

О. А. Журило, А. І. Барбова, Л. М. Сладкова MYCOBACTERIUM AVIUM — ЗБУДНИК МІКОБАКТЕРІОЗУ ЛЮДИНИ

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

Дніпропетровська медична академія МОЗ України

MYCOBACTERIUM AVIUM — ВОЗБУДИТЕЛЬ МИКОБАКТЕРИОЗА ЧЕЛОВЕКА

А. А. Журило, А. И. Барбова, Л. М. Сладкова

Резюме

Микобактериоз — инфекционное заболевание животных и человека, возбудителями которого являются представители большой группы нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), включающих *M. avium* complex.

В статье представлены сведения современной литературы об эпидемиологии микобактериоза, классификации нетуберкулезных микобактерий, характеристике и методах лабораторной диагностики наиболее частого возбудителя — *Mycobacterium avium*.

Несмотря на то, что передача *M. avium* от человека к человеку не доказана и микобактериоз носит спорадический характер, среди ВИЧ-инфицированных за последнее время наметилась тенденция к росту числа случаев диссеминированной формы заболевания, вызванного *M. avium*. В Украине установлено, что 2,9 % клинических изолятов микобактерий идентифицируется как НТМБ. В структуре НТМБ преобладают нефотохромогенные микобактерии — 77,1 %. Фотохромогенные микобактерии выделяются в среднем в 16,7 % случаев. Быстро-растущие микобактерии составляют минимальное количество — 6,3 %. В результате идентификации были выделены следующие виды НТМБ, которые циркулируют на территории Украины: *M. avium*-complex, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum* и *M. chelonae*. Наиболее часто выделялись *M. avium*-complex — 45,5 %, количество выделенных *M. fortuitum* — 13,5 %, реже — *M. xenopi* (7,1 %) и *M. kansasii* (5,8 %).

Отсутствие простых чувствительных методов микробиологической диагностики ограничивает возможности эпидемиологического мониторинга микобактериоза. Это диктует необходимость использования современных эффективных молекулярно-генетических методов исследования для выявления, видовой идентификации и типирования *M. avium*. Так, использование методов выявления инсерционного элемента IS901, анализа полиморфизма рестрикционных фрагментов гена *hsp65* и элемента IS1245 позволяет провести идентификацию и определение подвида *M. avium*. Исследование геномного полиморфизма штаммов *M. avium* для оценки структуры популяции возможно с помощью комплекса молекулярно-генетических методов VNTR-типирования, IS1245- и IS1311-RFLP-типирования.

Ключевые слова: микобактериоз, *Mycobacterium avium*, генотипирование.

Укр. пульмонол. журнал. 2020, № 1. С. 50–58.

Журило Олександр Анатолійович

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

Зав. лабораторією мікробіології і біохімії туберкульозу

Д-р. мед. наук, професор

10, вул. М. Амосова, Київ, 03038, Україна, тел: +38(044) 275-54-30

MYCOBACTERIUM AVIUM AS PATHOGEN OF HUMAN MYCOBACTERIOSIS

O. A. Zhurilo, A. I. Barbova, L. M. Sladkova

Abstract

Mycobacteriosis is an infectious disease of animals and humans caused by non-tuberculosis mycobacteria including *M. avium* complex.

The article presents the information of modern literature on the epidemiology of mycobacteriosis, the classification of non-tuberculous mycobacteria, the characteristics and laboratory diagnostic methods of the most common pathogen — *Mycobacterium avium*.

Despite the fact that the transmission of *M. avium* from human to human has not been proved, and mycobacteriosis has been sporadic, the number of cases of disseminated forms of disease caused by *M. avium* among HIV-positive patients during the last ten years was increasing. In Ukraine, it was found that 2.9 % of the clinical isolates of mycobacteria are identified as NTMB. Non-photochromogenic mycobacteria predominate in the structure of NTMB — 77.1 %. Photochromogenic mycobacteria stand out at the level of 16.7 %. Fast-growing mycobacteria make up a minimal amount — 6.3 %. As a result of identification, the following types of NTMB were identified that circulate in Ukraine: *M. avium*-complex, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum* and *M. chelonae*. Most often stood out *M. avium*-complex — 45.5 %, number allocated *M. fortuitum* — 13.5 %, less often *M. xenopi* (7.1 %) and *M. kansasii* (5.8 %).

The lack of simple methods for the microbiological diagnosis make difficult the epidemiological monitoring of mycobacteriosis. This facilitates the use of modern, efficient molecular genetic methods for the species and subspecies identification and typing of *M. avium*. Thus, the detection of mobile element IS901, restriction fragment polymorphism analysis of *hsp65* gene and IS1245 allow the detection and subspecies identification of *M. avium*. The study of genomic polymorphisms of bacterial strains for the assessment of *M. avium* population structure became feasible due to a complex of molecular techniques: VNTR-typing, IS1245- and IS 1311-RFLP-typing.

Key words: mycobacteriosis, *Mycobacterium avium*, genotyping.

Ukr. Pulmonol. J. 2020; 1:50–58.

Aleksandr A. Zhurilo

SI "National institute of phthisiology and pulmonology named after F. G. Yanovsky NAMS of Ukraine"

Chief of laboratory of microbiology and biochemistry of tuberculosis.

Doctor of medicine, professor

10, M. Amosova str., Kyiv, Ukraine, tel: +38(044) 275-54-30

Мікобактеріоз — інфекційне захворювання тварин і людини, збудниками якого є представники великої групи нетуберкульозних мікобактерій (НТМБ). У першій половині XX століття був опублікований цілий ряд повідомлень про виділення з мокротиння мікобактерій, які не відносилися до *M. tuberculosis* [1]. Нині рід *Mycobacterium* налічує більше 130 видів, і їх кількість продовжує

рости [2, 3]. Два з них: *M. tuberculosis* і *M. leprae* — викликають добре відомі захворювання. Крім того, ще декілька видів мікобактерій входять в так званий *M. tuberculosis* complex. Це *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*. Інші мікобактерії поширені в дикій природі як сапрофіти, але в деяких випадках можуть бути етіологічними чинниками важкої патології. Мікобактерії, що не входять до туберкульозного комплексу, називають також нетуберкульозними мікобактеріями, мікобактеріями довкілля (*environmental mycobacteria*), мікобактеріями іншими, ніж *M. tuberculosis* (*mycobacteria other*

than tuberculosis), збудниками мікобактеріозів, анонімними, опортуністичними, атиповими мікобактеріями. Нині найчастіше використовують термін нетуберкульозні мікобактерії. Важливою відмінністю НТМБ від комплексу *M. tuberculosis* вважалося те, що вони практично не передаються від людини до людини, проте цей факт останнім часом ставиться під сумнів [3].

Серед основних клінічних проявів мікобактеріозу найчастіше зустрічається ураження легенів, головним чином у літніх осіб, що мають хронічні неспецифічні захворювання легенів, силікоз, а також у хворих, вилікуваних від туберкульозу і мікозу органів дихання. У ВІЛ-інфікованих і хворих на СНІД в основному розвиваються дисеміновані захворювання з несприятливим прогнозом [4, 5]. За даними різних авторів, потенційними збудниками мікобактеріозу людини є від 10 до 24 видів НТМБ, серед яких найчастіше зустрічаються представники *Mycobacterium avium complex* (MAC) [4, 6].

Класифікація нетуберкульозних мікобактерій

Мікобактерії — нерухомі аеробні грампозитивні палички, які характеризуються кислото- і лугостійкістю при забарвленні карболовим фуксином, високим вмістом ліпідів в клітині і, особливо, в клітинній стінці. Різновиди воску, що входить до її складу, містять розчинні в хлороформі міколові кислоти з довгими розгалуженими ланцюгами (від 60 до 90 атомів вуглецю). Зміст Г+Ц в ДНК складає 62,0–70,0 % [7, 8].

Мікобактерії, включаючи збудників туберкульозу і НТМБ, відносять до єдиного роду *Mycobacterium* сімейства *Mycobacteriaceae* [9].

Захворювання, що викликаються НТМБ, були відомі ще в кінці дев'ятого століття: в 1868 році був описаний ТБ курей. Збудник цього захворювання відрізнявся від *M. tuberculosis* і був пізніше ідентифікований як *M. avium*. Один з перших випадків захворювання легенів, викликаного *M. avium complex* (MAC), був описаний в 1943 р. у пацієнта з силікозом. Проте, як патогени для людини, НТМБ почали вивчатися тільки з 50-х років ХХ століття, коли з'явилися повідомлення про цілий ряд випадків легеневого захворювання, викликаних ними. У 1954 р. A. Topley і E. Runyon запропонували класифікацію НТМБ, яку зазвичай називають класифікацією Runyon і яка найширше використовується в теперішній час. Згідно цієї класифікації, НТМБ за швидкістю зростання, морфології колоній і здатності до пігментоутворення розподіляють на 4 основних групи [10].

Групи 1, 2, 3 — це мікобактерії, що зростають повільно, вимагають для появи видимого зростання колоній приблизно стільки ж часу, скільки *M. tuberculosis*. Далі їх диференціюють щодо здатності продукувати жовтий пігмент: фотохромогени (утворюють пігмент на світлі) — *M. kansasii*, *M. marinum* і *M. simiae*, скотохромогени (не вимагають світла для синтезу пігменту) — *M. gordonae*, *M. szulgai* і *M. scrofulaceum*, нефотохромогени (не синтезують пігмент) — *M. avium complex*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. ulcerans*, *M. terrae*, *M. haemophilum* і *M. genavense*.

Група 4 — це швидкозростаючі мікобактерії (на звичайних живильних середовищах приблизно впродовж 7

днів) — *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis* і *M. flavescens* [11].

Ця класифікація використовується мікробіологами в практиці, хоча останнім часом вона поступово втрачає своє значення у зв'язку з розробкою сучасних методів ідентифікації НТМБ (молекулярно-генетичних, високо-ефективної рідинної хроматографії). Крім того, ця класифікація не враховує ступінь патогенності НТМБ і клінічні прояви патології, що ними викликається. НТМБ демонструють широкий спектр патогенності: від НТМБ, які рідко бувають патогенними для людини, наприклад, *M. gordonae*, до НТМБ, які майже завжди викликають захворювання, наприклад, *M. ulcerans* або *M. kansasii* [10, 11].

Останніми роками було запропоновано декілька класифікацій НТМБ за ступенем патогенності. До облигатно-патогенних мікобактерій відносять мікобактерії, високопатогенні для людини і тварин: *M. tuberculosis*, *M. bovis* і *M. leprae*. До потенційно патогенних — мікобактерії, здатні викликати захворювання людини за певних умов: *M. avium complex*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. ulcerans* та ін. До сапрофітних — мікобактерії, які виявляються в довкіллі і, як правило, безпечні для людини: *M. gordonae*, *M. phlei*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. flavescens*, *M. gastri* і ін. Слід підкреслити, що уявлення про патогенність тих або інших видів НТМБ останніми роками зазнають зміни [11].

В даний час вісім видів повільно зростаючих НТМБ: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. bouchardurhonense*, *M. marseillense* і *M. timonense* відносять до MAC [12].

Екологія *Mycobacterium avium complex*

У НТМБ описані різні чинники патогенності (вірулентності), проте відсутній один з головних чинників вірулентності *M. tuberculosis* — «корд-фактор». Треба відмітити, що найбільш значимі в клінічній практиці НТМБ, такі як *M. avium complex*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, які часто виявляють у воді і ґрунті, структурно і біохімічно схожі з *M. tuberculosis*. Пацієнти, які мають легеневі захворювання, викликані НТМБ, часто мають захворювання легенів, такі як хронічне обструктивне захворювання легенів, муковісцидоз, бронхоектази, пневмокониоз, перенесений ТБ, альвеолярний протеїноз і ін. Пацієнти з порушеннями продукції гамма-інтерферона або IL-12 схильні до важких мікобактеріальних інфекцій [13–16]. Впродовж багатьох років для диференціації пацієнтів, що мають і не мають ознак прогресу захворювання, використовувалися терміни «колонізація» або «носієство». Проте, нині встановлено, що у багатьох з цих пацієнтів, які, як вважалося, були носіями НТМБ, при проведенні комп'ютерної томографії виявляються ознаки захворювання, і відзначається повільний клінічний і рентгенологічний прогрес хвороби [17].

M. avium-intracellulare найчастіше виділяються після *M. tuberculosis*. До процесу залучаються легені. Клінічна картина подібна до легеневого ТБ, проте описані ураження шкірних покривів, м'язової тканини і кісткового скелета, включаючи остеомієліт хребта. MAC входять до числа збудників опортуністичних інфекцій, що ускладнюють синдром придбаного імунodefіциту. Встановлено,

що інфекція МАС у ВІЛ-інфікованих пацієнтів зазвичай розвивається після того, як кількість CD4 лімфоцитів знижується до рівня нижче 50,0 кл/мл і зазвичай проявляється у вигляді дисемінованого захворювання [16].

В той же час, МАС є опортуністичними патогенами диких і домашніх тварин (свиней та ін.), птахів і людини. Особливо широко МАС представлені в природних джерелах солоної і прісної води, а також в питній воді, водопровідній воді, госпітальних системах водопостачання [18–20] і біоплівках, які МАС легко формують завдяки своїм гідрофобним властивостям і стійкості до широкого спектру дезинфектантів і антибіотиків [21]. Біоплівки, можливо, є головною причиною поширення мікобактерій в питній воді [22].

Є дані про виділення МАС з аерозолів, які утворюються в результаті скупчення найдрібніших крапель води, що сприяє підтримці життєздатності мікробних клітин. Такі аерозолі утворюються як над природними джерелами прісної води (річки, озера), так і над штучними (закриті плавальні басейни та ін.). Будучи стійкими до хлору, бактерії МАС у складі аерозолів представляють загрозу для обслуговуючого персоналу сучасних водно-розважальних і оздоровчих комплексів, оскільки можуть викликати ушкодження дихальних шляхів різного характеру [23]. Сирі приміщення також є джерелами МАС [24].

Раніше вважалося, що *M. avium*, один з типових представників МАС, є збудником «пташиного» туберкульозу і рідкісних захворювань інших тварин. Типовий штам *M. avium* ATCC 25291 був виділений від хворої курки [25]. В якості потенційного збудника хвороб людини *M. avium* стали розглядати декілька десятиліть тому [26]. Ще E. Runyon (1943 р.) встановив, що в комплексі «споріднених» мікобактерій є вірулентні захворювання, що викликають, у курей, кроликів і людини (*M. avium*), і авірулентні (*M. intracellulare*). Останні, як було показано згодом, вірулентні для тварин і людини.

Нині в межах виду *M. avium* виділяють декілька підвидів, які мають специфічні геномні патерни, що асоціюються з певним кругом хазяїв, екологічними і географічними характеристиками штамів. Найбільше клінічне значення мають мікроорганізми *M. avium* subsp. *hominissuis*, що викликають мікобактеріоз у людей (у тому числі, у ВІЛ інфікованих) і свиней. *M. avium* subsp. *avium*, *silvaticum* і *paratuberculosis* вражають в основному птахів і/або диких і домашніх тварин [12, 22, 25].

Мікобактеріоз: епідеміологія і клінічні прояви

Останнім часом намітилася тенденція до зростання числа випадків захворювання мікобактеріозом, викликаного *M. avium*, що пов'язують з такими чинниками, як зростання поширеності імуносупресивних станів, особливо ВІЛ-інфекції, «схильність» (обумовлена генетично), підвищення вірулентності збудника, а також поява нових діагностичних тестів [27–29].

МАС-інфекція належить до найбільш поширених СНІД-асоційованих суперінфекцій. Останні спостереження показують, що МАС-інфекція — найчастіше ускладнення при СНІД: у 20,0 % хворих, незважаючи на профілактичне лікування, впродовж року розвивається дисемінована форма МАС-інфекції, а у нелікованих хво-

рих цей показник в два рази вище [3, 30].

В Україні встановлено, що 2,9 % клінічних ізолятів мікобактерій ідентифікуються як НТМБ. В структурі НТМБ переважають нефотохромогенні мікобактерії — 77,1 %. Фотохромогенні мікобактерії виділяються на рівні — 16,7 %. Мікобактерії, що швидко ростуть, складають мінімальну кількість — 6,3 %. В результаті фенотипічної ідентифікації були виділені наступні види НТМБ, що циркулювали на території України: *M. avium*-complex, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum* і *M. chelonae*. Найчастіше виділялись *M. avium*-complex — 45,5 %, кількість виділених *M. fortuitum* — 13,5 %, рідше — *M. xenopi* (7,1 %) і *M. kansasii* (5,8 %) [31].

За даними D. O'Brien і співавт., у ВІЛ-інфікованих *M. avium* є частішою причиною захворювання, ніж *M. intracellulare* [32]. Частково це можна пояснити тим, що вхідними воротами для *M. avium* служить не лише респіраторний, як у випадку з *M. intracellulare*, але і шлунково-кишковий тракт. Цей мікроорганізм, потрапляючи з їжею або водою в порожнину рота, здатний зберігатися в кислому середовищі шлунку і вражати слизову оболонку кишечника, викликаючи бактеріємію і вторинне ураження кісткового мозку і селезінки [33].

Лабораторна діагностика мікобактеріозу, обумовленого МАС

Висока частота поширення в довіклі обумовлює необхідність багатократного виділення НТМБ з джерела ураження для підтвердження їх етіологічної ролі. Американське торакальне товариство розробило критерії, які використовуються для встановлення етіологічної ролі НТМБ у ВІЧ-позитивних і ВІЧ-негативних пацієнтів. Це наявність клінічної симптоматики; інфільтративні, осередкові або кавернозні ураження, або множинні дрібні вогнища, або множинні бронхоектази, виявлені при проведенні комп'ютерної томографії; позитивні результати культурального дослідження як мінімум двох окремих зразків мокротиння або позитивний результат культурального дослідження трансbronхіальної або легеневої біопсії [16].

Важливе значення в ефективності діагностики мікобактеріозів, обумовлених МАС-інфекцією, має вдосконалення методів. Поява високоспецифічних і високочутливих методів ідентифікації НТМБ, а саме: культивування в автоматизованих системах з використанням рідких живильних середовищ, молекулярно-генетичні методи і метод високопродуктивної рідинної хроматографії міколових кислот (High Performance Liquid Chromatography — HPLC), MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) TOF MS (Time of Flight Mass-Spectrometry) — мас-спектрометрія значно розширили можливості лабораторної діагностики. Усе це дозволило підвищити швидкість і якість діагностики мікобактеріозів [11].

Для діагностики ТБ ВООЗ був прийнятий алгоритм, який включає двократне дослідження зразків мокротиння, зібраних впродовж 24 годин. Ця кратність обумовлена тим, що при збільшенні кількості досліджень вірогідність виділення мікобактерій зростає всього на 2,0 %. Проте цей підхід не можна однозначно використовувати відносно діагностики мікобактеріозів, обумовлених і

M. avium. Слід враховувати можливу транзиторну колонізацію слизових оболонок верхніх дихальних шляхів НТМБ з довкілля, у зв'язку з чим виділення мікроорганізмів цієї групи з мокротиння не завжди є критерієм для постановки діагнозу. З цієї причини Американським торакальним товариством було встановлено, що для постановки діагнозу «мікобактеріоз» необхідно отримання 3 ранкових зразків, зібраних в різні дні з інтервалом приблизно в тиждень. Це забезпечує зниження ризику контамінації клінічного матеріалу НТМБ з довкілля [34]. У разі використання в якості досліджуваного матеріалу бронхоальвеолярного лаважу для верифікації діагнозу досить одноразового виділення мікобактерій [35, 36].

До стандартних методів розжиження і деконтамінації мокротиння можна віднести: обробку матеріалу 10,0 % розчином трьохзаміщеного фосфорнокислого натрію; обробку 3,0 % сірчаною кислотою; обробку 4,0 % розчином їдкою натру. Трьохзаміщений фосфорнокислий натрій (Na_3PO_4) добре пригнічує супутню мікрофлору і впродовж 2–3 днів зберігання матеріалу при температурі (+4) °C не ушкоджує мікобактерії і мало впливає на їх здатність до зростання на живильних середовищах. Проте залишається відкритим питання про його вплив на швидкозростаючі НТМБ, які можуть мати відмінності у будові клітинної стінки. Гідроокис натрію і сірчана кислота дуже токсичні по відношенню як до контамінуючих біологічний матеріал мікроорганізмів, так і до мікобактерій. Тому при використанні цих методів потрібне суворе дотримання вказаного часу обробки [37–39].

Оскільки приведені вище методи мають ряд недоліків, в нормативних документах приведені альтернативні методи деконтамінації, до яких можна віднести метод з використанням N-ацетил L-цистеїну (NALC-NaOH). Препарат NALC, який використовується в якості муколітичного розчину, швидко розріджує мокроту і дозволяє значно понизити концентрацію деконтамінуючої речовини (NaOH) до 1,0 %. Метод мінімізує негативний вплив етапу деконтамінації на вітальні властивості мікобактерій.

У разі високого обсіменіння клінічного матеріалу забруднюючою мікрофлорою деконтамінацію краще проводити агресивнішими методами з використанням щавлевої або сірчаної кислоти. Особливо ефективний цей метод у разі забруднення мокроти грамнегативними мікроорганізмами, що не ферментують, і ентеробактеріями. Проблема якісної деконтамінації частково обумовлює низьку чутливість культурального методу дослідження на мікобактерії, яка складає близько 80,0–90,0 % [17, 34, 36]. Преаналітичні помилки, які обумовлюють зміну життєздатності мікобактерій в отриманому клінічному матеріалі, пов'язані з умовами зберігання і проведення підготовки проб, можуть складати від 50,0 до 68,0 % від усіх помилок в діагностиці ТБ. На жаль, дані про вплив цих чинників щодо діагностики мікобактеріозів в літературі не представлені [40].

При проведенні підготовки проб для виділення НТМБ слід враховувати, що використання деконтамінантів за будь-яких умов побічно або безпосередньо впливає на ростові властивості мікобактерій. Так, всі деконта-

мінанти можуть знищити і частину популяції мікобактерій. В результаті обробки деякими з них може загинути до 90,0 % мікобактерій [41]. Крім того, слід пам'ятати, що мікобактерії, що виділяються з дихальних шляхів, оточені великою кількістю слизу, що утрудняє їх концентрацію. У зв'язку з цим необхідно розробляти нові щадні методи обробки, що дозволяють, з одного боку, подавити швидкозростаючі умовно-патогенні мікроорганізми, а з іншої — максимально зберегти життєздатність присутніх в матеріалі мікобактерій [39].

Відомо, що клітинна стінка мікобактерій має схожі ознаки, властиві грампозитивним мікроорганізмам, проте на відміну від них містить значно більшу кількість ліпідів. Цей факт істотно впливає на сприйняття основних барвників, які застосовуються при мікроскопічному дослідженні нативного і обробленого матеріалу, а також чистих культур. Практично у всіх мікобактерій відсутня чутливість до анілінових барвників, що само собою створює додаткові труднощі в діагностиці мікобактеріозів. Застосування спеціальних методів забарвлення за методом Ціля-Нільсена і сприйнятливості до флюорохромних барвників (аурамін і родамін) дає можливість виявити мікобактерії в клінічному матеріалі, але, на жаль, не дозволяє провести диференціальну діагностику НТМБ з мікобактеріями туберкульозного комплексу [11, 37].

Культивування мікобактерій на живильних середовищах — поширений метод діагностики мікобактеріозів. З метою забезпечення максимальної чутливості цього методу має значення тип живильного середовища, а також використання добавок і підтримка оптимальної температури інкубації [11].

Проте культивування НТМБ істотно відрізняється від культивування *M. tuberculosis complex*. В першу чергу, це пов'язано з високою неоднорідністю цієї групи мікроорганізмів. Загальноприйнятою методикою виділення мікобактерій з клінічного матеріалу вважається культивування на щільних (Левенштейн-Єнсен, Фінн-ІІ) і рідких (Міддлбрук) середовищах. Останнім часом в лабораторіях отримали поширення автоматичні і напівавтоматичні системи культивування. Проте залишається відкритим питання про вибір найбільш оптимальної комбінації середовища при виділенні НТМБ з клінічного матеріалу. Так, якщо використовувати тільки рідкі живильні середовища, то зберігається ризик не виділення з матеріалу таких НТМБ, що зростають повільно, як *M. хепорі*, що обумовлено досить уповільненим метаболізмом цього мікроорганізму. З іншого боку, занадто активне зростання деяких швидкозростаючих НТМБ може бути помилково розцінено як контамінація матеріалу сапрофітною мікрофлорою. З цієї причини потрібна візуальна оцінка усіх негативних флаконів з використанням або прямої мікроскопії, або пересівання на щільні живильні середовища [42].

Використання тільки щільних живильних середовищ також обмежує можливість виділення деяких мікроорганізмів з НТМБ із-за особливостей їх метаболізму, а також відмінностей в температурному оптимумі при культивуванні деяких НТМБ.

Оскільки при використанні тільки класичних мікробіологічних методів виникає ряд невирішених проблем,

пов'язаних з виділенням і ідентифікацією НТМБ, досить часто на практиці використовуються додаткові методи, до яких можна віднести, зокрема, молекулярно-генетичні дослідження. За останній час ідентифікація НТМБ, що проводиться в лабораторіях протитуберкульозної служби різних країн, вийшла на якісно новий рівень. Передусім, це пов'язано з появою новітніх високоспецифічних і високоточних методів діагностики, серед яких молекулярно-генетичні методи зробили найбільший стрибок, особливо у порівнянні з біохімічними тестами і з методом високопродуктивної рідинної хроматографії мікролових кислот [43].

Найбільше поширення в лабораторних дослідженнях, що проводяться протитуберкульозними закладами, отримав метод лінійного аналізу ДНК-зондами (LIPA), призначений для проведення ампліфікації ДНК і подальшою гібридизацією на нейлонових мембранах, так званих ДНК-стрипах з маркерними олігонуклеотидними зондами. Запропоновані діагностичні набори дозволяють ідентифікувати види НТМБ, що часто зустрічаються і клінічно-значимі. Даний метод дозволяє досліджувати культуру, що виросла, як на щільному, так і на рідкому живильному середовищах [43].

У спеціалізованих лабораторіях наукового профілю використовується молекулярно-генетична ідентифікація мікобактерій по гену 16S rPHK, який має високу консервативність: відмінності в послідовності навіть на 1,0 % (і більше) зазвичай дозволяють говорити про видову відмінність зразків. Результати секвенування послідовності 16S rPHK для кожного виду вносяться в загальнодоступні бази даних, які служать як для ідентифікації вже відомих НТМБ, так і для реєстрації нових видів. Окрім консервативних ділянок для видової диференціації використовується аналіз двох гіперваріабельних послідовностей (так звані області A і B) в гені 16S rPHK. Як правило, достатньо аналізу послідовності області A для визначення видової належності більшості НТМБ. Область B аналізується у випадках опису нових видів або видів, що не диференціюються тільки по області A і консервативних послідовностей. Наприклад, послідовності 16S rPHK *M. chelonae* і *M. abscessus* відрізняються тільки 4 п.н., що утрудняє їх диференціацію цим методом [44]. Деякі види з недавньою дивергенцією можуть містити дуже схожі послідовності гена 16S rPHK (наприклад, різниця між *M. szulgai* і *M. malmoense* складає два нуклеотиди) [45, 46].

Окрім описаних нами методик у вирішенні проблеми видової диференціації знайшло застосування мультилокусне секвенування (Multi Locus Sequence Typing, MLST). Цей аналіз полягає в секвенуванні певного набору генів. В результаті кожен штам характеризується специфічним «алельним профілем» або сіквенс-типом по вибраних локусах. Метод дозволяє ідентифікувати бактерії до підвиду, проте цей аналіз досить важко впровадити в рутинну лабораторну діагностику у зв'язку з трудомісткістю і високою вартістю [44].

Широко застосовуються методи, які пов'язані з аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (PRA method) послідовності гена, що кодує білок теплового шоку 65 кДа (Hsp65). Розмір рестрикційних

фрагментів, як правило, видоспецифічний. Ця методика хоча і є відносно швидкою і дозволяє визначати багато видів НТМБ, які не ідентифікуються фенотипічними методами, але, також як і MLST, не є актуальною в рутинній практиці медичних лабораторій [44].

Усі вищезгадані методи широко використовуються в спеціалізованих мікробіологічних лабораторіях. Проте варто відмітити, що при цьому на ідентифікацію потрібно велику кількість часу і засобів. Оптимальним рішенням цієї проблеми є поява абсолютно нової системи, яка зробила революцію в сучасній мікробіології. Вона представлена у вигляді методу активованої для матриці лазерної десорбції/іонізації MALDI TOF MS — час прольотної мас-спектрометрії. Цей метод заснований на багатократній дії імпульсів лазера на заздалегідь покрити матрицею бактерійну клітину і подальшою іонізацією білків. Матриця є речовиною (α -ціано-4-гідроксикорична кислота), яка здатна знижувати деструктивні характеристики лазерного випромінювання і підвищувати подальшу іонізацію аналізованої речовини. Далі отримані іонізовані білки рухаються до детектора, який знаходиться в аналізаторі. Програмне забезпечення приладу оцінює час прольоту часток і перетворює цю інформацію в спектр молекулярних мас (мас-спектр), представлений у вигляді відношення маси і заряду. Мас-спектр порівнюється із спектрами з бази даних, і на підставі наявності певних білків, їх маси і кількості відбувається ідентифікація бактерій. Важливою перевагою цього методу є те, що він забезпечує високу продуктивність, специфічність, чутливість, а також неперевершену швидкість аналізу, що вимагає менше однієї хвилини, проте і цей метод не є ідеальним. Якість діагностики залежить від наявності певних баз даних, що впливає на вартість ідентифікації. Також на ідентифікацію можуть впливати умови культивування мікроорганізмів, методи підготовки проб і ряд інших чинників [11].

Медикаментозна чутливість *M. avium*

Відомо, що лікування інфекцій, викликаних *M. avium*, є досить складним внаслідок природної множинної медикаментозної стійкості (ММС) до більшості протитуберкульозних і інших антибактеріальних препаратів, що зазвичай не застосовуються для терапії туберкульозу. Тому лікування мікобактеріозу частенько вимагає використання комбінації з декількох препаратів, хірургічного втручання або поєднання обох методів. Спроби лікування хворих з дисемінованими процесами, викликаними МАС, у більшості випадків виявляються безуспішними [4].

Природна ММС *M. avium* обумовлена низькою проникністю клітинної стінки для медикаментозних препаратів, тому умови, сприяючі порушенню її цілісності, призводять до підвищення медикаментозної чутливості мікроба. Показано, що між медикаментозною чутливістю, вірулентністю і морфотипами колоній (прозорість і колір на середовищі з Конго червоним) *M. avium* існує залежність, що асоціюється з поліморфізмом мутацій в генах *pkc12* (Maa1979), *mtrAB* і *Maa2520* [47, 48].

Всього існує декілька методів визначення антибіотикорезистентності у мікобактерій. Більшість з них ґрунту-

ються на культивуванні мікобактерій на щільних або рідких живильних середовищах з додаванням антимікробних препаратів в різних концентраціях. Одним з найбільш перспективних на сьогодні методів є метод, який ґрунтується на подвійному серійному мікророзведенні препаратів різних груп для визначення мінімальних пригнічуючих концентрацій. Виробник пропонує дві тест-системи: для тих, що зростають повільно (13 найменувань препаратів) і швидкозростаючих (15 найменувань препаратів) НТМБ (Sensititre®) [49].

Особливості геному *M. avium*

Повністю закінчено секвенування геному штаму *M. avium* 104 (subsp. *hominissuis*). Нуклеотидна послідовність хромосомної ДНК цього штаму включає 5475491 пару нуклеотидів, що складає близько 5313 генів, які входять до складу функціональних груп, що займають 88,0 % потенційної кодуючої місткості геному. З них 5120 генів кодують білки, 50 генів — стабільну РНК. Інформація про повну нуклеотидну послідовність (сіквенс) геному штаму *M. avium* 104 доступна в GenBank. Також проведено секвенування геномів *M. avium avium* ATCC 25291 і *M. avium paratuberculosis* K-10.

Наявні у складі геному послідовно розташовані відкриті рамки прочитування (Open Reading Frame, ORF) визначають як «геномні острови» (genomic island, GI) [50, 51]. Геномні острови кодують мобільні елементи (IS-послідовності, профаги); регуляторні елементи транскрипції, особливо сімейства TetR, що регулюють експресію гена стійкості до тетрацикліну; різні оперони гена *tse*, що забезпечує проникнення в клітини ссавців; оперони гена *drrAB*, що кодують стійкість до антибіотиків доксорубіцину і даунорубіцину, що є серйозною проблемою при лікуванні інфекцій, викликаних *M. avium* у хворих СНІД [51, 52–54].

Експресію ключових антигенів і чинників вірулентності, які потрібні для виживання мікроорганізму в довкіллі, регулюють два головні типи геномних перебудов: інсерції/делеції геномних островів і геномні інверсії [51].

Генетична різноманітність *M. avium* обумовлена поліморфізмом кодуючих і некодуючих послідовностей генома. Так, для видової ідентифікації в якості генетичної мішені використовують видоспецифічну ділянку гена *hsp65* — одного з основних чинників патогенності *Mycobacterium*, що кодує білок теплового шоку (heat shock protein) молекулярною масою 65 kDa [55, 56].

А. Telenti і співавт. (1993 р.) описали оригінальний метод рестрикційного аналізу для ідентифікації мікобактерій — PCR-restriction enzyme analysis (PRA) — *hsp65*. Ампліфіковану в ході ПЛР ділянку гена *hsp65* обробляють рестриктазами BstE II і Hae III; отримані фрагменти рестрикції аналізують за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Це дозволяє ідентифікувати види мікобактерій, що відрізняються один від одного набором фрагментів рестрикції [57].

Також для ідентифікації *M. avium* і інших НТМБ використовують аналіз поліморфізму структурних генів *groV* (контролює синтез бета-субодиниці РНК-полімерази), *gyrB* (відповідальний за синтез бета-субодиниці ферменту ДНК-гірази), *secA1* (кодує білок Sec1, який забезпечує транспорт білків скрізь цитоплазматичну мембрану),

recA (бере участь в процесах рекомбінації ДНК, індукції SOS-відповіді і SOS-репарації), *sodA* (кодує фермент супероксиддисмутази), ген *16s rRNA* (несе інформацію про послідовність рибосомальної РНК) і область ITS гена *16 SrRNA* (транскрибуєма послідовність ДНК, яка розділяє активні ділянки гена *16s-23s rRNA*) [58, 59].

Для аналізу геномного поліморфізму штамів в межах виду і підвиду *M. avium* в якості генетичних маркерів використовують інсерційні послідовності — мобільні IS-елементи (англ. insertion sequence — послідовність, що вбудовується): IS901, IS900, IS1245, IS131 [60–63].

IS1245. Мобільний елемент IS1245 (427 bp) — представник сімейства інсерційних елементів IS256 [64], вперше описаний С. Guerrero із співавт. у 1995 р., являється специфічним для геному *M. avium* і кодує фермент транспозазу [65]. IS1245 представлений множинними копіями, що свідчить про наявність «гарячих точок» (сайтів інтеграції) для їх вбудовування. Цей елемент має високу міру подібності з послідовністю елемента IS1311 (85,0 %) [66, 67]. Круг «хазяїв» IS1245 обмежується підвидами *M. avium* і не характерний для *M. intracellulare* [68]. У складі хромосоми у переважної більшості клінічних ізолятів *M. avium*, як правило, є присутніми від трьох до 27 копій IS1245, ідентичних по нуклеотидній послідовності, що свідчить про міграцію елемента шляхом реплікативної транспозиції. Проте зустрічаються штами, позбавлені цього елемента [69].

Використання IS1245 як мішені для аналізу ДНК *M. avium* методом RFLP (англ. Restriction Fragment Length Polymorphism — поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів) є таким же ефективним, як і IS6110, який успішно застосовується для генотипування штамів *M. tuberculosis* [25].

За допомогою RFLP-аналізу з використанням інсерційних елементів IS1245 і IS901, були виявлені значні відмінності між ізолятами *M. avium*, які отримані від різних джерел [70]. Так, штами, виділені від птахів, характеризувалися малим числом копій IS1245 і присутністю елемента IS901, тоді як ізоляти, отримані від людини і свиней, навпаки, були представлені поліморфними багатокопійними патернами IS1245 (більше восьми) і відсутністю елемента IS901. Отримані дані лягли в основу положення про існування двох еволюційно різних підвидів *M. avium*, позначених як *M. avium avium* (ізоляти від птахів) і *M. avium hominissuis* (ізоляти від людини і свиней) [59, 71, 72]. Більше того, були продемонстровані значні відмінності у вірулентності цих генетично близькоспоріднених підвидів. Встановлено, що ізоляти *M. avium* subsp. *avium* від хворих птахів і деяких тварин (IS901⁺) є набагато більше вірулентними, ніж ізоляти *M. avium* subsp. *hominissuis* від ВІЛ-інфікованих хворих (IS901⁻) [73, 74]. Вірулентність штамів, що містять елемент IS901, була підтверджена експериментально [71, 74, 75].

IS1311. Мобільний елемент IS1311, IS256, що також відноситься до сімейства [76], зустрічається у підвидів *M. avium avium*, *M. avium hominissuis* і *M. avium paratuberculosis* [77], *M. intracellulare*, *M. malmoeense* і *M. scrofulaceum* [67]. Зважаючи на досить широке коло «хазяїв» цього елемента, можна припустити, що IS1311 є «древнішим» елементом [77].

Використання обох елементів (IS1245 і IS1311) для генотипування методом RFLP підвищує міра дискримінації досліджуваних штамів [78].

Існують також коротші послідовності, що повторюються, які можуть використовуватися для диференціації всередині підвидів *M. avium*.

Послідовності Variable Number Tandem Repeat (VNTR), так звані *Mycobacterium Interspersed Repetitive Units* (MIRU) були описані у *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* і *M. avium*. Характерними властивостями MIRU, які дозволяють відрізнити їх від інших тандемних повторів, є наявність регуляторних елементів, таких як кодони, що ініціюють, і стоп-кодони. Більшість MIRU перекривають термінуючі або ініціюючі кодони, та їх фланкуючі гени. Поліморфізм локусів тандемних повторів виникає в результаті будь-яких змін у нуклеотидній послідовності окремих нуклеотидів або цілого ряду тандемних повторів і використовується як вторинний маркер для тонкої диференціації штамів *M. avium*. У клінічних штамів *M. avium* описані також тандемні повтори MATR (англ. *Mycobacterium avium tandem repeat*, MATR) [79, 80].

Таким чином, використання методів виявлення інсерційного елементу IS901, аналізу поліморфізму рестрикційних фрагментів гена *hsp65* і елементу IS1245

дозволяє провести ідентифікацію і визначення підвиду *M. avium*. Дослідження геномного поліморфізму штамів *M. avium* для оцінки структури популяції можливо за допомогою комплексу молекулярно-генетичних методів VNTR-типування, IS1245- і IS1311- RFLP-типування [81].

Таким чином, хоча передача *M. avium* від людини до людини не доведена, і мікобактеріоз носить спорадичний характер, серед ВІЛ-інфікованих за останні час намітилася тенденція до зростання числа випадків захворювання, викликаного *M. avium*. Труднощі етіологічної діагностики мікобактеріозу і висока природна резистентність збудника призводять до розвитку хронічних деструктивних уражень легенів. При цьому у ВІЛ-інфікованих і хворих СНІД, незважаючи на профілактичне лікування, нерідко розвивається дисемінована форма інфекції з несприятливим прогнозом. В зв'язку з цим зросло число публікацій, що стосуються цієї проблеми. Недолік відомостей про структуру популяції *M. avium*, відсутність простих чутливих методів мікробіологічної діагностики обмежують можливості епідеміологічного моніторингу мікобактеріозу в нашій країні. Це диктує необхідність використання сучасних ефективних молекулярно-генетичних методів дослідження для виявлення, видової ідентифікації і типування *M. avium*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Литвинов ВИ, Макарова МВ, Краснова МА. Нетуберкулезные микобактерии. 2008; 256.
2. Euzébi J. List of bacterial names with standing in nomenclature. Genus *Mycobacterium*. 2003;12. Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103655>
3. Katoch V. Infections due to nontuberculous mycobacteria (NTM). Indian J. Med. Res. 2004;120:290–304.
4. Оттен ТФ, Васильев АВ. Микобактериоз. СПб.: Медицинская пресса. 2005;224.
5. CDC. Guidelines for the Control of Nontuberculous Mycobacteria in the Northern Territory. Northern Territory Government. 2002. Режим доступу: <http://www.health.nt.gov.au/library/scripts/objectifyMedia.aspx?file=pdf/10/88.pdf>
6. Литвинов ВИ. Нетуберкулезные микобактерии. М.2009;250 с.
7. Levy-Frebault VV, Portals F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int. J. Syst. Bacteriol.1992;42:315–323.
8. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. Europ. J. Clin. Microbiol.1994;13(11):884–901.
9. Euzéby JP. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Режим доступу: <http://www.bacterio.cict.fr>
10. Marras TK, Daley CL. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. Clin. Chest. Med. 2003;23:553–567.
11. Майорова АА. Идентификация нетуберкулезных микобактерий и выбор оптимальной комбинации методов для их видовой дифференциации: автореф. дис. ... канд. биол. наук. ФГУЗ «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора РФ. М. 2007;26.
12. Cayrou C et al. Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. Microbiology. 2010;156(3):687–694.
13. Heifets L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. Semin. In Respir. Crit. Care Med. 2004;25(3):283–295.
14. Field SK, Cowie RL. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. Chest. 2006; 129: 1653–1672.
15. Field SK, Fisher D, Cowie RL. Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients without HIV infection. Chest. 2004;126:566–581.
16. Griffith DE, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007;175:367–416.
17. Marras TK, et al. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. Thorax. 2007;62:661–666.
18. Falkinham III JO, Norton CD, Le Chevallier MW. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and other mycobacteria in drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. 2001;67(3):1225–1231.
19. Ichiyama S, Shimokata K, Tsukamura M. The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water, and dusts. Microbiol. Immunol. 1988;32(7):733–739.
20. Moulin GC, et al. Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. JAMA. 1988;260(11):1599–1601.
21. Taylor RH, et al. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. Appl. Environ. Microbiol. 2000;66:1702–1705.
22. Falkinham III JO. Nontuberculous mycobacteria in the environment. Clin. Chest Med. 2002;23:529–551.

REFERENCES

1. Litvinov VI, Makarova MV, Krasnova MA. *Netuberkuloznye mikobakterii* (Non-tuberculous mycobacteria). M. 2008; 256.
2. Euzébi J. List of bacterial names with standing in nomenclature. Genus *Mycobacterium*. 2003;12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103655>
3. Katoch V. Infections due to nontuberculous mycobacteria (NTM). Indian J. Med. Res. 2004;120:290–304.
4. Otten TF, Vasilev AV. *Micobacterios* (Mycobacteriosis). SPb.: Medicinskaya pressa. 2005;224.
5. CDC. Guidelines for the Control of Nontuberculous Mycobacteria in the Northern Territory. Northern Territory Government. 2002. Available at: <http://www.health.nt.gov.au/library/scripts/objectifyMedia.aspx?file=pdf/10/88.pdf>
6. Litvinov VI. *Netuberkuloznye mikobakterii* (Non-tuberculous mycobacteria). M. 2009;250.
7. Levy-Frebault VV, Portals F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int. J. Syst. Bacteriol.1992;42:315–323.
8. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. Europ. J. Clin. Microbiol.1994;13(11):884–901.
9. Euzéby JP. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Available at <http://www.bacterio.cict.fr>
10. Marras TK, Daley CL. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. Clin. Chest. Med. 2003;23:553–567.
11. Mayorova AA. *Identifikatsiya netuberkuleznykh mikobakteriy i vybor optimal'noy kombinatsii metodov dlya ikh vidovoy differentsiatsii: avtoreferat dissertatsii kandidata biologicheskikh nauk* (Identification of non-tuberculosis mycobacteria and choice of optimal combination of methods for their specific differentiation: abstract of the dissertation candidate of biological sciences (Rus)). FGUS "Moscow research institute of epidemiology and microbiology the name of G. N. Gabrichevskogo" Rosпотребнадзора RF. M. 2007;26.
12. Cayrou C, et al. Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. Microbiology. 2010;156(3):687–694.
13. Heifets L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. Semin. In Respir. Crit. Care Med. 2004;25(3):283–295.
14. Field SK, Cowie RL. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. Chest. 2006; 129: 1653–1672.
15. Field SK, Fisher D, Cowie RL. Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients without HIV infection. Chest. 2004;126:566–581.
16. Griffith DE, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007;175:367–416.
17. Marras TK, et al. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. Thorax. 2007;62:661–666.
18. Falkinham III JO, Norton CD, Le Chevallier MW. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and other mycobacteria in drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. 2001;67(3):1225–1231.
19. Ichiyama S, Shimokata K, Tsukamura M. The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water, and dusts. Microbiol. Immunol. 1988;32(7):733–739.
20. Moulin GC, et al. Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. JAMA. 1988;260(11):1599–1601.

23. Falkingham III JO, et al. Collection and characteristics of mycobacteria in aerosols. Morey PR, Feeley Sr JC, Otten JA. Biological contaminants in indoor environments, American Society for Testing and Materials. 1990:71–81.
24. Andersson MA, et al. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. Appl. Environ. Microbiol. 1997;63(2):387–393.
25. Turenne CY, Wallace R, Behr MA. Mycobacterium avium in the post genomic era. Clin. Microb. reviews. 2007;20(2):205–229.
26. Field S, Fisher D, Cowie R. Mycobacterium avium complex pulmonary diseases in patients without HIV infection. Chest. 2004;126:566–581.
27. Iseman M. Medical management of pulmonary disease caused by Mycobacterium avium complex. Clin. Chest Med. 2003;23:633–641.
28. Martn-Casabona N, et al. Spanish Group for Non-Tuberculosis Mycobacteria. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multicenter retrospective survey. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2004;8:1186–1193.
29. Wallace R, Glassroth J, Griffith D. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997;156:1–25.
30. Rossi M, et al. Disseminated M. avium complex infection in the swiss HIV cohort study: declining incidence, improved prognosis and discontinuation of maintenance therapy. Swiss Med. Wkly. 2001;131:471–478.
31. Журило ОА, Барбова АІ, Трофімова ПС, МIRONCHENKO СВ. Вивчення видової різноманітності нетуберкульозних мікобактерій в областях України з використанням класичного бактеріологічного методу і сучасного генетичного ДНК-стрипового GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Німеччина). Укр. пульмонолог. журн. 2019;(1):27–30.
32. O'Brien D, Currie B, Krause V. Nontuberculous mycobacterium disease in Northern Australia: a case series and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 2000;31:958–968.
33. McGarvey J, Bermudes L. Phenotypic and genomic analyses of the Mycobacterium avium complex reveal differences in gastrointestinal invasion and genomic composition. Infect. Immun. 2001;69:7242–7249.
34. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Eliot BA. An official ATS IDSA statement : diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007;(175):367–416.
35. Pye A, Hili SL, Bharadwa P. Effect of storage and postage on recovery and quantization of bacteria in sputum samples. J. Clin. Pathol. 2008;(61):352.
36. Mase SR, Ramsay A. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2007;(11):485–495.
37. Севастьянова ЭВ, Голышевская ВИ. Выявление туберкулеза методом микроскопии. Тверь, 2008:100.
38. Голышевская ВИ, Севастьянова ЭВ. Современное состояние микробиологической диагностики туберкулеза в России. Актуальные проблемы туберкулеза и болезней легких. М. 2006:17–18.
39. Ерохин ВВ, Голышевская ВИ, Шульгина МВ. Культуральные методы диагностики туберкулеза: учебное пособие. М. 2008:208.
40. Лопаків КВ, Сабгайда ТП, Попов СА. Новый интегральный показатель «эпидемиологический потенциал туберкулеза». Социальные аспекты здоровья населения. 2009;(1):4.
41. Перельман МИ. Туберкулез. М. 2003:233 с.
42. Долгова ВВ, Меньшикова ВВ. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. М. 2013;II:808.
43. Лабинская АС, Костюкова НН. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. М. 2013:752.
44. Hall L, et al. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. J. Clin. Microbiol. 2003;(41):1447–1453.
45. McNabb AD, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources. J. Clin. Microbiol. 2004;(42):3000–3011.
46. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. J. Clin. Microbiol. Rev. 2003;(2):319–354.
47. Cangelosi GA, et al. The two-component regulatory system mtrAB is required for morphotypic multidrug resistance in Mycobacterium avium. Antimicrob. Agents Chemother. 2006;50(2):461–468.
48. Philalay JS, et al. Genes required for intrinsic multidrug resistance in Mycobacterium avium. Antimicrob. Agents Chemother. 2004;48(9):3412–3418.
49. Huitt GA, Daley CL. Clinic in chest medicine. Nontuberculous mycobacteria. Elsevier. 2015;36(1):125.
50. Bannantine JP, et al. Genome scale comparison of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with Mycobacterium avium subsp. avium reveals potential diagnostic sequences. J. Clin. Microbiol. 2002;40:1303–1310.
51. Chia-wei Wu, et al. Whole-Genome Plasticity among Mycobacterium avium subspecies: insights from comparative genomic hybridizations. J. Bacteriol. 2006;188(2):711–723.
52. Arruda S, et al. Cloning of an M. tuberculosis DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science. 1993;261:1454–1457.
53. Casali N, et al. Invasion activity of a Mycobacterium tuberculosis peptide presented by the Escherichia coli AIDA autotransporter. Infect. Immun. 2002;70:6846–6852.
54. Choudhuri BS, et al. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes drrA and drrB of Mycobacterium tuberculosis. Biochem. J. 2002;367:279–285.
55. Chimara E, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PR A)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PR A-hsp65 patterns. BMC Microbiology. 2008;8:48.
56. McNabb A, et al. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of Mycobacterium species isolated from clinical sources. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(7):3000–3011.
57. Telenti A, et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 1993;31:175–178.
21. Taylor RH, et al. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of Mycobacterium avium. Appl. Environ. Microbiol. 2000;66:1702–1705.
22. Falkingham III JO. Nontuberculous mycobacteria in the environment. Clin. Chest Med. 2002;23:529–551.
23. Falkingham III JO, et al. Collection and characteristics of mycobacteria in aerosols. Morey PR, Feeley Sr JC, Otten JA. Biological contaminants in indoor environments, American Society for Testing and Materials. 1990:71–81.
24. Andersson MA, et al. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. Appl. Environ. Microbiol. 1997;63(2):387–393.
25. Turenne CY, Wallace R, Behr MA. Mycobacterium avium in the post genomic era. Clin. Microb. reviews. 2007;20(2):205–229.
26. Field S, Fisher D, Cowie R. Mycobacterium avium complex pulmonary diseases in patients without HIV infection. Chest. 2004;126:566–581.
27. Iseman M. Medical management of pulmonary disease caused by Mycobacterium avium complex. Clin. Chest Med. 2003;23:633–641.
28. Martn-Casabona N, et al. Spanish Group for Non-Tuberculosis Mycobacteria. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multicenter retrospective survey. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2004;8:1186–1193.
29. Wallace R, Glassroth J, Griffith D. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997;156:1–25.
30. Rossi M, et al. Disseminated M. avium complex infection in the swiss HIV cohort study: declining incidence, improved prognosis and discontinuation of maintenance therapy. Swiss Med. Wkly. 2001;131:471–478.
31. Zhurilo OA, Barbova AI, Trofimova PS, Mironchenko SV. *Vivchennia vidovoi riznomanitnosti netuberculoznych mycobacteriy v oblastach Ukraini z vikoristannam klssichnogo bakteriologichnogo method i suchasnogo genetichnogo DNK-stripovogo GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Nimechyna).* (Study of the species diversity of nontuberculous mycobacteria in the regions of Ukraine using the classical bacteriological method and the modern genetic DNA-striped GenoType Mycobacterium CM / AS (Hain Lifescience, Germany).) Ukr. pulmonol. zhurn. 2019;(1):27–30.
32. O'Brien D, Currie B, Krause V. Nontuberculous mycobacterium disease in Northern Australia: a case series and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 2000;31:958–968.
33. McGarvey J, Bermudes L. Phenotypic and genomic analyses of the Mycobacterium avium complex reveal differences in gastrointestinal invasion and genomic composition. Infect. Immun. 2001;69:7242–7249.
34. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Eliot BA. An official ATS IDSA statement : diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007;(175):367–416.
35. Pye A, Hili SL, Bharadwa P. Effect of storage and postage on recovery and quantization of bacteria in sputum samples. J. Clin. Pathol. 2008;(61):352.
36. Mase SR, Ramsay A. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2007;(11):485–495.
37. Sevastyanova EV, Golishevskaya VI. *Viyavlenie tuberculosa methodom microscopii* (Microscopic detection of tuberculosis). Tver. 2008:100.
38. Golishevskaya VI, Sevastyanova EV. *Sovremennoe sostoyanie microbiologicheskoy diagnostiki tuberculosa v Rossii* (The current state of microbiological diagnosis of tuberculosis in Russia). *Aktualnie problem tuberculosa s boleznei legkich*. М. 2006:17–18.
39. Erochin VV, Golishevskaya VI, Shulgina MV. *Kulturalnie metodi diagnostiki tuberculosa: uchebnoe posobie* (Cultural methods for the diagnosis of tuberculosis: a training manual). М. 2008:208.
40. Lopakov KV, Sabgayda TP, Popov SA. *Novyy integralniy pokazatel «epidemicheskii potencial tuberculosa»* (The new integral indicator "the epidemiological potential of tuberculosis"). *Sotsialnie aspekti zdorovya naseleniya*. 2009;(1):4.
41. Perelman MI. *Tuberculosis* (Tuberculosis). М. 2003:233.
42. Dolgova VV, Menshikova VV. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika: nacionalnoe rukovodstvo* (Clinical laboratory diagnostics: national guidelines). М. 2013;T. II:808.
43. Labinskaya AS, Kostukova NN. *Opportunistic infections: causative agents and etiologic diagnostics* (Opportunistic infections: pathogens and etiological diagnosis). М.: Binom; 2013:752.
44. Hall L, et al. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. J. Clin. Microbiol. 2003;(41):1447–1453.
45. McNabb AD, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources. J. Clin. Microbiol. 2004;(42):3000–3011.
46. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. J. Clin. Microbiol. Rev. 2003;(2):319–354.
47. Cangelosi GA, et al. The two-component regulatory system mtrAB is required for morphotypic multidrug resistance in Mycobacterium avium. Antimicrob. Agents Chemother. 2006;50(2):461–468.
48. Philalay JS, et al. Genes required for intrinsic multidrug resistance in Mycobacterium avium. Antimicrob. Agents Chemother. 2004;48(9):3412–3418.
49. Huitt GA, Daley CL. Clinic in chest medicine. Nontuberculous mycobacteria. Elsevier. 2015;36(1):125.
50. Bannantine JP, et al. Genome scale comparison of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with Mycobacterium avium subsp. avium reveals potential diagnostic sequences. J. Clin. Microbiol. 2002;40:1303–1310.
51. Chia-wei Wu, et al. Whole-Genome Plasticity among Mycobacterium avium subspecies: insights from comparative genomic hybridizations. J. Bacteriol. 2006;188(2):711–723.
52. Arruda S, et al. Cloning of an M. tuberculosis DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science. 1993;261:1454–1457.
53. Casali N, et al. Invasion activity of a Mycobacterium tuberculosis peptide presented by the Escherichia coli AIDA autotransporter. Infect. Immun. 2002;70:6846–6852.

58. Adekambi T, Drancourt M. 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.* 2004;54:2095–2105.
59. Ellingson JL, et al. Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Mol. Cell. Probes.* 2000;14:153–161.
60. Bartos M, et al. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-f lanking region PCR with internal standards. *J. Microbiol. Methods.* 2006;64:333–345.
61. Collins DM, Cavaignac S, de Lisle GW. Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol. Cell. Probes.* 1997;11:373–380.
62. Kunze ZM, et al. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogen city in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 1991;5: 2265–2272.
63. Pavlik I, et al. Relationship between IS901 in *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000;7:212–217.
64. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62 (3):725–774.
65. Guerrero C, et al. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(2):304–307.
66. Devallois A, Rastogi N. Computer-assisted analysis of *Mycobacterium avium* fingerprints using insertion elements IS1245 and IS1311 in a Caribbean setting. *Res. Microbiol.* 1997; 148: 703–713.
67. Keller AP, et al. Evidence of the presence of IS1245 and IS1311 or closely related insertion elements in non-tuberculous mycobacteria outside of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:1869–1872.
68. Pestal-Caron M, Arbeit RD. Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (7):1859–1863.
69. Beggs ML, Stevanova R, Eisenach KD. Species identification of *Mycobacterium avium* complex isolates by a variety of molecular techniques. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:508–512.
70. Van Soolingen D, et al. IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:3051–3054.
71. Dvorska L, et al. A standardized restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. *J. Microbiol. Methods.* 2003;55:11–27.
72. Ritacco V, et al. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 1998;2:242–251.
73. Kunze ZM, et al. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 1991;5:2265–2272.
74. Pedrosa J, et al. Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) isolates in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 1994;98:210–216.
75. Pavlik I, et al. Relationship between IS901 in *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000;7:212–217.
76. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62(3):725–774.
77. Whittington R, et al. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *Paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cell. Probes.* 1998;12:349–358.
78. Johansen TB, et al. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited comparison of Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) method. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43 (5):2500–2502.
79. Inagaki T, et al. Comparison of a VariableNumber Tandem-Repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with *Mycobacterium* Interspersed Repetitive-Unit-VNTR and IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(7):2156–2164.
80. Thibault VC, et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(8):2404–2410.
81. Radomski N, et al. Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(4):1026–1034.
54. Choudhuri BS, et al. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drdA* and *drdB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* 2002;367:279–285.
55. Chimara E, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiology.* 2008;8:48.
56. McNabb A, et al. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(7):3000–3011.
57. Telenti A, et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31:175–178.
58. Adekambi T, Drancourt M. 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.* 2004;54:2095–2105.
59. Ellingson JL, et al. Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Mol. Cell. Probes.* 2000;14:153–161.
60. Bartos M, et al. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-f lanking region PCR with internal standards. *J. Microbiol. Methods.* 2006;64:333–345.
61. Collins DM, Cavaignac S, de Lisle GW. Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol. Cell. Probes.* 1997;11:373–380.
62. Kunze ZM, et al. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogen city in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 1991;5: 2265–2272.
63. Pavlik I, et al. Relationship between IS901 in *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000;7:212–217.
64. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62 (3):725–774.
65. Guerrero C, et al. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(2):304–307.
66. Devallois A, Rastogi N. Computer-assisted analysis of *Mycobacterium avium* fingerprints using insertion elements IS1245 and IS1311 in a Caribbean setting. *Res. Microbiol.* 1997; 148:703–713.
67. Keller AP, et al. Evidence of the presence of IS1245 and IS1311 or closely related insertion elements in non-tuberculous mycobacteria outside of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:1869–1872.
68. Pestal-Caron M, Arbeit RD. Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (7):1859–1863.
69. Beggs ML, Stevanova R, Eisenach KD. Species identification of *Mycobacterium avium* complex isolates by a variety of molecular techniques. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:508–512.
70. Van Soolingen D, et al. IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:3051–3054.
71. Dvorska L, et al. A standardized restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. *J. Microbiol. Methods.* 2003;55:11–27.
72. Ritacco V, et al. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 1998;2:242–251.
73. Kunze ZM, et al. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 1991;5:2265–2272.
74. Pedrosa J, et al. Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) isolates in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 1994;98:210–216.
75. Pavlik I, et al. Relationship between IS901 in *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000;7:212–217.
76. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62(3):725–774.
77. Whittington R, et al. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *Paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cell. Probes.* 1998;12:349–358.
78. Johansen TB, et al. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited comparison of Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) method. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43 (5):2500–2502.
79. Inagaki T, et al. Comparison of a VariableNumber Tandem-Repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with *Mycobacterium* Interspersed Repetitive-Unit-VNTR and IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(7):2156–2164.
80. Thibault VC, et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(8):2404–2410.
81. Radomski N, et al. Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(4):1026–1034.