95051)	99,98 (JNBPO3730)	99,67 (JNBPO3730)	94,69 (95051)	29.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. vaccae</i>	100 (CIP105934)	99,86 (CIP105934)	99,25 (95051)	/	37.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. vaccae</i>	99,74 (95051)	100 (JNBPO3730)	99,69 (95051)	92,64 (95051)	38.
divlja svinja	Sisačko - moslavačka	<i>M. vaccae</i>	99,24 (95051)	100 (JNBPO3730)	99,20 (95051)	/	39.
srna	Bjelovarsko - bilogorska	<i>M. vaccae</i>	100 (CIP105934)	99,14 (95051)	97,63 (95051)	93,84 (95051)	97.

*naziv soja dostupnog u međunarodnoj bazi podataka NCBI s kojim naš ispitivani izolat dijeli najveći postotak sličnosti

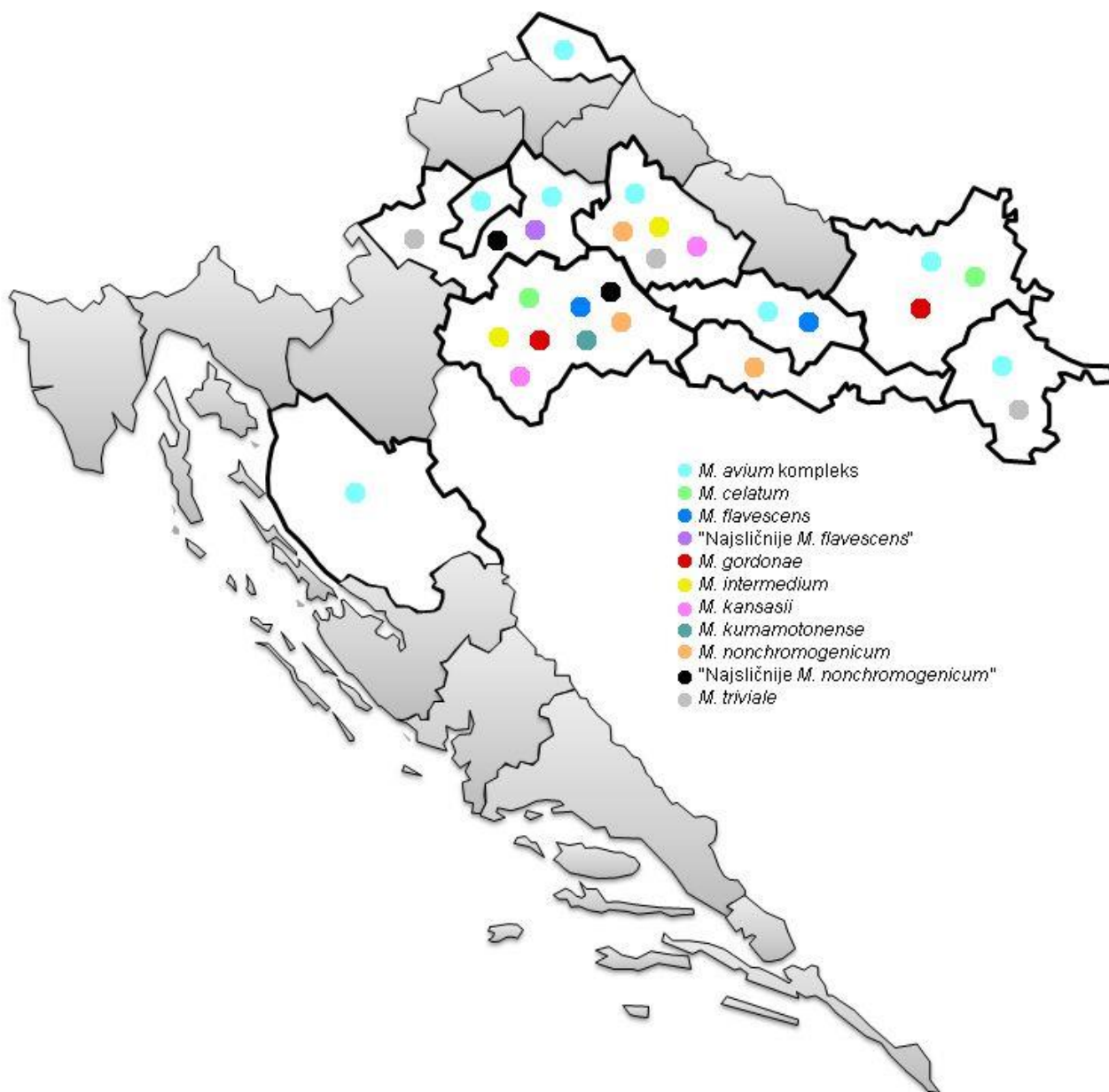
5.2.5 Distribucija dokazanih vrsta netuberkuloznih mikobakterija po županijama Republike Hrvatske

Od ukupno 155 izdvojenih izolata, pripadnost vrsti uspješno smo dokazali za 138 izolata, dok za njih 17 vrstu nismo uspjeli odrediti ranije navedenim metodama.

Spororastuće vrste netuberkuloznih mikobakterija opisali smo za ukupno 47 izolata, dok smo njih 91 opisali kao pripadnike brzorastućih vrsta.

Spororastuće vrste opisali smo unutar devet županija i Gradu Zagrebu, i to u Bjelovarsko – bilogorskoj, Zagrebačkoj, Sisačko – moslavačkoj, Međimurskoj, Osječko – baranjskoj, Požeško – slavonskoj, Brodsko – posavskoj, Vukovarsko – srijemskoj i Ličko – senjskoj županiji. U Bjelovarsko – bilogorskoj županiji izdvojili smo ukupno sedam izolata pripadnika pet različitih vrsta spororastućih mikobakterija, i to MAC (2 izolata iz srna), *M. intermedium* (1 izolat iz goveda), *M. kansasii* (2 izolata iz srna), *M. nonchromogenicum* (1 izolat iz srne) i *M. triviale* (1 izolat iz srne). U Zagrebačkoj županiji izdvojili smo ukupno 10 izolata pripadnika četiri različitih vrsta, i to MAC (3 izolata iz kokoši, 3 iz svinja, 1 iz goveda), *M. triviale* (1 izolat iz svinje), “Najsličnije *M. flavescens*” (1 izolat iz divlje svinje) i “Najsličnije *M. nonchromogenicum*” (1 izolat iz goveda). U Gradu Zagrebu izdvojili smo dva izolata pripadnika MAC-a (1 izolat iz kokoši i 1 iz patke). U Sisačko – moslavačkoj županiji izdvojili smo ukupno 15 izolata pripadnika osam različitih vrsta spororastućih mikobakterija, i to *M. celatum* (1 izolat iz goveda, 5 izolata iz divljih svinja), *M. gordonae* (2 izolata iz goveda), *M. intermedium* (1 izolat iz divlje svinje), *M. kansasii* (1 izolat iz goveda), *M. kumamotoense* (1 izolat iz goveda), *M. nonchromogenicum* (2 izolata iz goveda), *M. flavescens* (1 izolat iz divlje svinje) i “Najsličnije *M. nonchromogenicum*” (1 izolat iz divlje svinje). U Osječko – baranjskoj županiji izdvojili smo četiri izolata pripadnika tri različite vrste, i to MAC (1 izolat iz goveda), *M. celatum* (2 izolata iz goveda) i *M. gordonae* (1 izolat iz goveda). U Požeško – slavonskoj županiji izdvojili smo dva izolata pripadnika MAC-a (1 izolat iz goveda) i *M. flavescens* (1 izolat iz goveda). U Brodsko – posavskoj županiji izdvojili smo jedan izolat *M. nonchromogenicum* (1 izolat iz goveda), a u Vukovarsko – srijemskoj dva izolata pripadnika MAC-a (1 izolat iz patke) i *M. triviale* (1 izolat iz svinje). U Ličko – senjskoj županiji izdvojili smo jedan izolat MAC-a (1 izolat iz goveda), a u Međimurskoj tri izolata također MAC-a (3 izolata iz svinja).

Distribucija izdvojenih vrsta spororastućih NTM-a po županijama Republike Hrvatske prikazana je na slici 14.



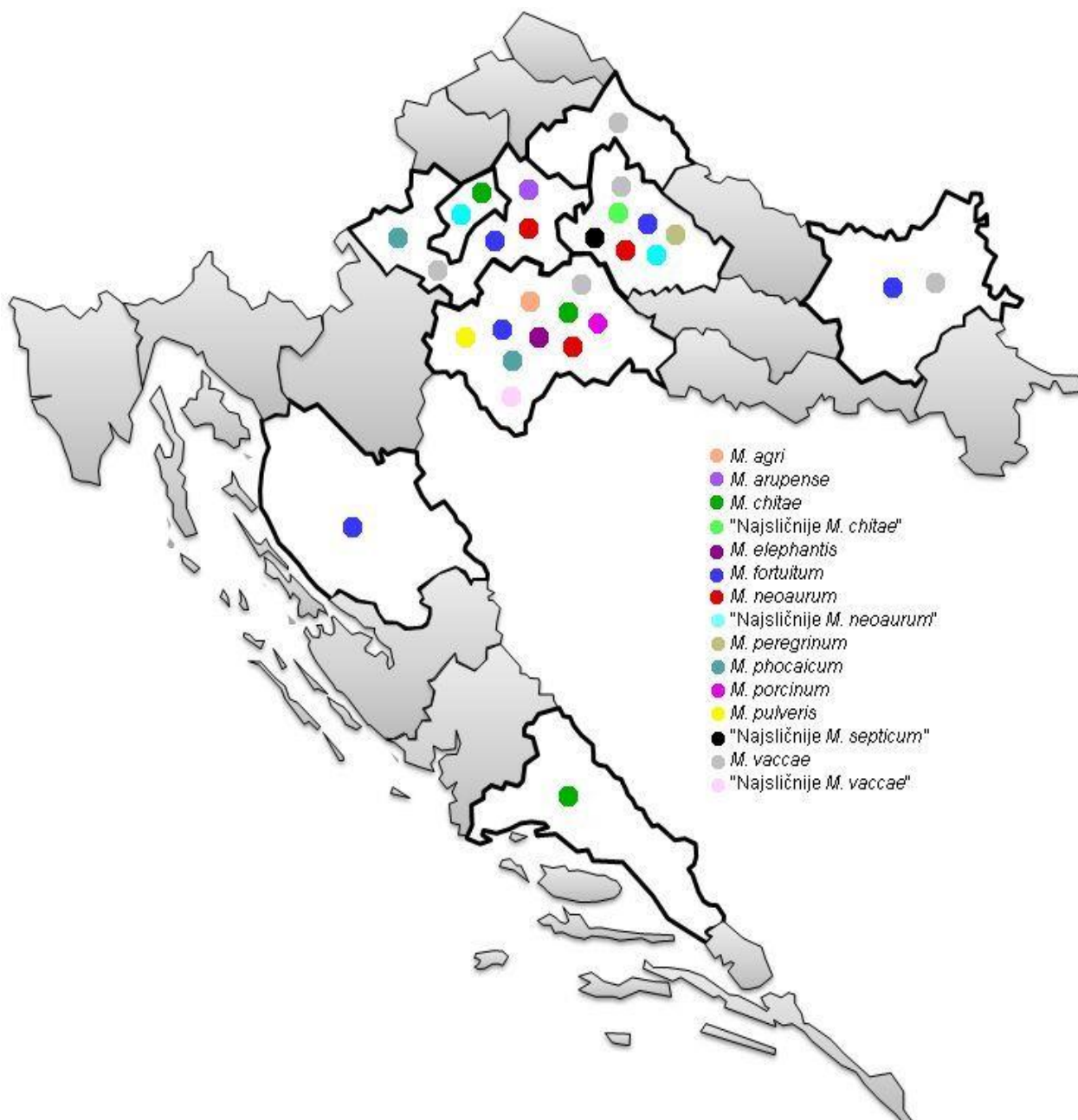
Slika 14. Distribucija izdvojenih spororastućih vrsta netuberkuloznih mikobakterija po županijama Republike Hrvatske

Brzorastuće vrste opisali smo unutar 7 županija i Gradu Zagrebu, i to u Bjelovarsko – bilogorskoj, Zagrebačkoj, Sisačko – moslavačkoj, Koprivničko - križevačkoj, Osječko – baranjskoj, Ličko – senjskoj i Splitsko – dalmatinskoj županiji.

U Bjelovarsko – bilogorskoj izdvojili smo ukupno 45 izolata pripadnika sedam različitih vrsta brzorastućih mikobakterija, i to *M. neoaurum* (1 izolat iz kokoši, 21 izolat iz srna), “Najsličnije *M. neoaurum*” (1 izolat iz srne), *M. fortuitum* (1 izolat iz goveda, 1 izolat iz svinja, 15 izolata iz srna), *M. vaccae* (1 izolat iz srne), *M. peregrinum* (1 izolat iz srne), “Najsličnije *M. chitae*” (2 izolata iz srna) i “Najsličnije *M. septicum*” (1 izolat iz srne). U

Zagrebačkoj županiji izdvojili smo ukupno 11 izolata pripadnika pet različitih vrsta, i to *M. neoaurum* (1 izolat iz divlje svinje), *M. fortuitum* (2 izolata iz goveda, 2 iz divljih svinja), *M. vaccae* (2 izolata iz divljih svinja), *M. phocaicum* (2 izolata iz divljih svinja) i *M. arupense* (2 izolata iz divljih svinja), a u Gradu Zagrebu dva izolata pripadnika *M. chitae* (1 izolat iz goveda) i “Najsličnije *M. neoaurum*” (1 izolat iz ovce). U Sisačko – moslavačkoj županiji izdvojili smo ukupno 28 izolata pripadnika 10 različitih vrsta brzorastućih mikobakterija, i to *M. neoaurum* (2 izolata iz divljih svinja), *M. fortuitum* (4 izolata iz divljih svinja), *M. chitae* (2 izolata iz goveda), *M. vaccae* (9 izolata iz divljih svinja), “Najsličnije *M. vaccae*” (1 izolat iz divlje svinje), *M. phocaicum* (5 izolata iz divljih svinja), *M. porcinum* (2 izolata iz divljih svinja), *M. pulveris* (1 izolat iz divlje svinje), *M. agri* (1 izolat iz divlje svinje) i *M. elephantis* (1 izolat iz goveda). U Koprivničko – križevačkoj županiji izdvojili smo jedan *M. vaccae* izolat (1 izolat iz goveda), a u Splitsko – dalmatinskoj županiji jedan *M. chitae* izolat (1 izolat iz goveda). U Osječko – baranjskoj županiji izdvojili smo dva izolata pripadnika *M. fortuitum* (1 izolat iz goveda) i *M. vaccae* (1 izolat iz goveda), a u Ličko – senjskoj jedan *M. fortuitum* izolat (1 izolat iz goveda).

Distribucija izdvojenih vrsta brzorastućih NTM-a po županijama Republike Hrvatske prikazana je na slici 15.



Slika 15. Distribucija izdvojenih brzorastućih vrsta netuberkuloznih mikobakterija po županijama Republike Hrvatske

5.2.6 Rezultati određivanja antimikrobne osjetljivosti

5.2.6.1 Rezultati određivanja antimikrobne osjetljivosti spororastućih netuberkuloznih mikobakterija

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti pripadnika spororastućih NTM-a proveli smo u ukupno 47 izolata. Uspješno smo očiteli rezultate 44 ispitana izolata, dok kod tri izolata

podrijetlom iz jednog goveda (redni broj (r.b.) 117. – "Najsličnije *M. nonchromogenicum*") i dvije divlje svinje (r.b. 146. – "Najsličnije *M. nonchromogenicum*"; 147. – *M. flavescens*) niti nakon ponovljenog ispitivanja nije bilo vidljivog porasta kolonija unutar mikrotitracijske pločice na temelju kojeg određujemo antimikrobnu osjetljivost (Slika 16.). Od ukupno 44 uspješno testirana izolata, 31 izolat podrijetlom je iz domaćih (17 goveda, 8 svinja, 4 kokoši, 2 patke), a 13 iz divljih životinja (7 divljih svinja, 6 srna). Ispitivanje smo proveli na ukupno 9 različitih vrsta pripadnika spororastućih NTM-a, i to *M. avium* spp. kod koje smo dokazali podvrste *M. avium* subsp. *avium* (8 izolata – 2 goveda, 4 kokoši, 2 patke) i *M. avium* subsp. *hominissuis* (10 izolata – 2 goveda, 6 svinja i 2 srne), zatim *M. celatum* (8 izolata – 3 goveda, 5 divljih svinja), *M. flavescens* (1 izolat iz goveda), *M. gordonae* (3 izolati iz goveda), *M. intermedium* (2 izolata – 1 govedo, 1 divlja svinja), *M. kansasii* (3 izolata – 1 govedo, 2 srne), *M. kumamotoense* (1 izolat iz goveda), *M. nonchromogenicum* (4 izolata – 3 goveda, 1 srna), *M. triviale* (3 izolata – 2 svinje, 1 srna), te "Najsličnije *M. flavescens*" (1 izolat iz divlje svinje).

Rezultate za sve ispitane antibiotike očitali smo 14. dana inkubacije, a prikazani su u tablici 16. Za sve izolate prilikom ispitivanja osjetljivosti na etambutol (EMB), streptomycin (STR), etionamid (ETH) i izoniazid (INH) zabilježili smo samo vrijednosti MIC-a bez tumačenja rezultata, dok kod vrste *M. kansasii* ispitivanje osjetljivosti na etambutol (EMB) i izoniazid (INH) nismo proveli iz razloga što njihova prijava nije preporučljiva kako je već ranije navedeno. Također, kod izolata MAC-a nismo proveli ispitivanje osjetljivosti na rifabutin (RFB) i rifampin (RIF), te etambutol (EMB), dok smo za izoniazid (INH), trimetoprim – sulfametoksazol (SXT), ciprofloksacin (CIP), streptomycin (STR), doksiciklin (DOX) i etionamid (ETH) zabilježili samo vrijednosti MIC-a bez tumačenja rezultata.

Prilikom testiranja izolata pripadnika MAC-a, svih 18 izolata od kojih je 16 izdvojeno iz domaćih (4 goveda – r.b. 110., 111., 116., 118.; 6 svinja – r.b. 125. – 127., 131. – 133.; 4 kokoši – r.b. 134. – 137.; 2 patke – r.b. 138., 139.), a 2 iz divljih životinja (2 srne – r.b. 149., 150.) pokazalo se osjetljivo na klaritromicin (CLA), a otporno na moksifloksacin (MXF). Na amikacin (AMI), 14 izolata bilo je osjetljivo i to sve iz domaćih životinja (4 goveda – r.b. 110., 111., 116., 118.; 5 svinja – r.b. 126., 127., 131. – 133.; 4 kokoši – r.b. 134. – 137.; 1 patka – r.b. 138.), tri umjereno osjetljivo; jedan iz domaćih (1 svinja – r.b. 125.) i dva iz divljih životinja (2 srne – r.b. 149., 150.), a jedan izolat iz patke bio je otporan (r.b. 139.). Nadalje, na linezolid (LZD) gotovo svi izolati su bili otporni, osim tri izolata iz domaćih životinja od kojih su dva bila umjereno osjetljiva (1 govedo – r.b. 118.; 1 kokoš – r.b. 134.), a jedan osjetljiv (1 kokoš – r.b. 137.).

Svih osam izolata vrste *M. celatum* od kojih su tri izdvojena iz domaćih (3 goveda – r.b. 109., 120., 122.), a pet iz divljih životinja (5 divljih svinja – r.b. 141. – 145.), bili su osjetljivi na klaritromicin (CLA), te otporni na pripadnike fluorokinolona moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP), kao i na linezolid (LZD) i doksiciklin (DOX). Na antibiotike skupine rifamicina, rifampin (RIF) također su svi izolati bili otporni, dok su na rifabutin (RFB) gotovo svi izolati bili osjetljivi osim jednog iz goveda koji je bio otporan (r.b. 120). Također, gotovo svi izolati bili su osjetljivi i na amikacin (AMI), osim jednog iz divlje svinje koji je bio umjereno osjetljiv (r.b. 144.).

Na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) gotovo svi izolati bili su otporni osim jednog iz goveda koji je bio osjetljiv (r.b. 122.).

Izolati vrste *M. flavescens* izdvojen iz goveda (r.b. 119.) i "Najsličniji *M. flavescens*" izdvojen iz divlje svinje (r.b. 140.) pokazali su se osjetljivima na klaritromicin (CLA), trimetoprim – sulfametoksazol (SXT), amikacin (AMI) i linezolid (LZD). Na antibiotike skupine rifamicina, rifabutin (RFB) izolati su bili osjetljivi, dok su na rifampin (RIF) bili otporni. Otpornost su također pokazali na doksiciklin (DOX), kao i na antibiotik skupine fluorokinolona moksifloksacin (MXF), dok je na ciprofloksacin (CIP) izolat iz goveda bio je otporan a izolat iz divlje svinje umjereno osjetljiv.

Ukupno tri izolata vrste *M. gordonae* izdvojenih iz goveda (r.b. 113., 115., 121.) bila su osjetljiva na klaritromicin (CLA), trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) i amikacin (AMI). Na antibiotike skupine rifamicina, rifabutin (RFB) izolati su bili osjetljivi, dok su na rifampin (RIF) bili otporni. Dva izolata bila su osjetljiva na fluorokinolone moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP), te na linezolid (LZD) (r.b. 113., 115.), dok je jedan izolat bio umjereno osjetljiv na moksifloksacin, a otporan na ciprofloksacin i linezolid (r.b. 121.). Na doksiciklin (DOX) dva izolata pokazala su otpornost (r.b. 115., 121.), a jedan umjerenu osjetljivost (r.b. 113.).

Izolati pripadnici vrste *M. intermedium* izdvojeni iz goveda (r.b. 107.) i divlje svinje (r.b. 148.) bili su osjetljivi na klaritromicin (CLA) i rifabutin (RFB). Izolat izdvojen iz goveda bio je otporan na rifampin (RIF), fluorokinolone moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP), trimetoprim – sulfametoksazol (SXT), linezolid (LZD) i doksiciklin (DOX), a umjereno osjetljiv na amikacin (AMI). Izolat izdvojen iz divlje svinje bio osjetljiv na sve navedene antibiotike.

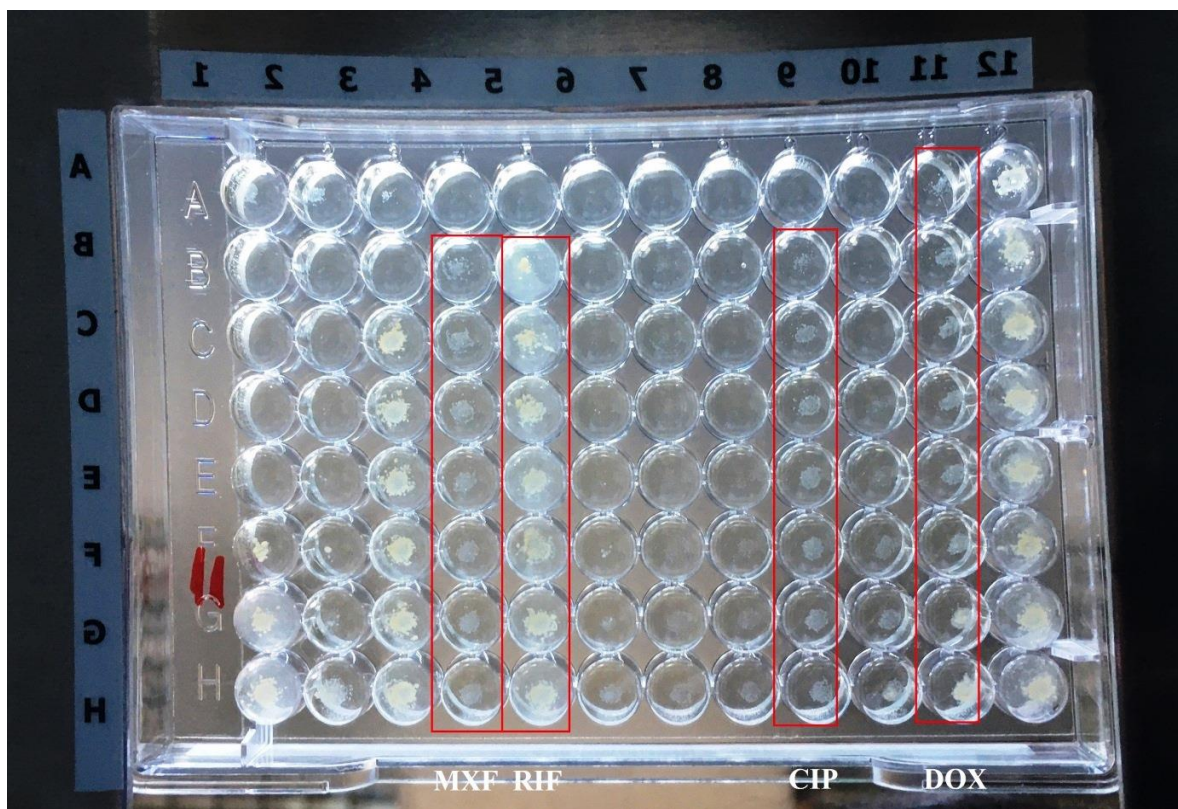
Sva tri izolata vrste *M. kansasii* od kojih je jedan izdvojen iz goveda (r.b. 114.), a dva iz srna (r.b. 153., 154.), bila su osjetljiva na klaritromicin (CLA), amikacin (AMI) i linezolid (LZD), a otporna na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) i doksiciklin (DOX). Na

antibiotike skupine rifamicina, rifabutin (RFB) svi izolati su bili osjetljivi, dok su na rifampin (RIF) dva izolata bila osjetljiva (1 govedo – r.b. 114.; 1 srna – r.b. 154.), a jedan otporan (1 srna – r.b. 153.). Na pripadnike fluorokinolona moksifloksacin (MXF) svi izolati su bili osjetljivi, dok su na ciprofloksacin (CIP) dva izolata bila otporna (1 govedo – r.b. 114.; 1 srna – r.b. 154.), a jedan osjetljiv (1 srna – r.b. 153.).

Izolat vrste *M. kumamotoense* izdvojen iz goveda pokazao se osjetljiv na klaritromicin (CLA), fluorokinolone moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP), amikacin (AMI), linezolid (LZD), i doksaciklin (DOX), a otporan na rifabutin (RFB) i rifampin (RIF), te na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT).

Ukupno četiri izolata vrste *M. nonchromogenicum* od kojih su tri izdvojena iz domaćih (3 goveda – r.b. 108., 114., 124.), a jedan iz divljih životinja (1 srna – r.b. 151.), bila su osjetljiva na klaritromicin (CLA). Na antibiotike skupine rifamicina, rifabutin (RFB) svi izolati su bili osjetljivi, dok su na rifampin (RIF) bili otporni. Na pripadnika fluorokinolona moksifloksacin (MXF) izolati su također bili otporni, dok su na ciprofloksacin (CIP) tri izolata bila su otporna (2 goveda – r.b. 108., 124.; 1 srna – r.b. 151.), a jedan umjereno osjetljiv (1 govedo – r.b. 114.). Na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) svi izolati izdvojeni iz goveda bili su otporni, dok je izolat iz srne bio osjetljiv. Na linezolid (LZD) i doksiciklin (DOX), dva izolata pokazala su otpornost (1 govedo – r.b. 124.; 1 srna – r.b. 151.), a dva umjerenu osjetljivost (2 goveda – r.b. 108., 114.). Na amikacin (AMI), dva su izolata bila otporna (2 goveda – 108., 114.), jedan umjereno osjetljiv (1 govedo – r.b. 124.) i jedan osjetljiv (1 srna – r.b. 151.).

Izolati vrste *M. triviale* od kojih su dva izdvojena iz domaćih (2 svinje – r.b. 128., 129.) i jedan iz divljih životinja (1 srna – r.b. 152.), pokazali su osjetljivost na klaritromicin (CLA), rifamicine rifabutin (RFB) i rifampin (RIF), amikacin (AMI) i linezolid (LZD). Na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) i doksiciklin (DOX), oba izolata iz svinja su bila otporna, dok je izolat iz srne bio osjetljiv (r.b. 152.). Nadalje na fluorokinolone, ciprofloksacin (CIP) jedan izolat iz svinje bio je otporan (r.b. 128.), a drugi umjereno osjetljiv (r.b. 129.), dok je izolat iz srne bio osjetljiv (r.b. 152.). Također na moksifloksacin (MXF) jedan izolat iz svinje bio je otporan (r.b. 129.), a drugi umjereno osjetljiv (r.b. 128.), dok je izolat iz srne bio osjetljiv (r.b. 152.).



Slika 16. Prikaz mikrotitracijske pločice 14. dana inkubacije prilikom očitavanja rezultata ispitivanja antimikrobne osjetljivosti pripadnika spororastućih netuberkuloznih mikobakterija. Izolat pripada vrsti *M. flavescens*, a izdvojen je iz goveda pod rednim brojem 119. Na slici su označeni antibiotici za koje je dokazana otpornost: MXF – moksifloksacin, RIF – rifampin, CIP – ciprofloksacin, DOX – doksiciklin

Tablica 16. Rezultati određivanja antimikrobne osjetljivosti izolata spororastućih NTM-a (**MIC** (engl. minimal inhibitory concentration) – najniža koncentracija koja prekida rast; **S** (engl. susceptible) – osjetljiv, **I** (engl. intermediate) – umjereno osjetljiv, **R** (engl. resistant) – otporan)

Vrsta životinje/ redni broj izolata	Vrsta izolata	MIC (tumačenje rezultata)												
		CLA	RFB	EMB	INH	MXF	RIF	SXT	AMI	LZD	CIP	STR	DOX	ETH
govedo/ 116.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	2 (S)	/	/	> 8	4 (R)	/	4/76	16 (S)	> 64 (R)	> 16	> 64	> 16	> 20
govedo/ 118.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	2 (S)	/	/	8	8 (R)	/	0,5/9,5	8 (S)	16 (I)	> 16	16	16	> 20
kokoš/ 135.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	2 (S)	/	/	> 8	> 8 (R)	/	> 8/152	16 (S)	64 (R)	> 16	> 64	> 16	> 20
kokoš/ 134.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	0,5 (S)	/	/	> 8	> 8 (R)	/	2/38	4 (S)	16 (I)	> 16	8	> 16	> 20
kokoš/ 136.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	1 (S)	/	/	> 8	> 8 (R)	/	8/152	4 (S)	32 (R)	> 16	16	> 16	> 20
kokoš/ 137.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	1 (S)	/	/	> 8	> 8 (R)	/	1/19	8 (S)	2 (S)	> 16	32	> 16	> 20
patka/ 138.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	1 (S)	/	/	> 8	> 8 (R)	/	4/76	4 (S)	32 (R)	> 16	16	> 16	> 20
patka/ 139.	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	2 (S)	/	/	> 8	> 8 (R)	/	8/152	64 (R)	32 (R)	> 16	> 64	> 16	> 20
govedo/ 110.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	2 (S)	/	/	8	4 (R)	/	8/152	16 (S)	64 (R)	16	32	> 16	> 20

govedo/ 111.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	4 (S)	/	/	> 8	4 (R)	/	1/19	16 (S)	64 (R)	> 16	64	> 16	> 20
svinja/ 125.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	4 (S)	/	/	> 8	4 (R)	/	2/38	32 (I)	64 (R)	> 16	64	> 16	> 20
svinja/ 126.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	4 (S)	/	/	> 8	8 (R)	/	8/152	16 (S)	64 (R)	> 16	64	> 16	> 20
svinja/ 127.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	2 (S)	/	/	> 8	8 (R)	/	4/76	8 (S)	64 (R)	> 16	64	> 16	> 20
svinja/ 131.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	2 (S)	/	/	> 8	8 (R)	/	8/152	16 (S)	64 (R)	> 16	64	> 16	> 20
svinja/ 132.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	2 (S)	/	/	> 8	8 (R)	/	8/152	16 (S)	64 (R)	> 16	64	> 16	> 20
svinja/ 133.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	4 (S)	/	/	> 8	> 8 (R)	/	8/152	16 (S)	64 (R)	> 16	64	> 16	> 20
srna/ 149.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	2 (S)	/	/	> 8	> 8 (R)	/	> 8/152	32 (I)	32 (R)	> 16	> 64	> 16	> 20
srna/ 150.	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	2 (S)	/	/	> 8	4 (R)	/	23	32 (I)	> 64 (R)	> 16	> 64	> 16	> 20
govedo/ 109.	<i>M. celatum</i>	1 (S)	0,5 (S)	2	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8/152 (R)	≤ 1 (S)	32 (R)	16 (R)	32	8 (R)	20
govedo/ 120.	<i>M. celatum</i>	1 (S)	4 (R)	2	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	4/76 (R)	16 (S)	64 (R)	> 16 (R)	32	> 16 (R)	2,5
govedo/ 122.	<i>M. celatum</i>	1 (S)	≤ 0,25 (S)	1	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	1/19 (S)	4 (S)	32 (R)	> 16 (R)	32	> 16 (R)	2,5

divlja svinja/ 141.	<i>M. celatum</i>	1 (S)	0,5 (S)	2	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	8/152 (R)	16 (S)	32 (R)	> 16 (R)	32	> 16 (R)	20
divlja svinja/ 142.	<i>M. celatum</i>	1 (S)	1 (S)	1	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	8/152 (R)	8 (S)	32 (R)	> 16 (R)	16	> 16 (R)	5
divlja svinja/ 143.	<i>M. celatum</i>	1 (S)	0,5 (S)	2	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8/152 (R)	8 (S)	32 (R)	> 16 (R)	4	8 (R)	2,5
divlja svinja/ 144.	<i>M. celatum</i>	1 (S)	1 (S)	1	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8/152 (R)	32 (I)	32 (R)	> 16 (R)	64	> 16 (R)	5
divlja svinja/ 145.	<i>M. celatum</i>	1 (S)	1 (S)	1	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8/152 (R)	4 (S)	32 (R)	> 16 (R)	> 64	> 16 (R)	5
govedo/ 119.	<i>M. flavescens</i>	0,5 (S)	2 (S)	8	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	1/19 (S)	8 (S)	8 (S)	16 (R)	16	> 16 (R)	> 20
divlja svinja/ 140.	"Najsličnije <i>M. flavescens</i> "	0,25 (S)	1 (S)	2	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	1/19 (S)	4 (S)	2 (S)	2 (I)	16	> 16 (R)	> 20
divlja svinja/ 147.	<i>M. flavescens</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
govedo/ 113.	<i>M. gordonae</i>	0,25 (S)	≤ 0,25 (S)	4	1	0,25 (S)	> 8 (R)	1/19 (S)	4 (S)	2 (S)	0,5 (S)	8	4 (I)	1,2

govedo/ 115.	<i>M. gordonae</i>	0,25 (S)	≤ 0,25 (S)	8	0,5	≤ 0,12 (S)	> 8 (R)	0,5/9,5 (S)	4 (S)	4 (S)	0,5 (S)	16	8 (R)	1,2
govedo/ 121.	<i>M. gordonae</i>	2 (S)	≤ 0,25 (S)	4	> 8	2 (I)	> 8 (R)	0,5/9,5 (S)	8 (S)	32 (R)	8 (R)	8	> 16 (R)	2,5
govedo/ 107.	<i>M. intermedium</i>	2 (S)	0,5 (S)	8	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	8/152 (R)	32 (I)	64 (R)	> 16 (R)	> 64	> 16 (R)	> 20
divlja svinja/ 148.	<i>M. intermedium</i>	≤ 0,06 (S)	≤ 0,25 (S)	≤ 0,5	0,5	≤ 0,12 (S)	≤ 0,12 (S)	2/38 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,5	≤ 0,12 (S)	5
govedo/ 112.	<i>M. kansasii</i>	0,25 (S)	≤ 0,25 (S)	/	/	≤ 0,12 (S)	0,5 (S)	8/152 (R)	8 (S)	2 (S)	4 (R)	32	16 (R)	1,2
srna/ 153.	<i>M. kansasii</i>	0,12 (S)	0,5 (S)	/	/	≤ 0,12 (S)	8 (R)	8/152 (R)	2 (S)	4 (S)	0,3 (S)	4	16 (R)	> 20
srna/ 154.	<i>M. kansasii</i>	0,25 (S)	≤ 0,25 (S)	/	/	≤ 0,12 (S)	0,25 (S)	8/152 (R)	4 (S)	4 (S)	4 (R)	8	8 (R)	≤ 0,3
govedo/ 123.	<i>M. kumamotoense</i>	2 (S)	8 (R)	2	> 8	≤ 0,12 (S)	> 8 (R)	> 8/152 (R)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	0,3 (S)	2	1 (S)	> 20
govedo/ 114.	<i>M. nonchromogenicum</i>	2 (S)	2 (S)	≤ 0,5	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8/152 (R)	> 64 (R)	16 (I)	2 (I)	4	4 (I)	≤ 0,3
govedo/ 117.	"Najsličnije <i>M. nonchromogenicum</i> "	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
govedo/ 108.	<i>M. nonchromogenicum</i>	2 (S)	2 (S)	1	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8/152 (R)	> 64 (R)	16 (I)	> 16 (R)	4	4 (I)	≤ 0,3

govedo/ 124.	<i>M.</i> <i>nonchromogenicum</i>	1 (S)	2 (S)	≤ 0,5	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	8/152 (R)	32 (I)	> 64 (R)	> 16 (R)	> 64	> 16 (R)	2,5
divlja svinja/ 146.	"Najsličnije <i>M.</i> <i>nonchromogenicum</i> "	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
srna/ 151.	<i>M.</i> <i>nonchromogenicum</i>	0,5 (S)	1 (S)	32	> 8	> 8 (R)	> 8 (R)	2/38 (S)	8 (S)	32 (R)	> 16 (R)	32	> 16 (R)	> 20
svinja/ 129.	<i>M. triviale</i>	0,12 (S)	≤ 0,25 (S)	4	> 8	4 (R)	0,5 (S)	4/76 (R)	8 (S)	4 (S)	2 (I)	16	> 16 (R)	> 20
svinja/ 128.	<i>M. triviale</i>	0,25 (S)	≤ 0,25 (S)	> 16	> 8	2 (I)	1 (S)	4/76 (R)	16 (S)	4 (S)	8 (R)	16	8 (R)	> 20
srna/ 152.	<i>M. triviale</i>	0,12 (S)	≤ 0,25 (S)	8	> 8	≤ 0,12 (S)	0,5 (S)	0,5/9,5 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,12 (S)	2	0,5 (S)	5
Pozitivna kontrola	<i>M. avium</i> ATCC 700898	1	1	8	> 8	2	1	0,5/9,5	8	8	4	16	4	1,2

Nadalje, u tablicama 17. i 18. prikazan je broj sojeva osjetljivih/otpornih na određeni istraživani antibiotik, te broj sojeva otpornih na jedan ili više antibiotika.

Tablica 17. Broj izdvojenih sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija osjetljivih/otpornih na određeni antibiotik

Skupina antibiotika	Antibiotik	S	I	R	Ukupno
MAKROLIDI	CLA	44	0	0	44
RIFAMICINI	RFB	24	0	2	26
	RIF	6	0	20	26
FLUOROKINOLONI	MXF	8	2	34	44
	CIP	6	3	17	26
	SXT	9	17	0	26
AMINOGLIKOZIDI	AMI	35	6	3	44
OKSAZOLIDINON	LZD	13	4	27	44
TETRACIKLINI	DOX	3	3	20	26

S (engl. susceptible) – osjetljiv, **I** (engl. intermediate) – umjereno osjetljiv, **R** (engl. resistant) – otporan

Tablica 18. Broj sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na jedan ili više antibiotika

Otporan na	N	%	Kumulativna frekvencija
0	2	4.55	4.55
1	4	9.09	13.64
2	15	34.09	47.73
3	8	18.18	65.91
4	3	6.82	72.73
5	3	6.82	79.55
6	8	18.18	97.73
7	1	2.27	100.00
Ukupno	44	100	100

Opažene razlike u pojavnosti otpornih sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija izdvojenih iz domaćih i divljih životinja statistički su značajne ($P=0.033$) (Tablica 19.).

Tablica 19. Broj sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na jedan ili više antibiotika u divljih i domaćih životinja

Otporan na	Divlje	Domaće	Ukupno
0	2	0	2
1-3	5	22	27
4 i više	6	9	15
Ukupno	13	31	44

Opažene razlike u pojavnosti otpornih sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija izdvojenih u različitim godinama promatranja nisu statistički značajne ($P=0.565$) (Tablica 20.).

Tablica 20. Broj sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na jedan ili više antibiotika u različitim godinama promatranja

Otporan na	2012.	2013.	2014.	2015.	2016.	Ukupno
0	0	1	0	1	0	2
1-3	7	9	8	1	2	27
4 i više	4	7	3	0	1	15
Ukupno	11	17	11	2	3	44

Opažene razlike u otpornosti prema antibioticima između različitih vrsta spororastućih netuberkuloznih mikobakterija statistički su značajne ($p<0.001$). Sojeva otpornih na tri i manje antibiotika dvostruko je više među pripadnicima *M. avium* kompleksa. Niti jedan od analiziranih sojeva otpornih na 4 i više antibiotika istovremeno ne pripadaju *M. avium* kompleksu nego ostalim vrstama (Tablica 21.).

Tablica 21. Broj sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na jedan ili više antibiotika u različitim vrsta spororastućih mikobakterija

Otporan na	<i>M. avium</i> kompleks	Ostale vrste	Ukupno
0	0	2	2
1-3	18	9	27
4 i više	0	15	15
Ukupno	18	26	44

5.2.6.1.1 Antimikrobna osjetljivost spororastućih netuberkuloznih mikobakterija prema županiji porijekla

Navedeno ispitivanje spororastućih NTM-a obuhvatilo je izolate iz ukupno devet županija i Grada Zagreba, i to Bjelovarsko – bilogorske, Zagrebačke, Sisačko – moslavačke, Osječko – baranjske, Požeško – slavonske, Brodsko – posavske, Vukovarsko – srijemske, Ličko – senjske i Međimurske županije.

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti proveli smo na ukupno sedam izolata pripadnika pet različitih vrsta spororastućih NTM-a s područja Bjelovarsko – bilogorskoj županije (Tablica 22.), i to MAC (2 izolata iz divljih životinja), *M. intermedium* (1 izolat iz domaćih životinja), *M. kansasii* (2 izolata iz divljih životinja), *M. nonchromogenicum* (1 izolat iz divljih) i *M. triviale* (1 izolat iz divljih).

Svi ispitani izolati bili su osjetljivi na klaritromicin (CLA). Na pripadnike skupine rifamicina, tj. rifabutina (RFB), svi izolati bili su osjetljivi, dok su na rifampin (RIF) otporni bili izolati *M. intermedium*, *M. nonchromogenicum* i jedan *M. kansasii* izolat, a osjetljivi jedan *M. kansasii* i *M. triviale* izolat. Nadalje, na antibiotike skupine flourokinolona, tj. moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP), izolati pripadnici MAC, *M. intermedium* i *M. nonchromogenicum* bili su otporni, dok su izolati *M. kansasii* i *M. triviale* bili osjetljivi. Na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) izolati vrste *M. intermedium* i *M. kansasii* bili su otporni, dok su *M. nonchromogenicum* i *M. triviale* bili osjetljivi. Na aminoglikozide, tj. amikacin (AMI) izolati vrste *M. kansasii*, *M. nonchromogenicum* i *M. triviale* bili su osjetljivi, dok su izolati MAC-a i *M. intermedium* bili umjereno osjetljivi. Na skupinu oksazolidinona, tj. linezolid (LZD) otpornost su pokazali izolati MAC-a, *M. intermedium* i *M. nonchromogenicum*, dok su *M. kansasii* i *M. triviale* bili osjetljivi. Na tetracikline, tj.

doksiciklin (DOX) izolati *M. intermedium*, *M. kansasii* i *M. nonchromogenicum* bili su otporni, dok je izolat *M. triviale* bio osjetljiv.

Kod ispitanih izolata u Bjelovarsko – bilogorskoj županiji, opisali smo najveću otpornost na antibiotike skupine fluorokinilona, tj. moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP), kao i na pripadnika oksazolidinona linezolid (LZD), a najzastupljenija je bila kod vrsta pripadnika MAC i *M. nonchromogenicum* izdvojenih iz divljih, te *M. intermedium* iz domaćih životinja. Kod navedenih vrsta smo također opisali otpornost na doksiciklin (DOX) i rifampin (RIF), kao i kod izolata *M. kansasii* iz divljih životinja. Na trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) opisali smo otpornost kod izolata vrste *M. intermedium* i *M. kansasii*. Nismo uočili značajne razlike u antimikrobnoj osjetljivosti između izolata izdvojenih iz domaćih i onih iz divljih životinja.

Iz navedene županije izdvojili bi dva izolata izdvojena iz goveda (1 izolat *M. intermedium* – r.b. 107.) i srne (1 izolat *M. nonchromogenicum* – r.b. 151.), kod kojih smo opisali otpornost na pet i više antibiotika, kao i dva izolata izdvojena iz srna koja su bila osjetljiva samo na jedan antibiotik (2 izolata MAC – r.b. 149., 150.).

Tablica 22. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata spororastućih NTM-a izdvojenih iz Bjelovarsko - bilogorske županije (**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

		Bjelovarsko - bilogorska županija															
	Antibiotik	Vrsta životinje	MAC (n=2) divlje Σ 2			<i>M. intermedium</i> (n=1) domaće Σ 1			<i>M. kansasii</i> (n = 2) divlje Σ 2			<i>M. nonchromogenicum</i> (n = 1) divlje Σ 1			<i>M. triviale</i> (n = 1) divlje Σ 1		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
MAKROLIDI	CLA	domaće	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	2	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
RIFAMICINI	RFB	domaće	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-	
		%	-	-	-	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	
	RIF	domaće	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	1	-	
		%	-	-	-	0	0	100	50	0	50	0	0	100	100	0	
FLUOROKINOLONI	EMB	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	INH	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
AMINOGLIKOZIDI	MXF	domaće	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-		
		divlje	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	-	1	1		
		%	0	0	100	0	0	100	100	0	0	0	0	100	100		
	CIP	domaće	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-		
		divlje	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	1		
		%	-	-	-	0	0	100	50	0	50	0	0	100	100		
SXT	domaće	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-			
	divlje	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	1			
	%	-	-	-	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100			
AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-			
		divlje	-	2	-	-	-	-	2	-	-	1	-	1			
		%	0	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100	100			
	STR	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

OKSAZOLIDINON	LZD	domaće	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	-	1	1
		%	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100
TETRACIKLIN	DOX	domaće	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	1	
		%	-	-	-	0	0	100	0	0	100	0	0	100	
ETH		domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Na području Zagrebačke županije i Grada Zagreba (Tablica 23.) ispitivanje smo proveli na ukupno 11 izolata pripadnika triju različitih vrsta spororastućih NTM-a, i to MAC (9 izolata iz domaćih životinja), "Najsličniji *M. flavescens*" (1 izolat iz divljih životinja) i *M. triviale* (1 izolat iz domaćih životinja).

Svi ispitani izolati bili su osjetljivi na klaritromicin (CLA). Na pripadnike skupine rifamicina, tj. rifabutin (RFB), svi izolati bili su osjetljivi, dok je na rifampin (RIF) izolat "Najsličniji *M. flavescens*" bio otporan, a *M. triviale* osjetljiv. Nadalje, na antibiotike skupine flourokinolona, tj. moksifloksacin (MXF) svi ispitani izolati bili su otporni, dok su na ciprofloksacin (CIP) bili umjereno osjetljivi. Na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) izolat "Najsličniji *M. flavescens*" bio je osjetljiv, dok je *M. triviale* bio otporan. Na aminoglikozide, tj. amikacin (AMI) izolati "Najsličniji *M. flavescens*" i *M. triviale* bili su osjetljivi, dok su kod MAC-a tri izolata bila osjetljiva, a jedan otporan. Na skupinu oksazolidinona, tj. linezolid (LZD) otpornost je pokazalo ukupno sedam izolata pripadnika MAC-a, dok je jedan bio umjereno osjetljiv, a jedan osjetljiv. Izolati "Najsličniji *M. flavescens*" i *M. triviale* bili su osjetljivi na navedeni antibiotik. Na tetracikline, tj. doksiciklin (DOX) testirani izolati bili su otporni.

Kod ispitanih izolata u Zagrebačkoj županiji i Gradu Zagrebu, najveću otpornost smo opisali na moksifloksacin (MXF), antibiotik skupine fluorokinilona, i to kod svih izolata, dok su na linezolid (LZD), pripadnika skupine oksazolidinona, otporni bili gotovo svi MAC izolati. Također smo opisali izolat iz divljih životinja "Najsličniji *M. flavescens*" otporan na rifampin (RIF) i doksiciklin (DOX), te izolat iz domaćih životinja *M. triviale* otporan na trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) i doksiciklin (DOX). Jedan izolat MAC iz domaćih životinja bio je otporan i na amikacin (AMI). Uočili smo razlike u antimikrobnoj osjetljivosti između izolata izdvojenih iz domaćih i onih iz divljih životinja, i to za antibiotik rifampin (RIF) gdje je jedan izolat iz divljih životinja bio otporan, dok je drugi iz domaćih bio osjetljiv, te za trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) gdje je izolat iz domaćih bio otporan, a iz divljih osjetljiv.

Iz navedenih županija izdvojili bi jedan izolat izdvojen iz patke (1 izolat MAC – r.b. 139.) koji je bio osjetljiv samo na jedan antibiotik.

Tablica 23. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata spororastućih NTM-a izdvojenih iz Zagrebačke županije i Grada Zagreba (**S** – osjetljiv, **I** – umjerenom osjetljiv, **R** – otporan)

			Zagrebačka županija									Grad Zagreb		
Antibiotik	Vrsta životinje	MAC (n=7) domaće Σ 7			"Najsličnije <i>M. flavescens</i> " (n=1) divlje Σ 1			<i>M. triviale</i> (n = 1) domaće Σ 1			MAC (n = 2) domaće Σ 2			
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
MAKROLIDI	CLA	domaće	7	-	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-
		divlje	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
RIFAMICINI	RFB	domaće	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	100	0	0	100	0	0	-	-	-
	RIF	domaće	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	0	0	100	100	0	0	-	-	-
FLUOROKINOLONI	EMB	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	INH	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FLUOROKINOLONI	MXF	domaće	-	-	7	-	-	-	-	-	1	-	-	2
		divlje	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	CIP	domaće	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	0	100	0	0	100	0	-	-	-

	SXT	domaće	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	
		divlje	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
		%	-	-	-	100	0	0	0	0	100	-	-	
AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	7	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1
		divlje	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	50	0	50
	STR	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OKSAZOLIDINON	LZD	domaće	1	-	6	-	-	-	1	-	-	-	1	1
		divlje	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	14,3	0	85,7	100	0	0	100	0	0	0	50	50
TETRACIKLINI	DOX	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	0	0	100	0	0	100	-	-	-
ETH	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti proveli smo na ukupno 13 izolata pripadnika šest različitih vrsta spororastućih NTM-a s područja Sisačko – moslavačke županije (Tablica 24.), i to *M. celatum* (6 izolata – 1 iz domaćih; 5 iz divljih životinja), *M. gordonae* (2 izolat iz domaćih životinja), *M. intermedium* (1 izolat iz divljih životinja), *M. kansasii* (1 izolat iz domaćih životinja), *M. kumamotoense* (1 izolat iz domaćih životinja) i *M. nonchromogenicum* (2 izolata iz domaćih životinja).

Svi ispitani izolati bili su osjetljivi na klaritromicin (CLA). Na pripadnike skupine rifamicina, tj. rifabutina (RFB), izolati vrste *M. gordonae*, *M. intermedium*, *M. kansasii* i *M. nonchromogenicum* bili su osjetljivi, dok je izolat *M. kumamotoense* bio otporan. Unutar *M.*

celatum izolata, pet izolata podrijetlom iz divljih životinja bilo je osjetljivo, dok je izolat iz domaćih životinja bio otporan. Na rifampin (RIF) otpornost su pokazali izolati *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. kumamotonense* i *M. nonchromogenicum*, dok su *M. intermedium* i *M. kansasii* bili osjetljivi. Nadalje, na antibiotike skupine flourokinolona, tj. moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP), izolati pripadnici *M. gordonae*, *M. intermedium* i *M. kumamotonense* bili su osjetljivi, dok su izolati *M. celatum* bili otporni. *M. kansasii* pokazao se osjetljivim na moksifloksacin, a otporan na ciprofloksacin, dok su oba izolata *M. nonchromogenicum* bila otporna na moksifloksacin, te jedan umjereno osjetljiv i jedan otporan na ciprofloksacin. Na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) izolati vrste *M. celatum*, *M. kansasii*, *M. kumamotonense* i *M. nonchromogenicum* bili su otporni, dok su *M. gordonae* i *M. intermedium* bili osjetljivi. Na aminoglikozide, tj. amikacin (AMI) izolati vrste *M. gordonae*, *M. intermedium*, *M. kansasii* i *M. kumamotonense* bili su osjetljivi, dok je kod *M. nonchromogenicum* jedan izolat bio umjereno osjetljiv, a drugi otporan. Unutar *M. celatum* izolata, pet ih je bilo otporno, a jedan umjereno osjetljiv na amikacin. Na skupinu oksazolidinona, tj. linezolid (LZD) osjetljivost su pokazali izolati *M. gordonae*, *M. intermedium*, *M. kansasii* i *M. kumamotonense*, dok su svi izolati *M. celatum* pokazali otpornost. Otporan je bio i jedan izolat *M. nonchromogenicum*, dok je drugi bio umjereno osjetljiv. Otpornost je također pokazao jedan izolat vrste *M. gordonae* i vrste *M. nonchromogenicum*, dok je drugi izolat u slučaju obje vrste pokazao umjerenu osjetljivost.

Kod ispitanih izolata u Sisačko - moslavačkoj županiji, najveću otpornost smo opisali na antibiotik skupine rifamicina rifampin (RIF), i to kod izolata *M. celatum* izdvojenih većinom iz divljih životinja, te *M. gordonae*, *M. kumamotonense* i *M. nonchromogenicum* sve iz domaćih životinja, dok je na rifabutin (RFB) većina izolata bila osjetljiva. Također visoki postotak otpornosti opisali smo za trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) kod vrsta *M. celatum*, *M. kansasii*, *M. kumamotonense* i *M. nonchromogenicum*, kao i za doksiciklin (DOX) kod vrsta *M. celatum*, *M. kansasii*, te jedan izolat *M. gordonae* i *M. nonchromogenicum*. Otpornost u visokom postotku smo opisali i za skupinu fluorokinolona (moksifloksacin, MXF i ciprofloksacin, CIP), i to kod vrsta *M. celatum*, *M. kansasii* i *M. nonchromogenicum*. Većina izolata *M. celatum* i jedan *M. nonchromogenicum* bili su otporni i na amikacin (AMI) i linezolid (LZD). Od razlika u antimikrobnoj osjetljivosti između izolata izdvojenih iz domaćih i onih iz divljih životinja uočili smo samo kod rifabutina (RFB) gdje je izolat iz domaćih životinja bio otporan, a svi izolati iz divljih su bili osjetljivi.

Iz navedene županije izdvojili bi skupno sedem izolata, i to dva iz goveda (1 izolat *M. celatum* – r.b. 120.; 1 izolat *M. nonchromogenicum* – r.b. 124.) i pet iz divljih svinja (5 izolata *M. celatum* – r.b. 141. – 145.), kod kojih smo opisali otpornost na pet i više antibiotika.

Tablica 24. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata spororastućih NTM-a izdvojenih iz Sisačko - moslavačke županije

(**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

		Sisačko - moslavačka županija																		
	Antibiotik	Vrsta životinje	<i>M. celatum</i> (n = 6) domaće Σ 1 divlje Σ 5			<i>M. goodnae</i> (n = 2) domaće Σ 2			<i>M. intermedium</i> (n = 1) divlje Σ 1			<i>M. kansasii</i> (n = 1) domaće Σ 1			<i>M. kumamotoense</i> (n = 1) domaće Σ 1			<i>M. nonchromogenicum</i> (n = 2) domaće Σ 2		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
MAKROLIDI	CLA	domaće	1	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	2	-	-
		divlje	5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
RIFAMICINI	RFB	domaće	-	-	1	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2	-	-
		divlje	5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	83,3	0	16,7	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0
	RIF	domaće	-	-	1	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	2
		divlje	-	-	5	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	100
FLUOROKINOLINI	EMB	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	INH	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FLUOROKINOLINI	MXF	domaće	-	-	1	2	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	2	
		divlje	-	-	5	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	100
	CIP	domaće	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	1
		divlje	-	-	5	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	50

	SXT	domaće	-	-	1	2	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	2	
		divlje	-	-	5	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100
AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	-	-	1	2	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	1	1	
		divlje	-	1	4	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
		%	0	16,7	83,3	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	50	50
	STR	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OKSAZOLIDINONI	LZD	domaće	-	-	1	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	
		divlje	-	-	5	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	50	50
TETRACIKLINI	DOX	domaće	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	
		divlje	-	-	5	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	0	50	50	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	50
	ETH	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Na području Osječko – baranjske, Požeško – slavonske, Brodsko – posavske i Vukovarsko – srijemske županije (Tablica 25., Tablica 26.) ispitivanje smo proveli na ukupno devet izolata sve podrijetlom iz domaćih životinja, pripadnika šest različitih vrsta spororastućih NTM-a, i to MAC (3 izolata), *M. celatum* (2 izolata), *M. gordonae* (1 izolat), *M. flavescens* (1 izolat), *M. nonchromogenicum* (1 izolat) i *M. triviale* (1 izolat).

Svi ispitani izolati bili su osjetljivi na klaritromicin (CLA). Na pripadnike skupine rifamicina, tj. rifabutin (RFB), svi izolati bili su osjetljivi, dok su na rifampin (RIF) svi izolati bili otporni, osim *M. triviale* koji je bio osjetljiv. Nadalje, na antibiotik skupine flourokinolona, tj. moksifloksacin (MXF) većina testiranih izolata je bila otporna, osim *M. gordonae* i *M. triviale* koji su bili umjereno osjetljivi, dok su na ciprofloksacin (CIP) svi bili otporni. Na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) izolati vrste *M. gordonae* i *M. flavescens* bili su osjetljivi, dok su *M. nonchromogenicum* i *M. triviale* bili otporni. Otpornost je pokazao i jedan izolat vrste *M. celatum*, dok je drugi bio osjetljiv.

Na aminoglikozide, tj. amikacin (AMI) izolati pripadnici MAC-a, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. flavescens* i *M. triviale* bili su osjetljivi, dok je *M. nonchromogenicum* bio otporan. Na skupinu oksazolidinona, tj. linezolid (LZD) otporni su bili izolati MAC-a, *M. celatum*, *M. gordonae*, dok su *M. flavescens* i *M. triviale* bili osjetljivi. *M. nonchromogenicum* bio je umjereno osjetljiv na navedeni antibiotik.

Na tetracikline, tj. doksiciklin (DOX) svi ispitani izolati bili su otporni, osim *M. nonchromogenicum* koji je bio umjereno osjetljiv.

Kod ispitanih izolata u navedenim županijama, najveću otpornost smo opisali na antibiotik skupine rifamicina rifampin (RIF) gdje su svi ispitani izolati bili otporni osim izolata *M. triviale* koji je bio osjetljiv, kao i na doksiciklin (DOX) gdje je umjereno osjetljiv bio samo izolat *M. nonchromogenicum*. Također visoki postotak otpornosti opisali smo za skupinu fluorokinolona, tj. moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP) gdje su svi izolati bili otporni osim izolata *M. triviale* i *M. gordonae* koji su bili umjereno osjetljivi na moksifloksacin, te za linezolid (LZD) gdje su otpornost pokazali izolati MAC, *M. celatum* i *M. gordonea*. Na trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) otpornost smo opisali kod jednog *M. celatum* izolata, te *M. nonchromogenicum* i *M. triviale*. Na amikacin (AMI) je jedan izolat *M. nonchromogenicum* također bio otporan.

U navedenim županijama svi ispitani izolati bili su podrijetlom iz domaćih životinja, te nismo bili u mogućnosti raditi usporedbu u antimikrobnoj osjetljivosti između izolata iz domaćih i divljih životinja.

Iz navedenih županija izdvojili bi ukupno tri izolata iz goveda (2 izolat *M. celatum* – r.b. 109., 122.; 1 izolat *M. nonchromogenicum* – r.b. 108.), kod kojih smo opisali otpornost na pet i više antibiotika.

Tablica 25. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata spororastućih NTM-a izdvojenih iz Osječko – baranjske i Požeško - slavonske županije (**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

			Osječko - baranjska županija									Požeško - slavonska županija					
	Antibiotik	Vrsta životinje	MAC (n=1) domaće Σ 1			<i>M. celatum</i> (n=2) domaće Σ 2			<i>M. gordoniae</i> (n = 1) domaće Σ 1			MAC (n = 1) domaće Σ 1			<i>M. flavescens</i> (n = 1) domaće Σ 1		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
MAKROLIDI	CLA	domaće	1	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
RIFAMICINI	RFB	domaće	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	100	0	0	100	0	0	-	-	-	100	0	0
	RIF	domaće	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	1
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	0	0	100	0	0	100	-	-	-	0	0	100
FLUOROKINOLONI	EMB	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	INH	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FLUOROKINOLONI	MXF	domaće	-	-	1	-	-	2	-	1	-	-	-	1	-	-	1
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	0	100
	CIP	domaće	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	1
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	0	0	100	0	0	100	-	-	-	0	0	100
SXT	domaće	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	
	divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	%	-	-	-	50	0	50	100	0	0	-	-	-	100	0	0	

AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	1	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	100	0	0
	STR	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OKSAZOLIDINON	LZD	domaće	-	-	1	-	-	2	-	-	1	-	-	1	1	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	100	0	0	0
TETRACIKLINI	DOX	domaće	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	1	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	0	0	100	0	0	100	-	-	-	0	0	100	
	ETH	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Na području Ličko – senjske županije ispitivanje smo proveli na jednom izolatu pripadniku vrste MAC-a, a navedeni izolat bio je osjetljiv na klaritromicin (CLA) i amikacin (AMI), umjereno osjetljiv na linezolid (LZD), a otporan na moksifloksacin (MXF) (Tablica 26.)

U Međimurskoj županiji ispitali smo ukupno tri izolata pripadnika MAC-a koji su bili osjetljivi na klaritromicin (CLA), a otporni na moksifloksacin (MXF) i linezolid (LZD). Na amikacin (AMI), dva izolata su bila osjetljiva, a jedan umjereno osjetljiv (Tablica 26.)

Tablica 26. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata spororastućih NTM-a izdvojenih iz Ličko – senjske, Međimurske, Brodsko – posavske i Vukovarsko - srijemske županije (**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

	Antibiotik	Vrsta životinje	Ličko - senjska županija			Međimurska županija			Brodsko - posavska županija			Vukovarsko - srijemska županija					
			MAC (n = 1) domaće \sum 1			MAC (n = 3) domaće \sum 3			<i>M. nonchromogenicum</i> (n = 1) domaće \sum 1			MAC (n = 1) domaće \sum 1			<i>M. triviale</i> (n = 1) domaće \sum 1		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
MAKROLIDI	CLA	domaće	1	-	-	3	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
RIFAMICINI	RFB	domaće	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	100	0	0	-	-	-	100	0	0
	RIF	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	0	0	100	-	-	-	100	0	0
FLUOROKINI LONI	EMB	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	INH	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MXF	domaće	-	-	1	-	-	3	-	-	1	-	-	1	-	1	-	
	divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	%	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	100	0	

	CIP	domaće divlje %	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - 1 - - - 0 0 100	- - - - - - - - -	- - 1 - - - 0 0 100
	SXT	domaće divlje %	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - 1 - - - 0 0 100	- - - - - - - - -	- - 1 - - - 0 0 100
AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće divlje %	1 - - - - - 100 0 0	2 1 - - - - 66,67 33,33 0	- - 1 - - - 0 0 100	1 - - - - - 100 0 0	1 - - - - - 100 0 0
	STR	domaće divlje %	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -
OKSAZOLIDINON	LZD	domaće divlje %	- 1 - - - - 0 100 0	- - 3 - - - 0 0 100	- 1 - - - - 0 100 0	- - 1 - - - 0 0 100	1 - - - - - 100 0 0
TETRACIKLINI	DOX	domaće divlje %	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- 1 - - - - 0 100 0	- - - - - - - - -	- - 1 - - - 0 0 100
	ETH	domaće divlje %	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -

5.2.6.1.2 Prikaz geografske rasprostranjenosti pojedinih vrsta spororastućih neuberkuloznih mikobakterija s obzirom na antimikrobnu otpornost u Republici Hrvatskoj

Svih 44 (100%) ispitanih izolata spororastućih NTM-a bilo je osjetljivo na antibiotik iz skupine makrolida, klaritromicin (CLA) (17 izolata iz goveda, 8 iz svinja, 4 iz kokoši, 2 iz pataka, 7 iz divljih svinja, 6 iz srna).

Na aminoglikozide, tj. amikacin (AMI) ukupno je 35 (79,6%) izolata bilo osjetljivo (13 izolata iz goveda, 7 iz svinja, 4 iz kokoši, 1 iz patke, 6 iz divljih svinja, 4 iz srna), dok je šest (13,6%) bilo umjereno osjetljivo (2 iz goveda, 1 iz svinje, 1 iz divlje svinje, 2 iz srna), a tri (6,8%) su bila otporna (2 iz goveda, 1 iz patke) (Slika 17.).

Na rifabutin (RFB), antibiotik skupine rifamicina, od protumačenih 26 izolata njih 24 (92,3%) je bilo osjetljivo (11 izolata iz goveda, 2 iz svinja, 7 iz divljih svinja, 4 iz srna), a dva (7,7%) izolata su bila otporna (2 iz goveda). Suprotno, na rifampin (RIF) je većina izolata, njih 20 od protumačenih 26 (76,9%) bila otporna (12 izolata iz goveda, 6 iz divljih svinja, 2 iz srna), dok je šest (13,6%) bilo osjetljivo (1 iz goveda, 2 iz svinje, 1 iz divlje svinje, 2 iz srne) (Slika 18.).

Nadalje, visoki postotak otpornosti također smo opisali za antibiotike skupine flourokinolona, tj. moksifloksacin (MXF) na koji su 34 (77,3%) testirana izolata bila otporna (12 iz goveda, 7 iz svinja, 4 iz kokoši, 2 iz pataka, 6 iz divljih svinja, 3 iz srna), dok su umjereno osjetljiva bila dva (4,5%) (1 iz goveda, 1 iz svinje), a osjetljivo osam (18,2%) izolata (4 iz goveda, 1 iz divlje svinje, 3 iz srna), te je za ovaj antibiotik opisan najveći postotak otpornosti među ispitanim spororastućim vrstama NTM-a. Također, na ciprofloksacin (CIP) je od protumačenih 26 izolata njih 17 (65,4%) bilo otporno (9 izolata iz goveda, 1 iz svinja, 5 iz divljih svinja, 2 iz srna), dok su umjerno osjetljiva bila tri (11,5%) (1 iz goveda, 1 iz svinje, 1 iz divlje svinje), a osjetljiva ukupno šest (23,1%) izolata (3 iz goveda, 1 iz divlje svinje, 2 iz srne) (Slika 19.).

Na tetracikline, tj. doksiciklin (DOX) je od protumačenih 26 izolata njih ukupno 20 (77%) bilo otporno (9 izolata iz goveda, 2 iz svinja, 6 iz divljih svinja, 3 iz srna), tri (11,5%) umjereno osjetljivo (3 iz goveda) i tri (11,5%) osjetljivo (1 iz goveda, 1 iz divlje svinje, 1 iz srne) (Slika 20.).

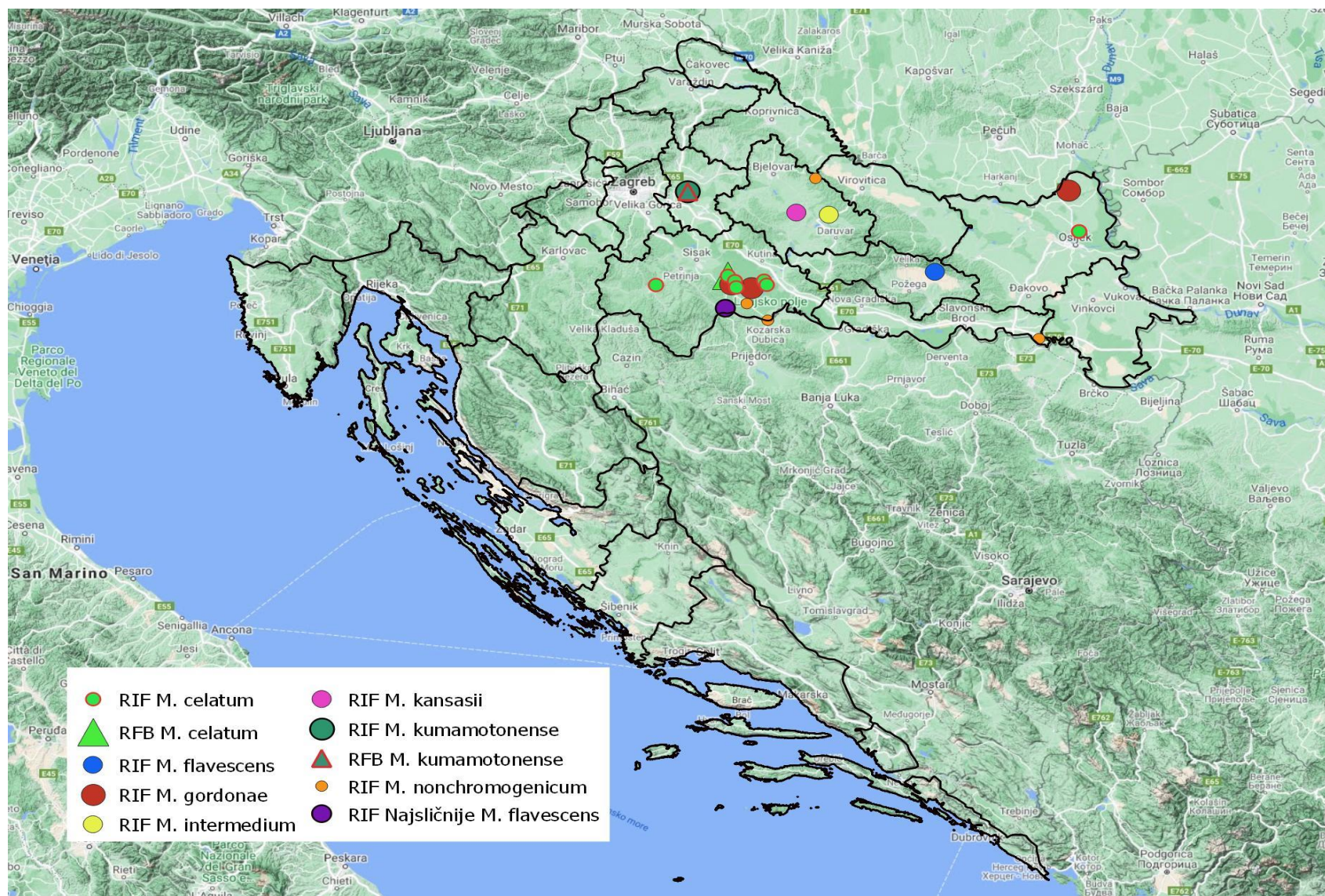
Na skupinu oksazolidinona, tj. linezolid (LZD) ukupno 27 (61,4%) izolata bilo je otporno (9 izolata iz goveda, 6 iz svinja, 2 iz kokoši, 2 iz pataka, 5 iz divljih svinja, 3 iz srna),

četiri (9,1%) umjereno osjetljivo (3 iz goveda, 1 iz kokoši), a 13 (29,5%) osjetljivo (5 iz goveda, 2 iz svinja, 1 iz kokoši, 2 iz divljih svinja, 3 iz srna) (Slika 21.).

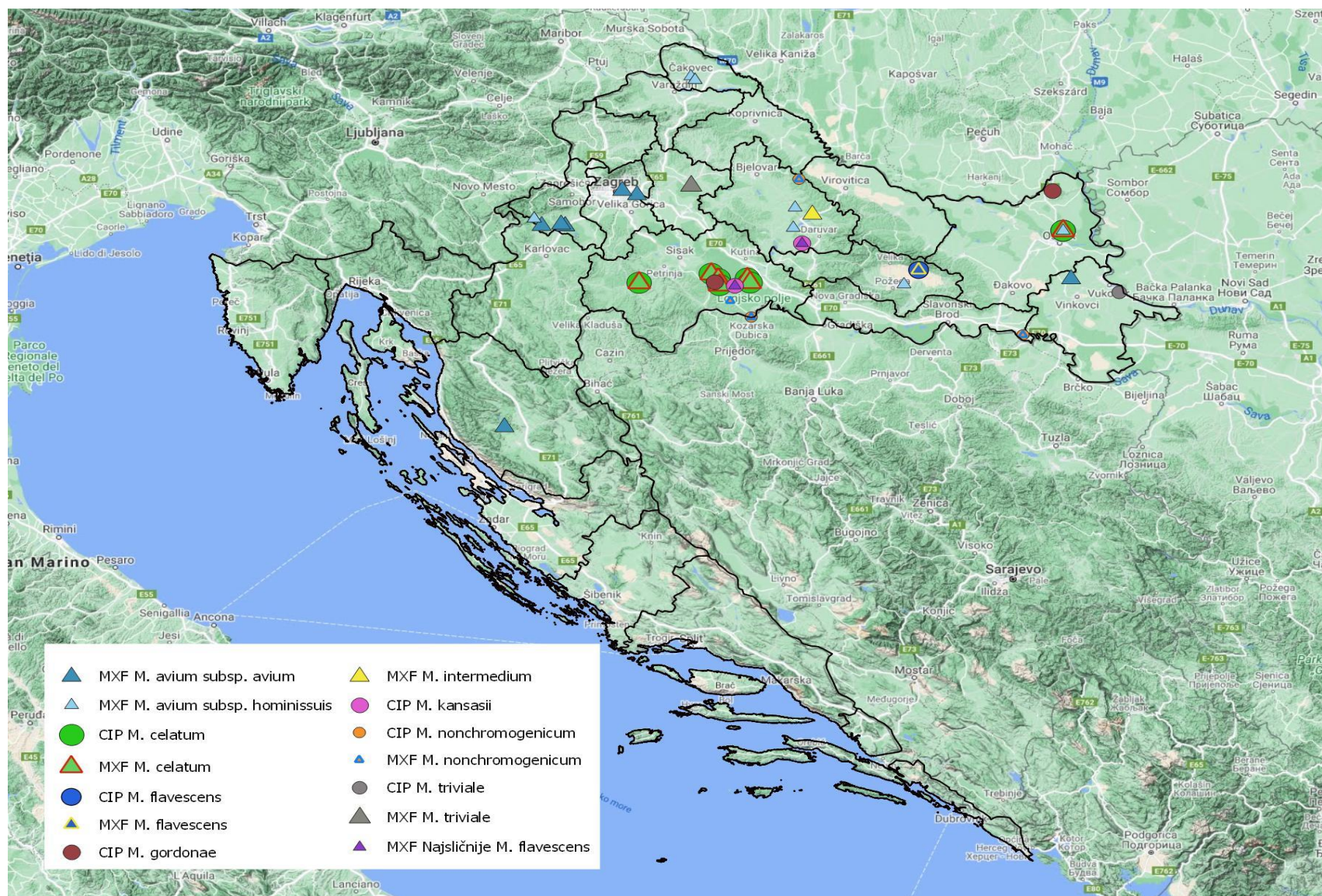
Na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT) je od protumačenih 26 izolata njih ukupno 17 (65,4%) bilo otporno (8 izolata iz goveda, 2 iz svinja, 5 iz divljih svinja, 2 iz srna), dok je ostalih 9 (34,6%) bilo osjetljivo (5 iz goveda, 2 iz divljih svinja, 2 iz srna) (Slika 22.).



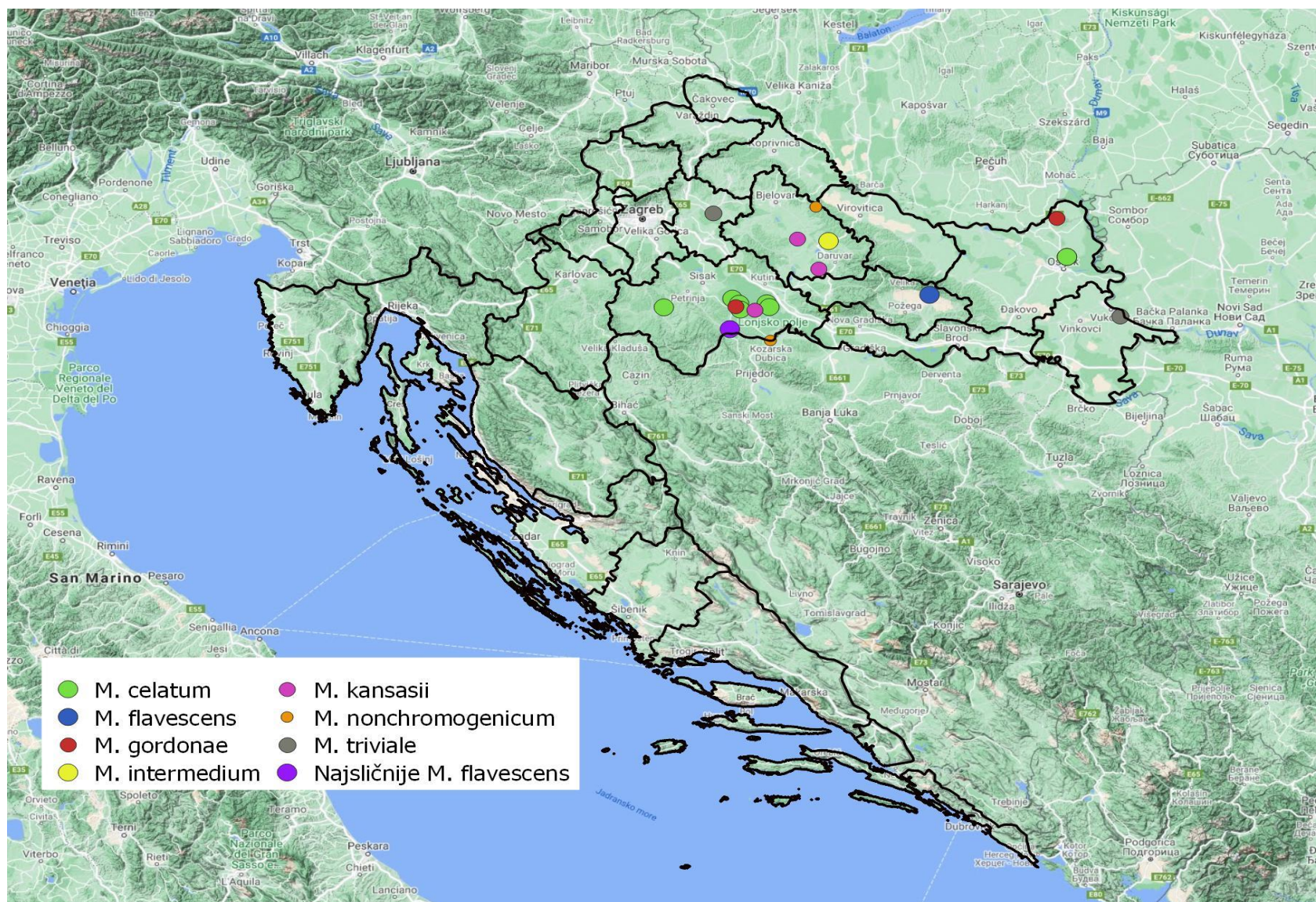
Slika 17. Geografski prikaz sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na amikacin (AMI)



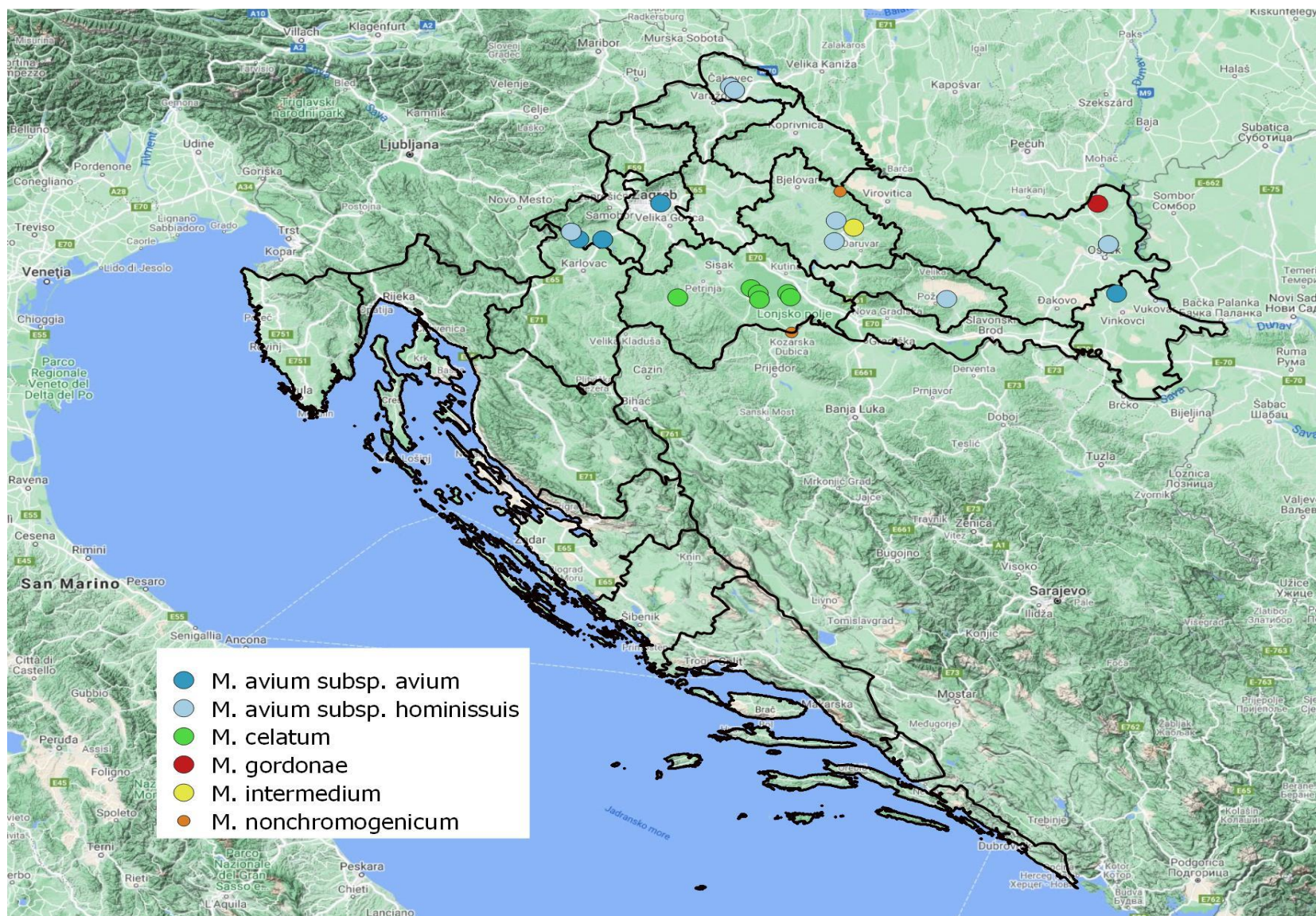
Slika 18. Geografski prikaz sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na rifabutin (RFB) i rifampin (RIF)



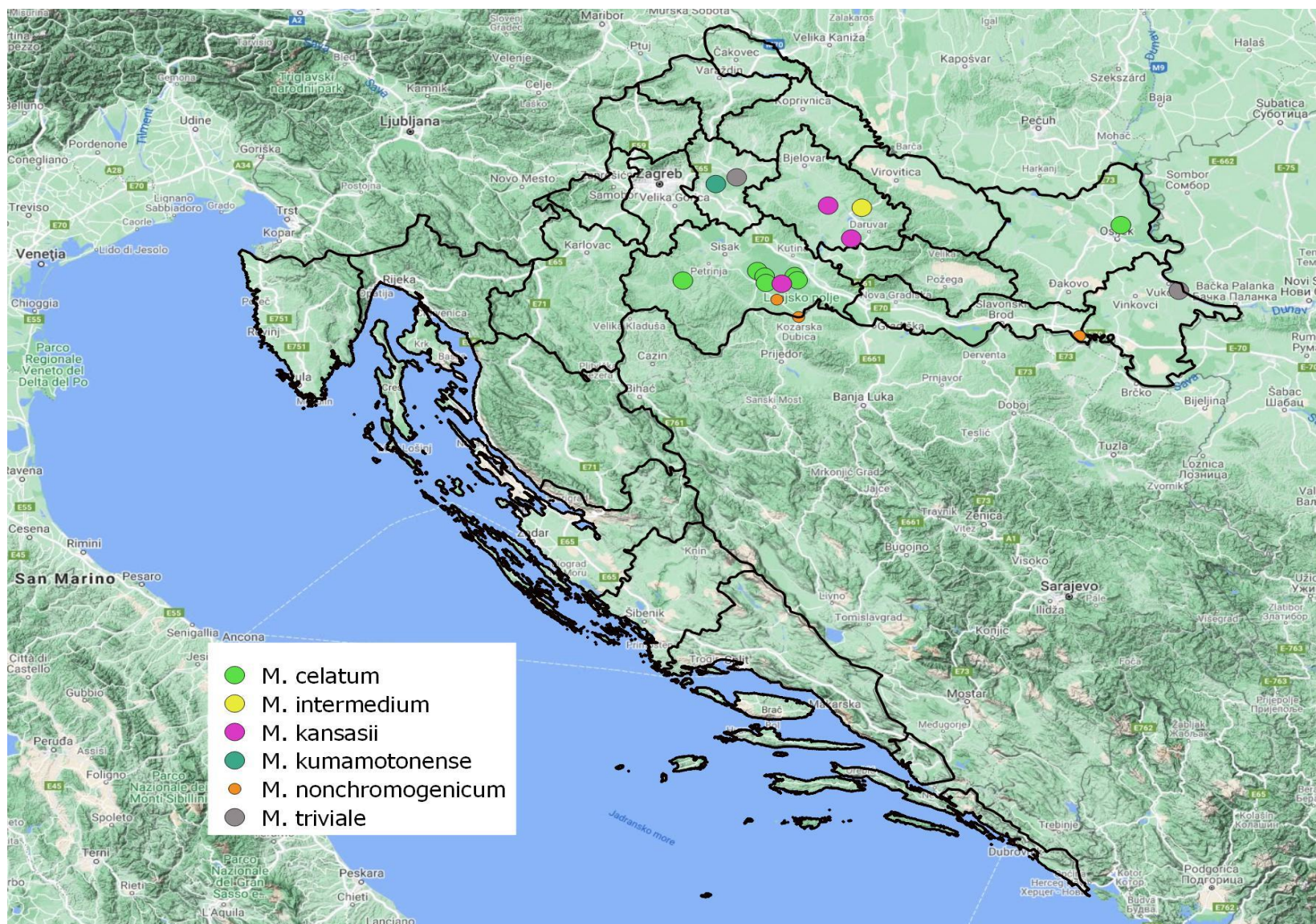
Slika 19. Geografski prikaz sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP)



Slika 20. Geografski prikaz sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na doksiciklin (DOX)



Slika 21. Geografski prikaz sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na linezolid (LZD)



Slika 22. Geografski prikaz sojeva spororastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na trimetoprim – sulfametoksazol (SXT)

5.2.6.2 Rezultati određivanja antimikrobne osjetljivosti brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti pripadnika brzorastućih NTM-a proveli smo u ukupno 91 izolata. Uspješno smo očitali rezultate kod ukupno 87 ispitanih izolata, dok kod četiri izolata podrijetlom iz divljih životinja (2 divlje svinje – redni broj (r.b.) 21. – *M. vaccae*, 25. – *M. agri*; 2 srne – r.b. 68., 69. – *M. neoaurum*) niti nakon ponovljenog ispitivanja nije bilo vidljivog porasta kolonija unutar mikrotitracijske pločice na temelju kojeg određujemo antimikrobnu osjetljivost (Slika 23.). Od ukupno 87 uspješno ispitanih izolata, 15 izolata podrijetlom je iz domaćih (12 goveda, 1 svinja, 1 ovca, 1 kokoš), a 72 izolata iz divljih životinja (32 divlje svinje, 40 srna). Ispitivanje smo proveli na ukupno 11 različitih vrsta pripadnika brzorastućih NTM-a, i to *M. agri* (1 izolati iz divlje svinje), *M. arupense* (2 izolata iz divljih svinja), *M. chitae* (4 izolata iz goveda), *M. elephantis* (1 izolati iz goveda), *M. fortuitum* (27 izolata – 5 goveda, 1 svinja, 6 divljih svinja, 15 srna), *M. neoaurum* (25 izolata – 1 kokoš, 3 divlje svinje, 21 srne), *M. peregrinum* (1 izolat iz srne), *M. phocaicum* (7 izolata iz divljih svinja), *M. porcinum* (2 izolata iz divljih svinja), *M. pulveris* (1 izolat iz divlje svinje), *M. vaccae* (14 izolata – 2 goveda, 11 divljih svinja, 1 srna), te "Najsličnije *M. chitae* (2 izolata iz srna), *M. neoaurum* (2 izolata – 1 ovca, 1 srna), *M. septicum* (1 izolat iz srne), *M. vaccae* (1 izolat iz divlje svinje)".

Rezultate za sve ispitane antibiotike očitali smo 5. dana inkubacije uz nekoliko iznimaka; za imipenem (IMI) kod vrsta *M. fortuitum*, *M. phocaicum*, *M. peregrinum*, *M. porcinum* i *M. septicum* ako je vrijednost MIC-a 5. dana inkubacije iznosila $> 8\mu\text{g/ml}$, testiranje smo ponovili uz inkubaciju ne dulju od tri dana, te u slučaju da je vrijednost MIC-a ponovljenog testa opet iznosila $> 8\mu\text{g/ml}$ navedene vrijednost nismo prijavili zbog nestabilnosti antibiotika. Druga iznimka je klaritromicin (CLA), kod kojeg smo rezultate očitavali 5. i 14. dana inkubacije, osim kod vrsta *M. phocaicum* i *M. peregrinum* kod kojih smo rezultate zabilježili 5. dana inkubacije. Nadalje, za sve testirane izolate prilikom ispitivanja osjetljivosti na tigeciklin (TGC) zabilježili smo samo vrijednosti MIC-a bez tumačenja rezultata, i to iz razloga što do sada u literaturi nije opisana povezanost između *in vitro* rezultata i kliničkog odgovora, pa time nisu određene niti krajnje točke koje razdvajaju osjetljive od otpornih izolata. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 27.

Prilikom ispitivanja izolata vrste *M. agri* izdvojenog iz divlje svinje (r.b. 25.), ispitivanje antimikrobne osjetljivosti je bilo bezuspješno iz razloga što niti nakon ponovljenog

ispitivanja nije bilo vidljivog porasta kolonija unutar mikrotitracijske pločice na temelju kojeg određujemo antimikrobnu osjetljivost.

Ispitana dva izolata vrste *M. arupense* oba izdvojena iz divljih svinja (r.b. 52. i 53.), pokazala su osjetljivost na pripadnike aminoglikozidnih antibiotika amikacin (AMI) i tobramicin (TOB), pripadnike flourokinolona ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), pripadnike tetraciklina doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN), te na klaritromicin (CLA), linezolid (LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT). Unutar skupine cefalosporina, oba izolata također su bila osjetljiva na cefoksitin (FOX), umjereno osjetljiva na cefriakson (AXO), dok je na cefepim (FEP) izolat r.b. 52. bio umjereno osjetljiv, a izolat r.b. 53. osjetljiv. Oba izolata pokazala su umjerenu osjetljivost na imipenem (IMI), a izolat r.b. 52. umjerenu osjetljivost i na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG), dok je izolat r.b. 53. bio osjetljiv.

Ukupno četiri izolata vrste *M. chitae* izdvojenih iz goveda (r.b. 5., 6., 7., 10.) pokazala su osjetljivost na pripadnike aminoglikozidnih antibiotika amikacin (AMI) i tobramicin (TOB), pripadnike flourokinolona ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), pripadnike tetraciklina doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN), pripadnike cefalosporina cefepim (FEP), cefoksitin (FOX) i cefriaksin (AXO), te na linezolid (LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT). Dva izolata bila su osjetljiva (r.b. 5. i 7.), a dva otporna (r.b. 6. i 10.) na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG). Prilikom ispitivanja klaritromicina (CLA) svaki je izolat pokazao drugačiji rezultat, pa je tako jedan izolat bio osjetljiv (r.b. 7) na klaritromicin, jedan umjereno osjetljiv (r.b. 6.), jedan je bio otporan (r.b. 5.) već 5. dana inkubacije, a jedan je 5. dana pokazao umjerenu osjetljivost dok se 14. dana inkubacije pokazao otpornim (r.b. 10.) što ukazuje na inducibilnu otpornost na makrolide uzrokovanu prisutnošću *erm* gena.

Dva izolata "Najsličnija *M. chitae*" izdvojena iz srna (r.b. 67. i 70.) pokazala su osjetljivost na sve ispitane antibiotike, osim na cefepim (FEP) gdje je jedan izolat bio osjetljiv (r.b. 70.), a drugi otporan (r.b. 67.).

Izolat vrste *M. elephantis* izdvojen iz goveda (r.b. 12.) pokazao se osjetljivim na pripadnike flourokinolona ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), pripadnike tetraciklina doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN), pripadnike cefalosporina cefepim (FEP), cefoksitin (FOX) i cefriaksin (AXO), te na klaritromicin (CLA), linezolid (LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT). Unutar skupine aminoglikozidnih antibiotika, izolat je pokazao osjetljivost na amikacin (AMI), a umjerenu osjetljivost na tobramicin (TOB). Umjerenu osjetljivost također je pokazao na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG), a otpornost na imipenem (IMI).

Svih 27 izolata vrste *M. fortuitum* od kojih je šest izdvojeno iz domaćih (5 goveda – r.b. 1., 3., 8., 9., 11.; 1 svinja – r.b. 14), a 21 iz divljih životinja (6 divljih svinja – r.b. 30., 42., 43., 45., 49., 57; 15 srna – r.b. 66., 71., 73., 80., 82., 83., 85., 95., 98. – 102., 104., 106.) pokazali su osjetljivost na trimetoprim/sulfametoksazol (SXT). Također na pripadnika aminoglikozidnih antibiotika amikacin (AMI) svi izolati bili su osjetljivi, dok je na tobramicina (TOB) ukupno 20 izolata bilo je osjetljivo; četiri izolata iz domaćih (4 goveda – r.b. 1., 8., 9., 11.) i 16 iz divljih životinja (4 divlje svinje – r.b. 43., 45., 49., 57.; 12 srna – r.b. 66., 71., 73., 80., 82., 83., 85., 95., 98. – 100., 104.), jedan izolat bio je umjereno osjetljiv (1 govedo – r.b. 3.) i šest izolata bila su otporna; jedan izolat iz domaćih (1 svinja – r.b. 14.) i pet iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 30., 42.; 3 srne – r.b. 101., 102., 106.). Prilikom ispitivanja pripadnika fluorokinolona, na moksifloksacin (MXF) svi izolati su bili osjetljivi, a na ciprofloksacin (CIP) su izolati podrijetlom iz divljih životinja bili osjetljivi, dok su tri izolata podrijetlom iz domaćih životinja bila umjereno osjetljiva (2 goveda – r.b. 1., 3.; 1 svinja – r.b. 14.), te ostala tri osjetljiva (3 goveda – r.b. 8., 9., 11.). Dobivene rezultate za pripadnike cefalosporina smo u nastavku opisali za svaki antibiotik zasebno, pa su tako na cefepim (FEP) osjetljiva bila samo dva izolata; jedan iz domaćih (1 govedo – r.b. 11.) a jedan iz divljih životinja (1 srna – r.b. 73.), umjereno osjetljiva četiri izolata iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 57., 42.; 2 srne – r.b. 83., 106.), a ukupno 21 izolat je pokazao otpornost; pet izolata iz domaćih (4 goveda – r.b. 1., 3., 8., 9.; 1 svinja – r.b. 14.) i 16 izolata iz divljih životinja (4 divlje svinje – r.b. 30., 43., 45., 49.; 12 srna – r.b. 66., 71., 80., 82., 85., 95., 98. – 102., 104.). Prilikom ispitivanja cefoksitina (FOX) gotovo svi izolati podrijetlom iz divljih životinja pokazali su osjetljivost, osim tri izolata podrijetlom iz divlje svinje (r.b. 43.) i srna (r.b. 99. i 106.) koji su pokazali umjerenu osjetljivost. Od pretraženih izolata podrijetlom iz domaćih životinja, jedan izolat je bio osjetljiv (1 govedo – r.b. 11.), četiri izolata bila su umjereno osjetljiva (3 goveda – r.b. 1., 3., 8.; 1 svinja – r.b. 14.), a jedan izolat bio je otporan na navedeni antibiotik (1 govedo – r.b. 9). Na cefriakson (AXO), ukupno 22 izolata su bila otporna; četiri izolata iz domaćih (3 goveda – r.b. 1., 8., 9.; 1 svinja – r.b. 14.) i 18 izolata iz divljih životinja (5 divljih svinja – r.b. 30., 42., 43., 45., 49.; 13 srna – r.b. 66., 80., 82., 83., 85., 95., 98. – 102., 104., 106.); dok su umjereno osjetljiva bila dva izolata iz divljih životinja (1 divlja svinja – r.b. 57.; 1 srna – r.b. 71.), a osjetljiva ukupno tri izolata; dva iz domaćih (2 goveda – r.b. 3., 11.) i jedan iz divljih životinja (1 srna – r.b. 73.). Nadalje, na pripadnika skupine tetraciklina, doksiciklin (DOX) osjetljivo je bilo ukupno devet izolata; tri izolata iz domaćih (3 goveda – r.b. 8., 9., 11.) i šest iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 43., 57.; 4 srne – r.b. 66., 71., 73., 82.), umjereno osjetljivo ukupno 13 izolata; dva iz domaćih (2 goveda

– r.b. 1., 3.) i 11 iz divljih životinja (3 divlje svinje – r.b. 30., 45., 49.; 8 srna – r.b. 80., 83., 85., 95., 98., 101., 102., 104.), a otporno je bilo ukupno pet izolata; jedan iz domaćih (1 svinja – r.b. 14.) i četiri iz divljih životinja (1 divlja svinja – r.b. 42.; 3 srne – r.b. 99., 100., 106.). Na minociklin (MIN), također pripadnika tetraciklina, ukupno 13 izolata bilo je osjetljivo; tri izolata iz domaćih (3 goveda – r.b. 8., 9., 11.) i 10 iz divljih životinja (3 divlje svinje – r.b. 49., 57., 43.; 7 srna – r.b. 66., 71., 82., 83., 95., 101., 104.), 11 izolata umjereno osjetljivo; dva izolata iz domaćih (2 goveda – r.b. 1., 3.) i devet iz divljih životinja (3 divlje svinje – r.b. 30., 42., 45.; 6 srna – r.b. 73., 80., 85., 98., 100., 102.), a tri izolata otporno; jedan izolat iz domaćih (1 svinja – r.b. 14.) i dva iz divljih životinja (2 srne – r.b. 99., 106.). Nadalje, na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG) ukupno tri izolata su bila osjetljiva; jedan iz domaćih (1 govedo – r.b. 11.) i dva iz divljih životinja (1 divlja svinja – r.b. 42., 1 srna – r.b. 71.), ukupno 6 izolata umjereno osjetljiva; dva iz domaćih (2 goveda – r.b. 1., 8.) i četiri iz divljih životinja (1 divlja svinja – r.b. 43., 3 srne – r.b. 73., 85., 95.), a njih ukupno 18 je bilo otporno; tri iz domaćih (2 goveda – r.b. 3., 9.; 1 svinja – r.b. 14.) i 15 iz divljih životinja (4 divlje svinje – r.b. 30., 45., 49., 57.; 11 srna – r.b. 66., 80., 82., 83., 98. – 102., 104., 106.). Prilikom ispitivanja klaritromicina (CLA) osjetljivo je bilo ukupno 15 izolata; tri izolata iz domaćih (3 goveda – r.b. 1., 3., 11.) i 12 iz divljih životinja (1 divlja svinja – r.b. 45.; 11 srna – r.b. 66., 71., 73., 80., 82., 83., 85., 98., 100., 101., 104.), umjereno osjetljivo dva izolata iz divljih životinja (1 divlja svinja – r.b. 57.; 1 srna – r.b. 95.), dok je već 5. dana inkubacije otporno bilo ukupno pet izolata; dva izolata iz domaćih (2 goveda – r.b. 8., 9.) i tri iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 30., 43.; 1 srna – r.b. 106.). Umjerenu osjetljivost 5. dana inkubacije pokazalo je ukupno četiri izolata, i to jedan izolat iz domaćih (1 svinja – r.b. 14.) i tri izolata iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 42., 49.; 1 srna – r.b. 99.), dok su 14. dana bili otporni. Također, jedan izolat iz srne 5. dana inkubacije pokazao je osjetljivost, a 14. dana otpornost na navedeni antibiotik (r.b. 102.). Nadalje, prilikom očitavanja osjetljivosti na imipenem (IMI) kod šest izolata vrste *M. fortuitum* (2 goveda – r.b. 1., 3.; 1 svinje – r.b. 14.; 3 srne – r.b. 82., 99., 106.) vrijednost MIC-a je 5. dana inkubacije iznosila $> 8\mu\text{g/ml}$, te smo ispitivanje ponovili uz inkubaciju ne dulju od tri dana. Vrijednosti MIC-a ponovljenog testa opet su iznosile $> 8\mu\text{g/ml}$, te navedene vrijednosti nismo prijavili zbog nestabilnosti antibiotika. Od ostalih ispitanih izolata ukupno 14 ih je bilo osjetljivo; dva izolata iz domaćih (2 goveda – r.b. 9., 11.) i 12 izolata iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 42., 45.; 10 srna – r.b. 66., 73., 80., 83., 85., 95., 98., 100., 102., 104.), a sedam umjereno osjetljivo na imipenem; jedan izolat iz domaćih (1 govedo – r.b. 8.) i šest iz divljih životinja (4 divlje svinje – r.b. 30., 43., 49., 57.; 2 srne – r.b. 71., 101.). Konačno, svi izolati pokazali su se

osjetljivima na linezolid (LZD), osim jednoga podrijetlom iz svinje koji je pokazao umjerenu osjetljivost (r.b. 14.).

Prilikom ispitivanja ukupno 25 izolata pripadnika vrste *M. neoaurum* od kojih je jedan izolat izdvojen iz domaćih (1 kokoš – r.b. 18.), a 24 iz divljih životinja (3 divlje svinje – r.b. 22., 41., 55.; 21 srne – r.b. 60. – 65., 68., 69., 72., 74., 75., 77., 79., 81., 84., 86., 87., 89., 91., 92., 97.), kod dva izolata (2 srne – r.b. 68., 69.) ispitivanje antimikrobne osjetljivosti je bilo bezuspješno iz razloga što niti nakon ponovljenog ispitivanja nije bilo vidljivog porasta kolonija unutar mikrotitracijske pločice na temelju kojeg određujemo antimikrobnu osjetljivost. Ostala 23 izolata pokazala su osjetljivost na pripadnike fluorokinolona ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), te pripadnike tetraciklina doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN). Svi izolati također su bili osjetljivi na amikacin (AMI), antibiotik skupine aminoglikozida, dok su na tobramicin (TOB) gotovo svi bili osjetljivi osim dva izolata od kojih je jedan bio umjereno osjetljiv (1 srna – r.b. 97.), a jedan otporan (1 srna – r.b. 79.). Prilikom ispitivanja pripadnika cefalosporina, na cefoksitin (FOX) su također gotovo svi izolati bili osjetljivi osim dva izolata koji su bili otporni (2 srne – r.b. 92., 97.). Na cefepim (FEP), također cefalosporin, samo tri izolata su bila osjetljiva i to svi iz divljih životinja (3 srne – r.b. 72., 87., 92.), pet izolata je bilo umjereno osjetljivo; jedan izolat iz domaćih (1 kokoš – r.b. 18.) i četiri iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 22., 41.; 2 srne – r.b. 77., 84.), dok je odstalih 15 izolata sve iz divljih životinja bilo otporno (1 divlja svinja – r.b. 55.; 14 srna – r.b. 60. – 65., 74., 75., 79., 81., 86., 89., 91., 97.). Konačno, na pripadnika cefalosporina cefriakson (AXO), ukupno pet izolata sve ih divljih životinja bilo je osjetljivo (5 srna – r.b. 60., 72., 84., 87., 89.), 12 izolata bilo je umjereno osjetljivo; jedan iz domaćih (1 kokoš – r.b. 18.) i 11 iz divljih životinja (1 divlja svinja – r.b. 41.; 10 srna – r.b. 62., 64., 74., 75., 77., 79., 81., 86., 91., 92.), a šest izolata sve iz divljih životinja bilo je otporno (2 divlje svinje – r.b. 22., 55.; 4 srne – r.b. 61., 63., 65., 97.). Nadalje, gotovo svi izolati također su pokazali osjetljivosti na amoksisicilin/klavulonsku kiselinu (AUG), klaritromicin (CLA), linezolid (LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), osim jednog izolata iz divljih životinja koji je pokazao otpornost na sve navedene antibiotike (1 srna – r.b. 92.). Na imipenem (IMI) ukupno 19 izolata je bilo osjetljivo; jedan izolat iz domaćih (1 kokoš – r.b. 18.) i 18 iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 55., 41.; 16 srna – r.b. 60., 61., 64., 65., 72., 74., 75., 77., 79., 81., 84., 87., 89., 91., 92., 97.), dok je četiri izolata iz divljih životinja bilo umjereno osjetljivo (1 divlja svinja – r.b. 22.; 3 srne – r.b. 62., 63., 86.).

Dva izolata "Najsličnija *M. neoaurum*" izdvojena iz ovce (r.b. 15.) i srne (r.b. 88.) pokazala su se osjetljivima na pripadnike aminoglikozidnih antibiotika amikacin (AMI) i

tobramicin (TOB), pripadnike flourokinolona ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), pripadnike tetraciklina doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN), te na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG), klaritromicin (CLA), imipenem (IMI), linezolid (LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT). Unutar skupine cefalosporina, izolati su bili osjetljivi na cefoksitin (FOX), umjereno osjetljivi na cefriakson (AXO) i otporni na cefepim (FEP).

Izolat vrste *M. peregrinum* izdvojen iz srne (r.b. 93.) pokazao se osjetljivim na pripadnike flourokinolona ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), te na linezolid (LZD), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), kao i na klaritromicin (CLA) kod kojeg smo rezultate očitali 5. dana inkubacije iz razloga što je za navedenu vrstu dokazano da ima nefunkcionalni ili odsutni erm gen i stoga se očekuje da je osjetljiva na klaritromicin, te smo zabilježili samo tumačenje rezultata, bez MIC-vrijednosti. Na pripadnike aminoglikozidnih antibiotika amikacin (AMI) testirani izolat bio je osjetljiv, dok je na tobramicin (TOB) bio otporan. Unutar skupine cefalosporina, izolat je bio osjetljiv na cefoksitin (FOX), a otporan na cefriakson (AXO) i cefepim (FEP). Na pripadnike skupine tetraciklina doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN) navedeni izolat je bio umjereno osjetljiv. Nadalje, na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG) bio je otporan. Nadalje, prilikom očitavanja osjetljivosti na imipenem (IMI) vrijednost MIC-a je 5. dana inkubacije iznosila $> 8\mu\text{g/ml}$, te smo ispitivanje ponovili uz inkubaciju ne dulju od tri dana. Vrijednost MIC-a ponovljenog testa opet je iznosila $> 8\mu\text{g/ml}$, te navedenu vrijednost nismo prijavili zbog nestabilnosti antibiotika.

Ukupno sedam izolata vrste *M. phocaicum* sve izdvojeno iz divljih svinja (r.b. 19., 20., 34., 35., 44., 47., 56.), bili su osjetljivi na pripadnike flourokinolona ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), te na linezolid (LZD), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), kao i na klaritromicin (CLA) kod kojeg smo rezultate očitali 5. dana inkubacije i to bez MIC vrijednosti, samo tumačenje rezultata kao što je opisano za prethodnu vrstu. Na pripadnike aminoglikozidnih antibiotika amikacin (AMI) testirani izolati bili su osjetljivi, dok je na tobramicin (TOB) jedan izolat bio otporan (r.b. 44.), a drugi osjetljivi. Unutar skupine cefalosporina, izolati su bili osjetljivi na cefoksitin (FOX), dok je na cefepim (FEP) i cefriakson (AXO) pet izolata bilo osjetljivo (FEP – r.b. 19., 35., 44., 47., 56.; AXO – r.b. 20., 35., 44., 47., 56.), jedan izolat umjereno osjetljiv (FEP – r.b. 20; AXO – r.b. 19.), a jedan otporan (FEP i AXO – r.b. 34.). Na pripadnike skupine tetraciklina doksiciklin (DOX) gotovo svi izolati su bili osjetljivi, osim jednog koji je bio umjereno osjetljiv (r.b. 44.), dok su na minociklin (MIN) četiri izolata bila osjetljiva (r.b. 34., 35., 47., 56.), a tri umjereno osjetljiva (r.b. 19., 20., 44.). Nadalje, na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG) tri izolata bila su

osjetljiva (r.b. 35., 44., 56.), dva umjereno osjetljiva (r.b. 20., 47.), a dva otporna (r.b. 19., 34.). Prilikom očitavanja osjetljivosti na imipenem (IMI) kod četiri izolata vrste *M. phocaicum* (r.b. 19., 20., 47., 56.) vrijednost MIC-a je 5. dana inkubacije iznosila $> 8\mu\text{g/ml}$, te smo ispitivanje ponovili uz inkubaciju ne dulju od tri dana. Vrijednosti MIC-a ponovljenog testa opet su iznosile $> 8\mu\text{g/ml}$, te navedene vrijednosti nismo prijavili zbog nestabilnosti antibiotika. Ostala tri ispitana izolata bila su osjetljiva na imipenem.

Oba izolata vrste *M. porcinum* izdvojena iz divljih svinja (r.b. 40., 46.) bila su osjetljiva na pripadnike flourokinolona ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), te na linezolid (LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), dok su oba bila otporna na klaritromicin (CLA). Na pripadnike aminoglikozidnih antibiotika amikacin (AMI) testirani izolati bili su osjetljivi, dok su na tobramicin (TOB) bili otporni. Unutar skupine cefalosporina, izolati su bili osjetljivi na cefoksitin (FOX), dok su oba bila otporna na cefepim (FEP) i cefriakson (AXO). Na pripadnike skupine tetraciklina doksiciklin (DOX) oba izolata su bila otporna, dok je na minociklin (MIN) jedan izolat je bio otporan (r.b. – 40.), a drugi umjereno osjetljiv (r.b. – 46.). Nadalje, na amoksisilin/klavulonsku kiselinu (AUG) je također jedan izolat je bio otporan (r.b. – 40.) dok je drugi bio umjereno osjetljiv (r.b. – 46.), a na imipenem (IMI) je jedan bio umjereno osjetljiv (r.b. – 40.) dok je drugi bio osjetljiv (r.b. – 46.).

Izolat vrste *M. pulveris* izdvojen iz divlje svinje (r.b. 32.) bio je osjetljiv na sve ispitane antibiotike osim na cefriakson (AXO) na koji je bio umjereno osjetljiv.

Izolat "Najsličniji *M. septicum*" izdvojen iz srne (r.b. 94.) bio je umjereno osjetljiv na doksiciklin (DOX) i imipenem (IMI) dok je na ostale ispitane antibiotike bio osjetljiv.

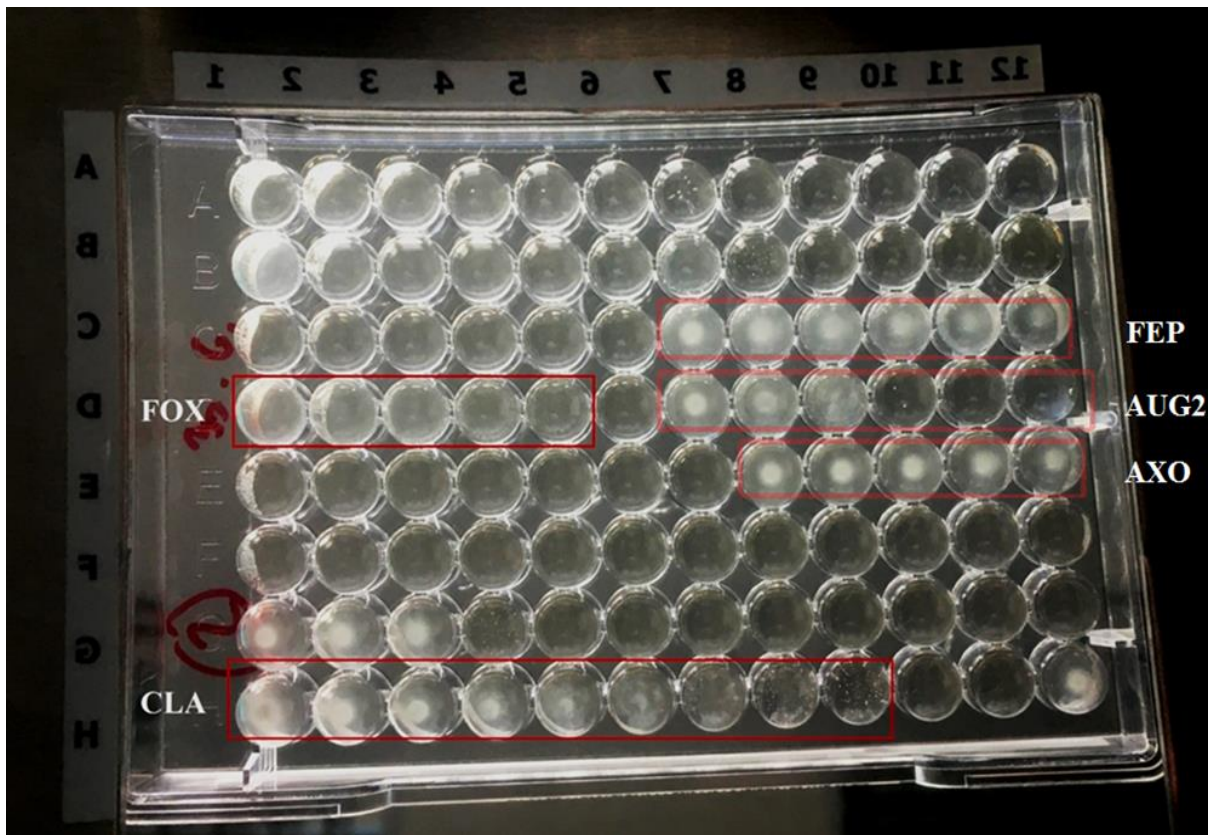
Od ukupno ispitanih 14 izolata pripadnika vrste *M. vaccae* od kojih su dva izolata izdvojena iz domaćih (2 goveda - r.b. 2., 4.) i 12 iz divljih životinja (11 divljih svinja – r.b. 21., 23., 24., 27. – 29., 37. – 39., 50., 58.; 1 srna – r.b. 96.), ispitivanje antimikrobne osjetljivosti je bilo bezuspješno kod jednog izolata (1 divlja svinja – r.b. 21.) iz razloga što niti nakon ponovljenog ispitivanja nije bilo vidljivog porasta kolonija unutar mikrotitracijske pločice. Ostalih 13 izolata bilo je osjetljivo na pripadnike fluorokinolona moksifloksacin (MXF), dok je na ciprofloksacin (CIP) jedan izolat bio otporan (1 divlja svinja – r.b. 38.), a ostali osjetljivi. Svi izolati također su bili osjetljivi na trimetoprim/sulfametoksazol (SXT). Nadalje, na pripadnike aminoglikozida amikacin (AMI) jedan je izolat bio umjereno osjetljiv (1 srna – r.b. 96.), a drugi osjetljivi, dok su na tobramicin (TOB) tri bila umjereno osjetljiva (r.b. 27., 39., 50.) i jedan otporan (r.b. 58.). Na pripadnike skupine tetraciklina doksiciklin (DOX) dva izolata iz divljih svinja su bila otporna (r.b. 39., 58.), jedan umjereno osjetljiv (r.b.

50.) i ostali osjetljivi, dok su na minociklin (MIN) dva bila otporna (2 divlje svinje – r.b. 58., 39.) i ostali osjetljivi. Unutar skupine cefalosporina, gotovo svi izolati bili su osjetljivi na cefoksitin (FOX) osim dva izolata koja su bila umjereno osjetljiva (1 divlja svinja – r.b. 58.; 1 srna – r.b. 96.). Prilikom ispitivanja cefepima (FEP), pripadnika cefalosporina, ukupno šest izolata pokazalo je osjetljivost i to sve iz divljih životinja (6 divljih svinja – r.b. 23., 24., 27. – 29., 38.), jedan izolat umjerenu osjetljivost (1 divlja svinja – r.b. 39.), dok je šest izolata pokazalo otpornost; dva izolata iz domaćih (2 goveda – r.b. 2., 4.) i četiri iz divljih životinja (3 divlje svinje – r.b. 37., 50., 58.; 1 srna – r.b. 96.). Konačno na pripadnika cefalosporina cefriakson (AXO), dva izolata su bila osjetljiva (2 divlje svinje – r.b. 29., 38.), tri umjereno osjetljiva; jedan izolat iz domaćih (1 govedo – r.b. 4.) i dva iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 24., 37.), dok ih je osam bilo otporno; jedan izolat iz domaćih (1 govedo – r.b. 2.) i sedam iz divljih životinja (6 divljih svinja – r.b. 23., 27., 28., 39., 50., 58.; 1 srna – r.b. 96.). Nadalje, na linezolid (LZD) gotovo svi izolati su bili osjetljivi, osim jednog koji je bio umjereno osjetljiv (1 divlja svinja – r.b. 58.). Na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG) devet izolata je bilo osjetljivo; jedan izolat iz domaćih (1 govedo – r.b. 4.) i osam iz divljih životinja (7 divljih svinja – r.b. 23., 24., 27. – 29., 37., 50.; 1 srna – r.b. 96.), tri umjereno osjetljivo; jedan izolat iz domaćih (1 govedo – r.b. 2.) i dva iz divljih životinja (2 divlje svinje – r.b. 38., 39.), a jedan izolat bio je otporan (1 divlja svinja – r.b. 58.).

Ukupno devet izolata bilo je osjetljivo na klaritromicin (CLA); dva izolata iz domaćih (2 goveda – r.b. 2., 4.) i sedam iz divljih životinja (6 divljih svinja – r.b. 23., 24., 29., 37., 38., 50., ; 1 srna – r.b. 96.), tri izolata bila su otporna (3 divlje svinje – r.b. 26. – 28.) od kojih jedan već 5. dana inkubacije (r.b. 28.), dok su dva izolata 5. dana inkubacije bila osjetljiva, a 14. dana otporna (2 divlje svinje – r.b. 39., 58.). Konačno, na imipenem (IMI) je ukupno pet izolata bilo osjetljivo; jedan izolat iz domaćih (1 govedo – r.b. 4.) i četiri iz divljih životinja (3 divlje svinje – r.b. 37., 39., 50.; 1 srna – r.b. 96.), sedam umjereno osjetljivo; jedan iz domaćih (1 govedo – r.b. 2.) i šest iz divljih životinja (6 divljih svinja – r.b. 23., 24., 27. – 29., 38.) i jedan izolat je bio otporan (1 divlja svinja – r.b. 58.)

Jedan izolat vrste "Najsličnije *M. vaccae*" izdvojen iz divlje svinje (r.b. 26.) bio je osjetljiv na pripadnike fluorokinolona moksifloksacin (MXF) i ciprofloksacin (CIP), pripadnike tetraciklina doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN), te na linezolid (LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT). Na pripadnike aminoglikozida amikacin (AMI) navedeni izolat bio je osjetljiv, dok je na tobramicin (TOB) bio otporan. Unutar skupine cefalosporina, izolat je bio umjereno osjetljiv na cefoksitin (FOX) i otporan na cefepim (FEP) i cefriakson

(AXO). Na amoksisicilin/klavulonsku kiselinu (AUG), klaritromicin (CLA) i imipenem (IMI) testirani izolat bio je otporan.



Slika 23. Prikaz mikrotitracijske pločice 5. dana inkubacije prilikom očitavanja rezultata ispitivanja antimikrobne osjetljivosti pripadnika brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija. Izolat pripada vrsti *M. fortuitum*, a izdvojen je iz goveda pod rednim brojem 9. Na slici su označeni antibiotici za koje je dokazana otpornost: FEP – cefepim, FOX – cefoksitin, AXO – cefriakson, AUG2 – amoksisicilin/klavulonska kiselina, CLA – klaritromicin

Tablica 27. Rezultati određivanja antimikrobne osjetljivosti izolata brzorastućih NTM-a (**MIC** (engl. minimal inhibitory concentration) – najniža koncentracija koja prekida rast; **S** (engl. susceptible) – osjetljiv, **I** (engl. intermediate) – umjereno osjetljiv, **R** (engl. resistant) – otporan)

Vrsta životinje/ redni broj izolata	Vrsta izolata	MIC (tumačenje rezultata)														
		AMI	AUG2	FEP	FOX	AXO	CIP	CLA (5.dan/ 14.dan)	DOX	IMI	LZD	MIN	MXF	TGC	TOB	SXT
divlja svinja/ 25.	<i>M. agri</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
divlja svinja/ 52.	<i>M. arupense</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	16 (I)	≤ 4 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	8 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 53.	<i>M. arupense</i>	≤ 1 (S)	8/4 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	≤ 0,12 (S)	16 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
govedo/ 7.	<i>M. chitae</i>	≤ 1 (S)	8/4 (S)	4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ 0,5 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
govedo/ 5.	<i>M. chitae</i>	4 (S)	4/2 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	> 16 (5.dan) (R)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
govedo/ 6.	<i>M. chitae</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	4 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	4/4 (I/I)	≤ 0,12 (S)	16 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
govedo/ 10.	<i>M. chitae</i>	≤ 1 (S)	64/32 (R)	4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	4/16 (I/R)	≤ 0,12 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)

srna/ 70.	"Najsličnije <i>M. chitae</i> "	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	4 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,25 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 67.	"Najsličnije <i>M. chitae</i> "	≤ 1 (S)	4/2 (S)	32 (R)	≤ 4 (S)	8 (S)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	≤ 0,12 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
govedo/ 12.	<i>M. elephantis</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	0,25 (S)	1/1 (S/S)	0,25 (S)	> 64 (R)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	4 (I)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
govedo/ 1.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	> 32 (R)	32 (I)	> 64 (R)	2 (I)	0,25/1 (S/S)	4 (I)	/	8 (S)	2 (I)	1 (S)	2	≤ 1 (S)	2/38 (S)
govedo/ 3.	<i>M. fortuitum</i>	8 (S)	64/32 (R)	32 (R)	32 (I)	8 (S)	2 (I)	≤ 0,06/ 0,25 (S/S)	4 (I)	/	4 (S)	4 (I)	1 (S)	2	4 (I)	1/19 (S)
govedo/ 8.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	> 32 (R)	64 (I)	> 64 (R)	0,25 (S)	> 16 (5.dan) (R)	≤ 0,12 (S)	8 (I)	2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
govedo/ 9.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	128 (R)	> 64 (R)	0,25 (S)	> 16 (5.dan) (R)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
govedo/ 11.	<i>M. fortuitum</i>	2 (S)	8/4 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	8 (S)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	0,5 (S)	≤ 2 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
svinja/ 14.	<i>M. fortuitum</i>	2 (S)	64/32 (R)	> 32 (R)	64 (I)	> 64 (R)	2 (I)	4/16 (I/R)	> 16 (R)	/	16 (I)	> 8 (R)	1 (S)	2	> 16 (R)	2/38 (S)
divlja svinja/ 49.	<i>M. fortuitum</i>	2 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	≤ 4 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	4/8 (I/R)	2 (I)	8 (I)	2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	2 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)

divlja svinja/ 57.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	16 (I)	8 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	4/4 (I/I)	0,5 (S)	8 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 42.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	8/4 (S)	16 (I)	16 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	4/>16 (I/R)	8 (R)	4 (S)	4 (S)	4 (I)	≤ 0,25 (S)	0,1	8 (R)	0,5/9,5 (S)
divlja svinja/ 30.	<i>M. fortuitum</i>	2 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	16 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	8/8 (R/R)	4 (I)	8 (I)	2 (S)	2 (I)	≤ 0,25 (S)	0,3	8 (R)	0,5/9,5 (S)
divlja svinja/ 43.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	> 32 (R)	64 (I)	> 64 (R)	0,5 (S)	> 16 (5.dan) (R)	0,5 (S)	8 (I)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 45.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	≤ 4 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/1 (S/S)	2 (I)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	2 (I)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 66.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	≤ 4 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,5/ 0,5 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	2 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 71.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	8/4 (S)	32 (R)	≤ 4 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,5 (S/S)	≤ 0,12 (S)	8 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 73.	<i>M. fortuitum</i>	2 (S)	16/8 (I)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	2 (I)	≤ 0,25 (S)	0,1	2 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 80.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	32 (R)	≤ 4 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	4 (I)	≤ 2 (S)	2 (S)	2 (I)	≤ 0,25 (S)	0,1	2 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)

srna/ 82.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	8 (S)	> 64 (R)	0,5 (S)	≤ 0,06/ 2 (S/S)	0,25 (S)	/	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5	2 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 83.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	16 (I)	≤ 4 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	2 (I)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0	2 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 85.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	> 32 (R)	4 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,5/ 0,5 (S/S)	4 (I)	≤ 2 (S)	2 (S)	4 (I)	≤ 0,25 (S)	0,1	2 (S)	1/19 (S)
srna/ 95.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	> 32 (R)	≤ 4 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	4/4 (I/I)	2 (I)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 98.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	64/32 (R)	> 32 (R)	8 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	4 (I)	≤ 2 (S)	4 (S)	2 (I)	≤ 0,25 (S)	0,1	2 (S)	0,5/9,5 (S)
srna/ 99.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	32 (I)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	4/ > 16 (I/R)	16 (R)	/	4 (S)	8 (R)	≤ 0,25 (S)	0,5	≤ 1 (S)	0,5/9,5 (S)
srna/ 100.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	8 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	8 (R)	4 (S)	2 (S)	4 (I)	≤ 0,25 (S)	0,1	2 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 101.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	>64/32 (R)	> 32 (R)	16 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ 0,25 (S/S)	4 (I)	8 (I)	2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	16 (R)	0,5/9,5 (S)
srna/ 102.	<i>M. fortuitum</i>	2 (S)	64/32 (R)	> 32 (R)	16 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	2/8 (S/R)	4 (I)	4 (S)	≤ 1 (S)	2 (I)	≤ 0,25 (S)	0,3	> 16 (R)	0,5/9,5 (S)

srna/ 104.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	8 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	4 (I)	4 (S)	2 (S)	1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	2 (S)	0,5/9,5 (S)
srna/ 106.	<i>M. fortuitum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	16 (I)	32 (I)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	8/ > 16 (R/R)	16 (R)	/	8 (S)	8 (R)	≤ 0,25 (S)	0,1	16 (R)	0,5/9,5 (S)
ovca/ 15.	"Najsličnije <i>M. neoaurum</i> "	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	> 32 (R)	8 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	0,5/9,5 (S)
kokoš/ 18.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	16 (I)	8 (S)	16 (I)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 55.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	4/2 (S)	> 32 (R)	8 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,25 (S/S)	≤ 0,12 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 22.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	16 (I)	8 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,25 (S/S)	≤ 0,12 (S)	16 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	2 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 41.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	16 (I)	≤ 4 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 60.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	32 (R)	≤ 4 (S)	8 (S)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,25 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 61.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	4/2 (S)	> 32 (R)	8 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)

srna/ 62.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	4/2 (S)	> 32 (R)	8 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	8 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 63.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	4/2 (S)	32 (R)	8 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,25 (S/S)	≤ 0,12 (S)	16 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 64.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	4/2 (S)	> 32 (R)	8 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,25 (S/S)	≤ 0,12 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 65.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	8/4 (S)	> 32 (R)	8 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,25 (S/S)	≤ 0,12 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 68.	<i>M. neoaurum</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
srna/ 69.	<i>M. neoaurum</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
srna/ 72.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 74.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	32 (R)	≤ 4 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 75.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	> 32 (R)	8 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 77.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	16 (I)	8 (S)	16 (I)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)

srna/ 79.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	> 32 (R)	≤ 4 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,25 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	8 (R)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 81.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	> 32 (R)	8 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 84.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	16 (I)	≤ 4 (S)	8 (S)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 86.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	32 (R)	8 (S)	16 (I)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,25 (S/S)	≤ 0,12 (S)	8 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 87.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	≤ 1 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	0,5/9,5 (S)
srna/ 88.	"Najsličnije <i>M. neoaurum</i> "	≤ 1 (S)	4/2 (S)	> 32 (R)	≤ 4 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 89.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	4/2 (S)	32 (R)	8 (S)	8 (S)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 91.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	32 (R)	≤ 4 (S)	16 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 92.	<i>M. neoaurum</i>	≤ 1 (S)	64/32 (R)	4 (S)	>128 (R)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	16/16 (R/R)	1 (S)	≤ 2 (S)	> 32 (R)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5	≤ 1 (S)	8/152 (R)

srna/ 97.	<i>M. neoaerum</i>	8 (S)	≤ 2/1 (S)	> 32 (R)	128 (R)	> 64 (R)	0,5 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	0,25 (S)	≤ 2 (S)	2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0	4 (I)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 93.	<i>M. peregrinum</i>	≤ 1 (S)	>64/32 (R)	> 32 (R)	16 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	(5.dan) (S)	4 (I)	/	4 (S)	4 (I)	≤ 0,25 (S)	0,3	8 (R)	0,5/ 9,5 (S)
divlja svinja/ 47.	<i>M. phocaicum</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	4 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	(5.dan) (S)	0,25 (S)	/	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 56.	<i>M. phocaicum</i>	≤ 1 (S)	8/4 (S)	4 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	(5.dan) (S)	0,25 (S)	/	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,5	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 19.	<i>M. phocaicum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	8 (S)	≤ 4 (S)	16 (I)	≤ 0,12 (S)	(5.dan) (S)	≤ 0,12 (S)	/	2 (S)	2 (I)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	0,5/ 9,5 (S)
divlja svinja/ 20.	<i>M. phocaicum</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	16 (I)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	(5.dan) (S)	0,25 (S)	/	≤ 1 (S)	2 (I)	≤ 0,25 (S)	0,5	≤ 1 (S)	1/19 (S)
divlja svinja/ 34.	<i>M. phocaicum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	≤ 4 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	(5.dan) (S)	≤ 0,12 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	≤ 0,015	≤ 1 (S)	2/38 (S)
divlja svinja/ 35.	<i>M. phocaicum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	(5.dan) (S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 44.	<i>M. phocaicum</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	4 (S)	8 (S)	8 (S)	0,25 (S)	(5.dan) (S)	4 (I)	≤ 2 (S)	2 (S)	2 (I)	≤ 0,25 (S)	1	8 (R)	0,5/ 9,5 (S)

divlja svinja/ 40.	<i>M. porcinum</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	16 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	8/16 (R/R)	> 16 (R)	8 (I)	4 (S)	> 8 (R)	≤ 0,25 (S)	0,3	16 (R)	0,5/ 9,5 (S)
divlja svinja/ 46.	<i>M. porcinum</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	32 (R)	8 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	8/8 (R/R)	16 (R)	4 (S)	2 (S)	4 (I)	≤ 0,25 (S)	0,1	8 (R)	0,5/ 9,5 (S)
divlja svinja/ 32.	<i>M. pulveris</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	16 (I)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	0,25 (S)	≤ 2 (S)	2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
srna/ 94.	"Najsličnije <i>M. septicum</i> "	≤ 1 (S)	4/2 (S)	4 (S)	≤ 4 (S)	8 (S)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	2 (I)	8 (I)	2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
govedo/ 4.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	> 32 (R)	8 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	1/1 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	0,5/ 9,5 (S)
govedo/ 2.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	> 32 (R)	≤ 4 (S)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,25/ 0,25 (S/S)	0,5 (S)	16 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	2 (S)	0,5/ 9,5 (S)
divlja svinja/ 50.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	8/4 (S)	32 (R)	16 (S)	> 64 (R)	1 (S)	1/2 (S/S)	4 (I)	4 (S)	4 (S)	≤ 1 (S)	1 (S)	0,5	4 (I)	1/19 (S)
divlja svinja/ 58.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	32/16 (R)	> 32 (R)	32 (I)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	2/16 (S/R)	> 16 (R)	32 (R)	16 (I)	> 8 (R)	≤ 0,25 (S)	0,5	> 16 (R)	2/38 (S)
divlja svinja/ 21.	<i>M. vaccae</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

divlja svinja/ 23.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	4 (S)	≤ 4 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	8 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	≤ 1 (S)	2/38 (S)
divlja svinja/ 24.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	8 (S)	≤ 4 (S)	32 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	8 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	1/19 (S)
divlja svinja/ 26.	"Najsličnije <i>M. vaccae</i> "	≤ 1 (S)	>64/32 (R)	> 32 (R)	64 (I)	> 64 (R)	≤ 0,12 (S)	16/16 (R/R)	0,5 (S)	> 64 (R)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	8 (R)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 27.	<i>M. vaccae</i>	2 (S)	≤ 2/1 (S)	4 (S)	8 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	16/16 (R/R)	≤ 0,12 (S)	8 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	4 (I)	0,5/ 9,5 (S)
divlja svinja/ 28.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	4 (S)	8 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	> 16 (5.dan) (R)	≤ 0,12 (S)	8 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	2 (S)	2/38 (S)
divlja svinja/ 29.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	8/4 (S)	≤ 1 (S)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 0,12 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	0,25 (S)	16 (I)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	0,5 (S)	0,3	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 37.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	≤ 2/1 (S)	32 (R)	≤ 4 (S)	16 (I)	≤ 0,12 (S)	0,12/ 0,12 (S/S)	≤ 0,12 (S)	≤ 2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,1	≤ 1 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
divlja svinja/ 38.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	4 (S)	≤ 4 (S)	≤ 4 (S)	4 (R)	0,5/ 0,5 (S/S)	0,5 (S)	16 (I)	2 (S)	≤ 1 (S)	1 (S)	0,1	≤ 1 (S)	0,5/ 9,5 (S)
divlja svinja/ 39.	<i>M. vaccae</i>	≤ 1 (S)	16/8 (I)	16 (I)	≤ 4 (S)	64 (R)	≤ 0,12 (S)	2/16 (S/R)	8 (R)	4 (S)	4 (S)	> 8 (R)	≤ 0,25 (S)	0,1	4 (I)	0,5/ 9,5 (S)

srna/ 96.	<i>M. vaccae</i>	32 (I)	≤ 2/1 (S)	> 32 (R)	64 (I)	> 64 (R)	0,25 (S)	≤ 0,06/ ≤ 0,06 (S/S)	0,25 (S)	≤ 2 (S)	2 (S)	≤ 1 (S)	≤ 0,25 (S)	0,3	2 (S)	≤ 0,25/ 4,75 (S)
Pozitivna kontrola	<i>M. smegmatis</i> ATCC 19420	/	/	/	/	/	0,5	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Nadalje, u tablicama 28. i 29. prikazan je broj sojeva osjetljivih/otpornih na određeni istraživani antibiotik, te broj sojeva otpornih na jedan ili više antibiotika.

Tablica 28. Broj izdvojenih sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija osjetljivih/otpornih na određeni antibiotik

Skupina antibiotika	Antibiotik	S	I	R
AMINOGLIKOZIDI	AMI	86	1	0
	TOB	68	6	13
PENICILINI	AUG2	46	14	27
CEFALOSPORINI	FEP	25	12	50
	FOX	74	10	3
	AXO	23	23	41
KARBAPENEMI	IMI	50	23	3
FLUOROKINOLONI	CIP	83	3	1
	MXF	87	0	0
MAKROLIDI	CLA	64	3	20
TETRACIKLINI	DOX	61	17	9
	MIN	65	16	6
OKSAZOLIDINON	LZD	84	2	1
	SXT	86	1	0

S (engl. susceptible) – osjetljiv, **I** (engl. intermediate) – umjereno osjetljiv, **R** (engl. resistant) – otporan

Tablica 29. Broj sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na jedan ili više antibiotika

Otporan na	N	%	Kumulativna frekvencija
0	20	22.99	22.99
1	24	27.59	50.57
2	16	18.39	68.97
3	10	11.49	80.46
4	6	6.90	87.36
5	5	5.75	93.10
6	3	3.45	96.55

7	2	2.30	98.85
8	1	1.15	100.00
Ukupno	87	100	100

Opažene razlike u pojavnosti otpornih sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija izdvojenih iz domaćih i divljih životinja nisu statistički značajne ($P=0.834$) (Tablica 30.).

Tablica 30. Broj sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija izdvojenih iz domaćih i divljih životinja otpornih na jedan ili više antibiotika

Otporan na	Divlje	Domaće	Ukupno
0	17	3	20
1	19	5	24
2	12	4	16
3	9	1	10
4 i više	15	2	17
Ukupno	72	15	87

Opažene razlike u pojavnosti otpornih sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija izdvojenih u različitim godinama promatranja nisu statistički značajne ($P=0.324$) (Tablica 31.).

Tablica 31. Broj sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na jedan ili više antibiotika u različitim godinama promatranja

Otporan na	2013.	2014.	2015.	2016.	Ukupno
0	10	5	4	1	20
1	7	10	6	1	24
2	4	8	3	1	16
3	3	1	5	1	10
4 i više	8	2	5	2	17

Najveći postotak višestruko otpornih sojeva prema korištenim antibioticima (na 4 i više antibiotika) uočen je u vrste *M. fortuitum*. Opažene razlike u osjetljivosti prema antibioticima između različitih vrsta brzorastućih mikobakterija statistički su značajne ($p < 0.001$) (Tablica 32.).

Tablica 32. Broj sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na jedan ili više antibiotika u različitim vrsta brzorastućih mikobakterija

Otporan na		<i>M. fortuitum</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. vaccae</i>	Ostali	Ukupno
0	N	2	6	2	10	20
	%	7.41	24.00	47.62	14.29	22.99
1	N	2	12	4	6	24
	%	7.41	48.00	28.57	28.57	27.59
2	N	5	5	5	1	16
	%	18.52	20.00	4.76	35.71	18.39
3	N	8	1	0	1	10
	%	29.63	4.00	4.76	0.00	11.49
4 i više	N	10	1	3	3	17
	%	37.04	4.00	14.29	21.43	19.54
Ukupno	N	27	25	14	21	87
	%	100	100	100	100	100

5.2.6.2.1 Antimikrobna osjetljivost brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija prema županiji porijekla

Navedeno ispitivanje brzorastućih NTM-a obuhvatilo je izolate iz ukupno sedam županija i Grada Zagreba, i to Bjelovarsko – bilogorske, Zagrebačke, Sisačko – moslavačke, Osječko – baranjske, Ličko – senjske, Koprivničko – križevačke i Splitsko – dalmatinske županije.

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti proveli smo na ukupno 43 izolata pripadnika sedam različitih vrsta brzorastućih mikobakterija s područja Bjelovarsko – bilogorske županije (Tablica 33.), i to *M. neoaurum* (20 izolata – 1 iz domaćih; 19 iz divljih životinja) i "Najsličnije *M. neoaurum*" (1 izolat iz divljih životinja), *M. fortuitum* (17 izolata – 2 iz domaćih; 15 iz divljih životinja), *M. vaccae* (1 izolat iz divljih životinja), *M. peregrinum* (1

izolat iz divljih životinja), "Najsličniji *M. chitae*" (2 izolata iz divljih životinja) i "Najsličniji *M. septicum*" (1 izolat iz divljih životinja).

Na aminoglikozidne antibiotike, tj. amikacin (AMI) svi izolati bili su osjetljivi osim *M. vaccae* koji je pokazao umjerenu osjetljivost. Na tobramicin (TOB), izolati vrste *M. vaccae*, "Najsličniji *M. chitae*" i "Najsličniji *M. septicum*" bili su osjetljivi, dok je *M. peregrinum* bio otporan. Nadalje, 19 izolata *M. neoaurum* bilo je osjetljivo na tobramicin (1 izolat iz domaćih, 18 iz divljih životinja), dok je jedan izolat bio umjereno osjetljiv, a drugi otporan (oba iz divljih životinja). Ukupno 13 izolata *M. fortuitum* bilo je osjetljivo na tobramicin (1 iz domaćih, 12 iz divljih životinja), dok ih je četiri bilo otporno (1 iz domaćih, 3 iz divljih životinja). Na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG) osjetljivi su bili izolati *M. vaccae*, "Najsličniji *M. chitae*" i "Najsličniji *M. septicum*", dok je izolat *M. peregrinum* bio otporan. Ukupno 20 izolata *M. neoaurum* bilo je osjetljivo na navedeni antibiotik (1 izolat iz domaćih i 19 iz divljih životinja), dok je jedan bio otporan (izolat iz divljih životinja). Ukupno 11 izolata *M. fortuitum* bilo je otporno (11 izolata iz divljih životinja), dok je njih pet (2 iz domaćih, 3 iz divljih životinja) bilo umjereno osjetljivo, a jedan izolat bio je osjetljiv (iz divljih životinja). Nadalje, na antibiotike skupine cefalosporina, tj. na cefepim (FEP), cefoksitin (FOX) i cefriakson (AXO) izolati "Najsličniji *M. septicum*" su bili osjetljivi, a izolati "Najsličniji *M. chitae*" su bili osjetljivi na cefoksitin i cefriakson, dok je na cefepim jedan izolat bio osjetljiv, a drugi otporan. Izolati *M. vaccae* i *M. peregrinum* bili su otporni na cefepim i cefriakson, dok je na cefoksitin *M. vaccae* bio umjereno osjetljiv, a *M. peregrinum* osjetljiv. Od *M. fortuitum* izolata, na cefepim ih je 14 bilo otporno (2 iz domaćih, 12 iz divljih životinja), dva umjereno osjetljivo i jedan osjetljiv (oba iz divljih životinja). Na cefoksitin, tri izolata bilo je otporno (1 iz domaćih, 2 iz divljih životinja), jedan umjereno osjetljiv (iz domaćih životinja) i 13 osjetljivo (iz divljih životinja), a na cefriakson ih je 15 bilo otporno (2 iz domaćih, 13 iz divljih životinja), jedan umjereno osjetljiv i jedan osjetljiv (oba iz divljih životinja). Kod izolata *M. neoaurum*, na cefepim je 14 izolata bilo otporno kao i izolat "Najsličniji *M. neoaurum*" (iz divljih životinja), tri umjereno osjetljivo (1 iz domaćih, 2 iz divljih životinja) i tri osjetljivo (iz divljih životinja); na cefoksitin su bila dva otporna (iz divljih životinja), a 19 osjetljivo (1 iz domaćih, 18 iz divljih životinja); te na cefriakson četiri je bilo otporno (iz divljih životinja), 11 umjereno osjetljivo kao i izolat "Najsličniji *M. neoaurum*" (1 iz domaćih, 11 iz divljih životinja), a pet osjetljivo (iz divljih životinja). Na skupinu karbapenema, tj. imipenem (IMI) izolati *M. vaccae* i "Najsličniji *M. chitae*" bili su osjetljivi, a izolat "Najsličniji *M. septicum*" umjereno osjetljiv. Od *M. fortuitum* izolata, 10 ih je bilo osjetljivo, a dva umjereno osjetljivo (sve iz divljih

životinja), dok rezultate za pet izolata nije bilo moguće očitati iz ranije navedenih razloga, kao i za izolat vrste *M. peregrinum*. Kod *M. neoaurum* izolata, 18 ih je bilo osjetljivo (1 iz domaćih, 17 iz divljih životinja), a tri umjereno osjetljivo (iz divljih životinja). Na skupinu fluorokinolona, ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), izolati *M. neoaurum*, *M. vaccae*, *M. peregrinum*, "Najsličniji *M. chitae*" i "Najsličniji *M. septicum*" bili su osjetljivi, dok su dva *M. fortuitum* izolata iz domaćih životinja bila umjereno osjetljiva, a ostali osjetljivi. Na makrolidni antibiotik klaritromicin (CLA), izolati vrsta *M. vaccae*, *M. peregrinum*, "Najsličniji *M. chitae*" i "Najsličniji *M. septicum*" bili su osjetljivi, dok su kod *M. neoaurum* jedan izolat (iz divljih životinja), te kod *M. fortuitum* četiri bila otporna (1 iz domaćih, 3 iz divljih životinja) i jedan umjereno osjetljiv (iz divljih životinja), a ostali osjetljivi. Izolati *M. neoaurum*, *M. vaccae* i "Najsličniji *M. chitae*" bili su osjetljivi na tetracikline, doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN), dok je *M. peregrinum* bio umjereno osjetljiv. Izolat "Najsličniji *M. septicum*" bio je umjereno osjetljiv na doksiciklin, a osjetljiv na minociklin. Od *M. fortuitum* izolata, na doksiciklin ih je četiri bilo otporno (1 iz domaćih, 3 iz divljih životinja), devet umjereno osjetljivo (1 iz domaćih, 8 iz divljih životinja) i četiri osjetljivo, a na minociklin dva otporno (iz divljih životinja), osam umjereno osjetljivo (2 iz domaćih, 6 iz divljih životinja) i sedam osjetljivo (iz divljih životinja). Na linezolid (LZD), antibiotik skupine oksazolidinona, svi izolati su bili osjetljivi, osim jednog *M. neoaurum* (iz divlje životinje) koji je bio otporan i jednog *M. fortuitum* koji je bio umjereno osjetljiv (iz domaćih životinja). I konačno, na trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) svi testirani izolati bili su osjetljivi osim jednog vrste *M. neoaurum* koji je bio otporan (iz divlje životinje).

Kod ispitanih izolata u Bjelovarsko – bilogorskoj županiji, opisali smo najveću otpornost na antibiotike skupine cefalosporina (cefepim, FEP; cefoksitin, FOX i cefriakson, AXO), a najzastupljenija je bila kod vrsta *M. neoaurum* izdvojenih iz divljih životinja, *M. fortuitum* izdvojenih iz domaćih i divljih životinja, *M. vaccae* i *M. peregrinum* također izdvojenih iz divljih životinja. Većina izolata vrste *M. fortuitum* i izolat *M. peregrinum* izdvojenih iz divljih životinja također je pokazala otpornost na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG), kao i jedan izolat vrste *M. neoaurum*. Također, pojedini izolati *M. fortuitum* izdvojeni iz domaćih i divljih životinja pokazali su otpornost na tobramicin (TOB), kao i izolat *M. neoaurum* i *M. peregrinum* iz divljih životinja. Nadalje, pojedini izolati *M. fortuitum* iz domaćih i divljih životinja bili su otporni na klaritromicin (CLA), kao i izolat *M. neoaurum* iz divlje životinje. Na tetracikline, doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN) također smo opisali otporne *M. fortuitum* izolate. Opisali smo i izolat vrste *M. neoaurum* iz divlje životinje otporan na linezolid (LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT). Nismo uočili značajne

razlike u antimikrobnoj osjetljivosti između izolata izdvojenih iz domaćih i onih iz divljih životinja, dok su najveću otpornost pokazali izolati vrsta *M. neoaurum*, *M. fortuitum* i *M. peregrinum*.

Iz navedene županije izdvojili bi jedan izolat izdvojen iz svinje (*M. fortuitum* – r.b. 14.) i četiri izolata izdvojena iz srna (3 izolata *M. fortuitum* – r.b. 99., 102., 106.; 1 izolat *M. neoaurum* – r.b. 92.), kod kojih smo opisali otpornost na pet i više antibiotika.

Tablica 33. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata brzorastućih NTM-a izdvojenih iz Bjelovarsko – bilogorske županije

(**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

		Bjelovarsko – bilogorska županija																		
	Antibiotik	Vrsta životinje	<i>M. neoaurum</i> i "Najsličnije <i>M. neoaurum</i> " (<i>n</i> = 21) domaće Σ 1 divlje Σ 20			<i>M. fortuitum</i> (<i>n</i> = 17) domaće Σ 2 divlje Σ 15			<i>M. vaccae</i> (<i>n</i> = 1) divlje Σ 1			<i>M. peregrinum</i> (<i>n</i> = 1) divlje Σ 1			"Najsličnije <i>M. chitae</i> " (<i>n</i> = 2) divlje Σ 2			"Najsličnije <i>M. septicum</i> " (<i>n</i> = 1) divlje Σ 1		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	20	-	-	15	-	-	-	1	-	1	-	-	2	-	-	1	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	TOB	domaće	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	18	1	1	12	-	3	1	-	-	-	-	1	2	-	-	1	-	-
		%	90,4	4,8	4,8	76,5	0	23,5	100	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0
PENICILINI	AUG	domaće	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	19	-	1	1	3	11	1	-	-	-	-	1	2	-	-	1	-	-
		%	95,2	0	4,8	5,9	29,4	64,7	100	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0

CEFALOSPORINI	FEP	domaće	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		divlje	3	2	15	1	2	12	-	-	1	-	-	1	1	-	1	-	-	
		%	14,3	14,3	71,4	5,9	11,8	82,3	0	0	100	0	0	100	50	0	50	100	0	0
	FOX	domaće	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	18	-	2	13	-	2	-	1	-	1	-	-	2	-	-	1	-	-
		%	90,5	0	9,5	76,5	5,9	17,6	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	AXO	domaće	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	5	11	4	1	1	13	-	-	1	-	-	1	2	-	-	1	-	-
		%	23,8	57,1	19,1	5,9	5,9	88,2	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0	0
KARBAPENEM	IMI*	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		divlje	17	3	-	10	2	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	
		%	85,7	14,3	0	58,9	11,8	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0
FLUOROKINOLONI	CIP	domaće	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		divlje	20	-	-	15	-	-	1	-	-	1	-	-	2	-	-	1	-	-
		%	100	0	0	88,2	11,8	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	MXF	domaće	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		divlje	20	-	-	15	-	-	1	-	-	1	-	-	2	-	-	1	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
MAKROLIDI	CLA	domaće	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		divlje	19	-	1	11	1	3	1	-	-	1	-	-	2	-	-	1	-	-
		%	95,2	0	4,8	70,6	5,9	23,5	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0

TETRACIKLINI	DOX	domaće	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	20	-	-	4	8	3	1	-	-	-	1	-	2	-	-	-	1
		%	100	0	0	23,5	53	23,5	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
	MIN	domaće	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	20	-	-	7	6	2	1	-	-	-	1	-	2	-	-	1	-
		%	100	0	0	41,2	47	11,8	100	0	0	0	100	0	100	0	0	100	0
OKSAZOLIDINON	LZD	domaće	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	19	-	1	15	-	-	1	-	-	1	-	2	-	-	1	-	
		%	95,2	0	4,8	94,1	5,9	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	SXT	domaće	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	19	-	1	15	-	-	1	-	-	1	-	2	-	-	1	-	-
		%	95,2	0	4,8	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0

*za imipenem vrijednost MIC-a i tumačenje rezultata nije bilo moguće prijaviti za dva izolata podrijetlom iz domaćih i 3 izolata iz divljih životinja vrste *M. fortuitum*, te za jedan izolat iz divljih životinja vrste *M. peregrinum*

U Sisačko – moslavačkoj županiji (Tablica 34., Tablica 35.) ispitivanje smo proveli na ukupno 26 izolata pripadnika osam različitih vrsta brzorastućih mikobakterija, i to *M. neoaurum* (2 izolata iz divljih životinja), *M. fortuitum* (4 izolata iz divljih životinja), *M. chitae* (2 izolata iz domaćih životinja), *M. phocaicum* (5 izolata iz divljih životinja), *M. vaccae* (8 izolata iz divljih životinja) i "Najsličnije *M. vaccae*" (1 izolat iz divljih životinja), *M. elephantis* (1 izolat iz domaćih životinja), *M. porcinum* (2 izolata iz divljih životinja) i *M. pulveris* (1 izolat iz divljih životinja).

Na aminoglikozidne antibiotike, tj. amikacin (AMI) svi izolati bili su osjetljivi. Na tobramicin (TOB), vrste *M. neoaurum*, *M. chitae* i *M. pulveris* bili su osjetljivi, *M. elephantis* bio je umjereno osjetljiv, a *M. porcinum* otporan. Od *M. fortuitum* izolata dva su bila osjetljiva i dva otporna, od *M. vaccae* izolata šest ih je bilo osjetljivo i dva umjereno osjetljiva, a izolat "Najsličniji *M. vaccae*" bio je otporan. Na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG) osjetljivi su bili izolati *M. neoaurum* i *M. pulveris*, dok je *M. elephantis* bio umjereno osjetljiv. Od *M. fortuitum* izolata, jedan je bio osjetljiv, jedan umjereno osjetljiv, a dva su bila otporna. Ukupno šest izolata *M. vaccae* bila su otporna, a dva umjereno osjetljiva, dok je izolat "Najsličniji *M. vaccae*" bio otporan. Otpornost su također pokazala dva izolata *M. phocaicum*, dok su ostala dva bila osjetljiva, a jedan umjereno osjetljiv. Kod izolata *M. chitae* jedan je bio otporan a drugi osjetljiv, te kod *M. porcinum* jedan izolat je bio otporan a drugi umjereno osjetljiv. Nadalje, na antibiotike skupine cefalosporina, tj. na cefepim (FEP), cefoksitin (FOX) i cefriakson (AXO) izolati *M. chitae* i *M. elephantis* bili su osjetljivi. Izolat *M. pulveris* bio je osjetljiv na cefepim i cefoksitin, dok je na cefriakson bio umjereno osjetljiv. Izolati *M. porcinum* bili su otporni na cefepim i cefriakson, a osjetljivi na cefoksitin. *M. neoaurum* izolati bili su umjereno osjetljivi na cefepim, osjetljivi na cefoksitin, dok je jedan izolat bio umjereno osjetljiv a drugi otporan na cefriakson. Od *M. fortuitum* izolata tri su bila otporna i jedan umjereno osjetljiv na cefepim, tri osjetljiva i jedan umjereno osjetljiv na cefoksitin, te četiri otporna na cefriakson. Ukupno šest izolata *M. vaccae* bilo je osjetljivo, jedan umjereno osjetljiv i jedan otporan na cefepim, dok su na cefoksitin svi bili osjetljivi. Na cefriakson četiri je izolata bilo otporno, dva su bila umjereno osjetljiva, a dva osjetljiva. Izolat "Najsličniji *M. vaccae*" bio je otporan na cefepim i cefriakson, dok je na cefoksitin bio umjereno osjetljiv. Od *M. phocaicum* izolata, tri su bila osjetljiva, jedan umjerno osjetljiv i jedan otporan na cefepim i cefriakson, dok su na cefoksitin bili osjetljivi. Na skupinu karbapenema, tj. imipenem (IMI) izolati *M. pulveris* i *M. phocaicum* bili su osjetljivi, dok je *M. elephantis* bio otporan. Kod izolata *M. neoaurum*, *M. chitae* i *M. porcinum* jedan je izolat je bio osjetljiv, a drugi umjereno osjetljiv na navedeni antibiotik, dok su kod *M. fortuitum* dva

izolata bila osjetljiva a dva umjereno osjetljiva. Ukupno sedam izolata *M. vaccae* je bilo umjereno osjetljivo a jedan osjetljiv, dok je izolat "Najsličniji *M. vaccae*" bio otporan. Rezultate za dva izolata *M. phocaicum* nije bilo moguće očitati iz ranije navedenih razloga. Na skupinu fluorokinolona, ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), svi izolati su bili osjetljivi, osim jednog izolata *M. vaccae* koji je bio otporan na ciprofloksacin. Na makrolidni antibiotik klaritromicin (CLA), izolati vrsta *M. neoaurum*, *M. phocaicum*, *M. elephantis* i *M. pulveris* bili su osjetljivi, dok su izolati *M. porcinum* bili otporni. Od *M. fortuitum* izolata, tri su bila otporna i jedan osjetljiv, a *M. vaccae* tri otporna i pet osjetljivih na navedeni antibiotik. Izolat "Najsličniji *M. vaccae*" bio otporan. Jedan izolat *M. chitae* bio je otporan, a drugi umjereno osjetljiv.

Izolati *M. neoaurum*, *M. chitae*, *M. elephantis* i *M. pulveris* bili su osjetljivi na tetracikline, doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN), dok su izolati *M. porcinum* bili otporni na doksiciklin, a jedan otporan i jedan umjereno osjetljiv na minociklin. Na doksiciklin, jedan *M. fortuitum* izolat bio je otporan i jedan osjetljiv, a dva su bila umjereno osjetljiva. Na minociklin, tri su bila umjereno osjetljiva, dok je jedan bio osjetljiv. Ukupno sedam *M. vaccae* izolata kao i izolat "Najsličniji *M. vaccae*" bilo je osjetljivo na oba tetraciklina, dok je jedan izolat bio otporan na oba. Kod *M. phocaicum* četiri izolata bilo je osjetljivo, a jedan umjereno osjetljiv na doksiciklin, dok je na minociklin dva izolata bilo osjetljivo, a tri umjereno osjetljivo. Na linezolid (LZD), antibiotik skupine oksazolidinona i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) svi ispitani izolati bili su osjetljivi.

Kod ispitanih izolata u Sisačko – moslavačkoj županiji, opisali smo najveću otpornost na antibiotike skupine cefalosporina (cefepim, FEP i cefriakson, AXO), a najzastupljenija je bila kod vrsta *M. fortuitum*, *M. porcinum*, *M. vaccae* i "Najsličnije *M. vaccae*" izdvojenih iz divljih životinja, a isto smo opisali i kod jednog izolata vrste *M. phocaicum* i *M. neoaurum* također iz divljih životinja. Također, mnogi izolati *M. fortuitum*, *M. porcinum*, *M. vaccae* i "Najsličniji *M. vaccae*" izdvojeni iz divljih, te *M. chitae* iz domaćih životinja bili su otporni na klaritromicin (CLA). Izolati vrste *M. fortuitum*, *M. phocaicum* i *M. porcinum* iz divljih, te *M. chitae* iz domaćih životinja također su u visokom postotku pokazali otpornost na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG), kao i jedan izolat "Najsličniji *M. vaccae*". Visoki postotak otpornost na tobramicin (TOB) opisali smo kod izolata *M. fortuitum*, *M. porcinum*, izolatu "Najsličnije *M. vaccae*", kao i kod jednog izolata *M. phocaicum* sve iz divljih životinja. Nadalje, izolati "Najsličniji *M. vaccae*" iz divljih i *M. elephantis* iz domaćih životinja bili su otporni na imipenem (IMI), dok je samo jedan izolat *M. vaccae* bio otporan na ciprofloksacin (CIP). Na tetracikline (doksiciklin, DOX i minociklin, MIN) smo također

opisali otpornost kod jednog izolata vrste *M. vaccae* i *M. fortuitum*, kao i kod svih *M. porcinum* izolata sve iz divljih životinja. Uočili smo razlike u antimikrobnoj osjetljivosti između izolata izdvojenih iz domaćih i onih iz divljih životinja, i to kod cefalosporina (cefepim, FEP i cefriakson, AXO) i tobramicina (TOB), gdje su izolati iz divljih otporni u visokom postotku, a izolati iz domaćih životinja osjetljivi. Najveću otpornost pokazali izolati vrste *M. fortuitum*, *M. porcinum*, *M. vaccae* i "Najsličniji *M. vaccae*".

Iz navedene županije izdvojili bi četiri izolata izdvojena iz divljih svinja (1 izolat *M. fortuitum* – r.b. 30.; 2 izolata *M. porcinum* – r.b. 40., 46.; "Najsličnije *M. vaccae*" – r.b. 26.), kod kojih smo opisali otpornost na pet i više antibiotika.

Tablica 34. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata brzorastućih NTM-a izdvojenih iz Sisačko – moslavačke županije

(**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

		Sisačko – moslavačka županija															
	Antibiotik	Vrsta životinje	<i>M. neoaurum</i> (n = 2) divlje Σ 2			<i>M. fortuitum</i> (n = 4) divlje Σ 4			<i>M. vaccae</i> i "Najsličnije <i>M.</i> <i>vaccae</i> " (n = 9) divlje Σ 9			<i>M. phocaicum</i> (n = 5) divlje Σ 5			<i>M. chitae</i> (n = 2) domaće Σ 2		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
		divlje	2	-	-	4	-	-	9	-	-	5	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	TOB	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
divlje		2	-	-	2	-	2	6	2	1	4	-	1	-	-	-	
%		100	0	0	50	0	50	66,7	22,2	11,1	80	0	20	100	0	0	
PENICILINI	AUG	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	
		divlje	2	-	-	1	1	2	6	2	1	2	1	2	-	-	-
		%	100	0	0	25	25	50	66,7	22,2	11,1	40	20	40	50	0	50

CEFALOSPORINI	FEP	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
		divlje	-	2	-	-	1	3	6	1	2	3	1	1	-	-	-
		%	0	100	0	0	25	75	66,7	11,1	22,2	60	20	20	100	0	0
FOX	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
	divlje	2	-	-	3	1	-	8	1	-	5	-	-	-	-	-	
	%	100	0	0	75	25	0	88,9	11,1	-	100	0	0	100	0	0	
AXO	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
	divlje	-	1	1	-	-	4	2	2	5	3	1	1	-	-	-	
	%	0	50	50	0	0	100	22,2	22,2	55,6	60	20	20	100	0	0	
KARBAPENEM	IMI*	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
		divlje	1	1	-	2	2	-	1	7	1	3	-	-	-	-	-
		%	50	50	0	50	50	0	11,1	77,8	11,1	60	0	0	50	50	0
FLUOROKINOLONI	CIP	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
		divlje	2	-	-	4	-	-	8	-	1	5	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	88,9	0	11,1	100	0	0	100	0	0
	MXF	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
divlje		2	-	-	4	-	-	9	-	-	5	-	-	-	-	-	
%		100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	
MAKROLIDI	CLA	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
		divlje	2	-	-	1	-	3	5	-	4	5	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	25	0	75	55,6	0	44,4	100	0	0	0	50	50

TETRACIKLINI	DOX	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
		divlje	2	-	-	1	2	1	8	-	1	4	1	-	-	-	-
		%	100	0	0	25	50	25	88,9	0	11,1	80	20	0	100	0	0
	MIN	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
		divlje	2	-	-	1	3	-	8	-	1	2	3	-	-	-	-
		%	100	0	0	25	75	0	88,9	0	11,1	40	60	0	100	0	0
OKSAZOLIDINON	LZD	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
		divlje	2	-	-	4	-	-	9	-	-	5	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	SXT	domaće	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
		divlje	2	-	-	4	-	-	9	-	-	5	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0

*za imipenem vrijednost MIC-a i tumačenje rezultata nije bilo moguće prijaviti za dva izolata podrijetlom iz divljih životinja vrste *M. phocaicum*

Tablica 35. Ostali rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata brzorastućih NTM-a izdvojenih iz Sisačko – moslavačke županije (**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

		Sisačko – moslavačka županija									
	Antibiotik	Vrsta životinje	<i>M. elephantis</i> (n = 1) domaće Σ 1			<i>M. porcinum</i> (n = 2) divlje Σ 2			<i>M. pulveris</i> (n = 1) divlje Σ 1		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R
			AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	1	-	-	-	-	-
divlje	-	-			-	2	-	-	1	-	-
%	100	0			0	100	0	0	100	0	0
TOB	domaće	-		1	-	-	-	-	-	-	-
	divlje	-		-	-	-	-	2	1	-	-
	%	0		100	0	0	0	100	100	0	0
PENICILINI	AUG	domaće	-	1	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	1	1	1	-	-
		%	0	100	0	0	50	50	100	0	0
CEFALOSPORINI	FEP	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	2	1	-	
		%	100	0	0	0	0	100	100	0	0
	FOX	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	2	-	-	1	-	
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0
AXO	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-		
	divlje	-	-	-	-	-	2	-	1		
	%	100	0	0	0	0	100	0	100	0	
KARBAPENEM	IMI	domaće	-	-	1	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	1	1	-	1	-	
		%	0	0	100	50	50	0	100	0	0
FLUOROKINOLONI	CIP	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	2	-	-	1	-	
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	MXF	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	2	-	-	1	-	
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0
MAKROLIDI	CLA	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	2	1	-	
		%	100	0	0	0	0	100	100	0	0

TETRACIKLINI	DOX	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	2	1	-	-
		%	100	0	0	0	0	100	100	0	0
	MIN	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	-	1	1	1	-	-
		%	100	0	0	0	50	50	100	0	0
OKSAZOLIDINON	LZD	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	2	-	-	1	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	SXT	domaće	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	-	2	-	-	1	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0

U Zagrebačkoj županiji (Tablica 36.) i Gradu Zagrebu (Tablica 37.) ispitivanje smo proveli na ukupno 13 izolata pripadnika šest različitih vrsta brzorastućih mikobakterija, i to *M. neoaurum* (1 izolat iz divljih životinja) i "Najsličnije *M. neoaurum*" (1 izolat iz domaćih životinja), *M. fortuitum* (4 izolata – 2 iz domaćih, 2 iz divljih životinja), *M. vaccae* (2 izolata iz divljih životinja), *M. phocaicum* (2 izolata iz divljih životinja), *M. arupense* (2 izolata iz divljih životinja) i *M. chitae* (1 izolat iz domaćih životinja).

Na aminoglikozidne antibiotike, tj. amikacin (AMI) i tobramicin (TOB) svi izolati bili su osjetljivi osim izolata vrste *M. vaccae* od kojih je jedan bio umjereno osjetljiv, a jedan otporan na tobramicin. Na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG) osjetljivi su bili izolati *M. neoaurum* i "Najsličniji *M. neoaurum*", dok je izolat *M. chitae* bio otporan. Kod izolata *M. phocaicum* i *M. arupense*, jedan izolat je bio osjetljiv, a drugi umjereno osjetljiv. Od *M. fortuitum* izolata, jedan iz domaćih životinja je bio umjereno osjetljiv, a ostala tri su bila otporna (1 izolat iz domaćih, 2 iz divljih životinja), dok je kod *M. vaccae* jedan izolat bio osjetljiv, a drugi otporan. Nadalje, na antibiotike skupine cefalosporina, tj. na cefepim (FEP), cefoksitin (FOX) i cefriakson (AXO) izolati *M. phocaicum* i *M. chitae* bili su osjetljivi. Izolat *M. neoaurum* bio je otporan na cefepim i cefriakson, a osjetljiv na cefoksitin, dok je izolat "Najsličniji *M. neoaurum*" bio otporan na cefepim, umjerno osjetljiv na cefriakson i osjetljiv na cefoksitin. Od *M. fortuitum* izolata, tri ih je bio otporno (2 izolata iz domaćih, 1 iz divljih životinja) i jedan umjereno osjetljiv (iz divljih životinja) na cefepim i cefriakson, dok su na cefoksitin dva izolata bila osjetljiva (iz divljih životinja), jedan umjereno osjetljiv i jedan

otporan (iz domaćih životinja). Svi testirani *M. vaccae* izolati bili su otporni na cefepim i cefriakson, dok je na cefoksitin jedan izolat bio osjetljiv, a drugi umjereno osjetljiv. Izolati vrste *M. arupense* bili su osjetljivi na cefoksitin, umjereno osjetljivi na cefriakson, dok je na cefepim jedan izolat bio osjetljiv, a drugi umjereno osjetljiv.

Na skupinu karbapenema, tj. imipenem (IMI) izolati *M. neoaurum*, "Najsličniji *M. neoaurum*" i *M. chitae* bili su osjetljivi, dok su *M. arupense* bili umjereno osjetljivi. Od *M. fortuitum* izolata, jedan izolat je bio osjetljiv (iz domaćih životinja), dok su tri bila umjereno osjetljiva (jedan iz domaćih, dva iz divljih životinja). Jedan izolat *M. vaccae* bio je otporan, a drugi osjetljiv na navedeni antibiotik. Rezultate za dva izolata *M. phocaicum* nije bilo moguće očitati iz ranije navedenih razloga. Na skupinu fluorokinolona, ciprofloksacin (CIP) i moksifloksacin (MXF), svi izolati su bili osjetljivi.

Na makrolidni antibiotik klaritromicin (CLA), izolati vrsta *M. neoaurum*, "Najsličniji *M. neoaurum*", *M. phocaicum* i *M. arupense* bili su osjetljivi, dok je izolat *M. chitae* bio otporan. Od *M. fortuitum* izolata jedan izolat (iz divljih životinja) je bio umjereno osjetljiv, dok su tri izolata bila otporna (dva izolata iz domaćih, jedan iz divljih životinja). Jedan izolat *M. vaccae* bio je otporan, a drugi osjetljiv na navedeni antibiotik. Izolati *M. neoaurum*, "Najsličniji *M. neoaurum*", *M. phocaicum*, *M. arupense* i *M. chitae* bili su osjetljivi na tetracikline (doksiciklin, DOX i minociklin, MIN), dok su svi *M. fortuitum* izolati bili osjetljivi osim jednog koji je bio umjereno osjetljiv na doksiciklin. Jedan izolat *M. vaccae* bio je otporan na oba antibiotika, dok je drugi bio umjereno osjetljiv na doksiciklin, a osjetljiv na minociklin. Na linezolid (LZD), antibiotik skupine oksazolidinona i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) svi ispitani izolati bili su osjetljivi osim jednog vrste *M. vaccae* koji je bio umjereno osjetljiv na linezolid.

Kod ispitanih izolata u Zagrebačkoj županiji i Gradu Zagrebu, opisali smo najveću otpornost na antibiotike skupine cefalosporina (cefepim, FEP i cefriakson, AXO), a najzastupljenija je bila kod vrsta *M. fortuitum* izdvojenih iz domaćih i divljih životinja, *M. vaccae*, *M. neoaurum* iz divljih i "Najsličnije *M. neoaurum*" iz domaćih životinja. Također su izolati *M. fortuitum* iz domaćih i divljih, *M. chitae* iz domaćih i *M. vaccae* iz divljih životinja u visokom postotku pokazali otpornost na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG) i klaritromicin (CLA). Jedan izolat vrste *M. vaccae* bio je također otporan i na tobramycin (TOB), imipenem (IMI) i oba tetraciklina (doksiciklin, DOX i minociklin, MIN). Uočili smo razlike u antimikrobnoj osjetljivosti između *M. fortuitum* izolata izdvojenih iz domaćih i onih iz divljih životinja, i to kod cefalosporina (FEP i AXO) i klaritromicina (CLA) gdje su izolati iz domaćih životinja bili otporniji u većem postotku.

Iz navedene županije izdvojili bi dva izolata izdvojena iz goveda (1 izolat *M. fortuitum* – r.b. 9.) i divlje svinje (1 izolat *M. vaccae* – r.b. 58.), kod kojih smo opisali otpornost na pet i više antibiotika.

Tablica 36. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata brzorastućih NTM-a izdvojenih iz Zagrebačke županije

(**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

		Zagrebačka županija															
	Antibiotik	Vrsta životinje	<i>M. neoaurum</i> (<i>n</i> = 1) divlje Σ 1			<i>M. fortuitum</i> (<i>n</i> = 4) domaće Σ 2 divlje Σ 2			<i>M. vaccae</i> (<i>n</i> = 2) divlje Σ 2			<i>M. phocaicum</i> (<i>n</i> = 2) divlje Σ 2			<i>M. arupense</i> (<i>n</i> = 2) divlje Σ 2		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
			AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
divlje	1	-			-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-
%	100	0		0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	
TOB	domaće	-		-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	divlje	1	-	-	2	-	-	-	1	1	2	-	-	2	-	-	
%	100	0	0	100	0	0	0	50	50	100	0	0	100	0	0		
PENICILINI	AUG	domaće	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	1	-	-	-	-	2	1	-	1	1	1	-	1	1	
		%	100	0	0	0	25	75	50	0	50	50	50	0	50	50	0
CEFALOSPORINI	FEP	domaće	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	-	-	1	-	1	1	-	-	2	2	-	-	1	1	
	%	0	0	100	0	25	75	0	0	100	100	0	0	50	50	0	
	FOX	domaće	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
divlje		1	-	-	2	-	-	1	1	-	2	-	-	2	-		
%	100	0	0	50	25	25	50	50	0	100	0	0	100	0	0		

	AXO	domaće	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	-	-	1	-	1	1	-	-	2	2	-	-	-
		%	0	0	100	0	25	75	0	0	100	100	0	0	0
KARBAPENEM	IMI*	domaće	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	1	-	-	-	2	-	1	-	1	-	-	-	-
		%	100	0	0	25	75	0	50	0	50	0	0	0	0
FLUOROKINOLONI	CIP	domaće	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	1	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0
	MXF	domaće	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	1	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0
MAKROLIDI	CLA	domaće	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	1	-	-	-	1	1	1	-	1	2	-	-	-
		%	100	0	0	0	25	75	50	0	50	100	0	0	0
TETRACIKLINI	DOX	domaće	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	1	-	-	1	1	-	-	1	1	2	-	-	-
		%	100	0	0	75	25	0	0	50	50	100	0	0	0
	MIN	domaće	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	1	-	-	2	-	-	1	-	1	2	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	50	0	50	100	0	0	0

OKSAZOLIDINON	LZD	domaće	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		divlje	1	-	-	2	-	-	1	1	-	2	-	-	2	-
		%	100	0	0	100	0	0	50	50	0	100	0	0	100	0
	SXT	domaće	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		divlje	1	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0

*za imipenem vrijednost MIC-a i tumačenje rezultata nije bilo moguće prijaviti za dva izolata podrijetlom iz divljih životinja vrste *M. phocaicum*

Izolati vrsta *M. fortuitum* i *M. vaccae* iz Osječko – baranjske županije (Tablica 37.) podrijetlom iz domaćih životinja bili su osjetljivi na sve ispitane antibiotike, osim na cefalosporine gdje je *M. vaccae* izolat bio otporan na cefepim (FEP) i umjereno osjetljiv na cefriakson (AXO).

Tablica 37. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata brzorastućih NTM-a izdvojenih iz Grada Zagreba i Osječko – baranjske županije

(**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

					Grad Zagreb			Osječko – baranjska županija						
Antibiotik	Vrsta životinje	"Najsličnije <i>M. neoaurum</i> " (<i>n</i> = 1) domaće ∑ 1			<i>M. chitae</i> (<i>n</i> = 1) domaće ∑ 1			<i>M. fortuitum</i> (<i>n</i> = 1) domaće ∑ 1			<i>M. vaccae</i> (<i>n</i> = 1) domaće ∑ 1			
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	TOB	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
PENICILINI	AUG	domaće	1	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0
CEFALOSPORINI	FEP	domaće	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	1
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	100
	FOX	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
AXO	domaće	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	1	-	
	divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	%	0	100	0	100	0	0	100	0	0	0	100	0	
KARBAPENEM	IMI	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0

FLUOROKINOLONI	CIP	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	MXF	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			100	0	0	-	-	0	100	0	0	100	0	0
MAKROLIDI	CLA	domaće	1	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			100	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0
TETRACIKLINI	DOX	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	MIN	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
divlje		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
OKSAZOLIDINON	LZD	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	SXT	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0

Izolat vrste *M. fortuitum* iz Ličko – senjske županije (Tablica 38.) podrijetlom iz domaćih životinja je na aminoglikozide, tj. na amikacin (AMI) je bio osjetljiv, dok je na tobramicin (TOB) bio umjereno osjetljiv. Osjetljiv je također bio na klaritromicin (CLA), linezolid (LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), dok je otporan bio na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG). Unutar cefalosporina bio je otporan na cefepim (FEP), umjereno osjetljiv na cefoksitin (FOX) i osjetljiv na cefriakson (AXO). Umjereno osjetljiv bio je na tetracikline (doksiciklin, DOX i minociklin, MIN), kao i na ciprofloksacin (CIP) iz skupine fluorokinolona, dok je moksifloksacin (MXF) bio osjetljiv. Rezultate za imipenem nije bilo moguće prijaviti iz ranije navedenih razloga.

Izolat vrste *M. vaccae* iz Koprivničko – križevačke županije (Tablica 38.) bio je osjetljiv na aminoglikozide (amikacin, AMI i tobramicin, TOB), fluorokinolone

(ciprofloksacin, CIP i moksifloksacin, MXF), makrolide (klaritromicin, CLA), tetracikline (doksiciklin, DOX i minociklin, MIN), oksazolidinon (linezolid, LZD) i trimetoprim/sulfametoksazol (SXT). Umjereno osjetljiv bio je na amoksisilin/klavulonsku kiselinu (AUG) i imipenem (IMI). Na cefalosporine cefepim (FEP) i cefriakson (AXO) je bio otporan, dok je na cefoksitin bio osjetljiv.

Izolat vrste *M. chitae* iz Splitsko – dalmatinske županije (Tablica 38.) podrijetlom iz domaćih životinja pokazao se osjetljivim na sve ispitivane antibiotike.

Tablica 38. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata brzorastućih NTM-a izdvojenih iz Ličko – senjske, Koprivničko – križevačke i Splitsko – dalmatinske županije

(**S** – osjetljiv, **I** – umjereno osjetljiv, **R** – otporan)

		Ličko – senjska županija			Koprivničko – križevačka županija			Splitsko – dalmatinska županija			
		<i>M. fortuitum</i> (n = 1) domaće ∑ 1			<i>M. vaccae</i> (n = 1) domaće ∑ 1			<i>M. chitae</i> (n = 1) domaće ∑ 1			
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	
AMINOGLIKOZIDI	AMI	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	TOB	domaće	-	1	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	100	0	100	0	0	100	0	0
PENICILINI	AUG	domaće	-	-	1	-	1	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	0	100	0	100	0	0
CEFALOSPORINI	FEP	domaće	-	-	1	-	-	1	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	0	100	0	0	100	100	0	0
	FOX	domaće	-	1	-	1	-	-	1	-	-
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	100	0	100	0	0	100	0	0
AXO	domaće	1	-	-	-	-	1	1	-	-	
	divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	%	100	0	0	0	0	100	100	0	0	

KARBAPENEM	IMI*	domaće	-	-	-	-	1	-	1	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		%	0	0	0	0	100	0	100	0	0	
FLUOROKINOLONI	CIP	domaće	-	1	-	1	-	-	1	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	0	100	0	100	0	0	100	0	0	
	MXF	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	
divlje		-	-	-	-	-	-	-	-	-		
%		100	0	0	100	0	0	100	0	0		
MAKROLIDI	CLA	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	
TETRACIKLINI	DOX	domaće	-	1	-	1	-	-	1	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	0	100	0	100	0	0	100	0	0	
	MIN	domaće	-	1	-	1	-	-	1	-	-	
divlje		-	-	-	-	-	-	-	-	-		
%		0	100	0	100	0	0	100	0	0		
OKSAZOLIDINON	LZD	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	
SXT	SXT	domaće	1	-	-	1	-	-	1	-	-	
		divlje	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		%	100	0	0	100	0	0	100	0	0	

*za imipenem vrijednost MIC-a i tumačenje rezultata nije bilo moguće prijaviti za jedan izolat iz domaćih životinja vrste *M. fortuitum* iz Ličko – senjske županije

Konačno, opažene razlike u pojavnosti otpornih sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija porijeklom iz različitih županija nisu statistički značajne (P=0.870) (Tablica 39.)

Tablica 39. Broj sojeva brzorasućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na jedan ili više antibiotika u različitim vrsta brzorasućih mikobakterija prema županiji porijekla

Županija	Broj sojeva otporno na					
	0	1	2	3	4 i više	Ukupno
Bjelovarsko – bilogorska	8	12	9	6	8	43
Zagrebačka i Grad Zagreb	4	2	3	1	3	13
Koprivničko – križevačka	0	0	1	0	0	1
Ličko – senjska	0	0	1	0	0	1
Osječko – baranjska	1	1	0	0	0	2
Sisačko – moslavačka	6	9	2	3	6	26
Splitsko - dalmatinska	1	0	0	0	0	1

5.2.6.2.2 Prikaz geografske rasprostranjenosti pojedinih vrsta brzorasućih neuberkuloznih mikobakterija s obzirom na antimikrobnu otpornost u Republici Hrvatskoj

Od ukupno 87 uspješno ispitanih izolata na aminoglikozide, tj. na amikacin (AMI) su gotovo svi (98,8%) bili osjetljivi (12 izolata iz goveda, 1 iz svinje, 1 iz ovce, 1 iz kokoši, 32 iz divljih svinja, 39 iz srna), osim jedne srne (1,2%) koja je bila umjereno osjetljiva. Na tobramicin (TOB) je 68 (78,2%) izolata bilo osjetljivo (10 izolata iz goveda, 1 iz kokoši, 1 iz ovce, 23 iz divljih svinja, 33 iz srna), šest (6,9%) je bilo umjereno osjetljivo (2 iz goveda, 2 iz divljih svina, 2 iz srna), a 13 (14,9%) otporno (1 iz svinje, 7 iz divljih svinja, 5 iz srna) (Slika 24.).

Nadalje, gotovo svi izolati bili su osjetljivi na skupinu fluorokinolona, unutar koje su na moksifloksacin (MXF) bili svi osjetljivi (100%), dok je na ciprofloksacin (CIP) 83 (95,4%) izolata bilo osjetljivo (10 izolata iz goveda, 1 iz kokoši, 1 iz ovce, 31 iz divljih svinja, 40 iz srna), tri (3,4%) umjereno osjetljivo (2 iz goveda, 1 iz svinje) i jedan (1,2%) otporan (iz divlje svinje) (Slika 25.).

Izolati su također većinom (98,8%) bili osjetljivi (12 izolata iz goveda, 1 iz svinje, 1 iz ovce, 1 iz kokoši, 32 iz divljih svinja, 39 iz srna) na trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) gdje je samo jedan izolat iz srne bio otporan (1,2%), kao i na antibiotik skupine oksazolidinona, linezolid (LZD) gdje su svega dva izolata bila umjereno osjetljiva (2,3%) (1 izolat iz divlje svinje, 1 iz svinje), jedan otporan (1,2%) (1 izolat iz srne), a ostali osjetljivi (96,5%) (12 izolata iz goveda, 1 iz ovce, 1 iz kokoši, 31 iz divljih svinja, 39 iz srna) (Slika 25.).

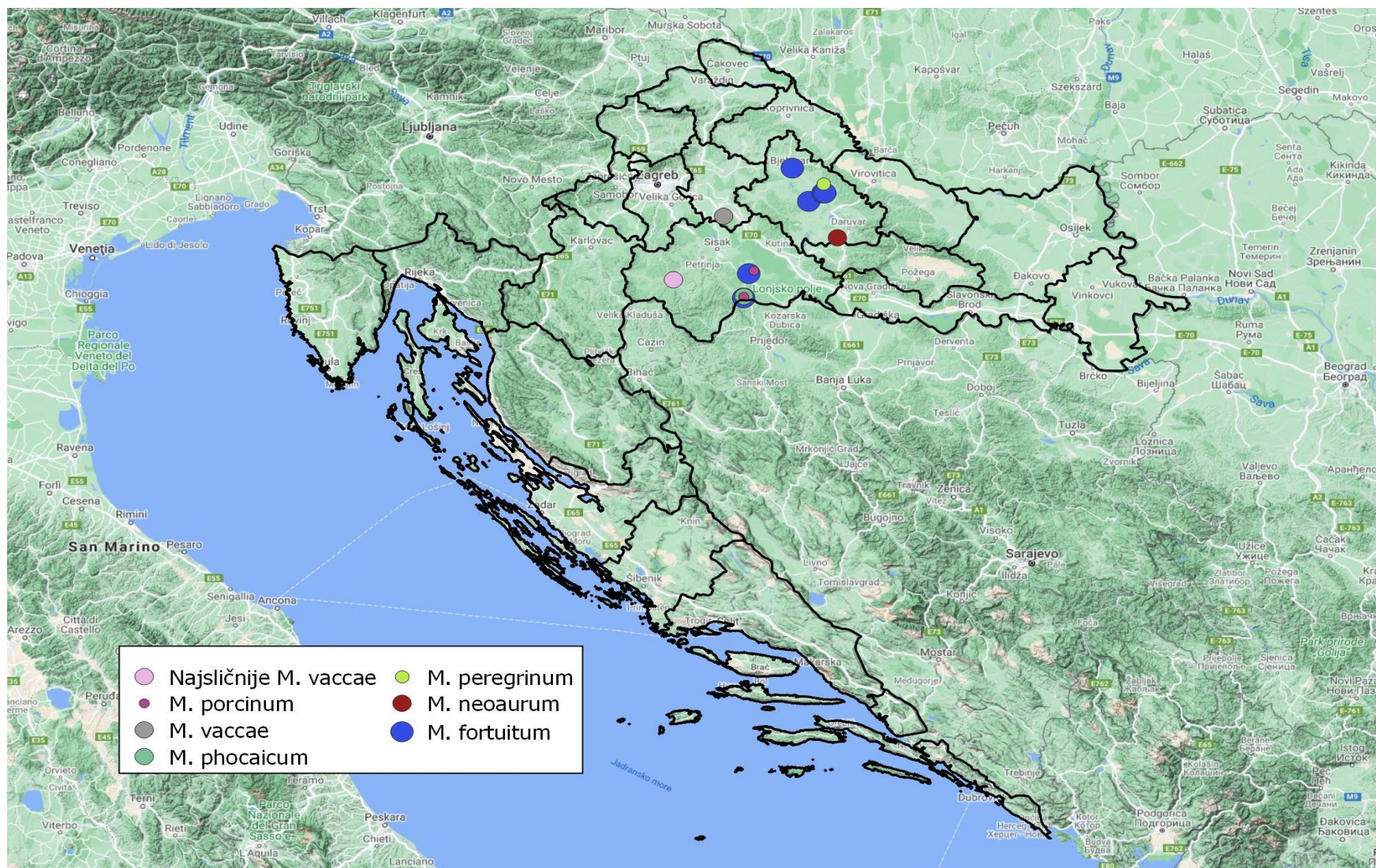
Na imipenem (IMI), antibiotik skupine karbapenema, ukupno 61 (70,1%) izolat bio je osjetljiv (8 izolata iz goveda, 1 iz svinje, 1 iz kokoši, 1 iz ovce, 16 iz divljih svinja, 34 iz srna), 23 (26,4%) umjereno osjetljivo (3 iz goveda, 14 iz divljih svinja, 6 iz srna) i tri (3,5%) otporno (1 iz goveda, 2 iz divljih svinja) (Slika 25.).

Na tetracikline, tj. na doksiciklin (DOX) ukupno 61 (70,1%) izolat bio je osjetljiv (10 izolata iz goveda, 1 iz ovce, 1 iz kokoši, 22 iz divljih svinja, 27 iz srna), 17 (19,5%) umjereno osjetljiva (2 iz goveda, 5 iz divljih svinja, 10 iz srna) i 9 (10,4%) otporno (1 iz svinje, 5 iz divljih svinja, 3 iz srna), dok je na minociklin (MIN) ukupno 65 (74,7%) izolata bilo osjetljivo (10 iz goveda, 1 iz ovce, 1 iz kokoši, 22 iz divljih svinja, 31 iz srna), 16 (18,4%) umjereno osjetljivo (2 iz goveda, 7 iz divljih svinja, 7 iz srna) i 6 (6,9%) otporno (2 iz goveda, 6 iz divljih svinja, 6 iz srna) (Slika 26.).

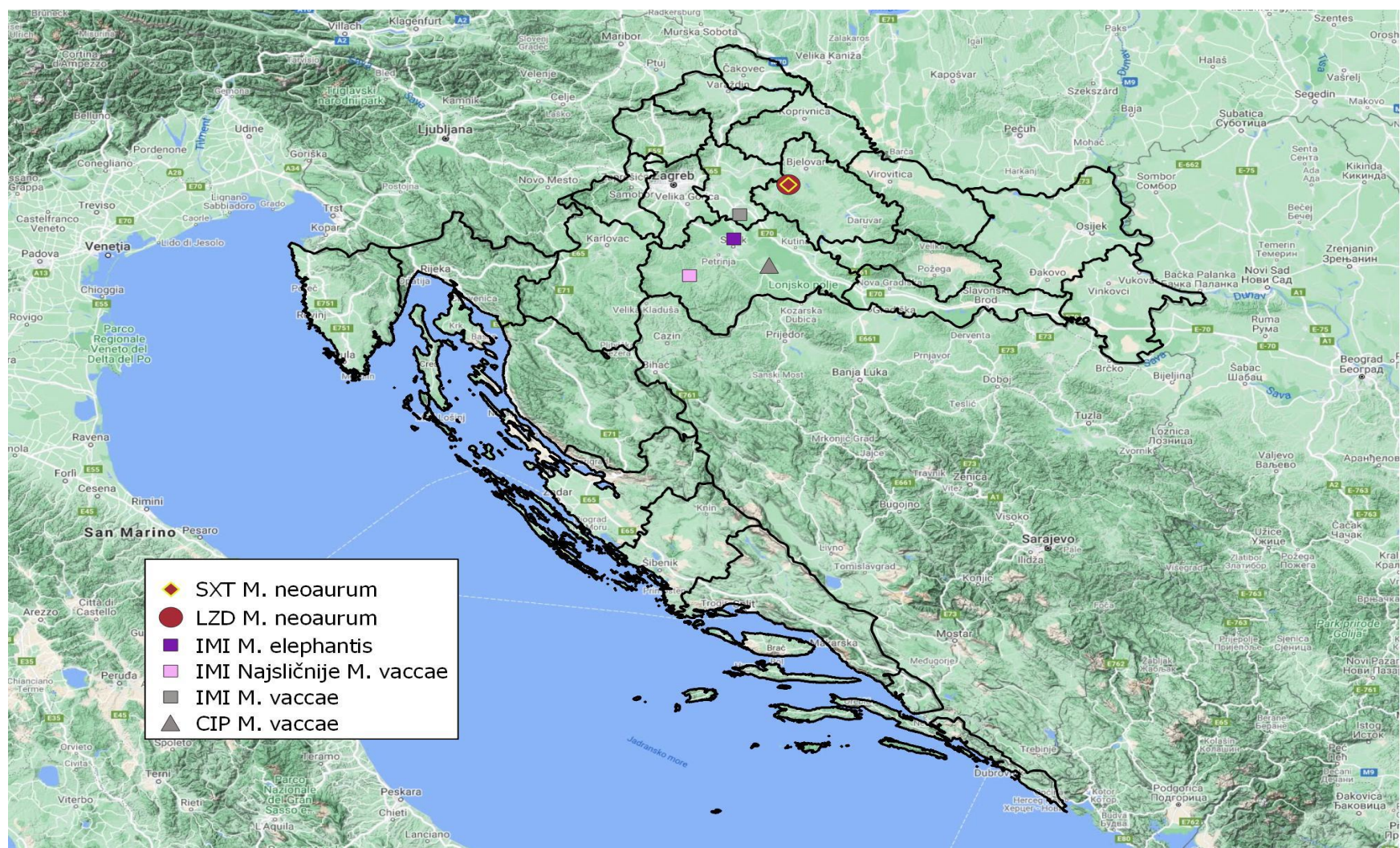
Na antibiotik skupine makrolida klaritromicin (CLA) ukupno 64 (73,5%) izolata je bilo osjetljivo (7 izolata iz goveda, 1 iz kokoši, 1 iz ovce, 20 iz divljih svinja, 35 iz srna), tri (3,5%) umjereno osjetljivo (po 1 izolat iz goveda, divlje svinje i srne) i 20 (23%) otporno (4 iz goveda, 1 iz svinje, 11 iz divljih svinja, 4 iz srna) (Slika 27.).

Na skupinu penicilina, amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG) ukupno 46 (52,9%) izolata je bilo osjetljivo (4 izolata iz goveda, 1 iz ovce, 1 iz kokoši, 16 iz divljih svinja, 24 iz srna), dok je njih 14 (16,1%) bilo umjereno osjetljivo (4 iz goveda, 7 iz divljih svinja, 3 iz srna), a 27 (31%) otporno (4 iz goveda, 1 iz svinje, 9 iz divljih svinja, 13 iz srna) (Slika 28.).

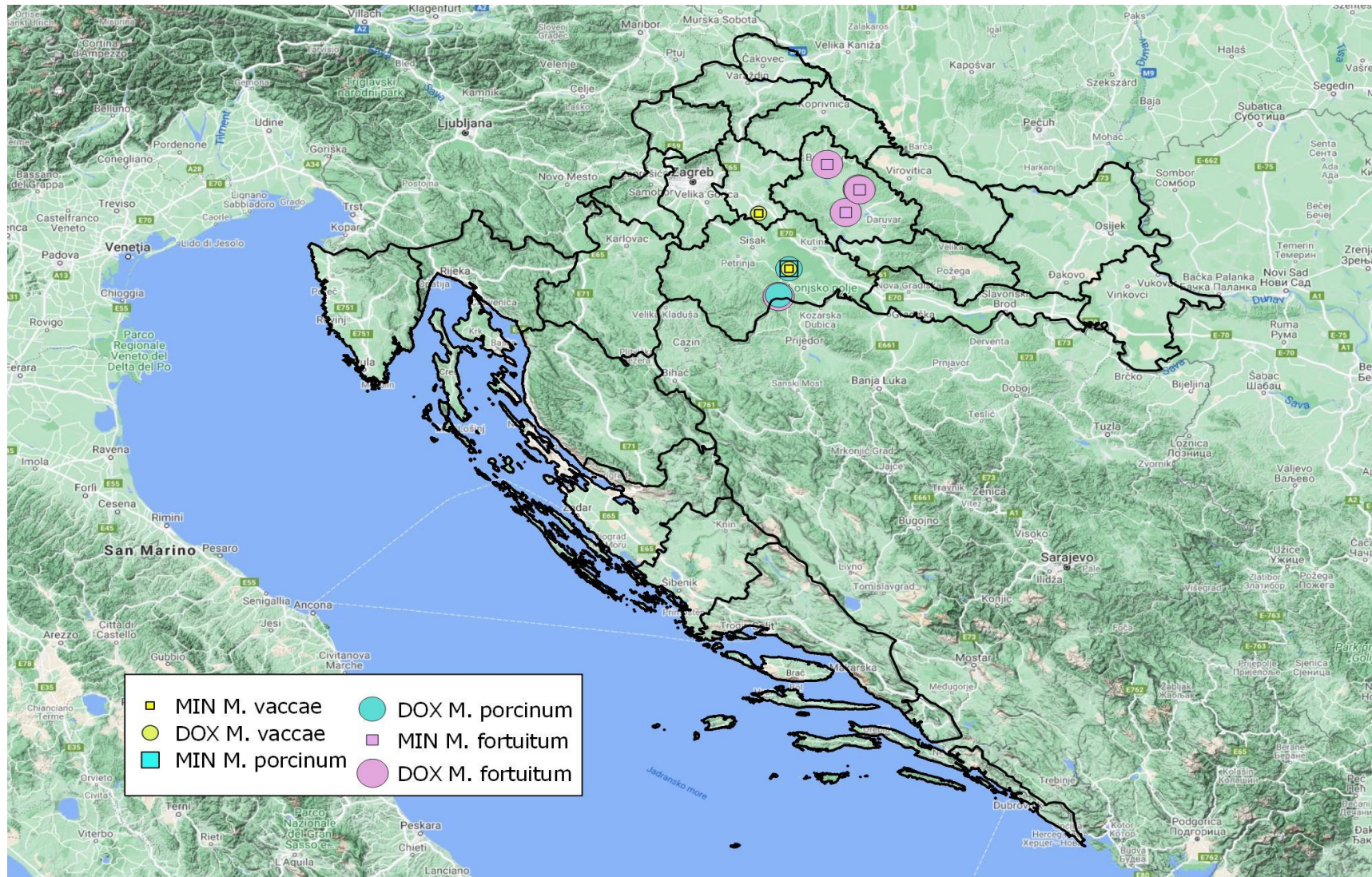
Najveću otpornost opisali smo unutar skupine cefalosporina, i to na cefepim (FEP) na koji je bilo otporno ukupno 50 (57,5%) izolata (6 izolata iz goveda, 1 iz svinje, 1 iz ovce, 12 iz divljih svinja, 30 iz srna), 12 (13,8%) ih je bilo umjereno osjetljivo (1 iz kokoši, 7 iz divljih svinja, 4 iz srna), a 25 (28,7%) osjetljivo (6 iz goveda, 13 iz divljih svinja, 6 iz srna) (Slika 29.). Nadalje, ukupno 41 (47,2%) izolat bio je otporan (2 izolata iz goveda, 1 iz svinje, 17 iz divljih svinja i 21 iz srna) na cefriakson (AXO), 23 (26,4%) je bilo umjereno osjetljivo (1 iz goveda, 1 iz ovce, 1 iz kokoši, 8 iz divljih svinja, 12 iz srna) i 23 (26,4%) osjetljivo (9 iz goveda, 7 iz divljih svinja, 7 iz srna) (Slika 30.). Na cefoksitin (FOX), samo tri (3,5%) izolata su bila otporna (1 izolat iz goveda, 2 iz srna), dok ih je 10 (11,5%) bilo umjereno osjetljivo (3 iz goveda, 1 iz svinje, 4 iz divljih svinja, 2 iz srna), a 74 (85%) osjetljivo (8 iz goveda, 1 iz ovce, 1 iz kokoši, 28 iz divljih svinja, 36 iz srna) (Slika 30.).



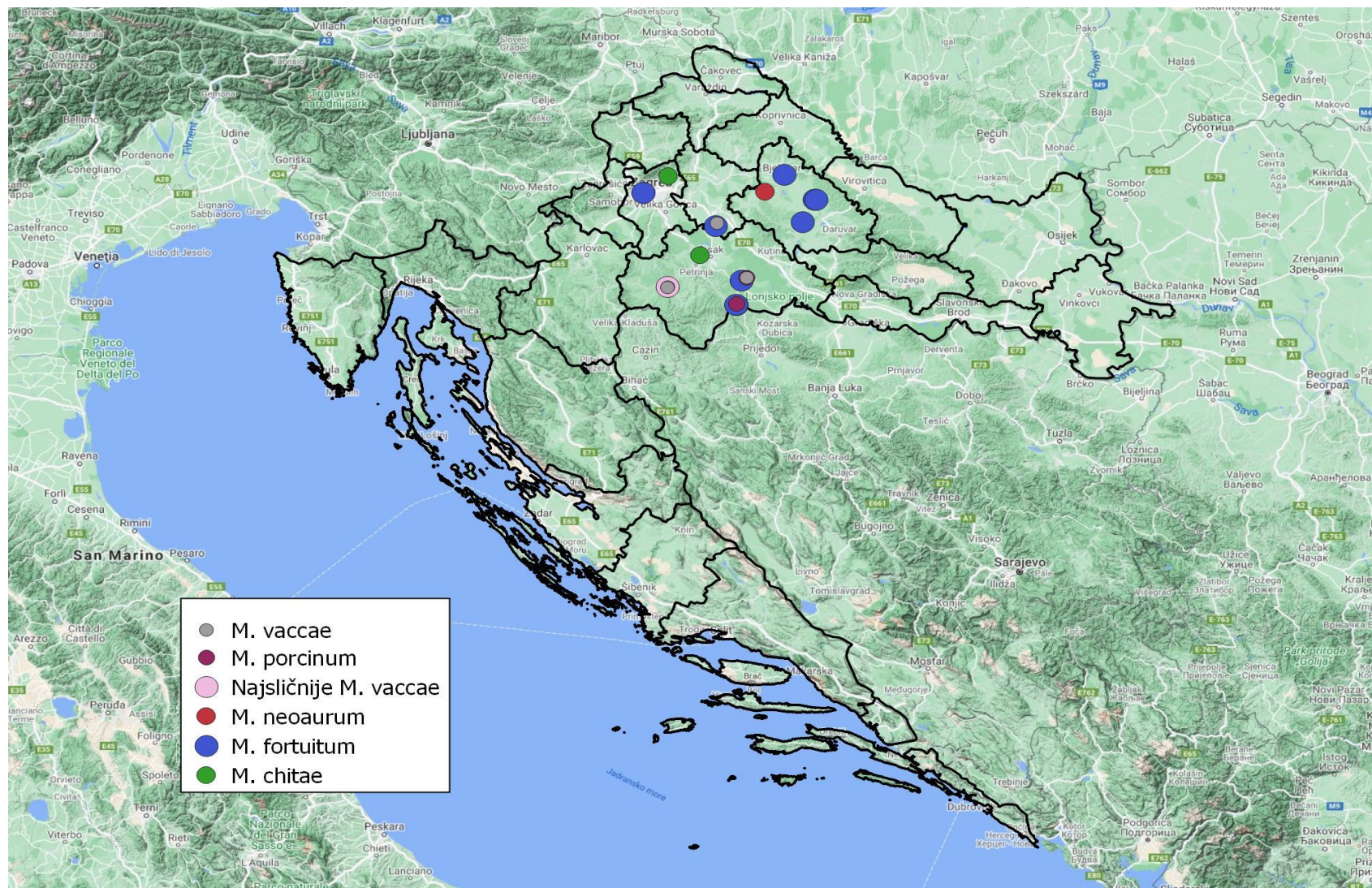
Slika 24. Geografski prikaz sojeva brzorasućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na tobramicin (TOB)



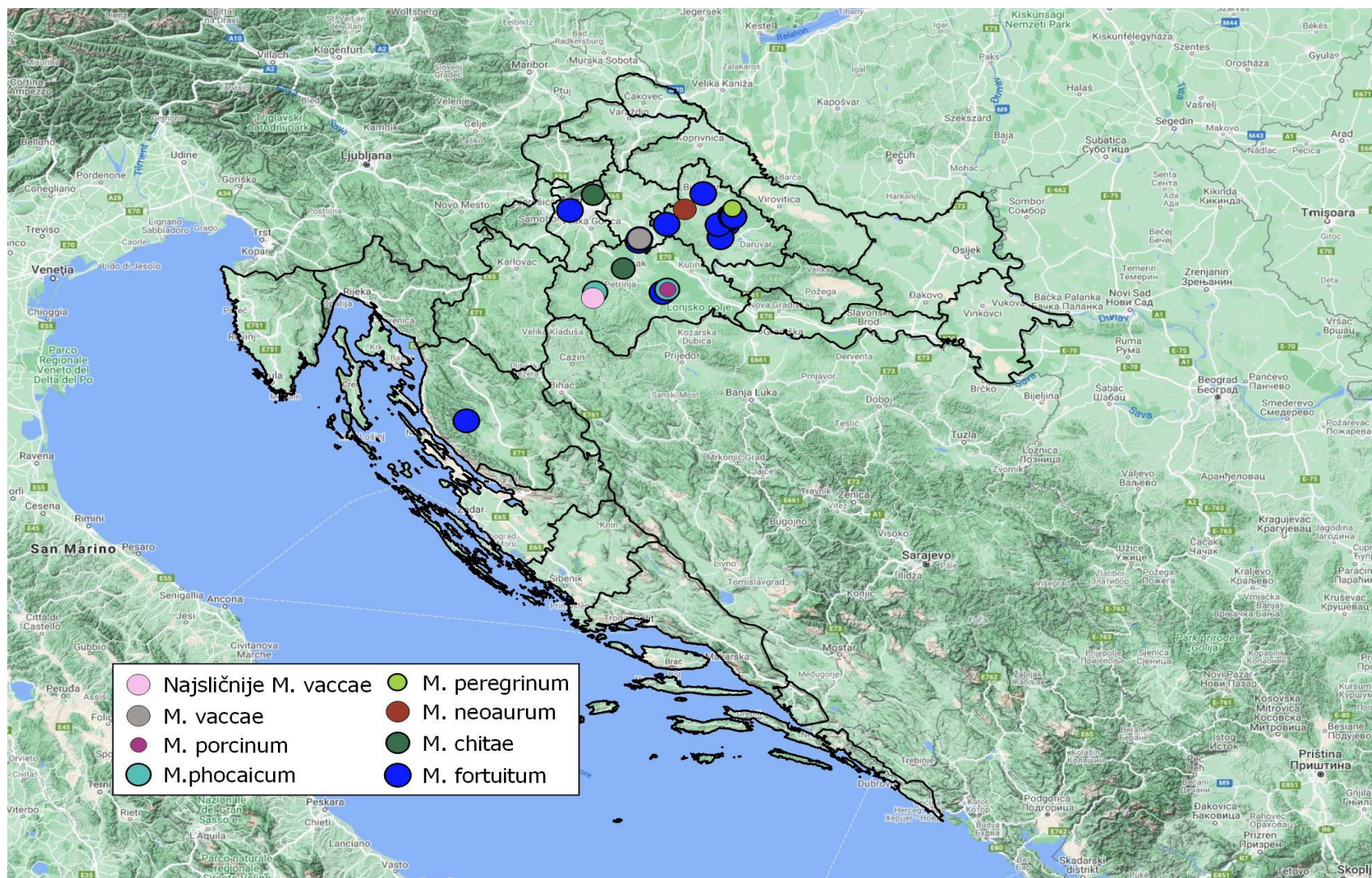
Slika 25. Geografski prikaz sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), linezolid (LZD), imipenem (IMI) i ciprofloksacin (CIP)



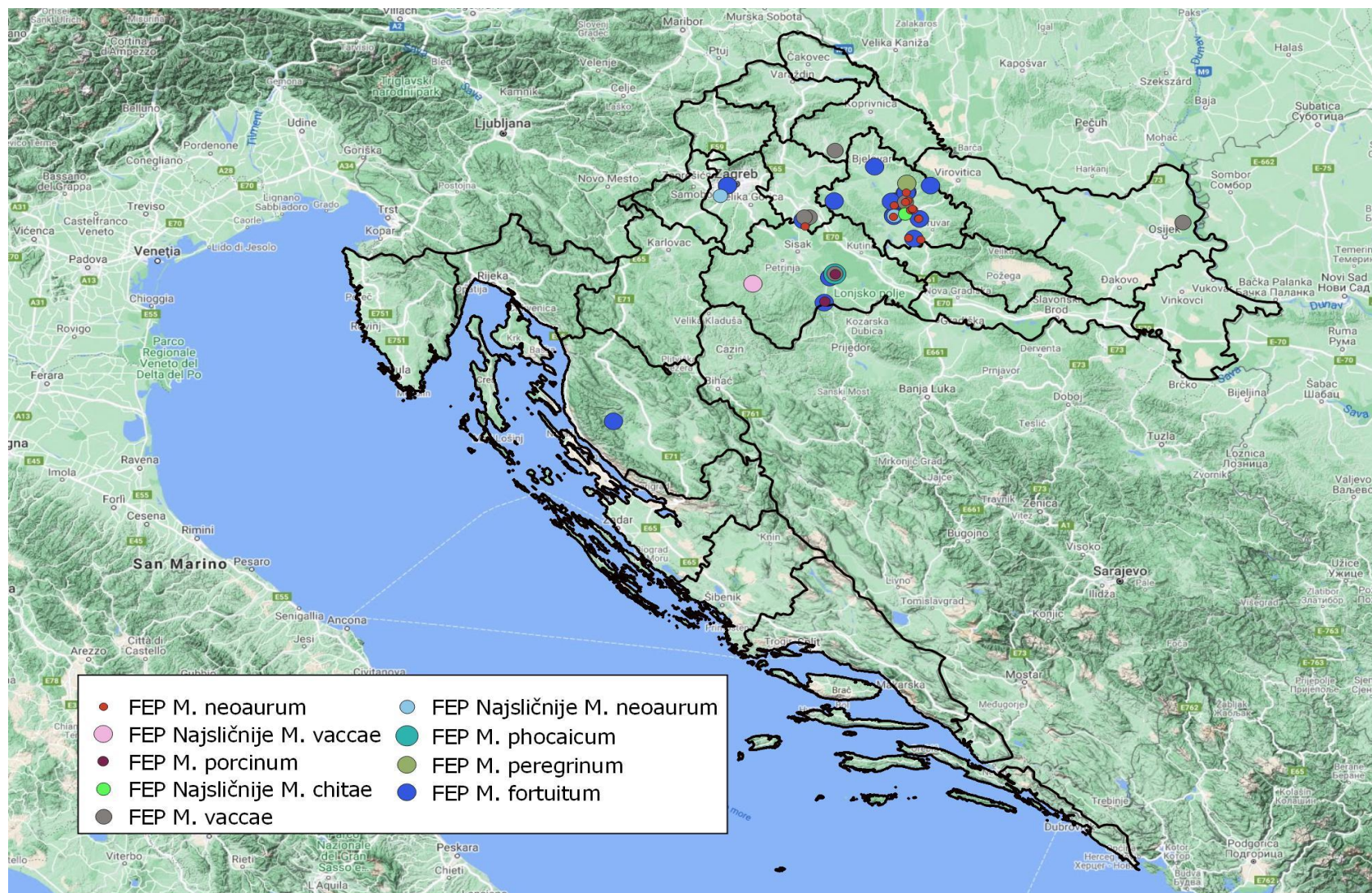
Slika 26. Geografski prikaz sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na doksiciklin (DOX) i minociklin (MIN)



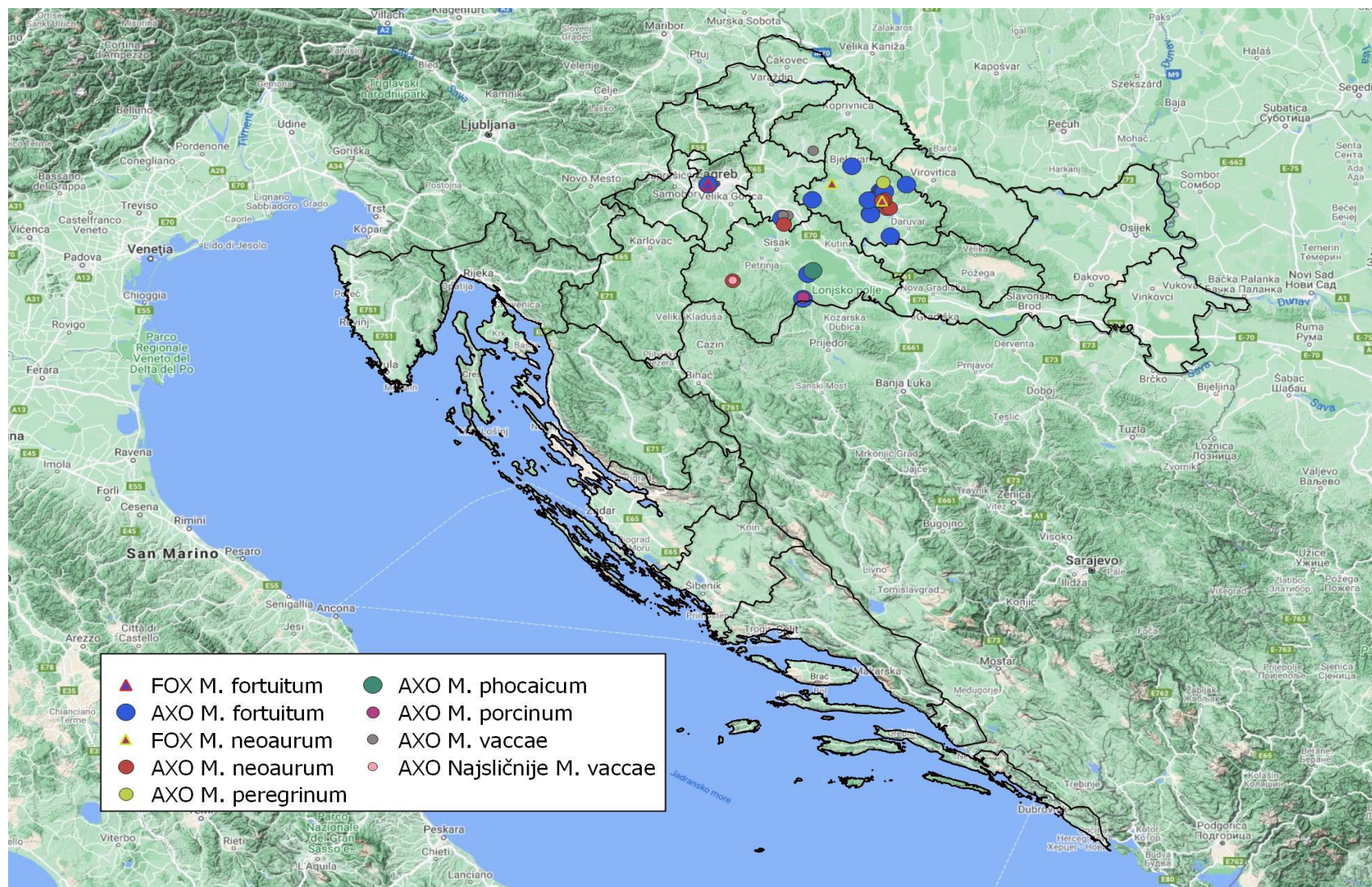
Slika 27. Geografski prikaz sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na klaritromicin (CLA)



Slika 28. Geografski prikaz sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na amoksicilin/klavulonsku kiselinu (AUG)



Slika 29. Geografski prikaz sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na cefepim (FEP)



Slika 30. Geografski prikaz sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija otpornih na cefriakson (AXO) i cefoksitin (FOX)

5.2.6.2.3 Usporedba osjetljivosti brzo i spororastućih mikobakterija prema antimikrobnim tvarima

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti ne obuhvaća iste antibiotike za sporo i brzorastuće mikobakterije, ali provodi se na sedam istih antibiotika kako je navedeno u tablici 40. Usporedbom osjetljivosti brzo i spororastućih mikobakterija prema tim antimikrobnim tvarima uočili smo statistički značajne razlike. Svi pretraženi izolati spororastućih mikobakterija osjetljivi su na klaritromicin (CLA) dok je među brzorastućim vrstama 20 izolata (23%) otporno. Uočene razlike između brzo i spororastućih mikobakterija u osjetljivosti prema CLA statistički su značajne ($p < 0.001$). Statistički značajna razlika uočljiva je i kada je u pitanju razlika u osjetljivosti prema linezolidu (LZD), doksiciklinu (DOX), fluorokinolonima moksifloksacinu (MXF) i ciprofloksacinu (CIP), trimetoprim/sulfametoksazolu (SXT) i amikacinu (AMI), gdje je udio otpornih sojeva prema svim navedenim antibioticima izraženiji u spororastućih mikobakterija.

Tablica 40. Usporedba rezultata ispitivanja antimikrobne osjetljivosti prema antimikrobnim tvarima testiranim za sporo i brzorastuće mikobakterije

Antibiotik		Brzorastuće	Spororastuće	P
CLA	S	64	44	<0.001
	R	20	0	
	I	3	0	
LZD	S	84	13	<0.001
	R	1	27	
	I	2	0	
DOX	S	61	3	<0.001
	R	9	20	
	I	17	0	
MXF	S	87	8	<0.001
	R	0	34	
	I			

CIP	S	83	6	<0.001
	R	1	17	
	I	3	0	
SXT	S	86	9	<0.001
	R	1	17	
	I			
AMI	S	86	35	0.027
	R	0	3	
	I	1	0	

S (engl. susceptible) – osjetljiv, I (engl. intermediate) – umjereno osjetljiv, R (engl. resistant) – otporan

6 RASPRAVA

U razdoblju od 2014. do 2016. godine na prisutnost *Mycobacterium* sp. bakteriološki smo pretražili ukupno 593 uzorka različitih organa i tkiva podrijetlom iz 153 životinja iz 14 županija i Grada Zagreba. Pripadnike roda *Mycobacterium* izdvojili smo iz ukupno 80 životinja (52%), i to 29 (36,2%) domaćih i 51 (63,7%) divlje životinje, a izdvojili smo ukupno 84 izolata. U istraživanje je također bio uključen 71 arhivski izolat netuberkuloznih mikobakterija podrijetlom iz 22 (31%) domaće i 49 (69%) divljih životinja iz 9 županija i Grada Zagreba. Od ukupno navedenih 155 izolata, 106 (68,4%) je pripadnika brzorastućih mikobakterija, a 49 (31,6%) je spororastućih mikobakterija. Pripadnici brzorastućih mikobakterija bili su zastupljeniji u divljih životinja iz kojih smo izdvojili 88 (83%) izolata, dok smo u domaćih životinja izdvojili ukupno 18 (17%) izolata. Pripadnici spororastućih mikobakterija bili su pak zastupljeniji u domaćih životinja kod kojih smo izdvojili ukupno 33 (67,3%) izolata, dok smo kod divljih životinja izdvojili njih 16 (32,7%).

Dokazivanje pripadnosti rodu *Mycobacterium* izdvojenih izolata započeli smo metodom lančane reakcije polimerazom umnožavanjem regije 16S rRNK gena i gena koji kodira 65 kD antigen prisutnih u svih mikobakterija, a tipične produkte umnožavanja utvrdili smo u svih 155 izolata. Nadalje, dokazivanje vrsta navedenih izolata nastavili smo metodom specifične hibridizacije pomoću testova "Geno Type® *Mycobacterium* CM i AS" (Hain Lifescience, Nehren, Njemačka). Navedenim testovima uspješno smo tipizirali 61 (39,4%) izolat do razine vrste, dok je za preostalih 94 izolata samo potvrđena pripadnost rodu *Mycobacterium*. Navedena metoda hibridizacije trenutno je jedina metoda u Republici Hrvatskoj koja se koristi u svrhu dokazivanja klinički značajnih mikobakterija kako u veterinarskoj tako i u humanoj medicini. Iako je specifičnost i osjetljivost metode vrlo visoka (70 - 80 %), a nespecifične reakcije vrlo rijetke (TORTOLI i sur., 2001., TORTOLI, 2003.), njome se može identificirati svega 40-ak vrsta od njih 200-njak dosada opisanih. Brzina rasta mikobakterijskih vrsta utječe na osjetljivost na antimikrobne lijekove kao i na kliničke znakove i patološke promjene zahvaćenog organizma (TORTOLI, 2003; CLSI, 2018b), te je točna identifikacija do razine vrste neophodna za kasnije određivanje antimikrobne otpornosti i odabir terapije u liječenju infekcija netuberkuloznim mikobakterijama u humanoj medicini.

Nakon tipizacije prethodno navedenom hibridizacijskom metodom, sve izdvojene izolate kojima je potvrđena pripadnost *M. avium* kompleksu podvrgnuli smo amplifikaciji integriranog insercijskog slijeda IS901 radi određivanja podvrste. Pripadnost *M. avium*

kompleksu dokazali smo u 18 (11,6%) izolata, od kojih je 10 izolata pripadalo *M. avium* subsp. *hominissuis*, a 8 izolata *M. avium* subsp. *avium*.

Kod preostala 94 izdvojena izolata u kojih se pripadnost vrsti nije mogla odrediti prethodno navedenim metodama umnožili smo dijelove DNK sekvenci najkonzerviranijih regija, 16S rRNK, *rpoB*, *hsp65* gena, te međugenske ITS regije. Sekvenciranje gena u novije vrijeme smatra se zlatnim standardom za identifikaciju vrsta roda *Mycobacterium* (KIM i SHIN, 2018.). Gen 16S rRNK najčešće je upotrebljavan za identifikaciju bakterijskih vrsta i prvi je izbor za analizu sekvenci. Međutim, ovaj gen ima vrlo slične sekvence u različitim vrstama mikobakterija, te možda neće razlikovati usko povezane vrste (DOBNER i sur., 1996., ROTH i sur., 1998., TORTOLI, 2003., CLARRIDGE, 2004.,). Kako bi se prevladala ta ograničenja, u novije vrijeme sve se više koriste i drugi geni poput *hsp65* i *rpoB* gena za točnu identifikaciju NTM-a. Jedini nedostatak je što da sada nisu točno definirani interpretacijski kriteriji za navedene gene. U našem istraživanju dobivene sekvence smo analizirali i usporedili sa sekvencama dostupnim u međunarodnoj bazi podataka GenBank. Prilikom usporedbe sekvenci slijedili smo objavljene smjernice Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI, 2018b), no one predlažu interpretacijske kriterije za procjenu identiteta samo za 16S rRNK gen, dok za preostale gene oni do danas nisu utvrđeni kako je već ranije navedeno. U našem istraživanju navedene smjernice smo također koristili prilikom usporedbe preostalih gena, tj. *rpoB*, *hsp65* gena i ITS regije. Pa se tako dobivena sekvenca mora preklapati u postotku od 100% sa poznatom sekvencom iz baze podataka kako bi sa sigurnošću mogli tvrditi da izolat pripada određenoj vrsti mikobakterije. Ako je dobiveni postotak podudarnosti iznosio do 99% izolat smo identificirali kao "Najsličniji" određenoj vrsti mikobakterije, a sve izolate čiji je postotak podudarnosti iznosio 98,9% i manje nismo uspjeli identificirati. Međusobnom usporedbom rezultata dobivenih analizom navedena četiri gena, pripadnost vrsti uspješno smo odredili za 68 izolata što od ukupnog broja pretraženih izolata (94 izolata) iznosi 72,3%. Devet izolata opisali smo kao "Najsličnije *Mycobacterium* + vrsta", dok za preostalih 17 izolata vrstu nismo uspjeli odrediti, te postoji mogućnost da se radi o dosada neopisanim vrstama mikobakterija. Dobiveni postotak uspješne identifikacije do razine vrste pomoću gena 16S rRNK iznosio je 42,3% (45/94 izolata), *hsp65* gena 19,7% (21/94 izolata), *rpoB* gena 18,9% (20/94 izolata) i ITS regije 2,8% (3/94 izolata). Iz navedenih rezultata možemo vidjeti da kombiniranom usporedbom sekvenci više gena i to po najstrožim kriterijima usporedbe, možemo uspješno identifikirati visoki postotak NTM-a. U nedavnoj studiji autori pak opisuju postotak uspješne identifikacije do razine vrste pomoću gena 16S rRNK od 71.13%, *hsp65* gena 86.79% i *rpoB* gena 81.55% (KIM i SHIN, 2018.).

Tako je postotak uspješne identifikacije kombiniranom analizom navedena tri gena iznosila 97,25%. Međutim, autori u navedenoj studiji držali su se slijedećih interpretacijskih kriterija: za 16S rRNK gen podudarnost sekvenci do 99% smatrali su dovoljnom za identifikaciju do razine vrste, dok su za *hsp65* i *rpoB* gen podudarnost do 96.0% smatrali dovoljnom za identifikaciju. KIM i sur. (1999.) navode kako je analizom *rpoB* gena raznolikost sekvenci između sojeva unutar iste vrste mikobakterija vrlo malena, od 0 - 1%. Nadalje, ROTH i sur. (1998.) usporedbom sekvenci ITS regije navode raznolikost sekvenci od 0 - 2% između sojeva istih vrsta mikobakterija. Drugi autori pak opisuju nemogućnost identifikacije određenih vrsta mikobakterija analizom samo *hsp65* gena, te opisuju *hsp65* gen kao manje diskriminirajući od 16S rRNK gena (LEE i sur., 2004.). RINGUET i sur. (1999.) navode kako je analizom *hsp65* gena raznolikost sekvenci manja od 2% unutar različitih vrsta mikobakterija, dok JOAO i sur. (2014.) navode kako je podudarnost sekvenci do 97% za taj isti gen dovoljna za identifikaciju do razine vrste. Iz očitih razlika u interpretaciji te nedostupnih interpretacijskih kriterija za navedene gene, smatrali smo da je potrebna podudarnost sekvenci od 100% za sve testirane gene kako bi sa sigurnošću mogli identificirati izolat do razine vrste. Zbog priloženih razlika generalno smo suočeni s problemima u tumačenju rezultata. Stoga je neophodno u budućnosti stvoriti standardiziranu bazu podataka i odgovarajuće interpretacijske smjernice za određene gene kako što točnije mogli identifikirati NTM-e.

U našem istraživanju dokazali smo 20 različitih vrsta netuberkuloznih mikobakterija i šest "Najsličnijih" vrsta. Najzastupljenija vrsta bila je *M. fortuitum* koju smo dokazali u 27 izolata, zatim *M. neoaurum* dokazana u 25 izolata, *M. avium* ssp. u 18 izolata i *M. vaccae* u 14 izolata. Slijede vrste *M. celatum* dokazana u osam izolata, *M. phocaicum* u sedam izolata, *M. chitae* i *M. nonchromogenicum* svaka dokazana u četiri izolata, *M. triviale*, *M. gordonae* i *M. kansasii* svaka u tri izolata, *M. arupense*, *M. flavescens*, *M. intermedium* i *M. porcinum* svaka u dva izolata, te *M. agri*, *M. elephantis*, *M. kumamotoense*, *M. peregrinum* i *M. pulveris* svaka dokazana u jednom izolatu. Također smo dokazali vrste "Najsličnije *M. chitae*", "Najsličnije *M. neoaurum*" i "Najsličnije *M. nonchromogenicum*" od kojih je svaka dokazana u dva izolata, te "Najsličnije *M. septicum*", "Najsličnije *M. flavescens*" i "Najsličnije *M. vaccae*" svaka dokaza u jednom izolatu. Studija provedena u Republici Hrvatskoj u domaćih svinja opisuje *M. avium* ssp. kao najčešći izolat (*M. avium* subsp. *hominissuis* zastupljeniji od *M. avium* subsp. *avium*), slijedi *M. fortuitum*, *M. chelonae* i *M. peregrinum* (CVETNIĆ i sur., 2007.). Slične rezultate također opisuje studija provedena u domaćih svinja gdje je *M. avium* ssp. također najčešći izolat (*M. avium* subsp. *hominissuis* u većini izolata), slijede izolati

pripadnici *M. tuberculosis* kompleksa, *M. fortuitum* i *M. peregrinum*, dok kod 2 izolata identifikacija vrste nije uspjela. Ista studija opisuje i izolate *M. avium* subsp. *hominissuis* u divlje svinje, jelena i čovjeka (ŠPIČIĆ i sur., 2010.). Nadalje, studija provedena u divljih svinja opisuje također *M. avium* subsp. *hominissuis* kao najčešći izolat i to u svih izolata, slijedi *M. fortuitum* i *M. gordonae*, te autori opisuju *M. avium* subsp. *hominissuis* kao najzastupljeniju vrstu mikobakterija kako u domaćih svinja tako i u divljih svinja u Hrvatskoj (CVETNIĆ i sur., 2011.). Slijedeća studija pak opisuje izolate *M. avium* ssp. kao najčešće i to *M. intracellulare*, slijede *M. fortuitum*, *M. chelonae* i *M. terrae* (CVETNIĆ i sur., 1998.). U našem istraživanju u domaćih svinja je najzastupljenija vrsta također bila *M. avium* subsp. *hominissuis*, slijede vrsta *M. triviale* koja nije opisana u prethodno navedenim studijama, te *M. fortuitum*. U divljih svinja pak nismo dokazali niti jedan *M. avium* ssp. izolat za razliku od prethodne studije koja opisuje upravo tu vrstu kao najzastupljeniju (CVETNIĆ i sur., 2011.). U naših izolata podrijetlom iz divljih svinja najzastupljenija je bila vrsta *M. vaccae*, slijede *M. phocaicum*, *M. fortuitum*, *M. celatum*, *M. neoaurum*, *M. arupense*, *M. porcinum*, zatim *M. flavescens*, *M. intermedium*, *M. agri*, *M. pulveris*, te "Najsličnije *M. flavescens*", "Najsličnije *M. nonchromogenicum*" i "Najsličnije *M. vaccae*". Nadalje, u srna smo opisali *M. neoaurum* kao najzastupljeniju vrstu, slijede *M. fortuitum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. kansasii*, "Najsličnije *M. chitae*", te *M. nonchromogenicum*, *M. triviale*, *M. peregrinum*, *M. vaccae*, "Najsličnije *M. neoaurum*" i "Najsličnije *M. septicum*". Na području Republike Hrvatske, kako je ranije navedeno dosada je opisan samo jedan izolat *M. avium* subsp. *hominissuis* u jelena (ŠPIČIĆ i sur., 2010.). U izolata izdvojenih iz goveda, kao najzastupljeniju vrstu opisali smo *M. fortuitum*, slijede *M. avium* ssp. (*M. avium* subsp. *hominissuis* i subsp. *avium*) i *M. chitae*, zatim *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum* i *M. vaccae*, te *M. flavescens*, *M. intermedium*, *M. kansasii*, *M. kumamotoense*, *M. elephantis* i "Najsličnije *M. nonchromogenicum*". U goveda u Republici Hrvatskoj dosada je opisana vrsta *M. terrae* kao najzastupljenija, slijede *M. gordonae*, *M. peregrinum*, *M. chitae*, *M. nonchromogenicum*, *M. parafortuitum*, *M. vaccae* i *M. thermoresistibile* (ŠPIČIĆ i sur., 2011.). Također opisali smo vrstu *M. avium* subsp. *avium* kao najzastupljeniju u kokoši i patke, te vrstu *M. neoaurum* u kokoši kao i izolat "Najsličnije *M. neoaurum*" u ovce. U ovih vrsta životinja do sada netuberkulozne mikobakterije na području Republike Hrvatske nisu opisane. Od ukupno 20 različitih vrsta koje smo opisali u našem istraživanju, 10 vrsta izdvojili smo i u domaćih i divljih životinja i to vrste *M. fortuitum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. triviale*, *M. celatum*, *M. nonchromogenicum*, *M. vaccae*, *M. flavescens*, *M. intermedium*, *M. kansasii* i *M. neoaurum*, te "Najsličnije *M. nonchromogenicum* i *M. neoaurum*", što nam ukazuje na

moću ulogu divljih životinja kao rezervoara netuberkuloznih mikobakterija te prijenos infekcije na domaće životinje. Nadalje, navedeni rezultati indikacija su prisutnosti navedenih vrsta u konkretnim ekosustavima te ih se mora ubrojiti kao potencijalne patogene i za čovjeka.

U studiji provedenoj u hrvatskih građana na temelju izdvajanja netuberkuloznih mikobakterija iz respiratornih uzoraka autori opisuju vrstu *M. gordonae* kao najčešći izolat, slijedi *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. avium* ssp., *M. abscessus*, *M. intracellulare* i *M. kansasii* (JANKOVIĆ i sur., 2013.). Nadalje, druga studija također provedena u humanoj medicini opisuje *M. gordonae* kao najčešći izolat, zatim slijedi *M. fortuitum*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae* i *M. xenopi* (ZLOJTRO i sur., 2015.). Od navedenih vrsta izdvojenih iz humanih izolata, pet vrsta dokazali smo i u našem istraživanju i to *M. fortuitum*, *M. avium* spp., *M. kansasii*, *M. gordonae* i *M. nonchromogenicum*, što nam ukazuje na zoonotski potencijal, te mogućnost prijenosa infekcije sa životinja na ljude.

Svih 138 izolata kojima smo uspješno dokazali vrstu ili "Najsličniju" vrstu podvrgnuli smo ispitivanju osjetljivosti na lijekove, tj. antimikrobnoj otpornosti koju smo proveli tehnikom mikrodilucije u bujonu korištenjem VersaTREK kit-a (TREK Diagnostic System, Cleveland, Ohio, SAD) za brzo i spororastuće mikobakterije. Tumačenje rezultata proveli smo prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI, 2018a i b). Kod preostalih 17 izolata kojima nismo uspjeli odrediti vrstu, ispitivanje nismo proveli iz razloga što sa sigurnošću ne možemo tvrditi da li izolati pripadaju brzo ili spororastućim mikobakterijama, što je od izuzetne važnosti za provođenje navedenog ispitivanja. Prema našim saznanjima u literaturi nisu dostupni podaci o antimikrobnoj osjetljivosti izolata netuberkuloznih mikobakterija izdvojenih iz životinja, te smo u nastavku teksta naše izolate i sporo i brzorastućih mikobakterija usporedili s izolatima izdvojenim iz ljudi na svjetskoj razini i time uvidjeli na zoonotski potencijal, te ulogu životinja kao rezervoara multirezistentnih sojeva netuberkuloznih mikobakterija.

Ispitali smo ukupno 47 izolata spororastućih mikobakterija, a uspješno smo očitali rezultate kod 44 ispitana izolata. Ispitivanje osjetljivosti brzorastućih mikobakterija proveli smo za ukupno 91 izolat, dok smo uspješno očitali rezultate za ukupno 87 ispitanih izolata. Ispitivanje smo proveli na ukupno devet različitih vrsta spororastućih mikobakterija i jednoj "Najsličnijoj", i to *M. avium* spp., *M. celatum*, *M. flavescens* i "Najsličnije *M. flavescens*", *M. gordonae*, *M. intermedium*, *M. kansasii*, *M. kumamotonense*, *M. nonchromogenicum* i *M. triviale*.

Svih 18 izolata pripadnika *M. avium* ssp., od kojih je 16 izdvojeno iz domaćih (4 iz goveda, 6 iz svinja, 4 iz kokoši, 2 iz pataka) a dva iz divljih životinja (2 srne), bili su otporni

na moksifloksacin. Otpornost smo također ustanovili u jednog izolata na amikacin, te 15 izolata na linezolid. Linezolid i moksifloksacin su jedni od preporučenih antibiotika koji se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih vrstama *M. avium* ssp. u humanoj medicini (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.), a koriste se kao lijekovi druge linije u slučaju pojave otpornih sojeva na koje lijekovi prve linije nisu dali odgovor (CLSI 2018a, CLSI 2018b). Jedan od lijekova prve linije je i amikacin (CLSI 2018a, CLSI 2018b), a u našem istraživanju opisali smo izolat izdvojen iz patke koji je pokazao otpornost i na amikacin i oba antibiotika druge linije, a osjetljivost je pokazao samo na klaritromicin. Također je zabrinjavajuća činjenica visokog postotka otpornosti na oba antibiotika druge linije kod izdvojenih izolata u našem istraživanju, što nam ukazuje na zoonotski potencijal i opasnost od prijenosa multirezistentnih sojeva na čovjeka. Vrste pripadnici *M. avium* kompleksa odgovorne su za najveći broj plućnih bolesti čovjeka uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama u svijetu (PREVOTS i MARRAS, 2015., STOUT, 2016.). Noviji makrolidi, poput klaritromicina i azitromicina, zajedno sa amikacinom temelji su u antibiotskom liječenju MAC plućne bolesti, a oni su jedina antimikrobna sredstva za koja je u kontroliranim kliničkim ispitivanjima dokazana povezanost između in vitro testiranja i kliničkog odgovora (GRIFFITH i sur., 2007., BROWN-ELLIOTT i sur., 2013.).

Svih osam izolata vrste *M. celatum*, od kojih su tri izdvojena iz domaćih (iz goveda) a pet iz divljih životinja (iz divljih svinja), bili su otporni na pripadnike fluorokinolona moksifloksacin i ciprofloksacin, kao i na linezolid i doksiciklin. Na antibiotike skupine rifamicina, rifampin također su svi izolati bili otporni, dok je na rifabutin bio otporan samo jedan izolat. Otpornost je također pokazalo sedam izolata na trimetoprim – sulfametoksazol. Infekcije uzrokovane vrstom *M. celatum* opisane su u humanoj medicini u vidu plućnih oboljenja, kod imunokompromitiranih osoba (CHAVARRIA i sur., 2018.). Isti autori opisuju uspješno liječenje te osjetljivost izdvojenog soja *M. celatum* na klaritromicin, ciprofloksacin i etambutol. Druga studija također opisuje osjetljivost izdvojenog soja na klaritromicin, ciprofloksacin i rifabutin, dok je na rifampin bio otporan (PIERSIMONI i sur., 2003.). Nadalje, JUN i sur. (2010.) također opisuju osjetljivost izdvojenog soja na klaritromicin i ciprofloksacin, a otpornost na rifampin, kao i PATSCHE i sur. (2014.) koji opisuju osjetljivost soja na amikacin, klaritromicin i moksifloksacin, a otpornost na rifampin i rifabutin. U svim navedenim studijama ciprofloksacin je korišten u protokolu liječenja, a sojevi *M. celatum* bili su osjetljivi na navedeni antibiotik. Međutim, u našem istraživanju svi izdvojeni sojevi pokazali su se otpornima na oba testirana fluorokinolona, moksifloksacin i ciprofloksacin. Također, LOCATELLI i sur. (2020.) opisuju uspješan protokol liječenja

koristeći klaritromicin, ciprofloksacin i linezolid, dok u našem istraživanju svi izolati pokazuju otpornost na ciprofloksacin i linezolid.

Izolati vrste *M. flavescens* izdvojen iz domaće (iz goveda) i "Najsličnije *M. flavescens*" izdvojen iz divlje životinje (iz divlje svinje) bili su otporni na rifampin, doksiciklin, kao i na antibiotik skupine flurorokinolona moksifloksacin. Iako se smatra da vrsta *M. flavescens* nije patogena za ljude (MILLER i sur., 2007.), dosad je opisano nekoliko slučajeva infekcije u imunokompromitiranih osoba. ALLEN i sur. (1993.) prvi su opisali infekciju uzrokovanu *M. flavescens* u vidu oboljenja mekih tkiva, zglobova, kostiju i pluća. Također, TORTOLI i sur. (2004.) opisuju *M. flavescens* u sinovijalnoj tekućini u bolesnika s artritismom, te osjetljivost izdvojenog izolata na klaritromicin, ciprofloksacin i etambutol. Drugi autor pak opisuje osteomijelitis uzrokovan ovom vrstom mikobakterije koja je pokazala otpornost na izoniazid i etambutol, a osjetljivost na streptomycin i rifampin (MASTROIANNI, 2003.). Naši izolati pokazali su otpornost na rifampin, dok rezultate za druge antibiotike navedene u prethodnoj studiji nismo mogli očitati.

Sva tri izolata vrste *M. gordonae* izdvojena iz goveda pokazala su otpornost na rifampin. Dva izolata bila su otporna na doksiciklin, a jedan izolat na ciprofloksacin i linezolid. Vrsta *M. gordonae* je široko zastupljena mikobakterija u okolišu i vrlo je često izdvojena iz vode iz slavine, a njena identifikacija vrlo se često smatra kontaminacijom (LALANDE i sur., 2001.). Unatoč ne virulentnoj prirodi, zabilježena su izvješća o klinički značajnoj bolesti u ljudi uzrokovanj *M. gordonae* u vidu plućnih oboljenja, oboljenja mekih tkiva, oka i diseminirane bolesti (WEINBERGER i sur., 1992.). Osim u imunokompromitiranih bolesnika opisana je kod djeteta sa mastoiditisom kod kojeg je liječenje uspješno provedeno izoniazidom, rifampinom, rifabutinom i klaritromicinom (MOLLOY i sur., 2008.). GRIFFITH i sur. (2007.) navode kako su etambutol, rifamicini, klaritromicin, linezolid i flourokinoloni najučinkovitiji antibiotici u liječenju infekcija uzrokovanih *M. gordonae*, dok su u našem istraživanju svi izolati bili otporni upravo na pripadnika rifamicina rifampin, a jedan izolat na linezolid i pripadnika fluorokinolona ciprofloksacin. Izdvajanje vrste *M. gordonae* u humanoj medicini pokazalo je veliki porast tijekom razdoblja ispitivanja s porastom od jednog opisanog slučaja u 1995. na 153 slučaja u 2006. godini (MOORE i sur., 2014.).

Izolati pripadnici vrste *M. intermedium* izdvojeni iz domaće (iz goveda) i divlje životinje (iz divlje svinje) pokazali su razlike u osjetljivosti. Tako je izolat iz domaće životinje bio otporan na rifampin, fluorokinolone moksifloksacin i ciprofloksacin, trimetoprim – sulfametoksazol, linezolid i doksiciklin, dok je izolat iz divlje bio osjetljiv na sve navedene

antibiotike. ITO i sur. (2005.) opisali su slučaj plućne infekcije u čovjeka uzrokovane *M. intermedium*, gdje se protokol liječenja koji je uključivao rifampin pokazao učinkovitim, a izolat je također bio osjetljiv i na fluorokinolone i klaritromicin. Međutim, u našem istraživanju jedan izolat bio je otporan upravo na te antibiotike, tj. na rifampin i fluorokinolone. Nadalje, opisan je i slučaj granulomatoznog dermatitisa u čovjeka uzrokovanog *M. intermedium* (EDSON i sur., 2006.).

Sva tri izolata vrste *M. kansasii*, od kojih je jedan izdvojen iz domaće (iz goveda) a dva iz divljih životinja (iz srna), bila su otporna na trimetoprim – sulfametoksazol i doksiciklin. Na rifampin jedan izolat je bio otporan, dok su na ciprofloksacin dva bila otporna. Od navedenih lijekova, rifampin, trimetoprim-sulfametoksazol i ciprofloksacin jedni su od preporučenih antibiotika koji se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih vrstom *M. kansasii* u humanoj medicini (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.). Rifampin je jedan od lijekova prve linije, dok su trimetoprim – sulfametoksazol, doksiciklin i ciprofloksacin lijekovi druge linije koji se koriste kod pojave otpornih sojeva na koje lijekovi prve linije nisu dali odgovor, te na koje smo opisali otpornost kod gotovo svih izolata (CLSI 2018a, CLSI 2018b). Vrsta *M. kansasii* jedna je od najčešće izdvojenih netuberkuloznih mikobakterija u čovjeka u europskim zemljama (MOORE i sur., 2014.). Vrsta je poznata prvenstveno kao plućni patogen, ali također su opisani slučajevi izvanplućne i diseminirane bolesti, te većina autora smatra da je ovo najpatogenija netuberkulozna mikobakterija (VAN INGEN i sur., 2009., WASSILEW i sur., 2016.). U humanoj medicini također su opisani rijetki slučajevi rifampin otpornih sojeva koji predstavljaju izazov u liječenju iz razloga što 38% bolesnika ne uspije dovršiti terapiju zbog alternativne terapije (GRIFFITH i sur., 2007.). Terapija fluorokinolonima, tj. ciprofloksacinom i moksifloksacinom smatra se učinkovitom premda je sve više opisa o pojavi otpornosti na jedan od tih antibiotika (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.), što je slučaj i u našem istraživanju.

Izolat vrste *M. kumamotonense* izdvojen iz domaće životinje (iz goveda) bio je otporan na rifabutin i rifampin, te na trimetoprim – sulfametoksazol. Dosada nije objavljeno mnogo studija o zastupljenosti i patogenosti ove vrste mikobakterija. TORTOLI i sur. (2013.) u svojem istraživanju opisuju izolate *M. kumamotonense* izdvojene iz kliničkih uzoraka iz ljudi kao jedne od najčešće izdvojenih. Opisan je jedan slučaj generalne limfadenopatije uzrokovane ovom vrstom mikobakterija gdje je izolat bio osjetljiv na rifampin (RODRÍGUEZ-ARANDA i sur., 2010.). Nadalje, *M. kumamotonense* izdvojena je i u pacijenta s plućnim oboljenjem, a izolat je bio osjetljiv na amikacin, klaritromicin, pripadnike rifamicina rifabutin i rifampin, fluorokinolone ciprofloksacin i moksifloksacin, te linezolid

(KONTOS i sur., 2016.). Također, TORTOLI (2014.) opisuje osjetljivost *M. kumamotonense* na amikacin, klaritromicin, rifampin, te fluorokinolone ciprofloksacin i moksifloksacin. Za razliku od prethodno navedenih istraživanja naš izolat je pokazao otpornost na oba pripadnika rifamicina, tj. i na rifabutin i rifampin.

Izolati vrste *M. nonchromogenicum* i *M. triviale* uključeni u naše istraživanje pripadnici su *M. terrae* kompleksa. Sva četiri izolata vrste *M. nonchromogenicum*, od kojih su tri izdvojena iz domaćih (iz goveda) a jedan iz divljih životinja (iz srne), bila su otporna na rifampin, kao i na pripadnike fluorokinolona moksifloksacin, dok su na ciprofloksacin tri izolata bila otporna. Na trimetoprim – sulfametoksazol također su tri izolata bila otporna, dok su dva izolata pokazala otpornost na linezolid, doksiciklin i na amikacin. U humanoj medicini dosada su opisani artritis, plućne bolesti, te meningitis uzrokovan vrstom *M. nonchromogenicum* kod imunosuprimiranih bolesnika ali i u ljudi bez kroničnih bolesti, a iskustva u liječenju ovih infekcija su vrlo ograničena (SMITH i sur., 2000., LAI i sur., 2008.). Od izdvojenih izolata vrste *M. triviale* od kojih su dva iz domaćih (iz svinja), a jedan iz divljih životinja (iz srne) pokazali su razlike u osjetljivosti. Izolat izdvojen iz divlje životinje bio je osjetljiv na sve testirane antibiotike, dok su oba izolata iz domaćih bila otporna na trimetoprim – sulfametoksazol i doksiciklin. Također jedan izolat pokazao je otpornost i na fluorokinolone moksifloksacin i ciprofloksacin. OKABAYASHI i sur. (2017.) opisuju plućnu infekciju uzrokovanu vrstom *M. triviale*, a uspješno liječenje provedeno je primjenom klaritromicina i levofloksacina. SMITH i sur. (2000.) opisuju osteoartritis uzrokovan vrstom *M. terrae* kompleksa, te uspješno liječenje primjenom klaritromicina, ciprofloksacina, etambutola i amikacin. Također opisuju granulomatozni tenosinovitis u prstu ruke, a izdvojeni soj je pokazao osjetljivost na ciprofloksacin, etambutol, klaritromicin i rifampin, no ishod liječenja nije se pokazao uspješnim. Autori zaključuju da je uspješan režim liječenja infekcija uzrokovan vrstama *M. terrae* kompleksa i dalje nepoznat, ali bi trebao obuhvatiti klaritromicin sa drugim učinkovitim antibiotikom, kao i primjenu amikacina. U našem istraživanju dva izolata vrste *M. nonchromogenicum* su pokazala otpornost upravo na amikacin.

Izolati pripadnici spororastućih netuberkuloznih mikobakterija uključeni u naše istraživanje pokazali su najveću otpornost na fluorokinolone, i to na moksifloksacin gdje je 77,3% izolata bilo otporno, a na ciprofloksacin 65,4%. Iz prethodno navedenih studija vidljivo je da je jedan od fluorokinolona bio uključen u gotovo svaki uspješan protokol liječenja infekcija navedenim vrstama NTM-a u humanoj medicini, a oni pripadaju lijekovima druge linije koji se koriste kod otpornih sojeva na koje ne djeluju lijekovi prve linije. Nadalje,

naši izolati također su pokazali visoki postotak otpornosti na doksiciklin (77%), trimetoprim – sulfametoksazol (65,4%) i linezolid (61,4%). U prethodno navedenim studijama vidljivo je da je linezolid također bio često korišten u protokolu liječenja navedenih vrsta, a navedeni lijek također je jedan od preporučenih za liječenje najčešćih NTM vrsta u humanoj medicini, zajedno sa trimetoprim – sulfametoksazolom (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.). Zatim, u našem istraživanju opisali smo visoki postotak otpornosti na pripadnika rifamicina rifampin od 76,9%, dok je na rifabutin postotak otpornosti bio mnogo manje izražen a iznosio je 7,7%. Rifamicini su također jedni od preporučenih lijekova za najčešće NTM vrste (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.), a u prethodno navedenim studijama vidljivo je da je upravo rifampin češće korišten. Također, opisali smo otpornost od 6,8% na amikacin, lijek prve linije koji se koristi u liječenju najpatogenijih vrsta NTM-a, dok je 13,6% izolata bilo umjereno osjetljivo. Osjetljivost svih izolata opisali smo samo na makrolid klaritromicin. Nadalje, u humanoj medicini etambutol je uključen u gotovo svaki protokol liječenja infekcija uzrokovanih NTM-ama, no u našem istraživanju prijavili smo samo MIC vrijednosti za navedeni antibiotik jer granične vrijednosti na temelju kojih određujemo osjetljivost izolata do sada nisu određene (CLSI 2018a, CLSI 2018b). Kako je ranije opisano u studijama provedenim u humanoj medicini, infekcije uzrokovane NTM-ama uspješno se liječe protokolom koji obuhvaća više antibiotika pripadnika različitih skupina, dok liječenje samo jednim antibiotikom rijetko daje rezultat. Zabrinjavajuća je činjenica što su izolati spororastućih NTM-a opisani u našem istraživanju pokazali visoke postotke otpornosti na većinu antibiotika koji su preporučeni za terapiju u humanoj medicini, a potpunu osjetljivost samo na jedan testirani antibiotik, što nam ukazuje na zoonotski potencijal i moguće izazove u liječenju infekcija uzrokovanih spororastućim mikobakterijama u ljudi.

Kod pripadnika brzorastućih mikobakterija ispitivanje smo proveli na ukupno 11 različitih vrsta i četiri "Najsličnije", i to *M. agri*, *M. arupense*, *M. chitae* i "Najsličnije *M. chitae*", *M. elephantis*, *M. fortuitum*, *M. neoaurum* i "Najsličnije *M. neoaurum* ", *M. peregrinum*, *M. phocaicum*, *M. porcinum*, *M. pulveris*, *M. vaccae* i "Najsličnije *M. vaccae*", te "Najsličnije *M. septicum*".

Određivanje antimikrobne osjetljivosti jednog izolata vrste *M. agri* izdvojenog iz divlje svinje u našem istraživanju je bilo bezuspješno. Prema našim saznanjima u humanoj medicini do sada nisu opisani slučajevi infekcije navedenom vrstom.

Ispitana dva izolata vrste *M. arupense* oba izdvojena iz divljih svinja, u našem istraživanju nisu pokazala otpornost niti na jedan ispitani antibiotik. U humanoj medicini navedena vrsta je dosada opisana kao uzročnik diseminirane bolesti u imunokompromitiranih

bolesnika (HEIDARIEH i sur., 2013.), osteoartritis (SEIDL i LINDEQUE, 2014.), plućnih infekcija (NEONAKIS i sur., 2010.), a najčešće tenosinovitis (BEAM i sur., 2014., LOPEZ i sur., 2016.). BEAM i sur. (2014.) opisuju otpornost sojeva vrste *M. arupense* na ciprofloksacin, moksifloksacin, rifampin i doksiciklin, kao i LOPEZ i sur. (2016.) koji opisuju otpornost na ciprofloksacin, moksifloksacin i kanamicin, te NEONAKIS i sur. (2010.) koji opisuju otpornost na ciprofloksacin, levofloksacin i trimetoprim-sulfometoksazol.

Od ukupno četiri izolata vrste *M. chitae* izdvojenih iz domaćih životinja (iz goveda), u našem istraživanju dva su bila otporna na amoksisilin/klavulonsku kiselinu i klaritromicin od kojih je jedan izolat bio otporan već petog dana inkubacije, a drugi 14. dana inkubacije čime dokazujemo posjedovanje *erm* gena odgovornog za inducibilnu otpornost na makrolide. Od dva izolata "Najsličnija *M. chitae*" izdvojenih iz divljih životinja (iz srna), jedan je bio otporan na cefepim. U humanoj medicini je vrlo malo opisa o infekcijama ovom vrstom, a prema našim saznanjima dosada su opisane samo plućne infekcije, dok liječenje nije opisano (MACELLONI MARQUES i sur., 2011.).

Izolat vrste *M. elephantis* izdvojen iz domaće životinje (iz goveda) pokazao je otpornost na imipenem. U humanoj medicini također je vrlo malo opisa o infekcijama ovom vrstom mikobakterije, a opisana je kod dišne infekcije i enteritisa gdje je izdvojeni soj bio osjetljiv na izoniazid, streptomycin, klaritromicin i kanamicin. Premda je vrsta *M. elephantis* prvi puta opisana u slona za kojeg se smatralo da je rezervoar (SHOJAEI i sur., 2000.), pacijent općenito nije imao kontakata sa životinjama (POTTERS i sur., 2003.).

Izolati vrste *M. fortuitum* kojih je u naše istraživanje bilo uključeno ukupno 27, od kojih je šest izdvojeno iz domaćih (5 iz goveda, 1 iz svinje) a 21 iz divljih životinja (6 iz divljih svinja, 15 iz srna), najveću otpornost su pokazali na pripadnike cefalosporina, i to na cefepim 21 izolat, cefriakson 22 izolata, dok je na cefoksitin samo jedan izolat bio je otporan. Nadalje, na tobramicin je šest izolata bilo otporno, na pripadnike tetraciklina doksiciklin pet izolata i minociklin tri izolata, na amoksisilin/klavulonsku kiselinu 18 izolata, te na klaritromicin ukupno 10 izolata od kojih je pet izolata bilo otporno već petog dana inkubacije, a pet izolata 14. dana inkubacije čime dokazujemo posjedovanje *erm* gena odgovornog za inducibilnu otpornost na makrolide. Vrsta *M. fortuitum* jedna je od najčešće zastupljenih vrsta NTM-a u humanih pacijenata u Europi, te se smatra jednom od globalno najznačajnijih vrsta (VAN DER WERF i sur., 2014.). Najčešće uzrokuje infekcije kože, mekih tkiva i kostiju (PEREIRA i sur., 2020.), ali opisane su i plućne infekcije (OKAMORI i sur., 2018.). Preporučeni antimikrobni lijekovi za liječenje infekcija *M. fortuitum* s postotkom osjetljivosti sojeva su amikacin (osjetljivost 100%), ciprofloksacin (100%), sulfonamidi (100%),

cefoksitin (50%), imipenem (100%), klaritromicin (80%) i doksiciklin (50%), ali preporuka je odrediti antimikrobnu osjetljivost svakog izdvojenog soja (SWENSON i sur., 1985., BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.). Od navedenih antibiotika, kod pojedinih izolata u našem istraživanju dokazali smo otpornost upravo na cefoksitin, doksiciklin i klaritromicin.

Od ukupno 23 uspješno ispitana izolata vrste *M. neoaurum*, od kojih je jedan izolat izdvojen iz domaćih (iz kokoši) a 22 iz divljih životinja (3 iz divljih svinja, 19 iz srna), jedan izolat je bio otporan na tobramicin, dok su najveću otpornost pokazali na pripadnike cefalosporina i to na cefepim sa 15 otpornih izolata, cefriakson sa šest otpornih izolata, te cefoksitin sa dva otporna izolata. Nadalje, jedan izolat izdvojen iz divlje životinje pokazao je otpornost i na amoksicilin/klavulonsku kiselinu, klaritromicin, linezolid i trimetoprim/sulfametoksazol.

Dva izolata "Najsličnija *M. neoaurum*" izdvojena iz domaće (iz ovce) i divlje životinje (iz srne) pokazala su otpornost samo na cefepim. Jedni od preporučenih antimikrobnih lijekova za liječenje infekcija uzrokovanih *M. neoaurum* u humanoj medicini su linezolid, trimetoprim-sulfametoksazol, klaritromicin, tobramicin i cefoksitin (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.), a upravo na te antibiotike smo kod pojedinih izolata u našem istraživanju opisali otpornost. BROWN-ELLIOTT i sur. (2010.) opisuju *M. neoaurum* kao uzročnika bakterijemije uzrokovane kontaminiranim kateterom što je i najčešća patologija uzrokovana ovom vrstom, te opisuju otpornost izolata samo na klaritromicin. Također su opisani meningoencefalitis (HECKMAN i sur., 2004.) i kožna infekcija kod imunokompetentnog pacijenta (MARTIN i sur., 2007.) uzrokovane ovom vrstom mikobakterije, kao i plućna infekcija gdje autori opisuju osjetljivost izolata na sve testirane antibiotike (MORIMOTO i sur., 2007.).

Izolat vrste *M. peregrinum* izdvojen iz divlje životinje (iz srne) bio je otporan na tobramicin, amoksicilin/klavulonsku kiselinu, te cefriakson i cefepim. U humanoj medicini nema mnogo opisa o infekcijama ovom vrstom mikobakterije, a izdvojena je u samo 1-2% infekcija uzrokovanih brzorastućim mikobakterijama (BROWN-ELLIOTT i WALLACE, 2002.). Kao pripadnik *M. fortuitum* grupe najčešće uzrokuje postoperativne kožne infekcije gdje autori opisuju izolat otporan na klaritromicin i doksiciklin (NAGAO i sur., 2009.), te kateterom uzrokovane bakterijemije (BROWN-ELLIOTT i WALLACE, 2002.). Također je opisana kao uzročnik tonzilarnog apscesa gdje je izolat bio osjetljiv na amikacin, ciprofloksacin, imipenem i klaritromicin (SAKAI i sur., 2005.), te kao uzročnik plućne infekcije gdje je izolat također bio osjetljiv na klaritromicin (SAWAHATA i sur., 2010.).

Od sedam izolata vrste *M. phocaicum* izdvojenih iz divljih životinja (iz divljih svinja), jedan je pokazao otpornost na tobramicin, cefriakson i cefepim, dok su dva izolata bila otporna na amoksisicilin/klavulonsku kiselinu. Ova vrsta opisana je kao uzročnik plućne infekcije te je istovremeno izdvojena iz bazena kojim se pacijent koristio (WETHASINGHE i sur., 2015.). Također je opisana i kateterom uzrokovana bakterijemija (COOKSEY i sur., 2008.), a autori navode osjetljivost vrste na amikacin, cefoksitin, klaritromicin, imipenem, fluorokinolone i minociklin, te otpornost na amoksisicilin i trimetoprim-sulfametoksazol (ADÉKAMBI i sur., 2006.).

Oba izolata vrste *M. porcinum* izdvojena iz divljih životinja (iz divljih svinja) bila su otporna na klaritromicin već petog dana inkubacije, tobramicin, cefalosporine cefepim i cefriakson, tetraciklin doksiciklin, dok je na minociklin jedan izolat bio otporan. Jedan izolat je također bio otporan na amoksisicilin/klavulonsku kiselinu. U humanoj medicini infekcije ovom vrstom sve su češći nalaz (BROWN-ELLIOTT i sur., 2011.). Opisane su infekcije rana, kateterom uzrokovane bakterijemije i rijetko plućne infekcije uzrokovane ovom vrstom mikobakterija, a dokazana je osjetljivost na ciprofloksacin, sulfametoksazol, linezolid kao i osjetljivost ili umjerena osjetljivost na cefoksitin, klaritromicin, imipenem i amikacin, te otpornost na doksiciklin (WALLACE i sur., 2004.). Drugi autori također opisuju osjetljivost na sve navedene antibiotike, te umjerenu osjetljivost na doksiciklin, dok je kod naših izolata otpornost bila znatno izraženija.

Izolat vrste *M. pulveris*, te "Najsličniji *M. septicum*", oba izdvojena iz divljih životinja (iz divlje svinje i srne) nisu pokazali otpornost niti na jedan ispitivani antibiotik. Prema našim saznanjima dosada nisu opisane infekcije uzrokovane *M. pulveris* u humanoj medicini.

Od uspješno istraženih 13 izolata pripadnika vrste *M. vaccae* od kojih su dva izolata izdvojena iz domaćih (iz goveda) a 11 iz divljih životinja (10 iz divljih svinja, 1 iz srne), najviše otpornih izolata je bilo na skupinu cefalosporina, i to osam izolata na cefriakson, te šest izolata na cefepim. Nadalje, na klaritromicin ukupno su tri izolata bila otporna, od kojih jedan već petog dana inkubacije, a dva 14. dana inkubacije. Na pripadnike skupine tetraciklina doksiciklin i minociklin dva su izolata bila otporna, a jedan je bio otporan i na ciprofloksacin, tobramicin, amoksisicilin/klavulonsku kiselinu i imipenem. Izolat "Najsličniji *M. vaccae*" bio je otporan na tobramicin, cefepim i cefriakson, amoksisicilin/klavulonsku kiselinu, klaritromicin i imipenem. Vrsta *M. vaccae* u humanoj medicini dosada je opisivana kao slabo patogena, a opisane su kožne i plućne infekcije uzrokovane ovom vrstom čiji je uspješan protokol liječenja obuhvatio antibiotike minociklin, trimetoprim-sulfametoksazol, doksiciklin i ciprofloksacin (HACHEM i sur., 1996.).

Izolati pripadnici brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija uključeni u naše istraživanje pokazali su najveću otpornost na skupinu cefalosporina, i to na cefepim s 57,5%, te cefriakson s 47,2% otpornih izolata, dok je na cefoksitin svega 3,5% izolata bilo otporno. Iz prethodno navedenih studija u humanoj medicini vidljivo je da je cefoksitin jedini od cefalosporina bio uključen u većinu režima liječenja navedenih vrsta NTM-a u humanoj medicini, a lijek je također jedan od preporučenih za liječenje najčešćih brzorastućih NTM vrsta u humanoj medicini (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.). Nadalje, u našem istraživanju također smo utvrdili postotak otpornih izolata od 31% na amoksisilin/klavulonsku kiselinu, 23% na klaritromicin, 3,5% na imipenem, te 1,2% na linezolid i trimetoprim/sulfametoksazol. Unutar skupine aminoglikozida ustanovili smo 14,9% otpornih izolata na tobramicin, dok su na amikacin svi izolati bili osjetljivi. Na tetracikline, tj. na doksiciklin dokazali smo 10,4% otpornih izolata, te na minociklin 6,9%. Na skupinu fluorokinolona, ustanovili smo 1,2% otpornih sojeva na ciprofloksacin, dok su na moksifloksacin svi izolati bili osjetljivi. Od navedenih, klaritromicin, imipenem, linezolid, trimetoprim/sulfametoksazol, tobramicin, doksiciklin i ciprofloksacin su također jedni od preporučenih za protokol liječenja najčešćih brzorastućih NTM vrsta u humanoj medicini (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012.), a prema prethodno navedenim studijama klaritromicin je prvi lijek odabira u svakom uspješnom režimu liječenja.

Izolati brzorastućih NTM-a opisani u našem istraživanju pokazali su određene postotke otpornosti na većinu antibiotika koji su preporučeni za terapiju u humanoj medicini, no taj postotak je vidljivo manji od onoga koji smo opisali kod spororastućih NTM-a. Ne treba zanemariti činjenicu da se infekcije uzrokovane brzorastućim NTM vrstama vrlo teško liječe, s visokim postotkom pojavnosti recidiva. Liječenje izvan plućnih infekcija obično se temelji na kirurškom uklanjanju zaraženog limfnog čvora ili zaraženog područja s uključenom antibiotskom terapijom (GRIFFITH i sur., 2007.). Antibiotici su osnova liječenja NTM infekcija, međutim, svaka NTM vrsta i svaki pacijent u humanoj medicini zahtijeva različite kombinacije antibiotika, a uporaba *in vitro* testova osjetljivosti je vrlo ograničena što dovodi do poteškoća u liječenju (HALSTROM i sur., 2015.). Osnova svih trenutno opisanih protokola liječenja NTM infekcija su makrolidi, iz razloga što imaju najbolju povezanost između *in vitro* rezultata osjetljivosti i kliničkog (*in vivo*) odgovora. Pristup liječenju plućnih NTM infekcija s više lijekova uključuju sedam osnovnih pravila: (1) protokol liječenja temeljen na makrolidima predložen je za većinu spororastućih vrsta NTM-a; (2) etambutol se obično dodaje protokolu liječenja s više antibiotika kao „pojačavajući“ lijek; (3) rifampin ili rifabutin obično se dodaje kao treći lijek protokola s više lijekova; (4) kao pomoćni lijek

ovisno od slučaja do slučaja koriste se aminoglikozidi; (5) odluka o svakodnevnom liječenju ili o liječenju s prekidima; (6) trajanje liječenja najmanje 12 mjeseci nakon bakteriološki negativnog nalaza ispljuvka; (7) liječenje infekcija uzrokovanih brzorastućim NTM-ama slično je onom koje se primjenjuje za plućne NTM infekcije (GRIFFITH i sur., 2007.).

Uspoređujući osjetljivost sporo i brzorastućih izolata netuberkuloznih mikobakterija uočili smo značajne razlike u otpornosti na određene antibiotike, a pripadnici spororastućih vrsta pokazali su se otpornijima na većinu antibiotika. Određivanje antimikrobne otpornosti ne obuhvaća iste antibiotike za sporo i brzorastuće mikobakterije, ali provodi se sa sedam istih antibiotika među kojim smo uočili značajne razlike. Pa su tako izolati pripadnici spororastućih mikobakterija bili otporniji na linezolid, doksiciklin, oba fluorokinolona moksifloksacin i ciprofloksacin, trimetoprim-sulfametoksazol i amikacin, dok su izolati brzorastućih bili otporniji samo na klaritromicin. Nadalje, uspoređujući osjetljivost između spororastućih vrsta uočili smo da unutar izolata *M. avium* kompleksa ima najmanje otpornih sojeva na tri i više korištenih antibiotika, no ne treba zanemariti činjenicu da su interpretacijski kriteriji za ovu vrstu mikobakterije dostupni za svega četiri antibiotika, a gotovo svi naši izolati pokazali su otpornost na dva od četiri antibiotika. Kod ostalih opisanih vrsta pripadnika spororastućih mikobakterija u našem istraživanju nismo ustanovili statistički značajne razlike na temelju otpornosti na tri i više korištenih antibiotika, tj. otpornost je bila podjednaka među vrstama. Uspoređujući osjetljivost između brzorastućih vrsta uočili smo najveći postotak višestruko otpornih izolata (na četiri i više antibiotika) prema korištenim antibioticima u vrste *M. fortuitum*. Također, visoki postotak otpornosti opisali smo i u vrste *M. neoaurum*, *M. vaccae* i *M. porcinum*, dok su ostale dokazane vrste bile u najvećem postotku osjetljive što nam ukazuje na razlike u osjetljivosti prema antibioticima između različitih vrsta brzorastućih mikobakterija. Opažene razlike u pojavnosti otpornih sojeva brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija izdvojenih iz domaćih i divljih životinja nisu statistički značajne. Navedene razlike statistički su značajne kod spororastućih vrsta a udio višestruko otpornih sojeva zastupljeniji je u domaćih životinja, no ne treba zanemariti činjenicu da je od ukupno 44 ispitana izolata upravo 31 izolat podrijetlom iz domaćih životinja te omjer izolata iz domaćih i divljih životinja nije proporcionalan za realnu usporedbu. Nadalje, razlike u pojavnosti otpornih sojeva kako brzo tako i spororastućih netuberkuloznih mikobakterija izdvojenih iz domaćih i divljih životinja u različitim godinama promatranja nisu statistički značajne. Bitno je napomenuti da smo u našem istraživanju opisali čak 26 višestruko otpornih izolata koji su pokazali otpornost na pet ili više antibiotika, a u slučaju MAC izolata na tri od četiri testirana antibiotika. Od navedenih izolata 15 ih je pripadnika spororastućih vrsta, i to *M. intermedium*,

M. nonchromogenicum, MAC i *M. celatum* od kojih je sedam izolata izdvojeno iz domaćih, a osam iz divljih životinja. Preostalih 11 izolata pripadnici su brzorastućih vrsta, i to *M. fortuitum*, *M. neoaurum*, *M. porcinum*, *M. vaccae* i "Najsličnije *M. vaccae*" od kojih su dva izolata izdvojena iz domaćih, a devet iz divljih životinja. Zabrinjavajuća je činjenica visokog postotka višestruko otpornih sojeva izdvojenih iz divljih životinja, za koje smatramo da su divlji izolati koji nisu bili u doticaju sa antibioticima. Iz tog razloga postoji potreba dodatno istražiti ekološke niše kako bi se dodatno razjasnile bolesti uzrokovane NTM-ama. Nadalje, razlike u pojavnosti otpornih sojeva kako sporo tako i brzorastućih netuberkuloznih mikobakterija porijeklom iz različitih županija nisu bile statistički značajne, a nismo uočili niti razlike u zastupljenosti opisanih vrsta po županijama RH.

Naše istraživanje pokazuje da netuberkulozne mikobakterije predstavljaju veliku i raznoliku populaciju mikobakterija koje su u velikoj mjeri podcijenjene i nedovoljno dijagnosticirane usprkos značajnom utjecaju kako na zdravlje životinja tako i ljudi. Taj utjecaj u veterinarskoj medicine može biti izravan uzrokujući manje ili više značajne infekcije i gubitak produktivnosti, ili neizravan ometajući dijagnozu i kontrolu goveđe tuberkuloze (HOPE i sur., 2005.). Kako bi se poboljšali programi kontrole goveđe tuberkuloze, čini se da je potrebno uzeti u obzir prisutnost i utjecaj NTM-a. Preventivne mjere protiv NTM-a trebale bi uključivati higijenu staja, stambenog prostora, opskrbe vodom, stočne hrane, dodataka hrani, gnojiva i pašnjaka. Analizirajući literaturu o ovoj temi, moguće je ukazati na različite pristranosti koje objašnjavaju zašto su prisutnost i važnost NTM-a sigurno podcijenjeni. Zapravo je većina izolata NTM-a u veterinarskoj medicini izolirana tijekom monitoringa goveđe tuberkuloze u potrazi za vrstama *M. tuberculosis* kompleksa. Uzorci koji se najčešće analiziraju uglavnom su limfni čvorovi dišnog sustava i pluća, a oni možda nisu prikladni za otkrivanje NTM-a s obzirom da se smatra da su infekcije NTM-ama uglavnom probavne (KANKYA i sur., 2011.). Dostupne tehnike otkrivanja i identifikacije NTM-a u Republici Hrvatskoj ne primjenjuju se široko. Nadalje, zoonotski rizik od NTM-a nije ograničen samo na genetski osjetljive ili imunokompromitirane pojedince, nego se inficirati mogu i zdrave osobe kako je već ranije u tekstu opisano. Međutim, epidemiologiju infekcija uzrokovanih NTM-ama trebalo bi dodatno istražiti. S pogleda humane medicine, ispitivanje osjetljivosti na antibiotike učinile su nas svjesnim više različitih čimbenika NTM-a koji su povezani s urođenom ili prirodnom otpornošću na lijekove (BROWN-ELLIOTT i sur., 2012., BROWN-ELLIOTT i sur., 2013.). Ti faktori urođene otpornosti ne moraju se specifično odražavati u MIC vrijednostima određenog ispitivanog antibiotika, a to je najviše uznemirujuća i kontradiktorna značajka NTM plućnih bolesti. Vjerojatno najpoznatiji primjer ovog fenomena

je inducibilni gen za rezistenciju na makrolide ili *erm* gen prisutan u *M. abscessus* i drugim vrstama poput *M. fortuitum* (NASH i sur., 2009.). Aktivnost ovog gena može se otkriti *in vitro* samo produljenom inkubacijom organizma u prisutnosti makrolida. Nažalost, rasprava o otpornosti NTM-a na antibiotike ne prestaje s urođenom otpornošću na lijekove. Mnogi NTM patogeni, uključujući MAC i *M. abscessus* također su podložni stečenoj mutacijskoj otpornosti na lijekove. Na primjer, makrolidi moraju biti zaštićeni učinkovitim popratnim lijekovima u režimu liječenja bolesti uzrokovane MAC-om kako bi se izbjeglo stvaranje otpornosti na makrolide uzrokovano mutacijom 23S rRNK gena. Ova pojava je povezana s lošim odzivom na liječenje i lošim ukupnim ishodom (GRIFFITH i sur., 2006.). Stečena mutacijska otpornost na lijekove pojavljuje se i u drugim NTM vrsta, osobito *rpoB* gena i stečene otpornosti kod vrste *M. kansasii* na rifamicin. Konačno, budućnost liječenja bolesti uzrokovanih NTM-ama trebala bi se usredotočiti na prepoznavanje urođenih mehanizama otpornosti na antibiotike i otkrivanje načina za prevladavanje istih. Nadalje, u obzir treba uzeti i činjenicu da se u posljednje vrijeme opisuju mobilni genski elementi, uz koje se veže antimikrobna otpornost u bakterija, a mikobakterijama se na taj način omogućava trenutna sposobnost rezistencije. Ova činjenica predstavlja ujedno i značajnu evolucijsku prilagodbu, pogotovo u spororastućih vrsta (REVA i sur., 2015.). Neupitno je da postoje mnoge slabosti i nedostaci u našem znanju o bolestima uzrokovanim NTM-a. Kako bi se te stvari razjasnile, potrebno je bolje razumijevanje ekoloških niša i bolje razumijevanje mehanizama sticanja otpornosti organizma iz tih niša.

7 ZAKLJUČCI

1. Korištenjem dvije metode identifikacije izolata netuberkuloznih mikobakterija (NTM) do razine vrste dokazano je da je metodom usporedbe najkonzerviranijih regija genoma moguće identificirati značajno veći broj vrsta u odnosu na metodu specifične hibridizacije.
2. Opisano je ukupno 20 različitih vrsta NTM-a i šest "Najsličnijih" vrsta, čime je dokazana velika vrsna raznolikost i široka rasprostranjenost mikobakterija u domaćih i divljih životinja, a time potvrđena i visoka kontaminiranost okoliša te uloga različitih vrsta životinja kao rezervoara NTM-a za životinje i ljude na području RH.
3. Najzastupljenije vrste dokazane istraživanjem bile su *M. fortuitum*, *M. neoaurum*, *M. avium* ssp. i *M. vaccae* čime je potvrđena najveća zastupljenost upravo najpatogenijih netuberkuloznih mikobakterijskih vrsta.
4. Nisu ustanovljene razlike u zastupljenosti opisanih vrsta po županijama RH.
5. Određivanjem antimikrobne osjetljivosti spororastućih NTM-a, dokazana je otpornost na različite antibiotike uz najučestaliju otpornost na fluorokinolone, dok je osjetljivost svih izolata opisana samo na makrolid klaritromicin.
6. Određivanjem antimikrobne osjetljivosti brzorastućih NTM-a dokazana je otpornost na različite vrste antibiotika uz najučestaliju otpornost na cefalosporine.
7. Učestalost otpornosti na antibiotike je viša u spororastućih NTM-a u odnosu na brzorastuće, a nije ustanovljena značajna razlika u izolatima iz domaćih i divljih životinja.
8. Opisano je 26 višestruko otpornih izolata koji su pokazali otpornost na pet ili više antibiotika, a u slučaju MAC izolata na tri od četiri testirana antibiotika s jednakom učestalošću u sporo i brzorastućih vrsta NTM-a.
9. Usporedbom osjetljivosti sporo i brzorastućih izolata NTM-a na pojedinačne antibiotike, otpornost je izraženija kod spororastućih vrsta na linezolid, doksiciklin, oba fluorokinolona, moksifloksacin i ciprofloksacin, te trimetoprim-sulfametoksazol i amikacin, dok su izolati brzorastućih vrsta bili otporniji na klaritromicin.
10. Usporedbom antimikrobne osjetljivosti u različitim vrsta brzorastućih NTM-a dokazana je najučestalija otpornost u vrsta *M. fortuitum*, *M. neoaurum*, *M. vaccae* i *M. porcinum*, dok su ostale vrste bile u najvećem postotku osjetljive.

11. Nisu ustanovljene razlike u antimikrobnoj osjetljivosti izolata pojedinih vrsta NTM-a u odnosu na podrijetlo iz domaćih ili divljih životinja kao niti razlike u različitim godinama promatranja ili razlike u odnosu na županiju u kojoj su izdvojeni.
12. Sojevi spororastućih NTM-a izdvojeni iz domaćih i divljih životinja pokazali su visoke postotke otpornosti na većinu antibiotika koji su preporučeni za liječenje u humanoj medicini, što je potvrđeno u određenom postotku i za brzorastuće sojeve.
13. Ustanovljena značajna učestalost otpornosti naglašava veliki zoonotski potencijal cirkulirajućih sojeva NTM-a na području RH, te izazove u liječenju infekcija životinja i ljudi koji su izraženiji za infekcije spororastućim mikobakterijama.
14. Usvojene i validirane metode identifikacije i određivanje antimikrobne osjetljivosti netuberkuloznih mikobakterija opisane u ovom istraživanju nisu korištene u dosadašnjim istraživanjima te predstavljaju smjernicu za unaprjeđenje zdravstvene zaštite životinja i ljudi na području RH.

8 POPIS LITERATURE

ADÉKAMBI, T., P. COLSON, M. DRANCOURT (2003): *rpoB*-based identification of nonpigmented and late pigmented rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5699–5708.

doi: 10.1128/jcm.41.12.5699-5708.2003

ADÉKAMBI, T., M. DRANCOURT (2004): Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2095-2105.

doi: 10.1099/ijs.0.63094-0

ADÉKAMBI, T., P. BERGER, D. RAOULT, M. DRANCOURT (2006): *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 133-143.

doi: 10.1099/ijs.0.63969-0

ADJEMIAN, J., K. N. OLIVIER, A. E. SEITZ, S. M. HOLLAND, D. R. PREVOTS (2012): Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 881–886.

doi: 10.1164/rccm.201111-2016OC

ALLEN, D. M., H. H. CHNG (1993): Disseminated *Mycobacterium flavescens* in a probable case of chronic granulomatous disease. *J. Infect.* 26, 83-86.

doi: 10.1016/0163-4453(93)97000-n

AMORIM, A., R. MACEDO, A. LOPES, I. RODRIGUES, E. PEREIRA (2010): Non-tuberculous mycobacteria in HIV-negative patients with pulmonary disease in Lisbon, Portugal. *Scand. J. Infect. Dis.* 42, 626–628.

doi: 10.3109/00365541003754485

ANDREJAK, C., R. NIELSEN, V. O. THOMSEN, P. DUHAUT, H. T. SORENSSEN, R. W. THOMSEN (2013): Chronic respiratory disease, inhaled corticosteroids and risk of non-tuberculous mycobacteriosis. *Thorax*. 68, 256–262.

doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-201772

AUBRY, A., F. MOUGARY, F. REIBEL, E. CAMBAU (2017): *Mycobacterium marinum*. *Microbiol. Spectr.* 5, 2.

doi: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0038-2016

BANKS, J., P. A. JENKINS (1987): Combined versus single antituberculosis drugs on the in vitro sensitivity patterns of non-tuberculous mycobacteria. *Thorax*. 42, 838-842.

doi: 10.1136/thx.42.11.838

BASTIAN, S., N. VEZIRIS, A. L. ROUX, F. BROSSIER, J. L. GAILLARD, V. JARLIER, E. CAMBAU (2011): Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm(41)* and *rrl* sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 775–781.

doi: 10.1128/AAC.00861-10

BEAM, E., S. VASOO, P. J. SIMNER, M. RIZZO, E. L. MASON, R. C. WALKER, S. M. DEML, B. A. BROWN-ELLIOTT, R. J. WALLACE JR, N. L. WENGENACK, I. G. SIA (2014): *Mycobacterium arupense* flexor tenosynovitis: case report and review of antimicrobial susceptibility profiles for 40 clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2706-2708.

doi: 10.1128/JCM.00277-14

BENDINGER, B., H. H. RIJNAARTS, K. ALTENDORF, A. J. ZEHNDER (1993): Physicochemical cell surface and adhesive properties of Coryneform Bacteria related to the presence and chain length of Mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3973–3977.

doi: 10.1128/aem.59.11.3973-3977.1993

BHAMIDI, S. (2009): Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. *Mycobacterial Cell Wall Arabinogalactan: a Detailed Perspective on Structure, Biosynthesis, Functions and Drug Targeting*. Caister Academic Press. Bremen, Njemačka, str. 39-69.

doi: 10.21775/9781912530045

BIET, F., M. L. BOSCHIROLI, M. F. THOREL, L. A. GUILLOTEAU (2005): Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet. Res. 36, 411–436.

doi:10.1051/vetres:2005001

BIET, F., M. L. BOSCHIROLI (2014): Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. Res. Vet. Sci. 97, 69-77.

doi: 10.1016/j.rvsc.2014.08.007

BONO, M., T. JEMMI, C. BERNASCONI, D. BURKI, A. TELENTI, T. BODMER (1995): Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. Appl. Environ. Microbiol. 61, 371-373.

doi: 10.1128/aem.61.1.371-373.1995

BRODA, A., H. JEBBARI, K. BEATON, S. MITCHELL, F. DROBNIIEWSKI (2013): Comparative drug resistance of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates from patients with and without cystic fibrosis in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 51, 217-223.

doi: 10.1128/JCM.02260-12

BROWN, B. A., R. J. WALLACE JR, G. O. ONYI (1996): Activities of the glycylicyclines N, N-dimethylglycylamido-minocycline and N, N-dimethylglycylamido-6-demethyl-6-deoxytetracycline against *Nocardia* spp. and tetracycline-resistant isolates of rapidly growing mycobacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 874–878.

doi: 10.1128/AAC.40.4.874

BROWN-ELLIOTT, B. A., R. J. WALLACE JR (2002): Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 15, 716-746.

doi: 10.1128/cmr.15.4.716-746.2002

BROWN-ELLIOTT, B. A., R. J. WALLACE JR, C. A. PETTI, L. B. MANN, M. MCGLASSON, S. CHIHARA, G. L. SMITH, P. PAINTER, D. HAIL, R. WILSON, K. E.

SIMMON (2010): *Mycobacterium neoaurum* and *Mycobacterium bacteremicum* sp. nov. as causes of mycobacteremia. J. Clin. Microbiol. 48, 4377-4385.

doi:10.1128/JCM.00853-10

BROWN-ELLIOTT, B. A., R. J. WALLACE JR, C. TICHINDELEAN, J. C. SARRIA, S. MCNULTY, R. VASIREDDY, L. BRIDGE, C. G. MAYHALL, C. TURENNE, M. LOEFFELHOLZ (2011): Five-year outbreak of community- and hospital-acquired *Mycobacterium porcinum* Infections related to public water supplies. J. Clin. Microbiol. 49, 4231-4238.

doi: 10.1128/JCM.05122-11

BROWN-ELLIOTT, B. A., K. A. NASH, R. J. WALLACE JR (2012): Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 25, 545-582.

doi: 10.1128/CMR.05030-11

BROWN-ELLIOTT, B. A., E. IAKHIAEVA, D. E. GRIFFITH, G. L. WOODS, J. E. STOUT, C. R. WOLFE, C. Y. TURENNE, R. J. WALLACE JR (2013): In vitro activity of amikacin against isolates of *Mycobacterium avium* complex with proposed MIC breakpoints and finding of a 16S rRNA gene mutation in treated isolates. J. Clin. Microbiol. 51, 3389-3394.

doi: 10.1128/JCM.01612-13

BROWN-ELLIOTT, B. A., K. HANSON, S. VASIREDDY, E. IAKHIAEVA, K. A. NASH, R. VASIREDDY, N. PARODI, T. SMITH, M. GEE, A. STRONG, A. BARKER, S. COHEN, H. MUIR, E. S. SLECHTA, R. J. WALLACE JR (2015a): Absence of a functional *erm* gene in isolates of *Mycobacterium immunogenum* and the *Mycobacterium mucogenicum* group, based on in vitro clarithromycin susceptibility. J. Clin. Microbiol. 53, 875-878.

doi: 10.1128/JCM.02936-14

BROWN-ELLIOTT, B. A., S. VASIREDDY, R. VASIREDDY, E. IAKHIAEVA, S. T. HOWARD, K. NASH, N. PARODI, A. STRONG, M. GEE, T. SMITH, R. J. WALLACE JR. (2015b): Utility of sequencing the *erm(41)* gene in isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* with low and intermediate clarithromycin MICs. J. Clin. Microbiol. 53,

1211-1215.

doi: 10.1128/JCM.02950-14

BUHLER, V. B., A. POLLAK (1953): Human infection with atypical acid-fast organisms; report of two cases with pathologic findings. *Am. J. Clin. Pathol.* 23, 363-374.
doi: 10.1093/ajcp/23.4.363

CADMUS, S. I., H. K. ADESOKAN, M. OKKER, K. JAHANS (2010): *Mycobacterium fortuitum* from lesions of slaughtered pigs in Ibadan, Nigeria. *Rev. Sci. Tech.* 29, 705-711.
doi: 10.20506/rst.29.3.2008

CANGELOSI, G. A., J. S. DO, R. FREEMAN, J. G. BENNETT, M. SEMRET, M. A. BEHR (2006): The two-component regulatory system *mtrAB* is required for morphotypic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 461-468.
doi: 10.1128/AAC.50.2.461-468.2006

CARLSON, L. D., C. K. WALLIS, M. B. COYLE (1998): Standardized BACTEC method to measure clarithromycin susceptibility of *Mycobacterium genavense*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 748-751.
doi: 10.1128/JCM.36.3.748-751.1998

CAYER, M. P., M. VEILLETTE, P. PAGEAU, R. HAMELIN, M. J. BERGERON, A. MÈRIAUX, Y. CORMIER, C. DUCHAINE (2007): Identification of mycobacteria in peat moss processing plants: application of molecular biology approaches. *Can. J. Microbiol.* 53, 92-99.
doi: 10.1139/w06-105

CHAISSON, R. E., C. A. BENSON, M. P. DUBE, L. B. HEIFETS, J. A. KORVICK, S. ELKIN, T. SMITH, J. C. CRAFT, F. R. SATTTLER (1994): Clarithromycin therapy for bacteremic *Mycobacterium avium* complex disease. A randomized, double-blind, dose-ranging study in patients with AIDS. AIDS Clinical Trials Group Protocol 157 Study Team. 121, 905-911.
doi: 10.7326/0003-4819-121-12-199412150-00001.

CHAN, J., M. HALACHEV, E. YATES, G. SMITH, M. PALLEEN (2012): Whole-genome sequence of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* strain 47J26. J. Bacteriol. 194, 549.

doi: 10.1128/JB.06440-11

CHAVARRIA, M., L. LUTWICK, B. L. DICKINSON (2018): TB or not TB? *Mycobacterium celatum* mimicking *Mycobacterium tuberculosis*: A case of mistaken identity. IDCases, 11, 83-87.

doi: 10.1016/j.idcr.2018.01.015

CIRILLO, J. D., S. FALKOW, L. S. TOMPKINS, L. E. BERMUDEZ (1997): Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. Infect. Immun. 65, 3759–3767.

doi: 10.1128/IAI.65.9.3759-3767.1997

CLARRIDGE 3RD, J. E. (2004): Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 17, 840–862.

doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

CLOUD, J. L., H. NEAL, R. ROSENBERY, C. Y. TURENNE, M. JAMA, D. R. HILLYARD, K. C. CARROLL (2002): Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. J. Clin. Microbiol. 40, 400–406.

doi: 10.1128/JCM.40.2.400-406.2002

CLOUD, J. L., K. C. CARROLL, S. COHEN, C. M. ANDERSON, G. L. WOODS (2005): Interpretive criteria for use of AccuProbe for identification of *Mycobacterium avium* complex directly from 7H9 broth cultures. J. Clin. Microbiol. 43, 3474–3478.

doi: 10.1128/JCM.43.7.3474-3478.2005

CLSI (2008a): Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline (MM18-A). Vol. 28/12. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, SAD, str. 48-52.

CLSI (2008b): Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline (M48-A). Vol. 28/17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, SAD, str. 6-8.

CLSI (2011): Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard (M24–A2). 2. izdanje. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, SAD, str. 19-43.

CLSI (2018a): Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes (M62). 1. izdanje. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, SAD, str. 4-11.

CLSI (2018b): Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and other aerobic actinomycetes (M24). 3. izdanje. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, SAD, str. 37-44.

COOKSEY, R. C., M. A. JHUNG, M. A. YAKRUS, W. R. BUTLER, T. ADÉKAMBI, G. P. MORLOCK, M. WILLIAMS, A. M. SHAMS, B. J. JENSEN, R. E. MOREY, N. CHARLES, S. R. TONEY, K. C. JOST JR, D. F. DUNBAR, V. BENNETT, M. KUAN, A. SRINIVASAN (2008): Multiphasic approach reveals genetic diversity of environmental and patient isolates of *Mycobacterium mucogenicum* and *Mycobacterium phocaicum* associated with an outbreak of bacteremias at a Texas hospital. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2480-2487.

doi: 10.1128/AEM.02476-07

COULON, C., A. COLLIGNON, G. MCDONNELL, V. THOMAS (2010): Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. J. Clin. Microbiol. 48, 2689–2697.

doi: 10.1128/JCM.00309-10

COURTENAY, O., L. A. REILLY, F. P. SWEENEY, V. HIBBERD, S. BRYAN, A. UL-HASSAN, C. NEWMAN, D. W. MACDONALD, R. J. DELAHAY, G. J. WILSON, E. M. WELLINGTON (2006): Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? Biol. Lett. 2, 460-462.

doi: 10.1098/rsbl.2006.0468

CVETNIĆ, Ž., H. KOVAČIĆ, M. OCEPEK (1998): Mycobacteria in the environment and feed of pigs in Croatia. (na njemačkom jeziku). Wien. Tierärztl. Monat. 85, 18-21.

CVETNIĆ, Ž., S. ŠPIČIĆ, M. BENIĆ, V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ, M. PATE, B. KRT, M. OCEPEK (2007): Mycobacterial infections of pigs in Croatia. Acta Vet. Hung. 55, 1-9.
doi: 10.1556/AVet.55.2007.1.1

CVETNIĆ, Ž., S. ŠPIČIĆ, J. TONČIĆ, I. RAČIĆ, S. DUVNJAK, M. ZDELAR-TUK (2011): *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* u divljim svinjama (*Sus scrofa*) u Republici Hrvatskoj. Vet. arhiv 81, 67-76.

DANILCHANKA, O., M. PAVLENOK, M. NIEDERWEIS (2008): Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 3127–3134.
doi: 10.1128/AAC.00239-08

DAVIDSON, P. T. (1989): The diagnosis and management of disease caused by *M. avium* complex, *M. kansasii*, and other mycobacteria. Clin. Chest. Med. 10, 431-433.

DAWSON, D. J. (1971): Potential pathogens among strains of mycobacteria isolated from house-dusts. Med. J. Aust. 1, 679–681.

doi: 10.5694/j.1326-5377.1971.tb87787.x

DE GROOTE, M. A., N. R. PACE, K. FULTON, J. O. FALKINHAM 3rd (2006): Relationships between *Mycobacterium* isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soils. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7602–7606.
doi: 10.1128/AEM.00930-06

DE ROSSI, E., M. C. BLOKPOEL, R. CANTONI, M. BRANZONI, G. RICCARDI, D. B. YOUNG, K. A. DE SMET, O. CIFERRI (1998): Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 1931–1937.

doi: 10.1128/AAC.42.8.1931

DE ZWAAN, R., J. VAN INGEN, D. VAN SOOLINGEN (2014): Utility of *rpoB* gene sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2544–2551.

doi: 10.1128/JCM.00233-14

DELAFONT, V., F. MOUGARI, E. CAMBAU, J. MICHEL, D. BOUCHON, Y. HÈCHARD, L. MOULIN (2014): First evidence of amoebae-mycobacteria association in drinking water network. *Environ. Sci. Technol.* 48, 11872–11882.

doi: 10.1021/es5036255

DEVULDER, G., M. PÉROUSE DE MONTCLOS, J. P. FLANDROIS (2005): A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 293–302.

doi: 10.1099/ijs.0.63222-0

DEY, A., A. K. VERMA, D. CHATTERJI (2010): Role of an RNA polymerase interacting protein, MsRbpA, from *Mycobacterium smegmatis* in phenotypic tolerance to rifampicin. *Microbiology.* 156, 873–883.

doi: 10.1099/mic.0.033670-0

DHAMA, K., M. MAHENDRAN, R. TIWARI, S. DAYAL SINGH, D. KUMAR, S. SINGH, P. M. SAWANT (2011): Tuberculosis in Birds: Insights into the *Mycobacterium avium* Infections. *Vet. Med. Int.* 20, 23–69.

doi: 10.4061/2011/712369

DOBNER, P., K. FELDMANN, M. RIFAI, T. LOSCHER, H. RINDER (1996): Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. *J. Clin. Microbiol.* 34, 866–869.

doi: 10.1128/JCM.34.4.866-869.1996

DU MOULIN, G. C., K. D. STOTTMEIER, P. A. PELLETIER, A. Y. TSANG, J. HEDLEY-WHYTE (1988): Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *JAMA.* 260, 1599–1601.

doi: 10.1001/jama.260.11.1599

DVORSKA, L., L. MATLOVA, M. BARTSON, I. PARMOVA, J. BARTL, P. SVASTOVA, T. J. BULL, I. PAVLIK (2004): Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. *Vet. Microbio.* 99, 239-250. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.01.008

EDSON, R. S., C. L. TERRELL, W. M. BRUTINEL, N. L. WENGENACK (2006): *Mycobacterium intermedium* granulomatous dermatitis from hot tub exposure. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 821–823. doi: 10.3201/eid1205.051281

EL HELOU, G., R. HACHEM, G. M. VIOLA, A. EL ZAKHEM, A. M. CHAFTARI, Y. JIANG, J. TARRAND, I. I RAAD (2013): Management of rapidly growing mycobacterial bacteremia in cancer patients. *Clin. Infect. Dis.* 56, 843–846. doi: 10.1093/cid/cis1032

FALKINHAM 3rd, J.O. (1996): Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 177-215. doi: 10.1128/CMR.9.2.177-215.1996

FALKINHAM 3rd, J. O., C. D. NORTON, M. W. LECHEVALLIER (2001): Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1225–1231. doi: 10.1128/AEM.67.3.1225-1231.2001

FALKINHAM 3rd, J. O., M. ISEMAN, P. DE HAAS, D. VAN SOOLINGEN (2008): *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *J. Water Health.* 6, 209–213. doi: 10.2166/wh.2008.032

FALKINHAM, J. O. (2009): Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J. Appl. Microbiol.* 107, 356–367. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x

FARIA, S., I. JOAO, L. JORDAO (2015): General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection. *J. Pathog.* 6, 1–10.

doi: 10.1155/2015/809014

FERNANDEZ-ROBLAS, R., N. Z. MARTIN-DE-HIJAS, A. I. FERNANDEZ-MARTINEZ, D. GARCÍA-ALMEIDA, I. GADEA, J. ESTEBAN (2008): In vitro activities of tigecycline and 10 other antimicrobials against nonpigmented rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4184–4186.

doi: 10.1128/AAC.00695-08

FLORES, A. R., L. M. PARSONS, M. S. PAVELKA (2005): Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology.* 151, 521–532.

doi: 10.1099/mic.0.27629-0

FROTHINGHAM, R., K. H. WILSON (1993): Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.* 175, 2818–2825.

doi: 10.1128/jb.175.10.2818-2825.1993.

FUJITA, K., Y. ITO, T. HIRAI, K. MAEKAWA, S. IMAI, S. TATSUMI, A. NIIMI, Y. IINUMA, S. ICHIYAMA, M. MISHIMA (2013): Genetic relatedness of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex isolates from patients with pulmonary MAC disease and their residential soils. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 537–541.

doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03929.x

GAO, L. Y., F. LAVAL, E. H. LAWSON, R. K. GROGER, A. WOODRUFF, J. H. MORISAKI, J. S. COX, M. DAFFE, E. J. BROWN (2003): Requirement for kasB in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol. Microbiol.* 49, 1547–1563.

doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03667.x

GARCÍA-JIMÉNEZ, W.L., J. M. BENÍTEZ-MEDINA, R. MARTÍNEZ, J. CARRANZA, R. CERRATO, A. GARCÍA-SÁNCHEZ, D. RISCO, J. C. MORENO, M. SEQUEDA, L. GÓMEZ, P. FERNÁNDEZ-LLARIO, J. HERMOSO-DE-MENDOZA (2015): Non-

tuberculous mycobacteria in wild boar (*Sus scrofa*) from Southern Spain: epidemiological, clinical and diagnostic concerns. *Transbound Emerg. Dis.* 62, 72-80.

doi: 10.1111/tbed.12083

GLAZER, C. S., J. W. MARTYNY, B. LEE, T. L. SANCHEZ, T. M. SELLS, L. S. NEWMAN, J. MURPHY, L. HEIFETS, C. S. ROSE (2007): Nontuberculous mycobacteria in aerosol droplets and bulk water samples from therapy pools and hot tubs. *J. Occup. Environ. Hyg.* 4, 831–840.

doi: 10.1080/15459620701634403

GRANT, I. R., H. J. BALL, M. T. ROWE (1996): Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. in milk by pasteurization. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 253–256.

doi: 10.1111/j.1472-765x.1996.tb01154.x

GRIFFITH, D. E. (2002): Management of disease due to *Mycobacterium kansasii*, *Clin. Chest. Med.* 23, 613-621.

doi: 10.1016/s0272-5231(02)00016-3

GRIFFITH D.E., B. A. BROWN-ELLIOTT, R. J. WALLACE JR. (2003) Thrice-weekly clarithromycin-containing regimen for treatment of *Mycobacterium kansasii* lung disease: results of a preliminary study. *Clin. Infect. Dis.* 37, 1178-1182.

doi: 10.1086/378742

GRIFFITH, D. E., B. A. BROWN-ELLIOTT, B. LANGSJOEN, Y. ZHANG, X. PAN, W. GIRARD, K. NELSON, J. CACCITOLO, J. ALVAREZ, S. SHEPHERD, R. WILSON, E. A. GRAVISS, R. J. WALLACE JR (2006): Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174, 928–934.

doi: 10.1164/rccm.200603-450OC

GRIFFITH, D. E., T. AKSAMIT, B. A. BROWN-ELLIOTT, A. CATANZARO, C. DALEY, F. GORDIN, S. M. HOLLAND, R. HORSBURGH, G. HUITT, M. F. IADEMARCO, M. ISEMAN, K. OLIVIER, S. RUOSS, C. F. VON REYN, R. J. WALLACE JR., K. WINTHROP, ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee, American Thoracic

Society; Infectious Disease Society of America (2007): An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 175, 367-416.
doi: 10.1164/rccm.200604-571ST

GRIFFITH, D. E., B. A. BROWN-ELLIOTT, J. L. BENWILL, R. J. WALLACE JR. (2015): *Mycobacterium abscessus*. “Pleased to meet you, hope you guess my name...”. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, 436–439.
doi: 10.1513/AnnalsATS.201501-015OI

GUPTA, R. S., B. LO, J. SON (2018): Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Front. Microbiol.* 9, 67.
doi: 10.3389/fmicb.2018.00067

HACHEM, R., I. RAAD, K. V. ROLSTON, E. WHIMBEY, R. KATZ, J. TARRAND, H. LIBSHITZ (1996): Cutaneous and pulmonary infections caused by *Mycobacterium vaccae*. *Clin. Infect. Dis.* 23, 173-175.
doi: 10.1093/clinids/23.1.173

HALSTROM, S., P. PRICE, R. THOMSON (2015): Environmental mycobacteria as a cause of human infection. *Int. J. Mycobacteriol.* 4, 81–91.
doi: 10.1016/j.ijmyco.2015.03.002

HANCE, A. J., B. GRANDCHAMP, V. LÉVY-FRÉBAULT, D. LECOSSIER, J. RAUZIER, D. BOCART, B. GICQUEL (1989): Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* 3, 843-849.
doi: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb00233.x

HANSON, K. E., E. S. SLECHTA, H. MUIR, A. P. BARKER (2014): Rapid molecular detection of inducible macrolide resistance in *Mycobacterium chelonae* and *M. abscessus* strains: a replacement for 14-day susceptibility testing? *J. Clin. Microbiol.* 52, 1705-1707.
doi: 10.1128/JCM.03464-13

HAWKINS, C. C., J. W. GOLD, E. WHIMBEY, T. E. KIEHN, P. BRANNON, R. CAMMARATA, A. E. BROWN, D. ARMSTRONG (1986): *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* 105, 184–188.

doi: 10.7326/0003-4819-105-2-184

HECKMAN, G. A., C. HAWKINS, A. MORRIS, L. L. BURROWS, C. BERGERON (2004): Rapidly progressive dementia due to *Mycobacterium neoaurum* meningoencephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 924–927.

doi: 10.3201/eid1005.030711

HEIDARIEH, P., A. HASHEMI-SHAHRAKI, A. D. KHOSRAVI, S. ZAKER-BOUSTANABAD, H. SHOJAEI, M. M. FEIZABADI (2013): *Mycobacterium arupense* infection in HIV-infected patients from Iran. *Int. J. STD AIDS.* 24, 485–487. doi: 10.1177/0956462412472818

HO, I. I., C. Y. CHAN, A. F. CHENG (2000): Aminoglycoside resistance in *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium-M. intracellulare*, and *Mycobacterium fortuitum*: are aminoglycoside-modifying enzymes responsible? *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 39–42. doi: 10.1128/aac.44.1.39-42.2000

HOEFSLOOT, W., J. VAN INGEN, C. ANDREJAK, K. ANGEY, R. BAURIAUD, P. BEMER, N. BEYLIS, M. J. BOEREE, J. CACHO, V. CHIHOTA, E. CHIMARA, G. CHURCHYARD, R. CIAS, R. DAZA, C. L. DALEY, P. N. DEKHUIJZEN, D. DOMINGO, F. DROBNIEWSKI, J. ESTEBAN, M. FAUVILLE-DUFAUX, D. B. FOLKVARDSSEN, N. GIBBONS, E. GÓMEZ-MAMPASO, R. GONZALEZ, H. HOFFMANN, P. R. HSUEH, A. INDRA, T. JAGIELSKI, F. JAMIESON, M. JANKOVI, E. JONG, J. KEANE, W. J. KOH, B. LANGE, S. LEO, R. MACEDO, T. MANNSÅKER, T. K. MARRAS, J. MAUGEIN, H. J. MILBURN, T. MLINKÓ, N. MORCILLO, K. MORIMOTO, D. PAPAVENTSIS, E. PALENQUE, M. PAEZ-PEÑA, C. PIERSIMONI, M. POLANOVÁ, N. RASTOGI, E. RICHTER, M. J. RUIZ-SERRANO, A. SILVA, M. P. DA SILVA, H. SIMSEK, D. VAN SOOLINGEN, N. SZABÓ, R. THOMSON, T. TÓRTOLA FERNANDEZ, E. TORTOLI, S. E. TOTTE, G. TYRRELL, T. VASANKARI, M. VILLAR, R. WALKIEWICZ, K. L. WINTHROP, D. WAGNER. Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group.

(2013): The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur. Respir. J.* 42, 1604–1613. doi: 10.1183/09031936.00149212

HOPE, J. C., M. L. THOM, B. VILLARREAL-RAMOS, H. M. VORDERMEIER, R. G. HEWINSON, C. J. HOWARD (2005): Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 432–439. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02882.x

HUARD, R. C., L. C. LAZZARINI, W. R. BUTLER, D. VAN SOOLINGEN, J. L. HO (2003): PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1637-1650. doi: 10.1128/jcm.41.4.1637-1650.2003

HUGHES, M. S., N. W. BALL, J. MCCARROLL, M. ERSKINE, M. J. TAYLOR, J. M. POLLOCK, R. A. SKUCE, S. D. NEILL (2005): Molecular analyses of mycobacteria other than the *M. tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. *Vet. Microbiol.* 108, 101-112. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.03.001

ICHIYAMA, S., K. SHIMOKATA, M. TSUKAMURA (1988): The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water and dusts. *Microbiol. Immunol.* 32, 733–739. doi: 10.1111/j.1348-0421.1988.tb01434.x

INAGAKI, T., K. NISHIMORI, T. YAGI, K. ICHIKAWA, M. MORIYAMA, T. NAKAGAWA, T. SHIBAYAMA, K. I. UCHIYA, T. NIKAI, K. OGAWA (2009): Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2156–2164. doi: 10.1128/JCM.02373-08.

ISEMAN, M. D., T. K. MARRAS (2008): The importance of nontuberculous mycobacterial disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 999–1000.

doi: 10.1164/rccm.200808-1258ED

ITO, A., F. KISHI, N. SAITO, Y. KAZUMI, S. MITARAI (2005): Pulmonary *Mycobacterium intermedium* disease in an elderly man with healed pulmonary tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 43, 1473–1474.

doi: 10.1128/JCM.43.3.1473-1474.2005

JAGIELSKI, T., A. MINIAS, J. VAN INGEN, N. RASTOGI, A. BRZOSTEK, A. ŻACZEK, J. DZIADEK (2016): Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 29, 239–290.

doi: 10.1128/CMR.00055-15

JANKOVIĆ, M., M. SAMARŽIJA, I. SABOL, M. JAKOPOVIĆ, V. KATALINIĆ
JANKOVIĆ, L. ZMAK, B. TIČAC, A. MARUŠIĆ, M. OBROVAC, J. VAN INGEN (2013): Geographical distribution and clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria in Croatia. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 17, 836-841.

doi: 10.5588/ijtld.12.0843

JARLIER, V., H. NIKAIDO (1994): Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiol. Lett. 123, 11–18.

doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07194.x

JOAO, I., P. CRISTOVAO, L. ANTUNES, B. NUNES, L. JORDAO (2014): Identification of nontuberculous mycobacteria by partial gene sequencing and public databases. Int. J. Mycobacteriol. 3, 144-151.

doi: 10.1016/j.ijmyco.2014.04.001

JONES, D., D. V. HAVLIR (2002): Nontuberculous mycobacteria in the HIV infected patient. Clin. Chest. Med. 23, 665–674.

doi: 10.1016/s0272-5231(02)00015-1

JOST JR., K. C., D. F. DUNBAR, S. S. BARTH, V. L. HEADLEY, L. B. ELLIOTT (1995): Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex directly from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high-performance liquid

chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1270–1277.

doi: 10.1128/JCM.33.5.1270-1277.1995

JUN, H. J., N. Y. LEE, J. KIM, W. J. KOH (2010): Successful treatment of *Mycobacterium celatum* pulmonary disease in an immunocompetent patient using antimicrobial chemotherapy and combined pulmonary resection. *Yonsei. Med. J.* 51, 980–983.
doi: 10.3349/ymj.2010.51.6.980

KANKYA, C., A. MUWONGE, B. DJONNE, M. MUNYEME, J. OPUDA-ASIBO, E. SKJERVE, J. OLOYA, V. EDVARDBSEN, T. B. JOHANSEN (2011): Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: public health significance. *BMC Public Health.* 11, 320.

doi: 10.1186/1471-2458-11-320

KENT, P. T., G. P. KUBICA (1985): Public health mycobacteriology: a guide for the level III. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta

KERR, J. H., T. BARRETT (2000): Military Dermatology. Atypical Mycobacterial Diseases. San Diego, California, SAD, str. 401.

KIM, B. J., S. H. LEE, M. A. LYU, S. J. KIM, G. H. BAI, G. T. CHAE, E. C. KIM, C. Y. CHA, Y. H. KOOK (1999): Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.* 37, 1714–1720.
doi: 10.1128/JCM.37.6.1714-1720.1999.

KIM, S. H., J. H. SHIN (2018): Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, *hsp65*, and *rpoB*. *J. Clin. Lab. Anal.* 32.
doi: 10.1002/jcla.22184

KLEIN, J. L., T. J. BROWN, G. L. FRENCH (2001): Rifampin resistance in *Mycobacterium kansasii* is associated with *rpoB* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3056–3058.
doi: 10.1128/AAC.45.11.3056-3058.2001

KOBASHI, Y., K. YOSHIDA, N. MIYASHITA, Y. NIKI, M. OKA (2006): Relationship between clinical efficacy of treatment of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease and drug-sensitivity testing of *Mycobacterium avium* complex isolates. J. Infect. Chemother. 12, 195–202.

doi: 10.1007/s10156-006-0457-8

KOHLER, P., S. P. KUSTER, G. BLOEMBERG, B. SCHULTHESS, M. FRANK, F. C. TANNER, M. RÖSSLE, C. BÖNI, V. FALK, M. J. WILHELM, R. SOMMERSTEIN, Y. ACHERMANN, J. TEN OEVER, S. B. DEBAST, M. J. H. M. WOLFHAGEN, G. J. B. BRAVO BRUINSMA, M. C. VOS, A. BOGERS, A. SERR, F. BEYERSDORF, H. SAX, E. C. BÖTTGER, R. WEBER, J. VAN INGEN, D. WAGNER, B. HASSE (2015): Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. Eur. Heart. J. 36, 2745–2753. doi: 10.1093/eurheartj/ehv342

KONTOS, F., D. N. MAVROMANOLAKIS, M. C. ZANDE, Z. G. GITTI (2016): Isolation of *Mycobacterium kumamotoense* from a patient with pulmonary infection and latent tuberculosis. Indian J. Med. Microbiol. 34, 241-244.

doi: 10.4103/0255-0857.180356

KUNZE, Z. M., F. PORTAEL, J. J. MCFADDEN (1992): Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. J. Clin. Microbiol. 30, 2366-2372.

LAGIER, J. C., S. EDOUARD, I. PAGNIER, O. MEDIANNIKOV, M. DRANCOURT, D. RAOULT (2015): Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 28, 208–236.

doi: 10.1128/CMR.00110-14

LAI, C. C., H. W. CHEN, W. L. LIU, L. W. DING, C. L. LIN, G. D. LU, P. R. HSUEH (2008): Fatal meningitis caused by *Mycobacterium nonchromogenicum* in a patient with nasopharyngeal carcinoma. Clin. Infect. Dis. 46, 325-326.

doi: 10.1086/524897

LALANDE, V., F. BARBUT, A. VARNEROT, M. FEBVRE, D. NESA, S. WADEL, V. VINCENT, J. C. PETIT (2001): Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with water from refrigerated fountains. *J. Hosp. Infect.* 48, 76-79.

doi: 10.1053/jhin.2000.0929

LAMBERT, P. A. (2002): Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 92, 46S–54S.

LANDE, L., R. KWAIT, M. D. WILLIAMS, E. IAKHIAEVA, D. D. PETERSON, R. J. WALLACE, J. FALKINHAM (2015): Hot water heaters are serving as incubators for nontuberculous mycobacteria in the home environment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191.

LEE, H., H. E. BANG, G. H. BAI, S. N. CHO (2003): Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2213–2218.

doi: 10.1128/JCM.41.5.2213-2218.2003

LEE, C. K., H. M. GI, Y. CHO, Y. K. KIM, K. N. LEE, K. J. SONG, J. W. SONG, K. S. PARK, E. M. PARK, H. LEE, G. H. BAI (2004): The genomic heterogeneity among *Mycobacterium terrae* complex displayed by sequencing of 16S rRNA and *hsp65* genes. *Microbiol. Immunol.* 48, 83-90.

doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03492.x.

LEHMANN, K. B., R. NEUMANN (1896): Atlas und Grundris der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik. 1. izdanje. München, Njemačka, str. 154.

doi: 10.5962/bhl.title.113833

LI, X. Z., L. ZHANG, H. NIKAIDO (2004): Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2415–2423.

doi: 10.1128/AAC.48.7.2415-2423.2004

LOCATELLI, M. E., S. TOSTO, V. D'AGATA, P. BONAVENTURA, R. S. GRASSO, A. MARINO, A. PAMPALONI, D. SCUDERI, F. COSENTINO, B. CACOPARDO (2020):

Disseminated disease by *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium celatum* in an immunocompromised host. Am. J. Case. Rep. 21, 1-5.

doi: 10.12659/AJCR.921517

LOPEZ, F. K., M. MILEY, B. TAIWO (2016): *Mycobacterium arupense* as an emerging cause of tenosynovitis. Emerg. Infect. Dis. 22, 559–561.

doi: 10.3201/eid2203.151479

LOURO, A. P., K. B. WAITES, E. GEORGESCU, W. H. BENJAMIN JR. (2001): Direct identification of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium gordonae* from MB/BacT bottles using AccuProbe. J. Clin. Microbiol. 39, 570–573.

doi: 10.1128/JCM.39.2.570-573.2001

LUCAS, A., G. GAYOT (1967): [Pathology of milk production. 3. Current procedures for detection of bovine tuberculosis]. Ann. Nutr. Aliment. 21, A1-A63

MACELLONI MARQUES, L. R., L. FERRAZOLI, É. CHIMARA (2011): Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: presumptive diagnosis based on the international microbiological criteria adopted in the state of São Paulo, Brazil, 2011-2014. J. Bras. Pneumol. 25, 45.

doi: 10.1590/1806-3713/e20180278

MACHADO, G. E., C. K. MATSUMOTO, E. CHIMARA, F. DA SILVA DUARTE, D. DE FREITAS, M. PALACI, D. J. HADAD, K. V. BATISTA, L. M. L. LOPES, J. P. RAMOS, C. E. CAMPOS, P. C. CALDAS, B. HEYM, S. C. LEÃO (2014): Multilocus sequence typing scheme versus pulsed-field gel electrophoresis for typing *Mycobacterium abscessus* isolates. J. Clin. Microbiol. 52, 2881–2891.

doi: 10.1128/JCM.00688-14.

MACHERAS, E., A. L. ROUX, F. RIPOLL, V. SIVADON-TARDY, C. GUTIERREZ, J. L. GAILLARD, B. HEYM (2009): Inaccuracy of single-target sequencing for discriminating species of the *Mycobacterium abscessus* group. J. Clin. Microbiol. 47, 2596–2600.

doi: 10.1128/JCM.00037-09

MACHERAS, E., A. L. ROUX, S. BASTIAN, S. C. LEÃO, M. PALACI, V. SILVADON-TARDY, C. GUTIERREZ, E. RICHTER, S. RÜSCH-GERDES, G. PFYFFER, T. BODMER, E. CAMBAU, J. L. GAILLARD, B. HEYM (2011): Multilocus sequence analysis and *rpo B* sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu Lato) strains. J. Clin. Microbiol. 49, 491–499. doi: 10.1128/JCM.01274-10

MARTIN, L. K., R. LAWRENCE, S. KOSSARD, D. F. MURRELL (2007): Cutaneous *Mycobacterium neoaurum* infection causing scarring alopecia in an immunocompetent host. Br. J. Dermatol. 157, 204-206. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07953.x.

MASTROIANNI, A. (2003): *Mycobacterium flavescens* vertebral osteomyelitis in an immunocompetent host. Infez. Med. 11, 97–101.

MATLOVA, L., L. DVORSKA, W. Y. AYELE, M. BARTSON, T. AMEMORI, I. PAVLIK (2005): Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. J. Clin. Microbiol. 43, 1261-1268. doi: 10.1128/JCM.43.3.1261-1268.2005

MATSUMOTO, C. K., P. J. BISPO, K. SANTIN, C. L. NOGUEIRA, S. C. LEÃO (2014): Demonstration of plasmid-mediated drug resistance in *Mycobacterium abscessus*. J. Clin. Microbiol. 52, 1727–1729. doi: 10.1128/JCM.00032-14

MCCORRY, T. P., C. M. MCCORMICK, M. S. HUGHES, J. M. POLLOCCK, S. D. NEILL (2004): *Mycobacterium nonchromogenicum* in nasal mucus from cattle in a herd infected with bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 99, 281-285. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.12.006

MEIER, A., P. KIRSCHNER, B. SPRINGER, V. A. STEINGRUBE, B. A. BROWN, R. J. WALLACE JR., E. C. BÖTTGER (1994): Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. Antimicrob. Agents. Chemother. 38,

381-384.

doi: 10.1128/aac.38.2.381

MEIER, A., L. HEIFETS, R. J. WALLACE JR., Y. ZHANG, B. A. BROWN, P. SANDER, E. C. BÖTTGER (1996): Molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *Mycobacterium avium*: observation of multiple 23S rDNA mutations in a clonal population. *J. Infect. Dis.* 174, 354-360.

doi: 10.1093/infdis/174.2.354

MIJS, W., P. DE HAAS, R. ROSSAU, T. VAN DER LAAN, L. RIGOUTS, F. PORTAELS, D. VAN SOOLINGEN (2002): Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1505-1518.

doi: 10.1099/00207713-52-5-1505

MILLER, C. D. , R. CHILD, J. E. HUGHES, M. BENSCAI, J. P. DER, R. C. SIMS, A. J. ANDERSON (2007): Diversity of soil mycobacterium isolates from three sites that degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1612–1624.

doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03202.x

MOHAMED, A. M., D. J. KUYPER, P. C. IWEN, H. H. ALI, D. R. BASTOLA, S. H. HINRICHS (2005): Computational approach involving use of the internal transcribed spacer 1 region for identification of *Mycobacterium species*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3811–2817.

doi: 10.1128/JCM.43.8.3811-3817.2005

MOLLOY, J., M. SHANDILYA, B. MAHESH, D. MCSHANE, B. EL NAZIR (2008): One to make the diagnosis. A case of non tuberculous mycobacterial mastoiditis in a nine year old female. *Ir. Med. J.* 101:123–124.

MOORE, J. E., M. E. KRUIJSHAAR, L. P. ORMEROD, F. DROBNIEWSKI, I. ABUBAKAR (2014): Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Public Health.* 10, 612.

doi:10.1186/1471-2458-10-612

MORIMOTO, Y., E. D. CHAN, L. HEIFETS, J. M. ROUTES (2007): Pulmonary infection with *Mycobacterium neoaurum* identified by 16S ribosomal DNA sequencing. *J. Infect.* 54, 227-231.

doi: 10.1016/j.jinf.2006.12.010

NAGAO, M., M. SONOBE, T. BANDO, T. SAITO, M. SHIRANO, A. MATSUSHIMA, N. FUJIHARA, S. TAKAKURA, Y. IINUMA, S. ICHIYAMA (2009): Surgical site infection due to *Mycobacterium peregrinum*: a case report and literature review. *Int. J. Infect. Dis.* 13, 209-211.

doi: 10.1016/j.ijid.2008.06.018

NASH, D. R., R. J. WALLACE JR, V. A. STEINGRUBE, T. UDOU, L. C. STEELE, G. D. FORRESTER (1986): Characterization of beta-lactamases in *Mycobacterium fortuitum* including a role in beta-lactam resistance and evidence of partial inducibility. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 1276–1282.

doi: 10.1164/arrd.1986.134.5.1276

NASH, K. A., C. B. INDERLIED (1995): Genetic basis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* isolated from patients with disseminated disease. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39, 2625-2630.

doi: 10.1128/aac.39.12.2625

NASH, K. A., N. ANDINI, Y. ZHANG, B. A. BROWN-ELLIOTT, R. J. WALLACE JR (2006): Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50, 3476–3478.

doi: 10.1128/AAC.00402-06

NASH, K. A., B. A. BROWN-ELLIOTT, R. J. WALLACE JR (2009): A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1367–1376.

doi: 10.1128/AAC.01275-08

NEONAKIS, I. K., Z. GITTI, F. KONTOS, S. BARITAKI, E. PETINAKI, M. BARITAKI (2010): *Mycobacterium arupense* pulmonary infection: antibiotic resistance and restriction fragment length polymorphism analysis. *Indian. J. Med. Microbiol.* 28, 173–176. doi: 10.4103/0255-0857.62502

NGEOW, Y. F., W. Y. WEE, Y. L. WONG, J. L. TAN, C. S. ONGI, K. P. NG, S. W. CHOO (2012a): Genomic analysis of *Mycobacterium abscessus* strain M139, which has an ambiguous subspecies taxonomic position. *J. Bacteriol.* 194, 6002–6003. doi: 10.1128/JB.01455-12

NGEOW, Y. F., Y. L. WONG, J. L. TAN, R. ARUMUGAM, G. J. WONG, C. S. ONG, K. P. NG, S. W. CHOO (2012b): Genome sequence of *Mycobacterium massiliense* M18, isolated from a lymph node biopsy specimen. *J. Bacteriol.* 194, 4125. doi: 10.1128/JB.00712-12

NGUYEN, L., S. CHINNAPAPAGARI, C. J. THOMPSON (2005): FbpA-Dependent biosynthesis of trehalose dimycolate is required for the intrinsic multidrug resistance, cell wall structure, and colonial morphology of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 187, 6603–6611. doi: 10.1128/JB.187.19.6603-6611.2005

NGUYEN, H. T., K. A. WOLFF, R. H. CARTABUKE, S. OGWANG, L. NGUYEN (2010): A lipoprotein modulates activity of the MtrAB two-component system to provide intrinsic multidrug resistance, cytokinetic control and cell wall homeostasis in *Mycobacterium*. *Mol. Microbiol.* 76, 348–364. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07110.x

NIEDERWEIS, M., O. DANILCHANKA, J. HUFF, C. HOFFMANN, H. ENGELHARDT (2010): Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends. Microbiol.* 18, 109–116. doi: 10.1016/j.tim.2009.12.005

OKABAYASHI, A., M. HASEGAWA, A. SATO, H. KATSURA, T. KAMATA, E. KOH, Y. SEKINE (2017): A case of respiratory infection possibly caused by *Mycobacterium triviale*:

Current problems on diagnostic and therapeutic strategies. *Respir. Med. Case Rep.* 21, 138-141.

doi: 10.1016/j.rmcr.2017.04.012

OKAMORI, S., T. ASAKURA, T. NISHIMURA, E. TAMIZU, M. ISHII, M. YOSHIDA, H. FUKANO, Y. HAYASHI, M. FUJITA, Y. HOSHINO, T. BETSUYAKU, N. HASEGAWA (2018): Natural history of *Mycobacterium fortuitum* pulmonary infection presenting with migratory infiltrates: a case report with microbiological analysis. *BMC Infect. Dis.* 18, 1. doi: 10.1186/s12879-017-2892-9

OLIVIER, K. N., D. E. GRIFFITH, G. EAGLE, J. P. MCGINNIS 2ND, L. MICONI, K. LIU, C. L. DALEY, K. L. WINTHROP, S. RUOSS, D. J. ADDRIZZO-HARRIS, P. A. FLUME, D. DORGAN, M. SALATHE, B. A. BROWN-ELLIOTT, R. GUPTA, R. J. WALLACE JR (2017): Randomized trial of liposomal amikacin for inhalation in nontuberculous mycobacterial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195, 814–823. doi: 10.1164/rccm.201604-0700OC

OVRUTSKY, A. R., E. D. CHAN, M. KARTALIJA, X. BAI, M. JACKSON, S. GIBBS, J. O. FALKINHAM 3rd, M. D. ISEMAN, P. R. REYNOLDS, G. MCDONNELL, V. THOMAS (2013): Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3185–3192. doi: 10.1128/AEM.03823-12

PANAGIOTOU, M., A. I. PAPAIOANNOU, K. KOSTIKAS, M. PARASKEUA, E. VELENTZA, M. KANELLOPOULOU, V. FILADITAKI, N. KARAGIANNIDIS (2014): The epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria: data from a general hospital in Athens, Greece, 2007-2013. *Pulm. Med.* 2014. doi: 10.1155/2014/894976

PARK, H., H. JANG, J. KIM, B. CHUNG, C. L. CHANG, S. K. PARK, S. SONG (2000): Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus- and species-specific PCR primers. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4080–

4085.

doi: 10.1128/JCM.38.11.4080-4085.2000

PARTE, A.C. (2018): LPSN – list of prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1825-1829.
doi: 10.1099/ijsem.0.002786

PATE, M., I. ZDOVC, T. PIRS, B. KRT, M. OCEPEK (2004): Isolation and characterisation of *Mycobacterium avium* and *Rhodococcus equi* from granulomatous lesions of swine lymph nodes in Slovenia. *Acta Vet. Hung.* 52, 143-150.
doi: 10.1556/AVet.52.2004.2.2

PATE, M., M. ŽOLNIR-DOVČ, D. KUŠAR, B. KRT, S. ŠPIČIĆ, Ž. CVETNIĆ, M. OCEPEK (2011): The first report of *Mycobacterium celatum* isolation from domestic pig (*Sus scrofa domestica*) and Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and an overview of human infections in Slovenia. *Vet. Med. Int.* 1-8.
doi: 10.4061/2011/432954

PATSCHE, C. B., E. SVENSSON, C. WEJSE (2014): Disseminated *Mycobacterium celatum* disease with prolonged pulmonary involvement. *Int. J. Infect. Dis.* 26, 88-90.
doi: 10.1016/j.ijid.2014.02.020

PAULS, R. J., C. Y. TURENNE, J. N. WOLFE, A. KABANI (2003): A high proportion of novel mycobacteria species identified by 16S rDNA analysis among slowly growing AccuProbe-negative strains in a clinical setting. *Am. J. Clin. Pathol.* 120, 560–566.
doi: 10.1309/VF40-1U7H-7DHE-0FRE

PEREIRA, A. C., B. RAMOS, A. C. REIS, M. V. CUNHA (2020): Non-tuberculous mycobacteria: Molecular and physiological bases of virulence and adaptation to ecological niches. *Microorganisms.* 8, 1380.
doi: 10.3390/microorganisms8091380

PERKINS, K. M., A. LAWSIN, N. A. HASAN, M. STRONG, A. L. HALPIN, R. R. RODGER, H. MOULTON-MEISSNER, M. B. CRIST, S. SCHWARTZ, J. MARDERS, C.

L. DALEY, M. SALFINGER, J. F. PERZ (2016): Notes from the field: *Mycobacterium chimaera* contamination of heater-cooler devices used in cardiac surgery – United States. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 65, 1117–1118.

doi: 10.15585/mmwr.mm6540a6

PETERSON, K. J. (1965): *Mycobacterium fortuitum* as a cause of bovine mastitis: tuberculin sensitivity following experimental infections. J. Am. Vet. Med. Assoc. 147, 1600-1607.

PHILALAY, J. S., C. O. PALERMO, K. A. HAUGE, T. R. RUSTAD, G. A. CANGELOSI (2004): Genes required for intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 3412–3418.

doi: 10.1128/AAC.48.9.3412-3418.2004

PIERSIMONI, C., P. G. ZITTI, D. NISTA, S. BORNIGIA (2003): *Mycobacterium celatum* pulmonary infection in the immunocompetent: case report and review. Emerg. Infect. Dis. 9, 399–402.

doi: 10.3201/eid0903.020342

PORVAZNIK, I., I. SOLOVIC, J. MOKRY (2017): Non-tuberculous mycobacteria: classification, diagnostics, and therapy. Adv. Exp. Med. Biol. 944, 19–25.

doi: 10.1007/5584_2016_45

POTTERS, D., M. SEGHERS, G. MUYLDERMANS, D. PIÉRARD, A. NAESSENS, S. LAUWERS (2003): Recovery of *Mycobacterium elephantis* from sputum of a patient in Belgium. J. Clin. Microbiol. 41, 1344.

doi: 10.1128/jcm.41.3.1344.2003

POWELL JR., B. L., J. E. STEADHAM (1981): Improved technique for isolation of *Mycobacterium kansasii* from water. J. Clin. Microbiol. 13, 969-975.

doi: 10.1128/JCM.13.5.969-975.1981

PRAMMANANAN, T., P. SANDER, B. A. BROWN, K. FRISCHKOM, G. O. ONYI, Y. ZHANG, E. C. BÖTTGER, R. J. WALLACE JR. (1998): A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine

aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. J. Infect. Dis. 177, 1573-1581.

doi: 10.1086/515328

PREVOTS, D. R., T. K. MARRAS (2015): Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. Clin. Chest. Med. 36, 13–34.

doi: 10.1016/j.ccm.2014.10.002

QUINN, P. J., B. K. MARKEY, F. C. LEONARD, E. S. FITZPATRIK, S. FANNING, P. J. HARTIGAN (2011): Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2. Izdanje. Blackwell Publishing, Oxford, Engleska, str. 250-262.

RAMIREZ, M. S., M. E. TOLMASKY (2010): Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist. Updat. 13, 151–171.

doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003

RAMOM-GARCIA, S., C. MARTIN, J. A. AINSA, E. DE ROSSI (2006): Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*. J. Antimicrob. Chemother. 57, 252–259.

doi: 10.1093/jac/dki436

REN, H., J. LIU (2006): AsnB is involved in natural resistance of *Mycobacterium smegmatis* to multiple drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 250–255.

doi: 10.1128/AAC.50.1.250-255.2006

REVA, O., I. KOROTETSKIY, A. ILIN (2015): Role of the horizontal gene exchange in evolution of pathogenic Mycobacteria. BMC Evol. Biol. 15, S2.

doi: 10.1186/1471-2148-15-S1-S2

REZNIKOV, M., J. H. LEGGO, D. J. DAWSON (1971): Investigation by seroagglutination of strains of the *Mycobacterium intracellulare*-*M. scrofulaceum* group from house dusts and sputum in Southeastern Queensland. Am. Rev. Respir. Dis. 104, 951–953.

doi: 10.1164/arrd.1971.104.6.951

RINDI, L., C. GARZELLI (2016): Increase in non-tuberculous mycobacteria isolated from humans in Tuscany, Italy, from 2004 to 2014. *BMC Infect. Dis.* 16, 44. doi: 10.1186/s12879-016-1380-y

RINGUET, H., C. AKOUA-KOFFI, S. HONORE, A. VARNEROT, V. VINCENT, P. BERCHE, J. L. GAILLARD, C. PIERRE-AUDIGIER (1999): *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 37, 852–857. doi: 10.1128/JCM.37.3.852-857.1999.

RIPOLL, F., S. PASEK, C. SCHENOWITZ, C. DOSSAT, V. BARBE, M. ROTTMAN, E. MACHERAS, B. HEYM, J. L. HERRMANN, M. DAFFE, R. BROSCHE, J. L. RISLER, J. L. GAILLARD (2009): Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One.* 4, e5660. doi: 10.1371/journal.pone.0005660

RODRÍGUEZ-ARANDA, A., M. S. JIMENEZ, J. YUBERO, F. CHAVES, R. RUBIO-GARCIA, E. PALENQUE, M. J. GARCÍA, M. C. MENÉNDEZ (2010): Misidentification of *Mycobacterium kumamotoense* as *M. tuberculosis*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1178-1180. doi: 10.3201/eid1607.091913

ROTH, A., M. FISCHER, M. E. HAMID, S. MICHALKE, W. LUDWIG, H. MAUCH (1998): Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J. Clin. Microbiol.* 36, 139-147. doi: 10.1128/JCM.36.1.139-147.1998

ROTH, A., U. REISCHL, A. STREUBEL, L. NAUMANN, R. M. KROPPESTEDT, M. HABICHT, M. FISCHER, H. MAUCH (2000): Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1094–1104. doi: 10.1128/JCM.38.3.1094-1104.2000.

RUNYON, E. H. (1965): Atypical mycobacteria: their classification. *Am. Rev. Respir. Dis.* 91, 288–289.

RUNYON, E. H. (1970): Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am. J. Clin. Pathol.* 54, 578–86.

doi: 10.1093/ajcp/54.4.578

RYAN, K. J., C. G. RAY (2004): *Sherris Medical Microbiology. Mycobacteria.* 4. izdanje. McGraw-Hill, New York, str. 457-463.

SAKAI, T., C. KOBAYASHI, M. SHINOHARA (2005): *Mycobacterium peregrinum* infection in a patient with AIDS. *Intern. Med.* 44, 266-269.

doi: 10.2169/internalmedicine.44.266

SALAH, I. B., T. ADEKAMBI, D. RAOULT, M. DRANCOURT (2008): *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology.* 154, 3715–3723.

doi: 10.1099/mic.0.2008/020164-0

SANDER, P., E. DE ROSSI, B. BODDINGHAUS, R. CANTONI, M. BRANZONI, E. C. BOTTGER, H. TAKIFF, R. RODRIQUEZ, G. LOPEZ, G. RICCARDI (2000): Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 193, 19–23.

doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09396.x

SAWAHATA, M., E. HAGIWARA, T. OGURA, S. KOMATSU, A. SEKINE, N. TSUCHIYA, H. TAKAHASHI (2010): Pulmonary mycobacteriosis caused by *Mycobacterium peregrinum* in a young, healthy man. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* 48, 866–870.

SCHULZE-RÖBBECKE, R., K. BUCHHOLTZ (1992): Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl. Environ.* 58, 1869–1873.

doi: 10.1128/AEM.58.6.1869-1873.1992

SEIDL, A., B. LINDEQUE (2014): Large joint osteoarticular infection caused by *Mycobacterium arupense*. *Orthopedics.* 37, 848–850.

doi: 10.3928/01477447-20140825-93

SHOJAEI, H., J. G. MAGEE, R. FREEMAN, M. YATES, N. U. HORADAGODA, M. GOODFELLOW (2000): *Mycobacterium elephantis* sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic *Mycobacterium* isolated from an elephant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1817-1820.

doi: 10.1099/00207713-50-5-1817

SILVA, P. E., F. BIGI, M. P. SANTANGELO, M. I. ROMANO, C. MARTIN, A. CATALDI, J. A. AINSA (2001): Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 800–804.

doi: 10.1128/AAC.45.3.800-804.2001

SIMNER, P. J., S. STENGER, E. RICHTER, B. A. BROWN-ELLIOTT, R. J. WALLACE JR, N. L. WENGENACK (2015): *Mycobacterium*: Laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. *Manual of clinical microbiology*. 11. izdanje. Washington, DC, ASM Press, str. 536-569.

doi: 10.1128/9781555817381.ch31

SMITH, D. S., P. LINDHOLM-LEVY, G. A. HUITT, L. B. HEIFETS, J. L. COOK (2000): *Mycobacterium terrae*: case reports, literature review, and in vitro antibiotic susceptibility testing. *Clin. Infect. Dis.* 3, 444-453.

doi: 10.1086/313693.

SONNENBERG, P., J. MURRAY, J. R. GLYNN, R. G. THOMAS, P. GODFREY-FAUSSETT, S. SHEARER (2000): Risk factors for pulmonary disease due to culture-positive *M. tuberculosis* or non-tuberculous mycobacteria in South African gold miners. *Eur. Respir. J.* 15, 291–296.

doi: 10.1034/j.1399-3003.2000.15b12.x

STEADHAM, J. E., S. K. STALL, J. L. SIMMANK (1985). Use of the BACTEC system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, and *M. avium* complex. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 3, 33-40.

doi: 10.1016/0732-8893(85)90064-1

STELMACK, P. L., M. R. GRAY, M. A. PICKARD (1999): Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 163–168. doi: 10.1128/AEM.65.1.163-168.1999

STEPHAN, J., C. MAILAENDER, G. ETIENNE, M. DAFPE, M. NIEDERWEIS (2004): Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4163–4170. doi: 10.1128/AAC.48.11.4163-4170.2004

STOUT, J. E., W. J. KOH, W. W. YEW (2016): Update on pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Int. J. Infect. Dis.* 45, 123–134. doi: 10.1016/j.ijid.2016.03.006

STRAHL, E. D., G. E. GILLASPY, J. O. FALKINHAM 3rd (2001): Fluorescent acid fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4432–4439. doi: 10.1128/aem.67.10.4432-4439.2001

STROLLO, S. E., J. ADJEMIAN, M. K. ADJEMIAN, D. R. PREVOTS (2015): The burden of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in the United States. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, 1458–1464. doi: 10.1513/AnnalsATS.201503-173OC

SWENSON, J. M., R. J. WALLACE JR, V. A. SILCOX, C. THORNSBERRY (1985): Antimicrobial susceptibility of five subgroups of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 807–811. doi: 10.1128/aac.28.6.807

ŠPIČIĆ, S., M. PATE, V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ, S. DUVNJAK, M. OCEPEK, M. ZDELAR-TUK, B. KRT, M. MITAK, Ž. CVETNIĆ (2010): Molecular epizootiology and epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolated from human, animals and environment in Croatia. (na njemačkom jeziku). *Wien. Tierärztl. Monat.* 97, 219–224.

ŠPIČIĆ, S., V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ, M. ZDELAR-TUK, S. DUVNJAK, I. RAČIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES, A. VUJNOVIĆ, Ž. CVETNIĆ (2011): Nontuberculous mycobacteria and unspecific tuberculin skin reaction in cattle in Croatia. Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology (ESM), 26.-29. lipnja, Lübeck, Njemačka. Zbornik radova, str. 80-81.

TELENTI, A., F. MARCHESI, M. BALZ, F. BALLY, E. C. BÖTTGER, T. BODMER (1993): Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 175–178.

doi: 10.1128/JCM.31.2.175-178.1993

TENOVER, F. C., R. D. ARBEIT, R. V. GOERING, P. A. MICKELSEN, B. E. MURRAY, D. H. PERSING, B. SWAMINATHAN (1995): Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.

doi: 10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995

THE RESEARCH COMMITTEE OF THE BRITISH THORACIC SOCIETY (2002): Pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium-intracellulare* in HIV-negative patients: five-year follow-up of patients receiving standardised treatment. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 6, 628–634.

THOEN, C. O., C. MALSTROM, E. M. HIMES, K. MILLS (1981): Use of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting mycobacterial antigens in tissues of *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1814-1815.

THOMAS, V., T. BOUCHEZ, V. NICOLAS, S. ROBERT, J. F. LORET, Y. LÉVI (2004): Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J. Appl. Microbiol.* 97, 950–963.

doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02391.x

THOREL, M. F., H. F. HUCHZERMEYER, A. L. MICHEL (2001): *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Rev. Sci. Tech.* 20, 204-218

doi: 10.20506/rst.20.1.1272

THOREL, M. F., J. O. FALKINHAM 3rd, R. G. MOREAU (2004): Environmental mycobacteria from alpine and subalpine habitats FEMS Microbiol. Ecol. 49, 343-347.
doi: 10.1016/j.femsec.2004.04.016

TICHENOR, W. S., J. THURLOW, S. MCNULTY, B. A. BROWN-ELLIOTT, R. J. WALLACE JR, J. O. FALKINHAM 3rd (2012): Nontuberculous mycobacteria in household plumbing as possible cause of chronic rhinosinusitis. Emerg. Infect. Dis. 18, 1612–1617.

TORTOLI, E., M. T. SIMONETTI (1995): Radiometric susceptibility testing of *Mycobacterium xenopi*. J. Chemother. 7, 114-117.
doi: 10.1179/joc.1995.7.2.114

TORTOLI, E. (2003): Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin. Microbiol. Rev. 16, 319-354.
doi: 10.1128/CMR.16.2.319-354.2003

TORTOLI, E., L. RINDI, A. BARTOLONI, C. GARZELLI, V. MANFRIN, A. MANTELLA, P. PICCOLI, C. SCARPARO (2004): Isolation of a novel sequevar of *Mycobacterium flavescens* from the synovial fluid of an AIDS patient. Clin. Microbiol. Infect. 10, 1017–1019.
doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00947.x

TORTOLI, E. (2009): Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. Clin. Microbiol. Infect. 15, 906-910.
doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03014.x

TORTOLI, E., M. PECORARI, G. FABIO, M. MESSINÒ, A. FABIO (2010): Commercial DNA probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species. J. Clin. Microbiol. 48, 307–310.
doi: 10.1128/JCM.01536-09

TORTOLI, E., Z. GITTI, H. P. KLENK, S. LAURIA, R. MANNINO, P. MANTEGANI, A. MARIOTTINI, I. NEONAKIS (2013): Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium*

terrae complex and description of *Mycobacterium engbaekii* sp. nov. *Mycobacterium heraklionense* sp. nov. and *Mycobacterium longobardum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 401-411.

doi: 10.1099/ijs.0.038737-0

TORTOLI, E. (2014): Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 727-752.

doi: 10.1128/CMR.00035-14

TORTOLI, E., T. A. KOHL, B. A. BROWN-ELLIOTT, A. TROVATO, S. CARDOSO LEAO, M. J. GARCIA, S. VASIREDDY, C. Y. TURENNE, D. E. GRIFFITH, J. V. PHILLEY, R. BALDEN, S. CAMPANA, L. CARIANI, C. COLOMBO, G. TACCETTI, A. TERI, S. NIEMANN, R. J. WALLACE JR, D. M. CIRILLO (2016): Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* subsp. comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 4471-4479.
doi: 10.1099/ijsem.0.001376.

TORVINEN, E., P. TORKKO, A. N. RINTALA (2010): Real-time PCR detection of environmental mycobacteria in house dust. *J. Microbiol. Methods.* 82, 78-84.
doi: 10.1016/j.mimet.2010.04.007

TURENNE, C. Y., M. SEMRET, D. V. COUSINS, D. M. COLLINS, M. A. BEHR (2006): Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 44, 433-440.

doi: 10.1128/JCM.44.2.433-440.2006

VAN DER WERF, M. J., C. KÖDMÖN, V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ, T. KUMMIK, H. SOINI, E. RICHTER, D. PAPAVENTSIS, E. TORTOLI, M. PERRIN, D. VAN SOOLINGEN, M. ZOLNIR-DOVČ, V. OSTERGAARD THOMSEN (2014): Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. *BMC Infect. Dis.* 14, 62.
doi: 10.1186/1471-2334-14-62

VAN INGEN, J., S. A. BENDIEN, W. C. M. DE LANGE, W. HOEFSLOOT, P. N. R. DEKHUIJZEN, M. J. BOEREE, D. VAN SOOLINGEN (2009): Clinical relevance of nontuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax*. 64, 502–506.

doi: 10.1136/thx.2008.110957

VAN INGEN, J., D. VAN SOOLINGEN (2011): Cervicofacial lymphadenitis caused by nontuberculous mycobacteria; host, environmental or bacterial factors? *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 75, 722-723.

doi: 10.1016/j.ijporl.2011.01.032

VAN INGEN, J., S. E. TOTTEN, N K. HELSTROM, L. B. HEIFETS, M. J. BOEREE, C. L. DALEY (2012a): *In vitro* synergy between clofazimine and amikacin in treatment of nontuberculous mycobacterial disease. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 56, 6324-6327.

doi: 10.1128/AAC.01505-12

VAN INGEN, J., M. J. BOEREE, D. VAN SOOLINGEN, J. W. MOUTON (2012b): Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist. Updat.* 15, 149–161.

doi: 10.1016/j.drug.2012.04.001

VAN INGEN, J., E. F. EGELUND, A. LEVIN, S. E. TOTTEN, M. J. BOEREE, J. W. MOUTON, R. E. AARNOUTSE, L. B. HEIFETS, C. A. PELOQUIN, C. L. DALEY (2012c): The pharmacokinetics and pharmacodynamics of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 559–565.

doi: 10.1164/rccm.201204-0682OC

VAN INGEN, J. (2013a): Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 34, 103-109.

doi: 10.1055/s-0033-1333569

VAN INGEN, J., B. E. FERRO, W. HOEFSLOOT, M. J. BOEREE, D. VAN SOOLINGEN (2013b): Drug treatment of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in HIV-negative

patients: the evidence. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 1065–1077.
doi: 10.1586/14787210.2013.830413

VAN INGEN, J., T. A. KOHL, K. KRANZER, B. HASSE, P. M. KELLER, A. KATARZYNA SZAFRAŃSKA, D. HILLEMANN, M. CHAND, P. W. SCHREIBER, R. SOMMERSTEIN, C. BERGER, M. GENONI, C. RÜEGG, N. TROILLET, A. F. WIDMER, S. L. BECKER, M. HERRMANN, T. ECKMANNS, S. HALLER, C. HÖLLER, S. B. DEBAST, M. J. WOLFHAGEN, J. HOPMAN, J. KLUYTMANS, M. LANGELAAR, D. W. NOTERMANS, J. TEN OEVER, P. VAN DEN BARSELAAR, A. B. A. VONK, M. C. VOS, N. AHMED, T. BROWN, D. CROOK, T. LAMAGNI, N. PHIN, E. G. SMITH, M. ZAMBON, A. SERR, T. GÖTTING, W. EBNER, A. THÜRMER, C. UTPATEL, C. SPRÖER, B. BUNK, U. NÜBEL, G. V. BLOEMBERG, E. C. BÖTTGER, S. NIEMANN, D. WAGNER, H. SAX (2017): Global outbreak of severe *Mycobacterium chimaera* disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* 17, 1033–1041.
doi: 10.1016/S1473-3099(17)30324-9

VASIREDDY, R., S. VASIREDDY, B. A. BROWN-ELLIOTT, N. L. WENGENACK, U. A. EKE, J. L. BENWILL, C. TURENNE, R. J. WALLACE JR (2016): *Mycobacterium arupense*, *Mycobacterium heraklionense*, and a newly proposed species, “*Mycobacterium virginense*” sp. nov., but not *Mycobacterium nonchromogenicum*, as species of the *Mycobacterium terrae* complex causing tenosynovitis and osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1340–1351.
doi: 10.1128/JCM.00198-16

WALLACE JR., R.J., A. MEIER, B. A. BROWN, Y. ZHANG, P. SANDER, G. O. ONYI, E. C. BÖTTGER (1996): Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 40, 1676-1681.
doi: 10.1128/AAC.40.7.1676

WALLACE JR, R. J., Y. ZHANG, B. A. BROWN-ELLIOTT, M. A. YAKRUS, R. W. WILSON, L. MANN, L. COUCH, W. M. GIRARD, D. E. GRIFFITH (2002): Repeat positive cultures in *Mycobacterium intracellulare* lung disease after macrolide therapy

represent new infections in patients with nodular bronchiectasis. *J. Infect. Dis.* 186, 266–273.
doi: 10.1086/341207

WALLACE JR, R. J., B. A. BROWN-ELLIOTT, R. W. WILSON, L. MANN, L. HALL, Y. ZHANG, K. C. JOST JR, J. M. BROWN, A. KABANI, M. F. SCHINSKY, A. G. STEIGERWALT, C. J. CRIST, G. D. ROBERTS, Z. BLACKLOCK, M. TSUKAMURA, V. SILCOX, C. TURENNE (2004): Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5689-5697.
doi: 10.1128/JCM.42.12.5689-5697.2004

WALLACE JR, R. J., E. IAKHIAEVA, M. D. WILLIAMS, B. A. BROWN-ELLIOTT, S. VASIREDDY, R. VASIREDDY, L. LANDE, D. D. PETERSON, J. SAWICKI, R. KWAIT, W. S. TICHENOR, C. TURENNE, J. O. FALKINHAM 3rd (2013): Absence of *Mycobacterium intracellulare* and presence of *Mycobacterium chimaera* in household water and biofilm samples of patients in the United States with *Mycobacterium avium* complex respiratory disease. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1747–1752.
doi: 10.1128/JCM.00186-13

WASSILEW, N., H. HOFFMANN, C. ANDREJAK, C. LANGE (2016): Pulmonary disease caused by non-tuberculous mycobacteria. *Respiration.* 91, 386–402.
doi: 10.1159/000445906

WATERS, W. R., A. O. WHELAN, K. P. LYASHCHENKO, R. GREENWALD, M. V. PALMER, B. N. HARRIS, R. G. HEWINSON, H. M. VORDERMEIER (2010): Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. *Clin. Vaccine. Immunol.* 17, 247-252.
doi: 10.1128/CVI.00442-09

WEINBERGER, M., S. L. BERG, I. M. FEURSTEIN, P. A. PIZZO, F. G. WITEBSKY (1992): Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: Report of a case and critical review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 14, 1229–1239.
doi: 10.1093/clinids/14.6.1229

WETHASINGHE, J., S. HOTU, S. TAYLOR, G. ANDERSON, C. WONG (2015): *Mycobacterium phocaicum* and *Mycobacterium avium-intracellulare* in a patient with hot tub lung. *Respirol. Case Rep.* 3, 19-21.

doi: 10.1002/rcr2.91

WINTHROP, K. L., E. CHANG, S. YAMASHITA, M. F. IADEMARCO, P. A. LOBUE (2009): Non-tuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1556–1561.

doi: 10.3201/eid1510.090310

WINTHROP, K. L., E. MCNELLEY, B. KENDALL, A. MARSHALL-OLSON, C. MORRIS, M. CASSIDY, A. SAULSON, K. HEDBERG (2010): Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 977–982.

doi: 10.1164/rccm.201003-0503OC

WOLFF, K. A., H. T. NGUYEN, R. H. CARTABUKE, A. SINGH, S. OGWANG, L. NGUYEN (2009): Protein kinase G is required for intrinsic antibiotic resistance in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3515–3519.

doi: 10.1128/AAC.00012-09

WOLINSKY, E. (1979): Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119, 107–159.

doi: 10.1164/arrd.1979.119.1.107

WONG, Y. L., C. S. ONG, Y. F. NGEOW (2012): Molecular typing of *Mycobacterium abscessus* based on tandem-repeat polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3084–3088.

doi: 10.1128/JCM.00753-12

WOODS, G. L., J. S. BERGMANN, F. G. WITEBSKY, G. A. FAHLE, A. WANGER, B. BOULET, M. PLAUNT, B. A. BROWN, R. J. WALLACE JR (1999): Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1676–1682.

doi: 10.1128/JCM.37.6.1676-1682.1999

WOODS, G. L., B. A. BROWN-ELLIOTT, E. P. DESMOND, G. S. HALL, L. HEIFETS, G. E. PFYFFER, J. C. RIDDERHOF, R. J. WALLACE JR, N. G. WARREN, F. G. WITEBSKY (2003): Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. NCCLS document M24-A.

ZHANG, Y., M. A. YAKRUS, E. A. GRAVISS, N. WILLIAMS-BOUYER, C. TURENNE, A. KABANI, R. J. WALLACE JR (2004): Pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium abscessus* isolates previously affected by DNA degradation. J. Clin. Microbiol. 42, 5582–5587.

doi: 10.1128/JCM.42.12.5582-5587.2004

ZLOJTRO, M., M. JANKOVIC, M. SAMARZIJA, LJ. ZMAK, V. KATALINIĆ JANKOVIĆ, M. OBROVAC, I. ZLOJTRO, M. JAKOPOVIĆ (2015): Nosocomial pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with a hospital's water supply contamination: a case series of 135 patients. J. Water. Health. 13, 125–130. doi: 10.2166/wh.2014.061

ZWADYK JR, P., J. A. DOWN, N. MYERS, M. S. DEY (1994): Rendering of mycobacteria safe for molecular diagnostic studies and development of a lysis method for strand displacement amplification and PCR. J. Clin. Microbiol. 32, 2140–2146. doi: 10.1128/JCM.32.9.2140-2146.1994

ŽMAK, LJ., M. JANKOVIĆ, M. OBROVAC, V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ (2013): Netuberkulozne mikobakterije. Infektološki glasnik 33, 95-101.

9 ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA

Irena Reil rođena je 28. travnja 1988. godine u Zagrebu. Završila je Gornjogradsku gimnaziju u Zagrebu, a 2006. upisala je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija volontirala je na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, a 2012. nagrađena je Rektorovom nagradom za akademsku godinu 2011./2012. Godine 2013. završila je integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine, te se iste godine zaposlila na radnom mjestu stručnog suradnika u sustavu znanosti u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti, Hrvatskog veterinarskog instituta, Zagreb. Laboratorij je Nacionalni referentni laboratorij za brucelozu, tuberkulozu goveda i maleus, te aktivno sudjeluje u provođenju sustava kvalitete HRN EN ISO/IEC 17025. Dosada je sudjelovala u nizu edukacijskih programa: rad u programu Bionumerics, Applied Maths, Sint-Martens Latem, Belgija; rad u programu STEM, BfR, Berlin, Njemačka; Anses, Pariz, Francuska; VISAVET, Madrid, Španjolska; Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Prirodoslovno – matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, te mnogi drugim. Nadalje, do sada je sudjelovala u objavi ukupno 40 znanstvenih i stručnih radova, od kojih je 11 CC radova. Prema Google Scholar - u radovi su joj citirani 93 puta, a h-index iznosi 4.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA:

RADOVI U ČASOPISIMA

Znanstveni i pregledni radovi

Beck, A., D. Huber, M. Antolić, Ž. Anzulović, **I. Reil**, A. Polkinghorne, G. Baneth, R. Beck (2019): Retrospective study of canine infectious haemolytic anaemia cases reveals the importance of molecular investigation in accurate postmortal diagnostic protocols. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65, 81-87. doi:10.1016/j.cimid.2019.05.006 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Stepanić, M., S. Duvnjak, **I. Reil**, S. Špičić, G. Kompes, R. Beck (2019): First isolation and genotyping of *Bartonella henselae* from a cat living with a patient with cat scratch disease in Southeast Europe. *BMC Infectious Diseases*, 19, 299. doi:10.1186/s12879-019-3929-z (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Duvnjak, S., I. Račić, S. Špičić, M. Zdelar-Tuk, **I. Reil**, Ž. Cvetnić (2018): Molecular epidemiology of *brucella melitensis* strains causing outbreaks in Croatia and Bosnia and Herzegovina. *Acta veterinaria Hungarica*, 66, 177-188. doi:10.1556/004.2018.017 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Cvetnić, Ž., M. Zdelar-Tuk, S. Duvnjak, **I. Reil**, M. Mikulić, Ž. Pavlinec, M. Cvetnić, S. Špičić (2018): Rezervoari *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa i njihovo značenje u infekciji životinja i ljudi. *Veterinarska stanica*, 49, 261-271. (recenziran, pregledni rad, znanstveni)

Cvetnić, Ž., S. Duvnjak, M. Zdelar-Tuk, **I. Reil**, M. Mikulić, M. Cvetnić, S. Špičić (2017): Swine Brucellosis caused by *brucella suis* biovar 2 in Croatia. *Slovenian veterinary research*, 54, 149-154. doi:10.26873/SVR-360-2017 (recenziran, članak, znanstveni)

Zdelar-Tuk, M., S. Špičić, S. Duvnjak, **I. Reil**, M. Cvetnić, Ž. Cvetnić (2017): Seroprevalencija leptospiroze goveda u Republici Hrvatskoj. *Veterinarska stanica*, 48, 169-175. (podatak o recenziji nije dostupan, članak, znanstveni)

Reil, I., S. Špičić, G. Kompes, S. Duvnjak, M. Zdelar-Tuk, D. Stojević, Ž. Cvetnić (2017): Netuberkulozne mikobakterije u gmazova u zatočeništvu i kućnih ljubimaca. *Acta veterinaria Brno*. 86, 101-107. doi:10.2754/avb201786010101 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Cvetnić, Ž., S. Duvnjak, M. Đuras, T. Gomerčić, M. Zdelar-Tuk, **I. Reil**, B. Habrun, S. Špičić (2017): Bruceloza u morskih sisavaca, s posebnim osvrtom na Republiku Hrvatsku. Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. *Medicinske znanosti*, 44, 9-24. doi:10.21857/yq32ohq0q9 (podatak o recenziji nije dostupan, članak, znanstveni)

Duvnjak, S., S. Špičić, D. Kušar, B. Papić, **I. Reil**, M. Zdelar-Tuk, Ž. Pavlinec, M. Đuras, T. Gomerčić, R. S. Hendriksen, Ž. Cvetnić (2017): Whole-Genome Sequence of the First Sequence Type 27 *Brucella* ceti Strain Isolated from European Waters. *Genome Announcements*. 5, 37. doi:10.1128/genomeA.00988-17 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Huber, D., **I. Reil**, S. Duvnjak, D. Jurković, D. Lukačević, M. Pilat, A. Beck, Ž. Mihaljević, L. Vojta, A. Polkinghorne, R. Beck (2017): Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Wolbachia* sp. but not *Ehrlichia canis* in Croatian dogs. *Parasitology research*, 116, 3019-3026. doi:10.1007/s00436-017-5611-y (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Beck, A., D. Huber, A. Polkinghorne, A. Gudan Kurilj, V. Benko, V. Mrljak, S. Reljić, J. Kusak, **I. Reil**, R. Beck (2017): The prevalence and impact of *Babesia canis* and *Theileria* sp. in free-ranging grey wolf (*Canis lupus*) populations in Croatia. *Parasites & Vectors*. 10, 168. doi:10.1186/s13071-017-2106-8 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Cvetnić, Ž., M. Zdelar-Tuk, S. Duvnjak, M. Benić, Ž. Mihaljević, B. Habrun, **I. Reil**, M. Cvetnić, S. Špičić (2017): Infectious epididymitis caused by *Brucella ovis* in Croatian sheep flocks. *Turkish journal of veterinary & animal sciences*. 41, 679-685. doi:10.3906/vet-1703-4 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Cvetnić, Ž., M. Zdelar-Tuk, S. Duvnjak, **I. Reil**, B. Habrun, S. Špičić (2016): Bruceloza u divljih životinja. Veterinarska stanica. 4, 335-343. (podatak o recenziji nije dostupan, pregledni rad, znanstveni)

Cvetnić, Ž., S. Duvnjak, M. Đuras, T. Gomerčić, **I. Reil**, M. Zdelar-Tuk, S. Špičić (2016): Evidence of Brucella strain ST27 in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in Europe. Veterinary microbiology. 196, 93-97. doi:10.1016/j.vetmic.2016.10.013 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Cvetnić, Ž., M. Đuras, T. Gomerčić, **I. Reil**, M. Zdelar -Tuk, S. Duvnjak, S. Špičić (2016): Rasprostranjenost bruceloze u morskih sisavaca s posebnim osvrtom na Hrvatsku. Veterinarska stanica. 47, 229-238. (podatak o recenziji nije dostupan, pregledni rad, znanstveni)

Cvetnić, Ž., M. Zdelar -Tuk, S. Duvnjak, M. Đuras, T. Gomerčić, **I. Reil**, S. Špičić (2016): Bruceloza u morskih sisavaca (II. dio). Veterinarska stanica. 47 (2016), 129-137. (podatak o recenziji nije dostupan, pregledni rad, znanstveni)

Cvetnić, Ž., M. Zdelar -Tuk, S. Duvnjak, M. Đuras, T. Gomerčić, **I. Reil**, S. Špičić (2016): Bruceloza u morskih sisavaca (I. dio). Veterinarska stanica. 47, 25-34. (podatak o recenziji nije dostupan, pregledni rad, znanstveni)

Cvetnić, Ž., S. Duvnjak, M. Zdelar-Tuk, **I. Reil**, B. Habrun, M. Benić, R. Beck, G. Kompes, M. Stepanić, S. Špičić (2015): Primjena različitih molekularnih metoda u tipizaciji vrsta roda Brucella (II. dio). Veterinarska stanica. 46, 273-279. (podatak o recenziji nije dostupan, pregledni rad, stručni)

Cvetnić, Ž., S. Duvnjak, M. Zdelar-Tuk, **I. Reil**, B. Habrun, M. Benić, R. Beck, G. Kompes, M. Stepanić, S. Špičić (2015): Primjena različitih molekularnih metoda u tipizaciji vrsta roda Brucella (I. dio). Veterinarska stanica. 46, 187-195. (podatak o recenziji nije dostupan, pregledni rad, stručni)

Duvnjak, S., I. Račić, S. Špičić, M. Zdelar-Tuk, **I. Reil**, Ž. Cvetnić (2015): Characterisation of *Brucella suis* isolates from Southeast Europe by multi-locus variable-number tandem repeat

analysis. *Veterinary microbiology*. 180, 146-150. doi:10.1016/j.vetmic.2015.08.013 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Cvetnić, Ž., S. Špičić, T. Kiš, M. Zdelar-Tuk, S. Duvnjak, I. Račić, M. Benić, B. Habrun, **I. Reil**, Z. Šostar (2014): Melitococcosis in the Republic of Croatia. *Psychiatria Danubina*. 26, 546-551. (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Stručni radovi

Špičić, S., K. Laroucau, M. Zdelar-Tuk, S. Duvnjak, Ž. Pavlinec, **I. Reil**, G. Kompes, B. Habrun, M. Štepanić, D. Želježić, Ž. Cvetnić (2018): Maleus (sakagija) gotovo zaboravljena zoonoza. *Veterinarska stanica*. 49, 31-36. (recenziran, članak, stručni)

Hengl, B., S. Špičić, S. Duvnjak, **I. Reil**, L. Kozačinski, A. Humski, I. Kovaček, A. Benussi Skukan (2017): Prisutnost *Coxiella burnetii* u sirovom mlijeku iz mljekomata u Republici Hrvatskoj. *Veterinarska stanica*. 48, 393-398. (domaća recenzija, članak, stručni)

Drugi radovi u časopisima

Cvetnić, Ž., **I. Reil**, M. Zdelar-Tuk, S. Duvnjak, Z. Dumbović, I. Brkić, Ž. Mihaljević, B. Habrun, S. Špičić (2017): Epizootija bruceloze ovaca i svinja na području Sisačko - moslavačke županije - opis slučaja. *Veterinarska stanica*. 48, 215-221. (podatak o recenziji nije dostupan, stručna rasprava, stručni)

Cvetnić, Ž., M. Zdelar -Tuk, S. Duvnjak, **I. Reil**, B. Habrun, S. Špičić (2016): Bruceloza u divljih životinja. *Veterinarska stanica*. 47, 335-343. (podatak o recenziji nije dostupan, pregledni rad, ostalo)

RADOVI U ZBORNICIMA SKUPOVA

Znanstveni radovi u zbornicima skupova

Beck, R., N. Šprem, Ž. Mihaljević, A. Beck, D. Huber, T. Šarić, K. Pintur, S. Duvnjak, **I. Reil**, M. Pilat (2016): Anaplazmoze domaćih i divljih životinja te kućnih ljubimaca u

Republici Hrvatskoj. Zbornik radova 6. Hrvatskog Veterinarskog Kongresa sa međunarodnim sudjelovanjem / Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Tiskara Zelina d.d., str. 293-298. (predavanje, međunarodna recenzija, cjeloviti rad (in extenso), znanstveni)

Velić, L., Ž. Cvetnić, S. Špičić, T. Eterović, Z. Mehmedbašić, V. Stevanović, T. Bajrović, **I. Reil** (2015): Molekularna identifikacija *Brucella melitensis* sojeva izdvojenih iz humanih uzoraka podrijetlom iz tri kantona u Federaciji Bosne i Hercegovine. Book of Abstracts; 2nd International Veterinary Congress of Bosnia and Herzegovina, International Congress "One World – One Health – One Vision" / Prof. dr. Hajrudin Besirović (ur.). Sarajevo: University of Sarajevo, Veterinary Faculty, str. 37-39. (predavanje, međunarodna recenzija, cjeloviti rad (in extenso), znanstveni)

Stručni radovi u zbornicima skupova

Račić, I., S. Duvnjak, S. Špičić, M. Zdelar-Tuk, **I. Reil**, Ž. Cvetnić (2015): Genotipovi *Coxiella burnetii* u Republici Hrvatskoj. Zbornik radova, Znanstveno-stručni simpozij Klasične bakterijske i parazitske zoonoze - Što nas očekuje? / Željko Cvetnić (ur.). Zagreb: Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Hrvatski veterinarski institut, str. 28-30. (predavanje, cjeloviti rad (in extenso), stručni)

SAŽECI SA SKUPOVA

Sažeci u zbornicima i časopisima

Cvetnić, L., M. Samardžija, S. Duvnjak, **I. Reil**, A. Bagarić, V. Jaki Tkalec, I. Folnožić, D. Majnarić, G. Kompes, B. Habrun (2018): Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* u etiologiji mastitisa krava u Republici Hrvatskoj. Zbornik sažetaka 43. hrvatskog simpozija mljekarskih stručnjaka / Volarić, Vera (ur.). Zagreb: Hrvatska mljekarska udruga, str. 69-70. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Huber, D., A. Beck, V. Benko, S. Reljić, **I. Reil**, J. Kusak, V. Mrljak, R. Beck (2017): Piroplasmosis of grey wolf (*Canis lupus*) population in Croatia. Journal of Comparative Pathology / Day, Michael D. (ur.). USA: Elsevier, str. 101-101. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Špičić, S., M. Benić, M. Zdelar-Tuk, S. Duvnjak, **I. Reil**, M. Cvetnić, Ž. Cvetnić (2017): Seroprevalencija infekcija klamidijama u pobačaja kod preživača u Hrvatskoj. Book of Abstracts / Danijela Horvatek Tomić; Konrad Sachse (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, str. 39-39. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)

Beck, A., D. Huber, **I. Reil**, S. Duvnjak, R. Beck (2016): Comparison of the pathological histological, cytological and genotyping results between imidokarb-dipropionate treated and untreated dogs infected with *Babesia canis*. Journal of Comparative Pathology / M. J. Day (ur.). Helsinki: Elsevier, str. 73-73. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Pirs, T., M. Pate, U. Zajc, S. Špičić, Ž. Cvetnić, M. Zdelar-Tuk, S. Duvnjak, **I. Reil**, M. Ocepek (2016): Outbreak of bovine tuberculosis in a beef cattle herd in Slovenia. 37th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology / Prof. Dr. Niemann, Stefan (ur.). Werne: Agency KONSENS Ltd, str. 55-55. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Cvetnić, Ž., S. Špičić, M. Zdelar-Tuk, S. Duvnjak, **I. Reil**, B. Habrun, M. Benić, G. Kompes, T. Kiš (2015): *Brucella melitensis* kod malih preživača u Republici Hrvatskoj. Book of Abstracts; 2nd International Veterinary Congress of Bosnia and Herzegovina, International Congress "One World - One Health - One Vision" / Prof. dr. Hajrudin Besirović (ur.). Sarajevo: University of Sarajevo, Veterinary Faculty, str. 54-55. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)

Beck, A., D. Huber, M. Antolić, Ž. Anzulović, **I. Reil**, R. Beck (2015): Molekularna retrospektivna studija infekcijskih hemolitičkih anemija pasa. Cutting Edge Pathology, 2nd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, Berlin, 2014; Journal of Comparative Pathology 152:1, pp. 53 / Dr. Anna-Lena Frisk, Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D. (ur.). Berlin: ECVP, ESVP, str. 74-74. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Špičić, S., M. Benić, G. Kompes, V. Katalinić-Janković, M. Zdelar-Tuk, **I. Reil**, S. Duvnjak, M. Pate, L. Cvetnić, Ž. Cvetnić (2015): Mastitis in cows caused by *Mycobacterium fortuitum* – a new moment in diagnostics and treatment. 36th Annual Congress of the European Society

of Mycobacteriology: Scientific Program including Abstracts / Niemann, Stefan (ur.). Selm: Agency KONSENS Ltd, str. 63-64. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Gotić, J., N. Brkljača Bottegaro, **I. Reil**, V. Mrljak, R. Beck (2015): Equine piroplasmiasis in 15 horses naturally invaded with *Babesia caballi*. Book of Abstracts, The 6th International Congress "Veterinary science and profession" / Horvatek Tomić, Danijela; Severin, Krešimir; Slavica, Alen (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, str. 50-50. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Špičić, S., T. Kiš, V. Katalinić- Janković, I. Račić, E. Richter, Lj. Žmak, M. Zdelar-Tuk, **I. Reil**, S. Duvnjak, G. Kompes (2014): Nontuberculous Mycobacteria presence in wild boars and cattle in Croatia - difficulties with species identification. Scientific Program including Abstracts / Niemann, Stefan (ur.). Werne, Njemačka: Agency KONSENSUS Ltd, str. 91-91. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Prošireni sažeci u zbornicima i časopisima

Stepanić, M., S. Duvnjak, **I. Reil**, S. Špičić, G. Kompes, D. Jurković, B. Zidar, R. Beck (2018): Prvi dokaz sekvencijskog tipa 5 *Bartonella henselae* u mačaka: najvjerojatniji izvor zaraze za djecu oboljelu od bolesti mačjeg ogreba. Program i zbornik sažetaka / Vilibić Čavlek, Tatjana; Barbić, Ljubo; Savić, Vladimir. (ur.). Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, str. 81-82. (poster, prošireni sažetak, znanstveni)