

非结核分枝杆菌：2010–2012年巴布亚新几内亚3个调查点的基线数据

Serej Ley^{abc}, Robyn Carter^d, Korai Millan^c, Suparat Phuanukoonnon^c, Sushil Pandey^d, Christopher Coulter^d, Peter Siba^c和Hans-Peter Beck^{ab}

通讯作者：Hans-Peter Beck（电子邮件：Hans-Peter.Beck@unibas.ch）。

目的：了解巴布亚新几内亚使用抗酸染色显微镜镜检诊断的肺结核患者痰标本中非结核分枝杆菌的比例。

方法：作为巴布亚新几内亚3个省级医院开展的结核病患者发现研究的一部分，收集了从2010年11月至2012年7月期间15岁及以上的疑似肺结核患者的痰标本。对痰中分离和培养增殖的结核分枝杆菌进行检测，以区分非结核分枝杆菌和结核分枝杆菌复合群。

结果：通过培养增殖的痰标本中，4%（9/225）为非结核分枝杆菌。其中，5份标本（2.2%）为单纯的非结核分枝杆菌，4份标本（1.8%）为同时含有结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌。共有4种不同的非结核分枝杆菌：偶发分枝杆菌（*M. fortuitum*）、胞内分枝杆菌（*M. intracellulare*）、土壤分枝杆菌（*M. terrae*）和鸟分枝杆菌（*M. avium*）。

讨论：本次研究首次报道了巴布亚新几内亚3个不同地方分离出非结核分枝杆菌。由于涂片显微镜镜检不能区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌，所以非结核分枝杆菌可以造成结核病的假阳性诊断。因此，应掌握非结核分枝杆菌的流行情况、并开发一个诊断流程以确认涂片中的抗酸杆菌为结核分枝杆菌。

分枝杆菌属除了结核分枝杆菌复合群（*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC），还包括120多个非结核分枝杆菌种类（non-tuberculous mycobacteria, NTM）^[1]。非结核分枝杆菌可在周围环境包括水和土壤中被发现，是人类偶发感染的疑似来源。非结核分枝杆菌可引起无症状的细菌定植，也可引起有症状的疾病^[2]，包括具有与结核病相似症状的其他慢性肺部疾病，如慢性咳嗽（有痰或无痰）、胸痛和消瘦^[3,4]。不同的非结核分枝杆菌可引起不同的疾病表现。鸟分枝杆菌复合群（包括鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌）常引起肺部感染。偶发分枝杆菌可引起肺部感染，但较常见的是引起皮肤、软组织或骨骼感染。免疫功能低下的病人（如HIV阳性患者）容易感染非结核分枝杆菌，尤其是播散型鸟分枝杆菌^[2]。然而，无诱发因素的免疫力正常的病人也可受到感染^[5–8]。

与结核分枝杆菌相比，标准的一线抗结核药物对非结核分枝杆菌的治疗效果不好^[2,9]，迄今为止，尚无针对非结核分枝杆菌的单独治疗方案。根据非结核分枝杆菌种类，推荐的治疗方案包括使用抗生素治疗，有时甚至使用外科手术清除感染组织^[2,10]。鸟分枝杆

菌复合群的治疗方案为联合使用克拉霉素、利福平和乙胺丁醇，连续治疗一年^[11]。虽然该治疗方案中包含利福平和乙胺丁醇这两类标准的一线抗结核药物，但是结核病治疗方案的时间长度却不足以治疗鸟分枝杆菌复合群感染。而且，异烟肼（除了利福平之外的最有效的一线抗结核药物）对鸟分枝杆菌的治疗效果极其有限^[9]，因此复发的情况很常见^[2]。

在结核病高负担的国家，关于非结核分枝杆菌感染情况的数据非常少，但是新发感染的情况可能比较严重^[12]。结核病高负担国家多为资源贫乏的国家，其结核病的诊断是基于显微镜检测痰标本中的抗酸杆菌。但是涂片显微镜镜检不能区分非结核分枝杆菌和结核分枝杆菌，因此就不能排除混合感染以及假阳性结核的诊断。很多诊断方法不能很好地检测出不同类型的非结核分枝杆菌；如果非结核分枝杆菌与结核分枝杆菌同时存在，那么非结核分枝杆菌可能检测不出来或者导致药敏试验失败^[13–15]。有研究表明，暴露于非结核分枝杆菌可影响卡介苗的效力^[16]，而且对结核菌素皮肤试验（TST）也会有交叉反应，因此在解释结核菌素皮肤试验阳性结果时以及评价这种唯一可用的抗结核疫苗的保护性时会比较困难^[17,18]。

^a 瑞士热带和公共卫生研究所，巴塞尔，瑞士。

^b 巴塞尔大学，巴塞尔，瑞士。

^c 巴布亚新几内亚医学研究所，戈罗卡和马当，巴布亚新几内亚。

^d 昆士兰分枝杆菌参比实验室，昆士兰病理，布里斯班，澳大利亚。

投稿日期：2015年5月5日；发表日期：2015年11月24日

doi: 10.5365/wpsar.2015.6.2.004

巴布亚新几内亚的非结核分枝杆菌的信息非常少。20世纪60年代在卡里穆伊（东部高地省）开展了麻风病试验^[19,20]，此外在巴布亚新几内亚东高地省的Marawaka区域开展了结核菌素皮肤试验的灵敏性研究^[21]，这些研究结果显示，在该地区的环境中未发现分枝杆菌。因此，在巴布亚新几内亚收集痰标本检测是否存在非结核分枝杆菌非常重要。本研究中，我们描述了巴布亚新几内亚的非结核分枝杆菌检测情况，并提供该菌在巴布亚新几内亚的基线信息。

方法

本研究是2010年11月至2012年7月在巴布亚新几内亚几所入选的省级医院开展的结核病患者发现研究的一部分，收集15岁及以上疑似结核患者的痰标本进行实验室检测。标本采集过程在以前文献中描述过^[22]。

通过抗酸杆菌萋-尼氏染色显微镜镜检或者胸部X线进行结核病诊断，使用彼得罗夫法（Petroff's method）去除痰标本的污染^[23]，将其注入到BD Bactec®分枝杆菌生长指示管培养基中（Becton, Dickinson和Co., Franklin Lakes, 新泽西, 美国），随后送往澳大利亚布里斯班的昆士兰分枝杆菌参比实验室进行培养。标本在分枝杆菌生长指示管中培育，直到他们出现培养阳性的结果（即可检测到增长）。对于培养阳性的分离株都要再重复一次萋-尼氏染色涂片，以确认抗酸杆菌的存在。使用快速免疫色谱鉴别试验（SD BIOLINE/BD TB Ag MPT64 Rapid, 标准诊断, Giheung-gu, 韩国）确认抗酸杆菌为结核分枝杆菌复合群。

当快速试验结果为阴性或者显微镜形态学检测不能确认抗酸杆菌为结核分枝杆菌复合群时，需使用分子生物学分析方法进一步确定分离株为非结核分枝杆菌还是结核分枝杆菌复合群。简而言之，使用粗提取法提取基因组DNA，首先95摄氏度水煮30分钟，然后超声15分钟。提取的DNA作为聚合酶链反应（PCR）扩增的模板，根据GenoType®结核分枝杆菌线性探针试剂盒（Hain LifeSciences, 内伦, 德国）说明书进行扩增，扩增16S rRNA基因片段（上游引物5' AGAGTTGGATCCTGGCTCAG，下游引物5' CCTACGAGCTCTTTACG）。将4μl的EXOSAP-IT（Affymetrix, 圣地亚哥, 加利福尼亚, 美国）和10ul的原始扩增产物混合，对扩增产物进行纯化，反应条件为37 °C 15分钟，80 °C 15分钟，40 °C浸泡）。使用Invitrogen无缓冲凝胶系统（hermoFisher Scientific, 沃尔瑟姆, 马萨诸塞, 美国）进行重复凝胶电泳检测。在ABI3130型定序仪（Distribio, 迪德朗日, 卢森堡）上使用Big Dye终止法进行测序反应。

测序结果提交到美国国家生物技术信息中心（NCBI）GenBank数据库进行比对。按照以前文献所描述^[25]，一旦培养物被鉴定为结核分枝杆菌复合群，随之使用比例法进行药敏试验^[24]。但是，如果培养物被证实为非结核分枝杆菌，则不需进行药敏试验。

患者的人口学资料和临床症状也被收集和分析。使用Stata 12.1（Stata-Corp, College Station, 德克萨斯, 美国）进行统计分析。使用Excel进行基本计算。由于样本量小，故未对非结核分枝杆菌患者进行统计分析。

本研究的伦理学通过了巴布亚新几内亚医学研究所伦理审查委员会（IRB No. 0913）和巴布亚新几内亚医学研究咨询委员会（MRAC No. 10.02）的批准。已经向Ethik-Kommission beider Basel进行了通报，并得到了批准。所有研究参与者都签署了书面知情同意书。

结果

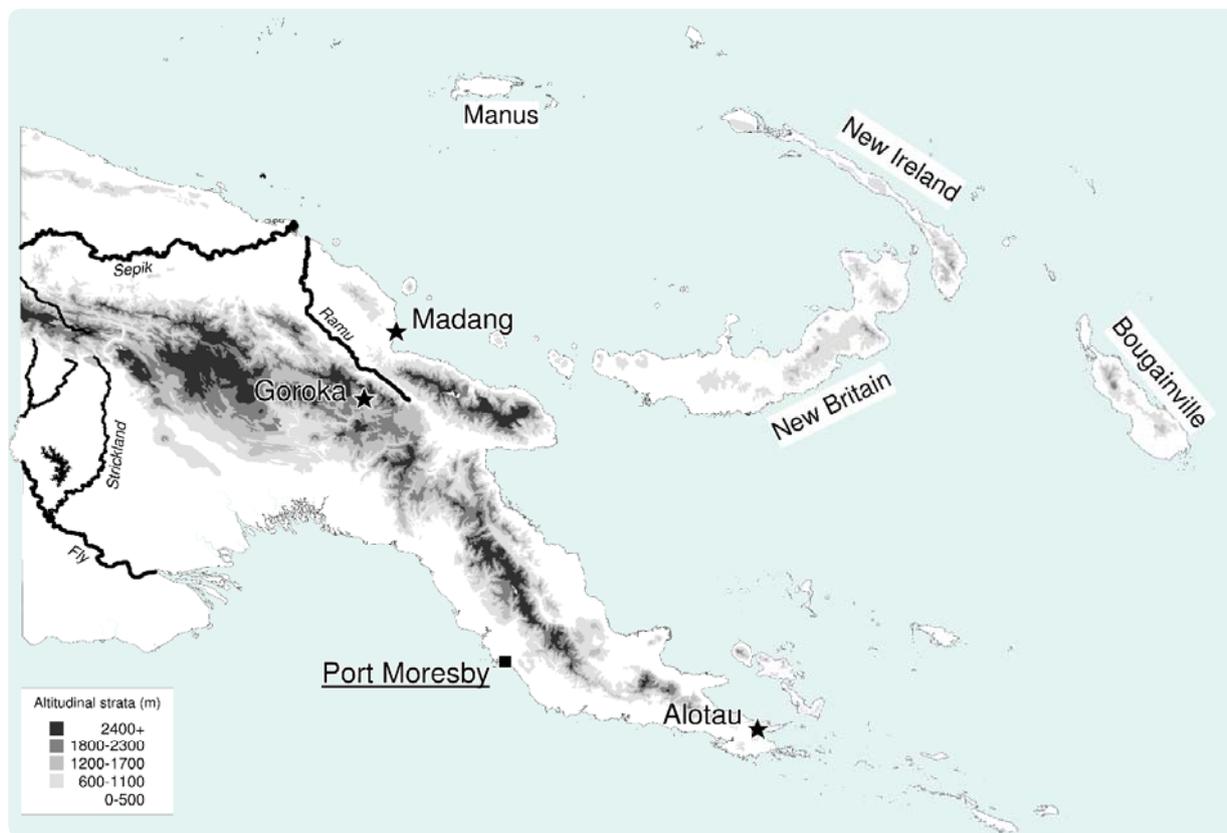
巴布亚新几内亚3个省级医院共收集到了396份痰标本（图1）。在收集的标本中，335份被送往澳大利亚进行培养，有225份在培养中有增殖，其中4%（9/225）检出了非结核分枝杆菌。5份标本（2.2%）仅包含一种非结核分枝杆菌，其中3份分离株为偶发分枝杆菌，1份分离株为土壤分枝杆菌，1份分离株为胞内分枝杆菌。有4份（1.8%）分离株为混合培养物，同时包括结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌，其中3份培养物为结核分枝杆菌复合群和鸟分枝杆菌，1份培养物为结核分枝杆菌复合群和胞内分枝杆菌（表1）。

除了1例之外，其他所有的非结核分枝杆菌感染者都是女性。所有患者，无论是混合感染还是仅感染非结核分枝杆菌，都有至少两周的排痰性咳嗽。而且，所有混合感染结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌的患者都出现了消瘦和至少一种其他症状，包括呼吸困难（ $n=3$ ）、胸痛（ $n=3$ ）、发热和盗汗（ $n=2$ ）。在仅有一种非结核分枝杆菌感染的5名患者中，4例患者有气促和发热，其中3例出现消瘦，同时有胸痛或/和盗汗。感染胞内分枝杆菌的患者除了排痰性咳嗽和头痛之外，没有出现其他症状。所有患者都报告之前从未患过结核（表1）。

讨论

据我们所知，本研究首次描述了巴布亚新几内亚非结核分枝杆菌的感染情况。225例患者中，有5例

图1. 2010–2012年巴布亚新几内亚结核病患者被动检测研究现场的位置图



注：作者使用MapInfo Professional 7.0设计的地图。

表1. 2010–2012年在巴布亚新几内亚痰标本中检出非结核分枝杆菌患者的特征以及报告症状 (n = 9)

性别	年龄 (岁)	分枝杆菌菌株	症状					疾病结局
			发热	消瘦	盗汗	呼吸困难	胸痛	
女性	50	结核分枝杆菌复合群 + 鸟分枝杆菌	是	是	是	是	否	放弃治疗
女性	28	结核分枝杆菌复合群 + 鸟分枝杆菌	否	是	否	是	否	失访
女性	19	结核分枝杆菌复合群 + 鸟分枝杆菌	是	是	是	否	否	失访
女性	32	结核分枝杆菌复合群 + 胞内分枝杆菌	是	是	否	是	是	完成治疗
女性	18	偶发分枝杆菌	是	是	是	是	是	治愈
女性	28	偶发分枝杆菌	是	否	是	是	否	完成治疗
女性	50	偶发分枝杆菌	是	是	否	是	是	不详
女性	60	胞内分枝杆菌	否	否	否	否	否	治愈
男性	36	土壤分枝杆菌	是	是	是	否	是	不详

MTBC, 结核分枝杆菌复合群, NTM, 非结核分枝杆菌。

(2.2%) 病例的标本中分离出非结核分枝杆菌。从至少一份的后续样本中未再培养出阳性结果，提示可能会有一些假阳性的结核病患者。非结核分枝杆菌感染引起的一般症状无法与结核患者的症状进行区别，抗酸杆菌萋-尼氏染色显微镜镜检对这些细菌的外观也无法区分。

有趣的是，在分离到非结核分枝杆菌的患者中，只有1例为男性，其他患者均为女性；这名男性患者的痰标本中分离到土壤分枝杆菌。有一些非结核分枝杆菌在女性中更常见^[2,7,26]。另一项研究显示，在感染鸟分枝杆菌复合群的女性患者中，漏斗胸和胸廓尺寸异常狭窄的情况日益增加，但是在男性中却未观察到^[26]。同样，所谓的温夫人综合征，即鸟分枝杆菌复合群感染引起的特定肺部疾患，仅在女性中被观察到^[27]。

来自结核病流行国家的关于非结核分枝杆菌的报道较少^[3]，而且通常也很难将我们的研究结果与其他国家的研究结果进行比较。例如，在一项近期发表的尼日利亚的研究中，对初步诊断为肺结核患者的标本进行培养，在经过培养而增殖的分枝杆菌中有15%是非结核分枝杆菌^[28]。与这项研究相比，本研究中的比例是2.2%，相对较低。但是，这两个研究的培养标准不同。在本研究中，只对涂阳的标本进行了培养。2013年开展的一项研究中也包括了涂阴的标本，但是研究结果证明涂阳的标本与非结核分枝杆菌感染的关联更强^[28]。本研究仅对涂阳分离株进行培养，这可能会降低在痰标本中发现非结核分枝杆菌的机会。但是，仅培养涂阳标本与巴布亚新几内亚的国家结核病规划的方案是一致的，而且考虑到国内痰培养设施缺乏的实际情况，也只能对涂阳标本进行培养。

此外，本研究的目标人群局限在巴布亚新几内亚3个调查点的15岁及以上的疑似肺结核患者，尚不清楚本研究结果是否可以扩展到巴布亚新几内亚的其他地区和人群中。尽管如此，在20世纪60年代和80年代巴布亚新几内亚开展的少数研究中^[19-21]，结核菌素皮肤试验并没有提供非结核分枝杆菌感染的证据，因此，本研究强调了在社区中非结核分枝杆菌的存在，以及对该国结核病诊断的潜在影响。尽管痰标本中非结核分枝杆菌的存在可能是由于环境中的微生物定植所致，但是当仅使用抗酸杆菌涂片显微镜镜检时，他们也会导致假阳性结核病的诊断。标准的抗结核治疗对于非结核分枝杆菌感染的治疗效果不佳，因为治疗非结核分枝杆菌需要使用与抗结核治疗不同的抗生素^[2,10]，这给患者和国家结核病规划带来了额外的负

担。随着HIV/AIDS的疾病负担日益增加，非结核分枝杆菌也可能变成一个日益增加的疾病来源，需要采用不同的方法对患者进行管理和治疗。

在巴布亚新几内亚，耐多药结核病的诊断需要基于对治疗依从性良好情况下重复发生的治疗失败的观察，因此耗时较长^[29]。从2012年起，基于Xpert®MTB/RIF试验（Cepheid，森尼韦尔，加利福尼亚，美国）的结核病耐药监测已经在一些主要城市开展^[30]。但是，对于很多医疗机构来说，通过培养和药敏试验确诊耐多药结核可能依然较难。如果治疗失败的真实原因不是耐药，而是非结核分枝杆菌感染，这将对个体患者的管理产生重要影响，尤其是当非结核分枝杆菌感染的症状与耐多药结核病的症状相似时。这种情况在印度的一项研究中已经显现，疑似耐多药肺结核患者中有17.6%实际上是非结核分枝杆菌感染^[31]。非结核分枝杆菌和结核分枝杆菌复合群的混合感染是对实验室的一个额外挑战；如果菌株不能在纯化培养基中被分离出来，可靠的药敏试验可能也很难鉴定出结核分枝杆菌复合群，这将导致错误的耐多药结核和广泛耐药结核的假阳性。

由于我们检出非结核分枝杆菌的样本量较小，因此需要开展进一步研究以获得更多的数据，通过这些数据建立起针对非结核分枝杆菌引起的肺部疾病的正确诊断流程和治疗指南。但是，非结核分枝杆菌鉴定还没有被列入巴布亚新几内亚的国家结核病规划的框架中，时至今日，该国还没有可用于培养分枝杆菌所要求的生物安全3级实验室。疑似耐多药结核病患者标本需要运送到澳大利亚的分枝杆菌参比实验室进行培养。在国内进行分枝杆菌培养将会更加快速地把结核病从非结核分枝杆菌感染中区分出来，同时也会改善耐多药结核病的发现。

建议将非结核分枝杆菌感染监测加入到国家结核病规划^[30]的结核病耐药监测中。非结核分枝杆菌监测的数据将会明确巴布亚新几内亚的肺部疾病中非结核分枝杆菌所起的作用，而且监测数据也可为卫生行政部门提供信息用于将来制定针对性的干预措施和应对计划。这将缓解患者和卫生系统的压力。由于Xpert®MTB/RIF试验不能检测非结核分枝杆菌，所以涂阳但Xpert®MTB/RIF试验阴性可以作为非结核分枝杆菌感染的指标，以及作为进一步调查的基础。在国内可开展培养之前，可以在国家中心公共卫生实验室开展基于PCR的扩增16-23S rRNA内转录间隔区的试验，直接从临床标本中把非结核分枝杆菌从结核分枝杆菌复合群中区分出来^[31]。

利益冲突

无。

资助

本研究在Stanley Thomas Johnson Foundation和Medicor Foundation Liechtenstein资助的结核病患者被动发现研究的框架下开展。

致谢

我们感谢所有同意收集和分析他们标本的研究参与者。感谢三个研究省份卫生行政部门的批准和支持。感谢巴布亚新几内亚医学研究所的研究团队以及3个调查点的医院工作人员，他们负责标本收集、诊断、提供基础设备和支持。同时，也由衷感谢昆士兰分枝杆菌参比实验室职员的贡献。

引用本文地址：

Ley S et al. Non-tuberculous Mycobacteria – baseline data from three sites, Papua New Guinea. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2015, 6(4):24–29. doi:10.5365/wpsar.2015.6.2.004

参考文献

- Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16:319–354. doi:10.1128/CMR.16.2.319-354.2003 pmid:12692101
- Griffith DE et al.; ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2007, 175:367–416. doi:10.1164/rccm.200604-571ST pmid:17277290
- Gopinath K, Singh S. Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: are we neglecting the danger? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2010, 4:e615. doi:10.1371/journal.pntd.0000615 pmid:20436962
- Kendall BA et al. Isolation of non-tuberculous mycobacteria from the sputum of patients with active tuberculosis. *International Journal Tuberculosis Lung Disease: Official Journal International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 2010, 14:654–656. pmid:20392362
- Henry MT et al. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *European Respiratory Journal*, 2004, 23:741–746. doi:10.1183/09031936.04.00114004 pmid:15176690
- Huang JH et al. *Mycobacterium avium*-intracellulare pulmonary infection in HIV-negative patients without preexisting lung disease: diagnostic and management limitations. *Chest*, 1999, 115:1033–1040. doi:10.1378/chest.115.4.1033 pmid:10208205
- Prince DS et al. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *New England Journal of Medicine*, 1989, 321:863–868. doi:10.1056/NEJM198909283211304 pmid:2770822
- Thomson RM; NTM working group at Queensland TB Control Centre and Queensland Mycobacterial Reference Laboratory. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16:1576–1583. doi:10.3201/eid1610.091201 pmid:20875283
- Mdluli K et al. Mechanisms involved in the intrinsic isoniazid resistance of *Mycobacterium avium*. *Molecular Microbiology*, 1998, 27:1223–1233. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00774.x pmid:9570407
- Root RK, editor. *Clinical infectious diseases: a practical approach*. New York, Oxford University Press, 1999, p. 1013.
- Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, 161:1376–1395. pmid:10764337
- Bensi EPA, Panunto PC, Ramos M de C. Incidence of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, differentiated by multiplex PCR, in clinical specimens of a large general hospital. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 2013, 68:179–184. doi:10.6061/clinics/2013(02)OA10 pmid:23525313
- Hwang SM et al. Simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2013, 93:642–646. doi:10.1016/j.tube.2013.07.007 pmid:23988279
- Luetkemeyer AF et al.; Adult AIDS Clinical Trials Group A5255 Study Team. Evaluation of two line probe assays for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis (TB) drug resistance, and non-TB mycobacteria in HIV-infected individuals with suspected TB. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52:1052–1059. doi:10.1128/JCM.02639-13 pmid:24430455
- van der Werf MJ et al. Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. *BMC Infectious Diseases*, 2014, 14:62. doi:10.1186/1471-2334-14-62 pmid:24502462
- Poyntz HC et al. Non-tuberculous mycobacteria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2014, 94:226–237. doi:10.1016/j.tube.2013.12.006 pmid:24572168
- Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*, 1995, 346:1339–1345. doi:10.1016/S0140-6736(95)92348-9 pmid:7475776
- Rieder HL. Methodological issues in the estimation of the tuberculosis problem from tuberculin surveys. *International Journal Tuberculosis Lung Disease: Official Journal International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 1995, 76:114–121. doi:10.1016/0962-8479(95)90552-9 pmid:7780092
- Bagshawe A et al. BCG vaccination in leprosy: final results of the trial in Karimui, Papua New Guinea, 1963–79. *Bulletin of the World Health Organization*, 1989, 67:389–399. pmid:2680140
- Scott GC, Wigley SG, Russell DA. The Karimui trial of BCG. 2. Tuberculin reactions in a leprosy-endemic but tuberculosis-free population. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 1966, 34:139–146. pmid:5330190

21. Brown P, Cathala F, Gajdusek DC. Mycobacterial and fungal skin sensitivity patterns among remote population groups in Papua New Guinea, and in the New Hebrides, Solomon, and Caroline Islands. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1981, 30:1085–1093. pmid:6792936
22. Ley SD et al. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance in different provinces of Papua New Guinea. *BMC Microbiology*, 2014, 14:307. doi:10.1186/s12866-014-0307-2 pmid:25476850
23. Petroff SA. A new and rapid method for the isolation and cultivation of *Tubercule bacilli* directly from the sputum and feces. *Journal of Experimental Medicine*, 1915, 21:38–42. doi:10.1084/jem.21.1.38 pmid:19867850
24. Canetti G et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bulletin of the World Health Organization*, 1969, 41:21–43. pmid:5309084
25. Ballif M et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Madang, Papua New Guinea. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 2012, 16:1100–1107. pmid:22710686
26. Iseman MD, Buschman DL, Ackerson LM. *Pectus excavatum* and *scoliosis*: thoracic anomalies associated with pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium* complex. *American Review of Respiratory Disease*, 1991, 144:914–916. doi:10.1164/ajrccm/144.4.914 pmid:1928970
27. Reich JM, Johnson RE. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease presenting as an isolated lingular or middle lobe pattern: the Lady Windermere syndrome. *Chest*, 1992, 101:1605–1609. doi:10.1378/chest.101.6.1605 pmid:1600780
28. Aliyu G et al. Prevalence of non-tuberculous mycobacterial infections among tuberculosis suspects in Nigeria. *PLoS ONE*, 2013, 8:e63170. doi:10.1371/journal.pone.0063170 pmid:23671669
29. National TB Program Unit, Disease Control Branch, National Department of Health. *Papua New Guinea country guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*. Port Moresby, Papua New Guinea, 2011, p. 69.
30. Ley SD, Riley I, Beck H-P. Tuberculosis in Papua New Guinea: from yesterday until today. *Microbes and infection/Institut Pasteur*, 2014, 16:607–614. doi:10.1016/j.micinf.2014.06.012 pmid:25025486
31. Gopinath K, Singh S. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complexes and other mycobacterial species directly from clinical specimens. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107:425–435. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04218.x pmid:19302308