

УДК 616-002.5-076.5-036.22

В. В. Николаевский, канд. биол. наук,  
Ю. И. Бажора, д-р мед. наук

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ МИКОБАКТЕРИЙ

Одесский государственный медицинский университет

### Введение

Актуальность глубокого изучения возбудителей туберкулеза человека — *Mycobacterium tuberculosis* — с целью разработки новых способов борьбы с этим заболеванием в настоящее время не вызывает сомнений. К сожалению, эпидемическая ситуация с туберкулезом в нашей стране, как и в некоторых других странах мира, с каждым годом ухудшается. По ряду оценок, даже при относительно благоприятных условиях в последующие 10–15 лет в мире будет наблюдаться рост заболеваемости туберкулезом, при этом «белая смерть» может унести до 30 млн жизней [1]. Ежегодно в мире регистрируется более 7 млн новых случаев заболевания, из которых свыше 300 тыс. вызваны первично устойчивыми, по меньшей мере, к одному из препаратов микобактериями, что значительно снижает эффективность терапии [2; 3].

В Украине в последние годы отмечен неуклонный рост заболеваемости туберкулезом [4; 5]. В 2002 г. показатели заболеваемости (количество новых случаев) и распространенности (общее количество больных туберкулезом) составили соответственно 75,6 и 287,4 на 100 тыс. населения, что на 10,2 и 15,0 % выше про-

шлогодних показателей [4]. Во многих областях нашей страны (Херсонской, Николаевской и др.) заболеваемость и распространенность туберкулеза превышают среднеукраинские показатели в 1,1–1,5 раза и более.

Не останавливаясь в данном обзоре на причинах такого положения, которые достаточно хорошо изучены и описаны во многих публикациях [3; 5–8 и др.], следует отметить, что несовершенство методов диагностики туберкулеза и микобактериозов вообще и лабораторной диагностики в частности играет в создавшемся положении далеко не последнюю роль.

В настоящее время основная роль в лабораторной диагностике туберкулеза практически во всех странах мира принадлежит микроскопическим и бактериологическим методам. Однако в последнее время все большее значение приобретают молекулярно-биологические методы диагностики, основанные на выявлении и изучении специфических участков ДНК микобактерий, отвечающих за те или иные свойства микроорганизма. Сейчас они занимают все более важное, нередко основное место в общей стратегии лабораторных исследований при туберкулезе [9].

Нами уже были освещены вопросы применения молекулярно-генетических методов для диагностики лекарственной устойчивости микобактерий [10]. В данной работе авторы попытались осветить важнейшие и наиболее перспективные, на наш взгляд, направления применения молекулярно-генетических методов с целью идентификации и типирования микобактерий.

### Генотипирование: задачи и методы

Генотипирование микобактерий имеет огромные перспективы в диагностике, лечении и эпидемиологии туберкулеза. Методы генотипирования позволяют выявить различия и сходства между штаммами *M. tuberculosis* и других видов микобактерий на уровне генома, сгруппировать и классифицировать исследуемые образцы по ряду критериев. В последующем проводится поиск корреляций между характером генотипа и особенностями течения заболевания, чувствительностью к препаратам, а также путями распространения тех или иных штаммов микобактерий, выявление эпидемических цепей, мониторинг динамики распространения заболевания [11].

Как правило, современные молекулярные методы типирования

рования организмов, в том числе бактерий, основаны на анализе количества и расположения в геноме так называемых высококонсервативных повторяющихся последовательностей различных типов с помощью ряда гибридизационных и (или) ПЦР-методов. Эти последовательности являются некодирующими и расположены в спейсерных участках между генами. В качестве примеров такого рода участков генома можно назвать микро- и минисателлитные повторы, повторяющиеся единицы которых состоят из 3–4 либо 5–20 и более пар нуклеотидов соответственно. Все методы молекулярного генотипи-

рования микобактерий можно разделить на две основные группы: основанные на «классических» молекулярно-генетических технологиях блоттинга и гибридизации, а также на использовании ПЦР.

### Гибридизационные технологии без использования ПЦР

Наиболее разработанным и широко распространенным представителем данной группы методов является метод полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) [12–14] (рис. 1). При этом ДНК микобактерий подвергается рестрикции с использованием определенных рестрицион-

ных эндонуклеаз, полученные фрагменты денатурируются (для разделения цепей ДНК), методом блоттинга по Саузерну переносятся на нитроцеллюлозную либо нейлоновую мембрану и гибридизуются с ДНК-зондом, содержащим одну из повторяющихся высокополиморфных последовательностей. Зонд в своем составе имеет метку (в настоящее время, как правило, используются нерадиоактивные системы мечения на основе биотина или дигоксигенина), что позволяет в дальнейшем визуализировать результаты гибридизации путем автордиографии на рентгеновской пленке. Результатом реакции является

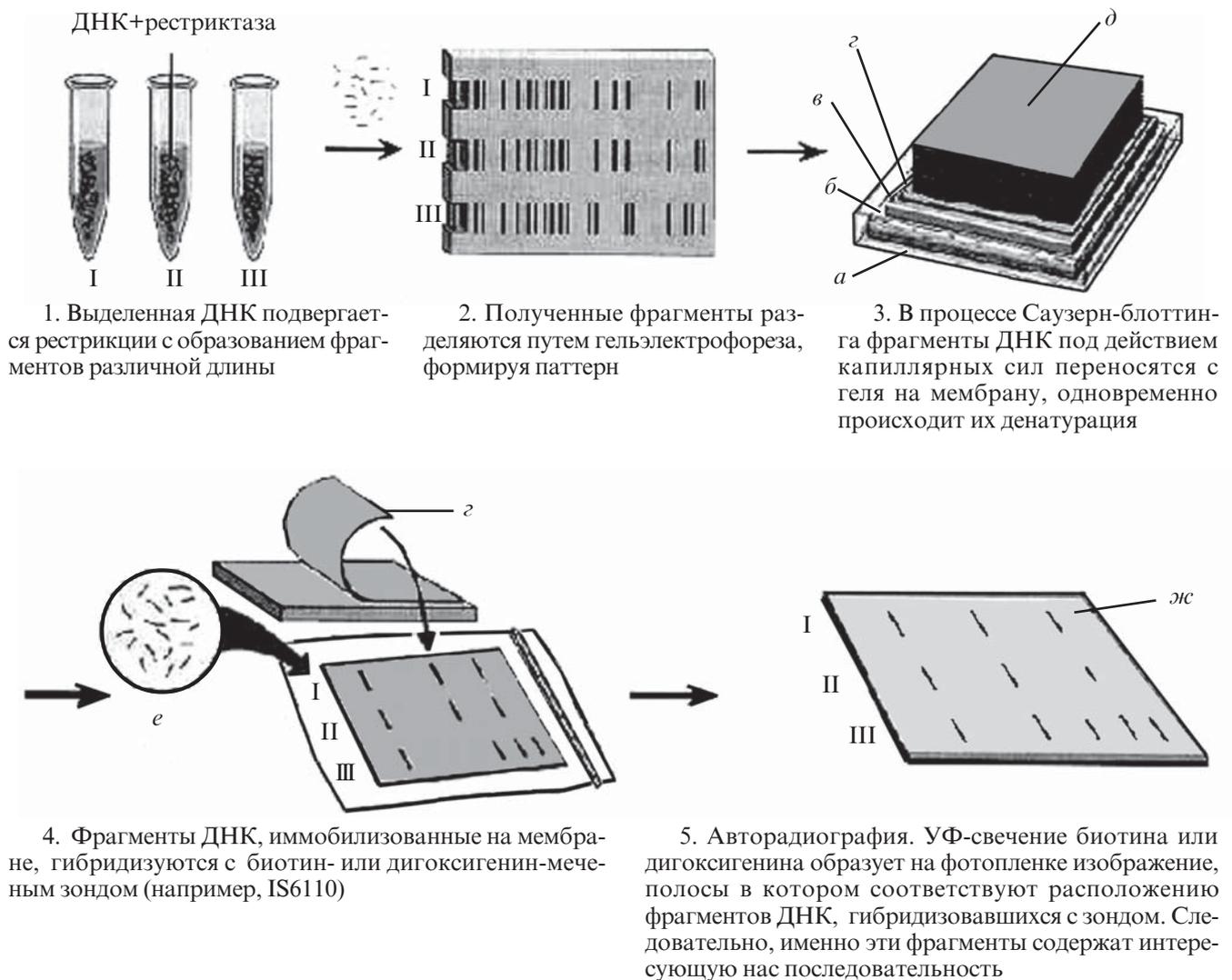


Рис. 1. Основные этапы генотипирования микроорганизмов методом полиморфизма длины рестриционных фрагментов (1–4): а — щелочной раствор; б — пористый материал; в — агарозный гель; г — мембрана; д — слой фильтровальной бумаги; е — ДНК-зонд, меченный биотином; ж — фотопленка

паттерн, или последовательность полос, отвечающих фрагментам ДНК различной молекулярной массы.

«Золотым» международным стандартом ПДРФ является использование в качестве зонда инсерционной (вставочной) последовательности IS6110, характерной именно для *M. tuberculosis* и встречающейся в геноме в количестве от нескольких до 25 повторов. Использование стандартизированных методик рестрикции и гибридизации позволяет получить на рентгеновской пленке уникальные для штамма или группы штаммов гибридизационные картины, различающиеся по количеству и молекулярной массе фрагментов [15], что определяет принадлежность ПДРФ к группе методов геномного фингерпринтинга. Анализ и сравнение полученных профилей осуществляются в настоящее время с помощью специализированных компьютерных программ “Gel-Compare”, “BioNumerics” (Applied Maths, Belgium) или других, позволяющих определить молекулярный вес фрагментов, сходства и различия профилей и выполнить их кластеризацию с последующим построением дендрограмм с вычислением генетических дистанций.

С помощью ПДРФ с использованием зонда IS6110 получены важнейшие данные о путях распространения полирезистентных микобактерий в США [16], Нидерландах и многих других странах мира, а также выявлены уровни активной трансмиссии туберкулеза в Великобритании [17] и ряде других стран. В последнее время активно ведутся исследования по молекулярной эпидемиологии с применением ПДРФ и других методов генотипирования в нескольких регионах России [14; 18; 19]. Штаммы, циркулирующие на территории Украины, в настоящее время практически неис-

следованы с позиций молекулярной эпидемиологии.

Несмотря на большие возможности ПДРФ, в ряде работ отмечают и существенные недостатки этого метода. Чисто технически он, как и другие методы «классического молекулярного клонирования», не основанные на применении ПЦР, гораздо более требователен к оснащению лаборатории, а также количеству ДНК и качеству ее очистки, более трудоемок и требует значительных затрат времени [20]. Кроме того, информативность метода значительно снижается при исследовании низкокопийных (содержащих от 1 до 4 последовательностей) по IS6110 штаммов, доля которых составляет 10–20 % [17]. Выявляемая при этом степень полиморфизма является недостаточной для анализа.

#### ПЦР-технологии

При использовании ПЦР для исследования достаточно минимальных количеств ДНК в виде клеточных лизатов микобактерий, что резко сокращает затраты труда, времени и материалов для анализа. Особого внимания среди основанных на ПЦР методов генотипирования по информативности, простоте и высокой степени выявляемого полиморфизма заслуживают методы типирования по числу переменных тандемных повторов (VNTR-локусов), случайно амплифицирующихся последовательностей (RAPD), двойных повторяющихся элементов (DRE-PCR) и спוליготипирования.

Генотипирование на основе DRE-PCR в значительной мере сходно с ПДРФ, при этом в качестве мишеней для гибридизации используются богатые ГЦ основаниями участки генома микобактерий. В ряде работ данный метод предложен в качестве альтернативы ПДРФ [21], однако, по мнению других авторов, он все же об-

ладает меньшей разрешающей способностью [22].

**VNTR-генотипирование.** В последнее время одним из наиболее широко применяемых подходов к генотипированию организмов (не только бактерий) является использование в качестве маркерных локусов мини- и микросателлитных участков генома организмов. Данные методы являются универсальными — достаточно сказать, что аналогичные методы геномного фингерпринтинга используются для идентификации личности в судебной медицине [23; 24]. Одним из широко используемых методов этой группы является VNTR-типирование (Variable Number Tandem Repeats), то есть выявление полиморфизма по числу тандемных повторов в геноме микроорганизмов.

До недавнего времени для типирования микобактерий применялись системы, основанные на полиморфизме пяти минисателлитных локусов ETR A — ETR F. Для каждого локуса использовалась индивидуальная пара праймеров, при этом молекулярная масса продуктов амплификации свидетельствовала о количестве повторов минисателлитной последовательности. Регистрация результатов проводилась путем электрофореза и последующей фото- либо видеосъемки. В многочисленных исследованиях, посвященных сравнительной информативности вышеперечисленных подходов, отмечается высокая диагностическая ценность, стабильная повторяемость и простота выполнения VNTR-генотипирования, что позволило рекомендовать его в качестве параллельного взаимодополняющего ПДРФ метода выявления полиморфизма микобактерий [12; 20; 25; 26].

В самое последнее время (2001–2003 гг.) предложены усовершенствования VNTR с использованием 24 локусов MIRU (*Mycobacterium inter-*

spersed repetitive units, повторяющихся элементов, «рассеянных» в геноме микобактерий) вместо пяти локусов VNTR [27; 28]. Трудоемкую систему фоторегистрации результатов 24 отдельных электрофорезов предложено заменить автоматизированным учетом размеров амплифицированных фрагментов с применением автоматических секвенаторов генов [29] либо использовать мультиплексную ПЦР. Первые исследования показывают, что MIRU-VNTR по воспроизводимости и степени дифференциации геномов может сравниться с ПДРФ и даже превзойти ее [29; 30].

**RAPD-генотипирование.** В числе достаточно простых методов генотипирования, не требующих гибридизации, можно назвать также RAPD и RAPET. В качестве праймеров при этом используются олигонуклеотиды, связывающиеся с эмпирически подобранными участками генома (RAPD) либо локусами, содержащими последовательности IS6110 (RAPET). Метод RAPD, позволяющий выявить геномный полиморфизм различных групп микроорганизмов, с успехом использовался рядом исследователей, в том числе и в нашей лаборатории, для изучения внутри- и межвидовых различий микобактерий. Нами была показана удовлетворительная воспроизводимость результатов при дифференциации и идентификации ряда видов атипичных микобактерий [31]. Достаточно высокой надежностью, экспрессностью и простотой исполнения отличается метод RAPET, в котором продукты амплификации для максимального выявления полиморфизма подвергаются дополнительной рестрикции [32].

Широкие возможности, предоставляемые методами ПДРФ, RAPD, RAPET и рядом других в молекулярно-эпидемиологических исследованиях, не-

сколько ограничиваются определенной субъективностью при учете результатов даже при использовании программ сканирования профилей с последующей компьютерной обработкой. В силу этих и иных обстоятельств они не полностью применимы для исследования клинических образцов и культур с целью идентификации видов микобактерий [33]. От многих из этих недостатков свободен метод сполиготипирования, впервые предложенный Kamerbeek et al. [34].

**Сполиготипирование** (спейсер-олигонуклеотидное типирование) основано на детекции наличия и количества спейсеров в так называемом DR-регионе, или регионе прямых повторов микобактериальной хромосомы (рис. 2). Было обнаружено, что в данном участке генома микобактерий комплекса *M. tuberculosis* имеется последовательность повторяющихся элементов (прямых повторов), разделенных спейсерными участками. Важной особенностью, которая и была использована при разработке метода сполиготипирования, является то, что порядок расположения спейсеров одинаков для всех штаммов, при этом, однако, ряд спейсеров может отсутствовать. Всего у микобактерий было обнаружено 43 типа спейсеров, из которых 37 являются характерными для дикого штамма *M. tuberculosis*, а еще 6 дополнительно характеризуют *M. bovis* BCG. Полиморфизм, регистрируемый при сполиготипировании, отражает наличие или отсутствие определенных типов спейсеров в DR-регионе микобактерий (см. рис. 2, а).

Сполиготипирование осуществляется путем амплификации всего DR-региона микобактериальной хромосомы с последующей гибридизацией продуктов амплификации с олигонуклеотидными пробами 43 спейсеров, иммобилизован-

ными на мембране (см. рис. 2, б). Амплификация DR-региона выполняется с помощью биотин-меченых праймеров, что позволяет получить меченые биотином продукты амплификации и в дальнейшем визуализировать результаты гибридизации. При этом с высокой степенью точности определяется наличие тех или иных спейсеров у исследуемого штамма. Таким образом, метод позволяет эффективно и с высокой достоверностью дифференцировать человеческий и бычий виды туберкулеза, а также выявить сходства и различия исследуемых штаммов с целью проведения эпидемиологических исследований.

Как указывают многие авторы [19; 20; 25; 34], результаты сполиготипирования уточняют и дополняют данные, полученные при помощи других методов, что позволяет рекомендовать его в качестве необходимого при проведении молекулярно-эпидемиологических исследований. С помощью сполиготипирования выявлены особенности эпидемиологии и географические пути распространения штаммов *M. tuberculosis* в США, Великобритании, многих странах Европы, ряде областей России [19; 34]. Интересно отметить, что с помощью сполиготипирования в совокупности с другими методами ДНК-диагностики была доказана принадлежность ДНК, выделенной из средневековых костных останков человека, к виду *M. tuberculosis*, и проведен ее генетический анализ [35]. Немаловажным преимуществом сполиготипирования является адаптация к нему существующих мощных компьютерных программ генетического анализа (вышеупомянутые "GelCompare" и "BioNumerics", Applied Maths, Belgium). В настоящее время разработана универсальная международная методология сполиготипирования и создаются всемирные базы дан-

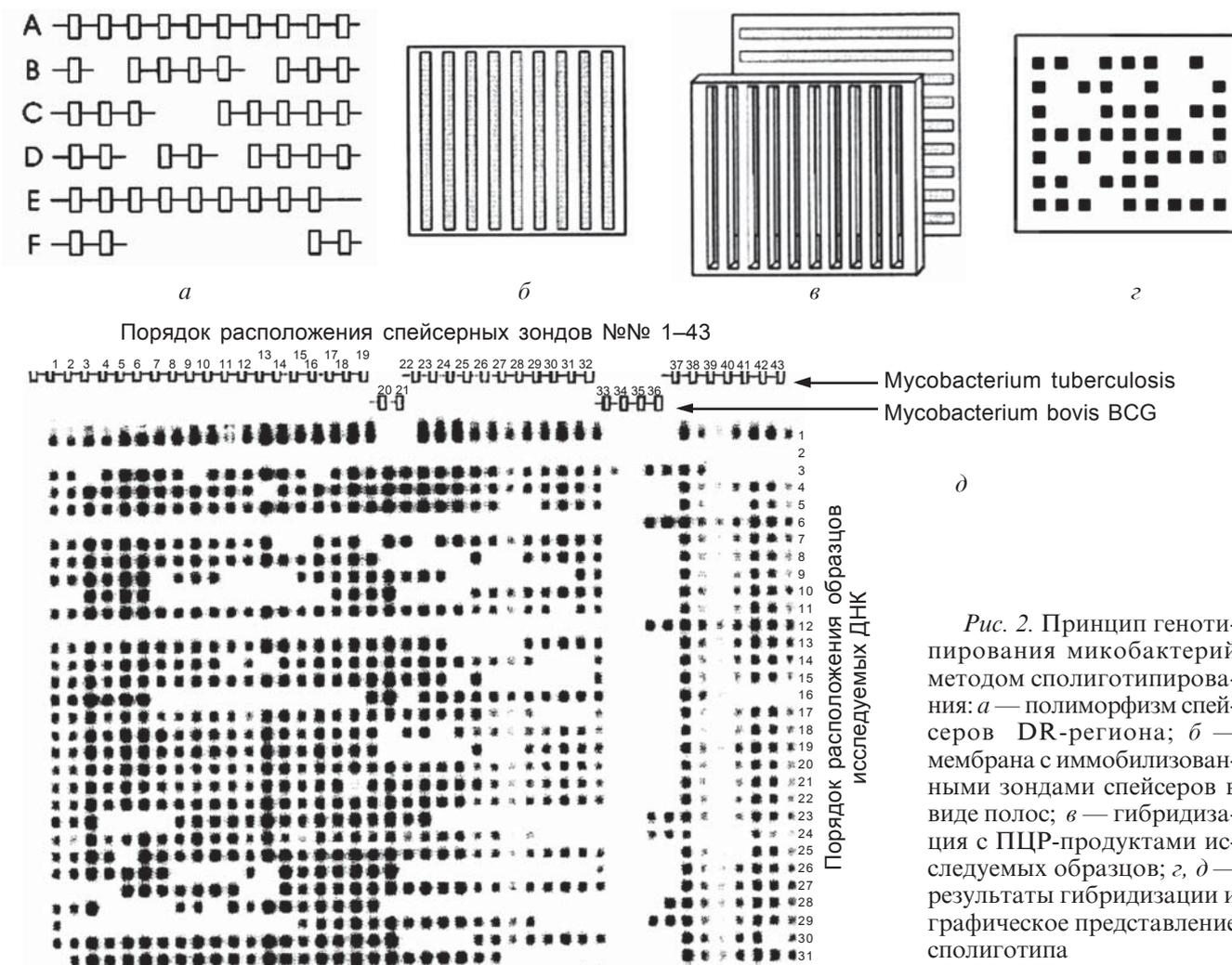


Рис. 2. Принцип генотипирования микобактерий методом сполиготипирования: а — полиморфизм спейсеров DR-региона; б — мембрана с иммобилизованными зондами спейсеров в виде полос; в — гибридизация с ПЦР-продуктами исследуемых образцов; г, д — результаты гибридизации и графическое представление сполиготипа

ных сполиготипов микобактерий [36; 37].

Особенно эффективным является применение сполиготипирования для выявления циркуляции определенных семейств штаммов, например *Beijing*, для которых была показана ассоциированность с высокими уровнями лекарственной устойчивости. В ряде регионов России распространенность штаммов семейства *Beijing* (Самарская, Ленинградская, Архангельская области) составляет более 60 % [19; 34; 37].

Нами проведены исследования распространенности штаммов семейства *Beijing* в Одесской и Николаевской областях Украины в 2003 г. Среди культур, выделенных от больных в Николаевской области, типичный профиль семейства *Beijing* был зарегистрирован у 17,5 %

штаммов. В Одесской области доля штаммов семейства *Beijing* значительно больше и составляет, по нашим данным, 39,6 %, что, тем не менее, значительно ниже показателей, приведенных для России. По нашему мнению, сполиготипирование, благодаря высокой эффективности и относительной простоте выполнения, является одной из важнейших составных частей комплекса молекулярно-эпидемиологических исследований штаммов микобактерий, циркулирующих на территории нашей страны.

#### Выводы

1. Международным «золотым стандартом» генотипирования микобактерий является в настоящее время метод ПДРФ (Restriction Fragments Length Polymorphism, RFLP) с

зондом IS6110, обладающий наибольшей разрешающей способностью по степени выявляемого полиморфизма. Основными недостатками метода являются большие затраты времени, технологические трудности и невозможность анализа штаммов микобактерий с незначительным (менее 5) повтором элемента IS6110.

2. Основанные на ПЦР-технологиях так называемые «вторичные» (secondary) методы генотипирования лишены основных недостатков ПДРФ, однако их разрешающая способность в настоящее время несколько ниже метода ПДРФ.

3. Наиболее эффективными методами генотипирования на основе ПЦР являются сполиготипирование и VNTR. Метод VNTR на основе генотипирования по 24 локусам по разрешающей способности равен

или даже превосходит ПДРФ, однако в настоящее время его применение ограничено технологическими сложностями.

4. Основными направлениями практического применения методов генотипирования являются внутривидовая дифференциация, кластеризация и определение принадлежности циркулирующих штаммов микобактерий к определенным семействам, например, *Beijing*, *Haarlem* и др., что позволяют прогнозировать развитие эпидемического процесса и изучать многие клинически важные свойства штаммов, в том числе степень устойчивости к антибактериальным препаратам. Важнейшая роль принадлежит методам молекулярной эпидемиологии при исследовании путей заражения, в частности при внутрибольничных инфекциях.

Таким образом, методы молекулярно-генетического типирования обладают очень широкими возможностями и могут (и должны) быть с успехом применены не только в научных исследованиях, но и в практической медицине. К сожалению, в настоящее время молекулярно-эпидемиологическая информация относительно штаммов, циркулирующих на территории Украины, практически отсутствует. Поэтому первоочередной задачей является сбор данных по генотипам штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в различных регионах Украины, создание баз данных и их интеграция в международные банки генотипов микобактерий. Кроме того, важнейшей проблемой является разработка и унификация методик клинико-диагностической интерпретации данных генотипирования. По нашему мнению, базовая эпидемиологическая информация относительно штаммов на территории Украины может быть получена с помощью методов сполитипирования (для дифференциации штаммов семей-

ства *Beijing*) и MIRU с использованием, возможно, ограниченного числа наиболее полиморфных локусов (для идентификации других семейств штаммов и дифференциации внутри семейства *Beijing*).

Использование данных молекулярной эпидемиологии с целью мониторинга эпидемического процесса будет иметь немаловажное значение для борьбы с туберкулезом, особенно в странах с высокими уровнями заболеваемости и лекарственной устойчивости микобактерий, к которым, к сожалению, относится и Украина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Small P. M.* Tuberculosis in the 21<sup>st</sup> century: DOTS and SPOTS // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* — 1999. — Vol. 3, N 11. — P. 949-955.
2. *Espinal M. A.* The global situation of MDR-TB // *Tuberculosis.* — 2003. — Vol. 83. — P. 44-51.
3. *Епідеміологія, діагностика та лікування хіморезистентного туберкульозу органів дихання* / Ю. І. Фещенко, В. М. Петренко, С. О. Черненко та ін. // *Укр. пульмонол. журнал.* — 2002. — № 4. — С. 5-12.
4. *European Database Health for All, European World Health Organization Bureau, Copenhagen, Denmark, 2003* ([www.euro.who.int/hfaddb](http://www.euro.who.int/hfaddb)).
5. *Фещенко Ю. И.* Ситуация с туберкулезом в Украине // *Доктор.* — 2002. — № 4. — С. 11-14.
6. *Фещенко Ю. И. Мельник В. М., Кобилянська А. В.* Основні тенденції динаміки статистичних показників з туберкульозу в Україні за останні 10 років // *Укр. пульмонол. журнал.* — 2000. — № 4. — С. 5-9.
7. *Perelman M. I.* Tuberculosis in Russia // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* — 2000. — Vol. 4, N 12. — P. 1097-1103.
8. *Frieden T. R., Lemer B. H., Rutherford B. R.* Lessons from the 1800s: tuberculosis control in the new millennium // *The Lancet.* — 2000. — Vol. 355. — P. 1088-1092.
9. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis* / F. A. Drobniowski, M. Caws, A. Gibson, D. Young // *Lancet Inf. Dis.* — 2003. — Vol. 3. — P. 141-147.
10. *Николаевский В. В., Бажора Ю. И.* Выявление лекарственной ус-

тойчивости микобактерий молекулярно-генетическими методами // *Буковин. мед. вісник.* — 2003. — № 3. — С. 137-144.

11. *Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics and Microbial Epidemiology* / A. van Belkum, M. Struelens, A. de Visser et al. // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2001. — Vol. 14, N 3. — P. 547-560.

12. *Genetic Diversity of Mycobacterium africanum Clinical Isolates Based on IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, Spoligotyping and Variable Number of Tandem DNA Repeats* / C. Viana-Niero, C. Gutierrez, C. Sola et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39, N 1. — P. 57-65.

13. *Evolution of the IS6110-Based RFLP Pattern during the Transmission of Mtb* / R. M. Warren, G. D. van der Spuy, M. Richardson et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40, N 4. — P. 1277-1282.

14. *Использование молекулярно-биологических методов для индивидуальной характеристики штаммов Mycobacterium tuberculosis* / И. Г. Шемякин, В. Н. Степашина, О. Ю. Манзюк и др. // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии.* — 2000. — № 2. — С. 6-11.

15. *Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology* / J. D. van Embden, M. D. Cave, J. T. Crawford et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1993. — Vol. 31. — P. 406-409.

16. *A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes* / T. R. Frieden, L. F. Sherman, K. L. Maw et al. // *JAMA.* — 1996. — Vol. 276. — P. 1229-1235.

17. *Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995-1997 showing low rate of active transmission* / H. Maguire, J. W. Dale, T. D. McHugh et al. // *Thorax.* — 2002. — Vol. 57. — P. 617-622.

18. *Phylogenetic reconstruction within Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in North Western Russia* / I. Mokrousov, O. Narvskaya, T. Otten et al. // *Research in Microbiol.* — 2002. — Vol. 153. — P. 629-637.

19. *Nosocomial outbreak of MDR-TB caused by a strain of Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family in St.-Petersburg, Russia* / O. Narvskaya, T. Otten, E. Limeschenko et al. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.* — 2002. — Vol. 21. — P. 596-602.

20. *Genetic Diversity of Mtb in Sicily Based on Spoligotyping and VNTR and Comparison with a Spoligotyping Database for Population-Based Analysis* / C. Sola, S. Ferdinand, C. Mammina et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39, N 4. — P. 1559-1565.
21. *Spoligotyping followed by double-repetitive element PCR is a rapid alternative methodology to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis* / C. Sola, L. Horgen, J. Maisetti et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1998. — Vol. 36. — P. 1122-1124.
22. *Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility* / K. Kremer, D. van Soolingen, R. Frothingham et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 2607-2618.
23. *Сиволан Ю. М., Кривда Г. Ф. Молекулярна генетика і судово-медична експертиза* // *Одес. мед. журнал.* — 2002. — № 6. — С. 70-75.
24. *DNA-based identification of a boiled, skeletonized, and varnished human skull, and bone fragments found in a fireplace* / Yu. M. Sivolap, G. F. Krivda, H. Kozuhova et al. // *Amer. J. Forensic Med. Path.* — 2001. — Vol. 22. — P. 412-414.
25. *Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping* / I. Filliol, S. Ferdinand, L. Negroni et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 38. — P. 2520-2524.
26. *Rapid Identification of Laboratory Contamination with Mycobacterium tuberculosis Using VNTR Analysis* / D. M. Gascoyne-Binzi, R. E. L. Barlow, R. Frothingham et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39, N 1. — P. 69-74.
27. *Automated High-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed units* / O. Supply, S. Lesjean, E. Savine et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 3563-3570.
28. *Genotyping of the Mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics* / C. Sola, I. Filliol, E. Legrand et al. // *Infection, Genetics and Evolution.* — 2003. — Vol. 3. — P. 125-133.
29. *Evaluation of the Epidemiologic Utility of Secondary typing methods for differentiation of Mycobacterium tuberculosis isolates* / A. Kwara, R. Schira, L. S. Cowan et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 2683-2685.
30. *Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of Mycobacterium tuberculosis compared to IS6110-based RFLP analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis* / P. M. Hawkey, E. G. Smith, J. T. Evans et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 3514-3520.
31. *Бажора Ю. И., Николаевский В. В. Идентификация потенциально патогенных микобактерий методом RAPD-анализа* // *Буковин. мед. вісник.* — 2002. — № 1. — С. 157-162.
32. *Yates M. D., Drobniowski F. A., Wilson S. M. Evaluation of Rapid PCR-based epidemiological typing method for routine studies of Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 712-714.
33. *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology* / J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1997. — Vol. 35. — P. 907-914.
34. *Rifampin- and Multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: dominance of the Beijing strain family* / F. A. Drobniowski, Y. M. Balabanova, M. Ruddy, L. Weldon // *Emerg. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 8. — P. 1320-1326.
35. *Genotypic analysis of Mycobacterium tuberculosis from medieval human remains* / G. M. Taylor, M. Goyal, A. J. Legge et al. // *Microbiology.* — 1999. — Vol. 145. — P. 899-904.
36. *Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mtb complex: recommendations for standardized procedure* / J. W. Dale, D. Brittain, A. A. Cataldi et al. // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* — 2001. — Vol. 5, N 3. — P. 216-219.
37. *Global distribution of Mycobacterium tuberculosis spoligotypes* / I. Filliol, J. R. Driscoll, D. van Soolingen et al. // *Emerg. Inf. Dis.* — 2002. — Vol. 8. — P. 1347-1349.

УДК 616-002.5-076.5-036.22

В. В. Николаевский, Ю. И. Бажора

#### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ МИКОБАКТЕРИЙ

Представлена информация по использованию молекулярно-генетических методов в типировании возбудителя туберкулеза — *Mycobacterium tuberculosis* при решении задач диагностики, клиники и молекулярной эпидемиологии туберкулеза. Рассмотрены важнейшие группы методов типирования: полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, вариабельных длин тандемных повторов, сполиготипирования и их модификации. Освещены преимущества и недостатки отдельных методов, обращено внимание на особенности их практического использования. Приведена краткая информация о собственных исследованиях в области молекулярной эпидемиологии возбудителя туберкулеза на Юге Украины. Предложены первоочередные меры по развитию молекулярно-эпидемиологических исследований в Украине, созданию национальных баз данных генотипов микобактерий и их интеграции в международные научные программы.

**Ключевые слова:** туберкулез, эпидемиология, молекулярная диагностика, генотипирование.

UDC 616-002.5-076.5-036.22

V. V. Nikolayevsky, Yu. I. Bazhora

#### MOLECULAR GENETIC TYPING OF MYCOBACTERIA

This is review of recent publications on the problems of genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* and its application in diagnosis and molecular epidemiology of tuberculosis. Recent methods of *Mycobacteria* typing, including IS6110 RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), VNTR (Variable Number Tandem Repeats), spoligotyping and their modifications are described. A particular attention is paid to advantages, shortcomings and modes of practical application of the certain methods. Practical usefulness of molecular epidemiology studies is demonstrated. Urgent issues regarding implementation of molecular typing technique in clinical microbiology practice in Ukraine, creation of national databases and their integration in international programmes are proposed.

**Key words:** tuberculosis, epidemiology, molecular diagnosis, genotyping.