А. І. Барбова, О. А. Журило, П. С. Трофімова, А. О. Чайка, С. В. Мирончeнко, А. О. Пустовалова, Л. В. Гайова

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ЩОДО ПРОВЕДЕННЯ БАКТЕРІОЛОГІЧНОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКОБАКТЕРІЙ

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
КРУ «Протитуберкульозний диспансер № 1», м. Сімферополь
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОВЕДЕНИЮ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ

А. И. Барбова, А. А. Журило, П. С. Трофимова, А. А. Чайка, С. В. Мирончeнко, А. А. Пустовалова, Л. В. Гаевая

Резюме

В настоящее время в Украине, наряду с уменьшением заболеваемости туберкулезом, наблюдается резкое увеличение количества заболеваний легких, связанных с воздействием потенциально патогенных нетуберкулезных микобактерий — возбудителей микобактериозов. Для идентификации микобактерий используются стандартные биохимические и культуральные тесты, основанные на фенотипических подходах диагностики туберкулеза. Недостатками этих тестов является трудоемкость и большая продолжительность периода исследования, а также необходимость использования только плотных питательных сред.

Цель работы — усовершенствование и стандартизация методов дифференцированного выявления микобактерий с учетом современных фенотипических подходов.

В результате проведенных исследований был предложен новый тест идентификации микобактерий — MGIT Tbc ID, который дает возможность в короткий срок провести идентификацию микобактерий туберкулезного и нетуберкулезного комплексов. Тест высокоспецифичен, поскольку основан на определении фракции MPT64 белка, который продуцирует клетка микобактерий туберкулезного комплекса в процессе культивирования. Тест MGIT Tbc ID более эффективный по сравнению с традиционными фенотипичными идентификационными тестами, которые используются для дифференциации микобактерий, поскольку выявляет специфическую фракцию белка, которую продуцируют микобактерии туберкулезного комплекса в процессе роста. Тест может быть использован вместо известных традиционных биохимических тестов идентификации в сети лабораторий противотуберкулезных учреждений для верификации диагноза «туберкулез».

Ключевые слова: тест идентификации микобактерий, микобактерии туберкулезного и нетуберкулезного комплексов, диагностика туберкулеза.

Укр. пульмонол. журнал. 2013, № 3, С. 28–32.

Барбова Анна Іванівна
ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
Старший науковий співробітник лабораторії мікробіології
Керівник центральної референт-лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України
Тел. 38 044 270-35-41, microbio@ifp.kiev.ua

MODERN APPROACHES TO THE BACTERIOLOGICAL IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA

A. I. Barbova, A. A. Zhurilo, P. S. Trofimova, A. A. Chaika, S. V. Mironchenko, A. A. Pustovalova, L. V. Gaevaya

Abstract

Currently in Ukraine along with a decreasing tuberculosis morbidity it is observed a growing number of pulmonary diseases, associated with potentially pathogenic non-tuberculosis mycobacteria. A standard phenotype-based biochemical and cultural methods are used for identification of mycobacteria. Those tests are time- and resource-consuming, requiring the use of only solid media.

The aim of the study was an improvement and standardization of methods of differential identification of mycobacteria considering modern phenotypical approaches.

The results led to a development of novel test for identification of mycobacteria — MGIT Tbc ID, which allowed quick identification of Mycobacterium tuberculosis and non-tuberculosis complex. The test is highly specific, because it is based on the determination of the protein fraction MPT64, produced by of Mycobacterium tuberculosis complex bacterial cells. Current test is more efficient than conventional phenotypic identification tests as it uses a specific protein fraction. The test can be used instead of conventional biochemical tests within tuberculosis laboratories network for verification of tuberculosis diagnosis.

Key words: test for the identification of mycobacteria, mycobacterium tuberculosis and non-tuberculosis complex, diagnosis of tuberculosis.

Ukr. Pulmonol. J. 2013; 3: 28–32.

Anna I. Barbova
National institute of phthisiology and pulmonology named after F. G. Yanovskyi NAMS of Ukraine
Laboratory of microbiology
Senior research assistant
Chief of reference-laboratory of tuberculosis micribiological diagnostics of Ministry of Health Care of Ukraine
Tel.: 38 044 270-35-41, microbio@ifp.kiev.ua

На сьогоднішній день поряд зі зниженням захворюваності на туберкульоз різко зросла питома вага захворювань легень, що пов'язані з потенційно-патогенними нетуберкульозними мікобактеріями (НТМБ), які є збудниками мікобактеріозів [1, 2].

Мікобактеріози є актуальною проблемою сучасної медицини, оскільки нині спостерігається зростання випадків захворювання серед населення всіх країн світу. Так, за останні 15 років кількість випадків мікобак-

© Барбова А. І., Журило О. А., Трофімова П. С., Чайка А. О., Мирончeнко С. В., Пустовалова А. О., Гайова Л. В., 2013

теріозів на 100 000 населення в США зросла в 1,7 разів, в Швейцарії — в 2,5 разів, у Великобританії — в 5,4 рази, в Японії — в 4,2 разів, в Австрії — в 5,3 разів, в Латвії — в 2 рази, в Росії — в 5,8 разів [3, 4].

Ріст випадків мікобактеріозів, з однієї сторони, пов'язаний зі збільшенням питомої ваги хворих на СНІД та ВІЛ-інфікованих, у яких частіше за все виникають такі захворювання (від 10 % до 53 %). Ризик розвитку мікобактеріозів також зростає у хворих з хронічними неспецифічними захворюваннями легень [4, 5].

З іншої сторони — більш ретельний підхід до проведення бактеріологічних досліджень та впровадження в практику сучасних надійних, стандартизованих та інформативних тестів ідентифікації, безумовно, дозволяє відокремити НТМБ від мікобактерій туберкульозного комплексу (МБТ), які є збудниками туберкульозу [6, 7].

Відомо, що до комплексу НТМБ відноситься більш, ніж 45 видів мікобактерій. Для клініки особливе значення мають наступні види НТМБ: M. kansasii, M. marinum, M. scrofulaceum, M. xenopi, M. avium, M. intracellulare, M. fortuitum [8].

Диференціація мікобактерій має особливе значення для своєчасного призначення ефективної терапії, а також для проведення епідеміологічного моніторингу щодо циркуляції окремих видів мікобактерій.

До останнього часу в мережі практичних бактеріологічних лабораторій України для ідентифікації мікобактерій використовувалися основні стандартні тести ідентифікації, які ґрунтуються на фенотипових підходах діагностики туберкульозу — біохімічні (ніациновий, нітратредуктазний, каталазний) та культуральні (середовища з саліциловокислим натрієм або паранітробензойною кислотою) [9, 10].

Перевагами цих тестів є низька вартість дослідження, можливість диференціювання мікобактерій туберкульозного комплексу (МБТ) від мікобактерій нетуберкульозного комплексу (НТМБ), отримання достовірних результатів для окремих НТМБ. Недоліками цих тестів є: трудомісткість та тривалість дослідження, можливість застосування тільки щільних живильних середовищ [9].

Тому нами були проведені дослідження щодо використання нового тесту для ідентифікації мікобактерій, який є швидким та дає можливість проводити диференціацію культур мікобактерій з рідкого або щільного живильного середовища.

Метою нашої роботи було удосконалення та стандартизація методів диференційної діагностики мікобактерій з урахуванням сучасних фенотипових підходів.

Тест BD MGIT TBc Identification Test (ідентифікаційний тест BD MGIT TBc) (TBc ID) являє собою експрес-метод хроматографічного імуноаналізу для якісного визначення антигену комплексу Mycobacterium tuberculosis (МБТ) в пробірках з позитивним результатом росту мікобактерій. Пристрій дозволяє виявляти такі види комплексу МБТ: M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum і M. microti, M. canetti, M. caprae. Загальний час дослідження складає 15 хвилин [11].

Цей тест є високоспецифічним, оскільки виявляє MPT64, фракцію білка мікобактерій, що виділяється з клітин мікобактерій туберкульозного комплексу в процесі культивування. При дослідженні зразків за допомогою пристрою для тестування антиген MPT64 зв'язується з антитілами до MPT64, що кон'юговані з видимими частками на тестовій смужці. Комплекс антиген-кон'югат переміщується по тестовій смужці в область реакції і захоплюється іншим специфічним антитілом до MPT64, нанесеним на мембрану. Якщо у зразку присутній антиген MPT64, спостерігається кольорова реакція мічених частинок колоїдного золота, яка проявляється у вигляді смуги від рожевого до червоного кольору [12]. Позитивний тест — комплекс МБТ (присутність антигену MPT64) — смуга від рожевого до червоного кольору з'являється в положенні тесту «Т» і в положенні контролю «С» у вікні зчитування. Це означає, що у зразку був виявлений антиген MPT64. Інтенсивність смуг С і Т може змінюватися. Навколишня поверхня повинна бути білою або світло-рожевою (Рис.1). Негативний тест — комплекс НТМБ (антиген MPT64 не виявлений) — відсутність смуги від рожевого до червоного кольору в положенні тесту «Т» у вікні зчитування. Це означає, що в зразку не був виявлений антиген MPT64. Смуга в положенні контролю «С» у вікні зчитування вказує на правильне виконання методики тестування. Навколишня поверхня повинна бути білою або світло-рожевою (Рис. 2) [12].

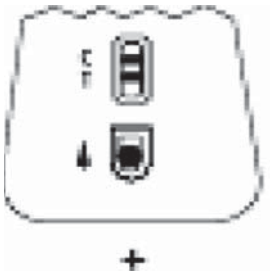

Рис. 1. Позитивний тест BD MGIT TBc

Рис. 2. Негативний тест BD MGIT TBc

Матеріали і методи

Було проведено ідентифікацію 516 культур мікобактерій, що були виділені з біологічного матеріалу від хворих на туберкульоз легень. Культури були виділені з проб мокротиння, які після передпосівної обробки засівали паралельно на 1 пробірку з рідким середовищем в апарат BACTEC 960 та на 1 пробірку зі щільним середовищем Левенштейна-Єнсена. Для підтвердження кислотостійкості виділених культур та наявності корд-фактору в позитивних пробірках з рідким середовищем був застосований метод світлової мікроскопії мазків, забарвлених за методом Ціля-Нільсена. Для перевірки наявності чи відсутності контамінації клінічних ізолятів супутньою мікрофлорою, був застосований метод посіву суспензій

виділених культур на 5,0 %-ий кров'яний агар. При дослідженні культур мікобактерій, що були виділені на щільному середовищі, враховували наявність пігменту колоній.

Для позитивних культур мікобактерій, що були виділені в рідкому живильному середовищі, ідентифікацію здійснювали лише за допомогою тесту MGIT TBc ID. Для позитивних культур, що виявили на щільному живильному середовищі, ідентифікацію здійснювали за допомогою тесту MGIT TBc ID, а також за допомогою традиційних біохімічних тестів (ніацинового і нітратредуктазного) та культуральних тестів з саліциловокислим натрієм. Оскільки ніациновий і нітратредуктазний тести засновані на виявленні ніацину та нітратредуктазної активності фермента у щільному живильному середовищі, на якому ростуть мікобактерії, а не в самих мікобактеріях, вони не застосовувалися для мікобактерій, що були виділені в рідкому живильному середовищі. Результати досліджень порівнювали.

Ніациновий тест — основний тест ідентифікації M. tuberculosis, оскільки ця мікобактерія синтезує у 10–20 разів ніацину більше, ніж нетуберкульозні мікобактерії. Для проведення тесту одержували водний екстракт, який отримували шляхом додавання в пробірку з 3–4 тижневою культурою мікобактерій, що виросла на щільному живильному середовищі, дистильованої води в кількості 1,0–1,5 мл і витримування пробірок у горизонтальному положенні 2–3 години у термостаті при 37 ^{0}C. 0,6 мл екстракту мікобактерій, що були внесені в пробірку, досліджували на наявність ніацину, шляхом занурення паперової смужки з роданистими сполуками калію. Наявність яскраво-жовтого забарвлення, що з'являлось на протязі 15 хвилин, свідчило про наявність ніацину. Дана методика дозволяє визначати концентрацію ніацину від 5,0 мкг/мл і вище [13].

Реакція відновлення нітратів дає можливість диференціювати M. tuberculosis, які мають нітратредуктазу, від M. bovis і M. avium та від деяких нетуберкульозних бактерій, у яких цей фермент відсутній. Це дозволяє використовувати даний тест у сполученні з ніациновим тестом для диференціальної діагностики M. tuberculosis та мікобактерій інших видів [14].

Принцип методу полягає у визначенні активності нітратредуктази за кількістю відновленого нітриту з нітрату, що супроводжується кольоровою реакцією з пара-диметиламінобензальдегідом.

Для тесту використовували 5,0 мл 3–4-тижневої культури, що виросла на щільному живильному середовищі, в концентрації 1,0 McF в 0,067 М фосфатному буфері з 0,1 % нітратом натрію культуру мікобактерій, після інкубації в термостаті при 37 ^{0}C 15–16 годин. Поява рожевого, темно-рожевого чи фіолетового забарвлення при введенні нітрит-реагенту, який адсорбовано на стрипі, свідчило про присутність нітриту в середовищі [15].

Для культуральної ідентифікації мікобактерій застосовували тести з саліциловокислим натрієм, який при додаванні до щільного живильного середовища в концентрації 0,5 мг/мл інгібує ріст мікобактерій туберкульозного комплексу [13, 15].

Для внутрішнього контролю якості досліджень використовували референс-штам M. tuberculosis H_{37}Rv.

Робота виконана за кошти державного бюджету.

Результати та їх обговорення

Відомо, що при мікроскопії культур, які виділені в рідкому живильному середовищі, від хворих до початку лікування, мікобактерії туберкульозу розташовуються у вигляді «кіс», тобто утворюють «корд-фактор» що є їх диференціальною ознакою [13]. Культури мікобактерій туберкульозу, що виділяються від хворих в процесі лікування, а також мікобактерії нетуберкульозного комплексу, що виростають в рідкому живильному середовищі, при мікроскопії позитивної культури, розташовуються окремо.

При бактеріоскопічному дослідженні 516 культур, що дали ріст в рідкому живильному середовищі в апараті BACTEC 960, всі культури виявилися кислотостійкими бактеріями, «корд-фактор» був виявлений в 412 випадках, 114 культури не створювали «корд-фактору», при цьому, кислотостійкі бактерії були розташовані окремо в полі зору. В подальшому була проведена ідентифікація виділених культур за допомогою MGIT TBc ID. Тест визначив 492 культури як МТБ-комплекс і 24 культури як НТМБ. Результати досліджень представлені в табл. 1.

З табл. 1 видно, що всі мікобактерії, що утворювали «корд-фактор» дали позитивний результат ідентифікаційного тесту, тому можна їх віднести до мікобактерій туберкульозного комплексу. Їх кількість складає 79,8 %. За нашими даними 24 (4,7 %) культури мали негативний результат ідентифікаційного тесту і не створювали «корд-фактор», тому їх можна віднести до комплексу НТМБ. При проведенні аналізу результатів ідентифікації 80 культур мікобактерій, що не створювали «корд-фактор» і були позитивними за результатами MGIT TBc ID-тесту, було виявлено, що ці штами були виділені від хворих в процесі лікування, тому вони втратили свої здібності щодо створення «корд-фактору», але ж мають в наявності MPT64 фракцію білка і тому належать до мікобактерій туберкульозного комплексу.

Таблиця 1

Результати ідентифікації мікобактерій, виділених з рідкого живильного середовища методами бактеріоскопії та MGIT TBc ID (M ± m) %

Методи	Кількість штамів мікобактерій	
	абс.	%
Бактеріоскопія «корд-фактор» «+» MGIT TBc ID «+»	412	79,8 ± 1,3
Бактеріоскопія «корд-фактор» «–» MGIT TBc ID «+»	80	15,5 ± 1,2
Бактеріоскопія «корд-фактор» «+» MGIT TBc ID «–»	0	0
Бактеріоскопія «корд-фактор» «–» MGIT TBc ID «–»	24	4,7 ± 0,6
Всього	516	100

Примітки: «+» — позитивний результат; «–» — негативний результат.

Результати проведення ідентифікації культур мікобактерій, що були виділені на щільному живильному середовищі класичними методами представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Порівняльне вивчення результатів ідентифікації мікобактерій, виділених на щільному середовищі за допомогою ніацинового тесту, редукції нітратів, тесту з саліциловокислим натрієм та MGIT TBc ID (M ± m) %

Тести	Кількість штамів					
	Позитивних		негативних		всього	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Ніациновий	469	90,8 ± 1,2*	37	9,2 ± 1,2	516	100
Редукція нітратів	447	86,6 ± 1,4*	54	13,4 ± 1,4	516	100
Ріст на середовищі з саліциловокислим натрієм 0,5 мг/мл і 1,0 мг/мл	20	3,9 ± 0,7*	502	96,1±0,7	516	100
MGIT TBc ID	492	95,3 ± 0,9	24	4,7±0,9	516	100

Примітка: * — p < 0,01 при порівнянні результатів ніацинового тесту і MGIT TBc ID, тесту редукції нітратів і MGIT TBc ID, тесту з саліциловокислим натрієм і MGIT TBc ID.

Як видно з даних табл. 2, за результатами ніацинового тесту, 469 культур (90,8 %) із 516 синтезували ніацин. При цьому 37 культур (9,2 %) були ніациннегативними.

При проведенні тесту на редукцію нітратів варто пам'ятати, що цей тест є основним для визначення НТМБ — M. kansasii і особливо M. szulgai, тобто M. kansasii (I група за Runyon), M. fortuitum, а також всі мікобактерії IV групи (швидкоростучі) у більшості випадків дають позитивний тест редукції нітратів.

Таким чином, за допомогою ніацинового тесту і редукції нітратів можна з великою впевненістю припустити, що штами мікобактерій з позитивними результатами обох тестів являються M. tuberculosis і навпаки, мікобактерії з негативними результатами обох тестів не відносяться до МБТ [13].

Як видно з табл. 2, загальна кількість нітрат-позитивних штамів мікобактерій із кількості 516 досліджених склала 447 штамів (86,6 %). Позитивні результати ніацинового і нітратредуктазного тестів співпадали у 86,6 % випадків. Штами з такими результатами були віднесені до M. tuberculosis. Негативний результат тесту редукції нітратів, при позитивному результаті ніацинового тесту може бути пов'язаний з тим, що нітрат міг перетворитися в нітрит, а той в свою чергу — в закис азоту чи просто азот, що не дало кольорової реакції на нітрит-реагент, але сам штам являється — позитивним [15].

Подальша ідентифікація штамів мікобактерій показала, що на середовищі з 0,5 мг/мл і 1,0 мг/мл саліциловокислого натрію дали ріст 20 штамів МБТ (3,9 %), тому вони були віднесені до нетуберкульозних мікобактерій. Використання середовища з саліциловокислим натрієм у двох розведеннях — 0,5 мг/мл і 1,0 мг/мл, є необхідним для запобігання діагностичних помилок. Використання двох концентрацій ускладнює роботу, тобто використання більшої концентрації робить результат менш достовірним при наявності стійкості до меншої концентрації [15].

Таким чином, з використанням традиційних тестів, заснованих на фенотиповій ідентифікації культур мікобактерій, що були виділені на щільному живильному середовищі від хворих з клінічними симптомами туберкульозу, 86,6 % штамів були віднесені до мікобактерій туберкульозного комплексу. Додаткові позитивні результати ніацинового тесту для 22 штамів мікобактерій дозволили з високою долею вірогідності стверджувати, що дані культури є мікобактеріями туберкульозу, тобто відносяться до МБТ-комплексу.

На сьогоднішній день, під впливом різних факторів, мікобактерії змінюють свої біологічні властивості. Тому, незважаючи на те, що визначення ніацину є основним тестом для диференціації мікобактерій туберкульозного комплексу, спостерігаються випадки (2,0–4,0 %), коли ніациновий тест є негативним у туберкульозних мікобактерій, а серед ізоніазидрезистентних штамів їх кількість досягає 7,2 % [16]. В останній час цей тест не завжди може допомогти у складних випадках диференціальної діагностики і важливим є застосування інших тестів, які у співвідношенні могли б дати чітку відповідь про належність мікобактерій до туберкульозного комплексу [15].

При ідентифікації культур мікобактерій за допомогою MGIT TBc ID було виявило 492 (95,3 %) позитивних результати. Це означає, що клітина мікобактерій в процесі культивування продукує білок, MPT64 фракція якого є загальним антигеном для мікобактерій туберкульозного комплексу, і виявляється у високоспецифічному тесті MGIT TBc ID [12]. Тому можна стверджувати, що в результаті проведених досліджень даний тест дозволив додатково виявити 47 (8,7 %) штамів мікобактерій туберкульозного комплексу в порівнянні з аналогічним показником при використанні традиційних тестів ідентифікації мікобактерій та 23 (4,5 %) штами комплексу МБТ в порівнянні з найбільш інформативним ніациновим тестом.

В подальшому нами було проведено порівняльний аналіз результатів ідентифікації штамів мікобактерій, що були виділені в рідкому та щільному живильних середовищах за допомогою MGIT TBc ID-тесту. Результати досліджень наведені в табл. 3.

Таблиця 3

Зведені дані ефективності тесту MGIT TBc ID за результатами ідентифікації культур мікобактерій, що були виділені з рідкого живильного середовища та на щільному живильному середовищі (M ± m) %

Результати тесту MGIT TBc ID	Кількість штамів, що були виділені					
	з рідкого середовища		на щільному середовищі		всього	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Позитивний «+»	492	95,3±0,9	492	95,3±0,9	516	100
Негативний «–»	24	4,7±0,9	24	4,7±0,9	516	100

Як свідчать дані табл. 3, при проведенні ідентифікації культур мікобактерій, що були виділені з проб клінічного матеріалу хворих з симптомами туберкульозу при одночасному їх посіві в рідке та на щільне живильне середовище, з використанням тесту MGIT TBc ID, показало повне співпадіння позитивних і негативних результатів.

Тобто, якщо в рідкому середовищі була виділена культура мікобактерій, що давала позитивний результат тесту MGIT TBc ID, культура мікобактерій, що була виділена на щільному середовищі з того ж зразку матеріалу при дослідженні колоній давала також позитивній результат даного тесту.

Висновки

Тест MGIT TBc ID дає можливість в короткий термін провести ідентифікацію мікобактерій туберкульозного і нетуберкульозного комплексів, що виділені як у рідкому, так і на щільному живильному середовищі, що дозволяє встановити правильний діагноз пацієнтам з клінічними ознаками туберкульозу і призначити ефективне лікування.

Тест MGIT TBc ID є більш ефективним в порівнянні з традиційними фенотиповими ідентифікаційними тестами, що використовуються для диференціації мікобактерій, оскільки виявляє специфічну фракцію білку, що продукують мікобактерії туберкульозного комплексу в процесі культивування і росту. Тому може бути використаний замість відомих традиційних біохімічних тестів ідентифікації.

Таким чином, сучасний тест MGIT TBc ID є стандартизованим, високочутливим і високоспецифічним і може бути використаним для швидкої фенотипової діагностики туберкульозу і мікобактеріозів.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kirschner, R. A.* Epidemiology of infection by nontuberculosis mycobacteria [Text] / R. A. Kirschner, B. S. Parkes, J. O. Falkinham // Amer. Rev. Resp. Dis. — 2007. — Vol. 145, № 2. — P. 271–276.
2. *Оттен, Т. Ф.* Микобактериоз [Текст] / Т. Ф. Оттен, А. В. Васильев. — Санкт-Петербург. : Мед. пресса, 2005. — 218 с.
3. *Wolinsky, E.* Mycobacterial diseases other than tuberculosis [Text] / E. Wolinsky // Clin. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 17. — P. 21–27.
4. *Griffith, D. E.* Nontuberculous mycobacteria [Text] / D. E. Griffith // Curr. Opin. Pulm. Med. — 2007. — Vol. 6, № 5. — P. 139–145.
5. *Hawkins, C. C.* Mycobacterium avium complex infections in patients with the acquired immunodeficiency sindrom [Text] / C. C. Hawkins, Y. W. Gold // Ann. Intern. Med. — 2006. — Vol. 2, № 5. — P. 189–193.
6. *Нетуберкулезные* микобактерии как возбудители заболеваний человека [Текст] / Т. Ф. Оттен // Сборник научных трудов. — Санкт-Петербург, 2004. — С. 24–28.
7. *Jenkins, P. A.* Nontuberculosis micobacteria and disease [Text] / P. A. Jenkins // Europ. J. Resp. Dis. — 2004. — Vol. 62. — P. 69–71.
8. *Видовая* принадлежность микобактерий [Текст] / Н. П. Овдиенко [и др.] // Сборник научных трудов. — Санкт-Петербург, 1996. — С. 46–48.
9. *Shinnick, T. M.* Diagnostic mycobacteriology laboratory practices [Text] / T. M. Shinnick, R. S. Good // Clin. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 20. — P. 291–299.
10. *Бактериологическая* и биохимическая идентификация микобактерий [Текст] : методические рекомендации / Т. Ф. Оттен. — Санкт-Петербург, 2001. — 20 с.
11. *Global* Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing [Text] / World Health Organization // WHO Report. — 2008. — 320 p.
12. *Hirano, K.* Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative Mycobacterium tuberculosis isolates [Text] / K. Hirano, A. Aono, M. Takahashi // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 42. — P. 390–392.
13. *Інструкція* з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції [Текст] / Ю. І. Фещенко, О. А. Журило, А. І. Барбова // Наказ МОЗ України № 45. — К., 2002. — 118 с.
14. *Оттен, Т. Ф.* Клинико-бактериологические критерии диагностики микобактериоза легких [Текст] / Т. Ф. Оттен // БЦЖ о туберкулезе. — 1999. — № 3. — С. 16–19.
15. *Журило, О. А.* Визначення основних тестів ідентифікації мікобактерій [Текст] / О. А. Журило, А. І. Барбова, С. В. Мироненко // Укр. пульмонол. журнал. — 2009. — № 3. — С. 20–23.
16. *Niacin-negative* Mycobacterium tuberculosis isolated from pations with AIDS [Text] / N. Irving [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 30, № 5. — P. 1344–1346.

REFERENCES

1. Kirschner RA, Parkes BS, Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculosis mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis. 2007;145(2):271–276.
2. Otten TF, Vasilyev AV. *Mikobakterioz* (Mycobacteriosis). Sankt-Peterburg : Med.pressa, 2005. 218 p.
3. Wolinsky E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. Clin. Infect. Dis. 2009;17:21–27.
4. Griffith DE. Nontuberculous mycobacteria. Curr. Opin. Pulm. Med. 2007;6(5):139–145.
5. Hawkins CC, Gold YW. Mycobacterium avium complex infections in patients with the acquired immunodeficiency sindrom. Ann. Intern. Med. 2006;2(5)189–193.
6. Otten TF. *Netuberkuleznyye mikobakterii kak vozbuditeli zabolevaniy cheloveka* (Non-tuberculous mycobacteria as human pathogens). *Sbornik nauchnykh trudov*. Sankt-Peterburg, 2004:24–28.
7. Jenkins PA. Nontuberculosis micobacteria and disease. Europ. J. Resp. Dis. 2004;62:69–71.
8. Ovdiyenko NP, et al. *Vidovaya prinadlezhnost mikobakteriy* (Mycobacterial species belonging). *Sbornik nauchnykh trudov*. Sankt-Peterburg, 1996:46–48.
9. Shinnick TM, Good RS. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. Clin. Infect. Dis. 2005;20:291–299.
10. Otten TF. *Bakteriologicheskaya i biokhimicheskaya identifikatsiya mikobakteriy : metodicheskiye rekomendatsii* (Bacteriological and biochemical identification of mycobacteria : guidelines). Sankt-Peterburg, 2001. 20 p.
11. World Health Organization. Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing. WHO Report. 2008. 320 p.
12. Hirano K, Aono A, Takahashi M. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative Mycobacterium tuberculosis isolates. J. Clin. Microbiol. 2006;42:390–392.
13. Feshchenko YuI, Zhurylo OA, Barbova AI. *Instruktsiya z bakteriologichnoyi diagnostyky tuberkuloznoyi infektsiyi* (Instructions bacteriological diagnosis of tuberculosis infection). *Nakaz MOZ Ukrayiny № 45.* Order № 45 of Ministry of Health of Ukraine. Kyiv, 2002. 118 p.
14. Otten TF. *Kliniko-bakteriologicheskiye kriterii diagnostiki mikobakteriosa legkikh* (Clinical and bacteriological criteria for diagnosing pulmonary mycobacteriosis). *BTSZH o tuberkuleze*. 1999:No 3:16–19.
15. Zhurylo OA, Barbova AI, Myronchenko SV. *Vyznachennya osnovnykh testiv identyfikatsiyi mikobakteriy* (Determination of the main tests of identification of mycobacteria). *Ukr. Pulmonol. Zhurnal*. 2009;No 3: 20–23.
16. Irving N, et al. Niacin-negative Mycobacterium tuberculosis isolated from pations with AIDS. J. Clin. Microbiol. 2001;30(5):1344–1346.