

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт

эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

«УТВЕРЖДАЮ»

Председатель секции по эпидемиологии,
инфекционным болезням и вирусологии

Ученого Совета Минздрава России

академик РАМН, профессор

В.И.Покровский

2004 г.

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА И ЕГО
ПРИМЕНЕНИЕ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ ОБСЛЕДОВАНИИ ОЧАГОВ**

ПОСОБИЕ ДЛЯ ВРАЧЕЙ

Санкт-Петербург 2002

Пособие разработано сотрудниками Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера МЗ РФ – к.м.н. О.В. Нарвской, д.м.н., профессором Л.И. Шляхтенко, к.б.н. И.В. Мокроусовым; Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии - д.м.н. Т.Ф. Оттен, д.м.н. Б.И. Вишневым, к.м.н. О.В.Гращенковой; Санкт-Петербургского городского противотуберкулезного диспансера - Л.Н. Стекловой.

В пособии содержится описание молекулярно-генетического метода внутривидового типирования возбудителя туберкулеза, основанного на определении различий в количестве копий и расположении на бактериальной хромосоме особой нуклеотидной последовательности – элемента *IS6110*. Применение метода в различных очагах туберкулеза позволяет достоверно установить источник инфекции или общность источника для групповых заболеваний, подтвердить передачу возбудителя от больного контактным, идентифицировать эпидемические штаммы на определенной территории и следить за их распространением.

Пособие предназначено для микробиологов и эпидемиологов.

ВВЕДЕНИЕ

В условиях высокой заболеваемости туберкулезом, сопровождающейся широким распространением лекарственноустойчивых штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ), ранняя клинико-лабораторная диагностика и эпидемиологическая диагностика в очагах являются необходимыми звеньями борьбы с инфекцией.

Важнейшими задачами эпидемиологического обследования очагов туберкулеза являются своевременность выявления источника заражения и определение круга контактных с ним с целью предупреждения новых случаев инфицирования МБТ (2). Длительный инкубационный период болезни в условиях интенсивной миграции и высокой плотности населения в городах, лекарственная устойчивость возбудителя, в том числе - множественная, до недавнего времени не позволяли врачу-эпидемиологу сделать однозначный вывод о наличии эпидемиологических связей между заболеваниями на основе сопоставления определяемых культуральным методом профилей лекарственной устойчивости МБТ, выделенных от больного и контактных (5, 7).

Достижения молекулярной биологии и генетики позволили разработать надежные методы внутривидовой дифференцировки и значимого эпидемиологического маркирования изолятов *Mycobacterium tuberculosis* complex. Это достигается путем выявления особых нуклеотидных последовательностей ДНК - элементов IS (англ., Insertion Sequence, – “встраивающаяся” последовательность) в составе хромосомы микобактерий (9). Среди них наиболее известен элемент IS6110 – последовательность размером 1355 пар нуклеотидов (п.н.) (13). Зарубежные и отечественные исследования показали высокую эффективность генотипирования изолятов МБТ на основе определения «профилей» IS6110, отражающих количество копий элемента IS6110, которое может варьировать от 1 до 25, и их положение на бактериальной хромосоме (4-9). С этой целью применяют метод IS6110-RFLP (англ., Restriction Fragment Length

Polymorphism - полиморфизм длин фрагментов рестрикции), предложенный Van Embden et al. (1993). В процессе исследования ДНК культур МБТ подвергают энзиматическому расщеплению (рестрикции), в том числе, на участке элемента *IS6110*. Полученные фрагменты ДНК разделяют в геле путем электрофореза, переносят на специальную мембрану и гибридизуют с ДНК-зондом, который представляет собой меченную пероксидазой нуклеотидную последовательность, гомологичную участку элемента *IS6110*. Мембрану экспонируют на светочувствительной пленке, что позволяет учитывать специфичный для каждого изолята *IS6110*-профиль гибридизации - набор фрагментов рестрикции ДНК, содержащих последовательность *IS6110*.

Большинство эпидемиологически несвязанных штаммов МБТ имеют индивидуальные профили *IS6110*. Выделение в очагах туберкулеза штаммов МБТ с одинаковыми профилями *IS6110*, свидетельствуя об их идентичности, служит доказательством эпидемиологических связей между заболеваниями, позволяет достоверно установить источник или общность источника для нескольких заболеваний, подтвердить передачу возбудителя от больного контактным. Для системы эпидемиологического надзора не менее важно идентифицировать эпидемические штаммы на конкретной территории и следить за их распространением (3-5, 7-9).

Компьютерная обработка профилей *IS6110* штаммов МБТ с помощью специального программного обеспечения позволит создать локальные, а в перспективе - федеральный банки данных для совершенствования эпидемиологического мониторинга туберкулеза.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Показанием для применения метода генетического маркирования изолятов МБТ является проведение эпидемиологического обследования очагов туберкулеза, особенно, очагов со вспышечным характером эпидемического процесса, возникающих в семьях, квартирах, учебных заведениях, производственных подразделениях, детских, лечебно-профилактических учреждениях и других условиях, для достоверного установления источника инфекции, подтверждения передачи возбудителя от определенного больного контактным. Метод пригоден для идентификации эпидемических штаммов на территории и дифференцировки рецидивов заболевания от случаев экзогенной туберкулезной суперинфекции.

Противопоказаний к применению метод не имеет.

МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА

- Стандартное оборудование и материалы для микробиологических лабораторий и лабораторий, использующих метод полимеразной цепной реакции;
- Центрифуга высокоскоростная до 13200 об/мин (16100g) с охлаждением Eppendorf, Германия, кат. № 5415R, (или аналогичная);
- Вакуумный блоттер, Appligene, Франция, кат. № 2327 (или аналогичный);
- Камера горизонтальная для электрофореза, гребенки 24 зубца, Owl Scientific Inc., США, кат. № А3 (или аналогичная);
- Источник питания, макс. 600 В и 600 мА, стабилизация по току или напряжению, Apelex ST 606, Франция, (или аналогичный);
- Печь для гибридизации с ротором, температура до $90 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, Amersham Pharmacia Biotech, Англия, кат. № RPN2510 (или аналогичная);

- Трансиллюминатор (источник ультрафиолетового излучения) с длиной волны 312 и 254 нм, 4 УФ-лампы по 8 Вт, Vilber Lourmat, Франция, TFX-35M (или аналогичный);
- Микропробирки, и 1,5 мл, Sarstedt, Германия, кат. № 72.699 (или аналогичные);
- Микропробирки, Safe-Lock 0,5 и 1,5 мл, Eppendorf, Германия, кат. № 0030 121.023 и 0030 120.086 (или аналогичные);
- Тубы для гибридизации, Amersham Pharmacia Biotech, Англия, кат. № RPN2516;
- Мембрана для переноса нуклеиновых кислот Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Англия, кат. № RPN203B;
- Бумага для блоттера, Amersham Pharmacia Biotech, Англия, кат. № RPN5101M;
- Пленка для выявления хемолюминесценции, Hyperfilm ECL, 18x24, Amersham Pharmacia Biotech, Англия, кат. № RPN 2103H;
- Кассета для пленки Hyperfilm ECL, 24x30, Amersham Pharmacia Biotech, Англия, кат. № RPN 11643;
- Пероксидаза, высокоочищенная, Марки А, ТУ 6-09-10-1408;
- Трис(оксиметил)аминометан (Tris), ч, ТУ 6-09-4292-76;
- Борная кислота, рег. № 95/335/16;
- Хлороформ, хч, ТУ 6-09-4263-76;
- Фенол, чда, ГОСТ 6447-72;
- Пропанол-2 абсолютированный, тех, ГОСТ 9805-84;
- Бромфеноловый синий, чда, ТУ МТ УХП 271-59;
- Изоамиловый спирт, Merck, Германия, кат. № 1.00979;
- Этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль (EDTA), Boehringer Mannheim, Германия, кат. № 86717520;
- Натрия додецилсульфат (SDS), ВДН, Англия, кат. № L354392 809.
- Гексадецил триметил аммония бромид (Cetyltrimethylammonium bromide, СТАВ), Sigma, США, кат. № H-6269;
- Лизоцим, Sigma, США, кат. № L-6876;

- Протеиназа К, Sigma, США, кат. № P-8044;
- Этидиума бромид, Sigma, США, кат. № E 8751;
- Масло минеральное, Sigma, США, кат. № 400-5;
- Агароза стандартная для электрофореза, Quantum Bioprobe, США, кат. № АГАН02;
- Ультрарачистый набор нуклеотидных оснований (dNTP), Amersham Pharmacia Biotech, США, кат. № 27-2035-02;
- Маркер молекулярных масс ДНК, 50 оснований, Amersham Pharmacia Biotech, Англия, кат. № 27-4005-01;
- Реагент для мечения и детекции ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, Англия, кат. № RPN3001;
- Олигонуклеотидные праймеры INS-1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3') и INS-2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3'), ТУ 9398-410-17253567-97, Силекс, Москва;
- Рекомбинантная термостабильная ДНК-полимераза Taq и буферный раствор 10x, Perkin Elmer, США, кат. № 808-0101;
- Рестриктаза Pvu II 40 U/mcl, Amersham Pharmacia Biotech, Англия, кат. № 0899216 (или аналогичная);
- Набор для очистки фрагментов ДНК из агарозного геля «Wizard™ PCR Preps DNA Purification System», Promega, США, кат. № A7170 (или аналогичный);
- Проявитель и фиксаж для пленки, Kodak, США, кат. № 875 1752; 367 0346.

Перечень штаммов МБТ

Штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ДНК используют в качестве матрицы для получения зонда IS6110) может быть получен из музея культур Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии (Приказ № 61 от 15 февраля 2002 г).

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Первый этап исследований по выделению культур МБТ из исследуемого материала и их идентификации проводится в микробиологических лабораториях городских и областных противотуберкулезных диспансеров с использованием стандартного метода культивирования на среде Левенштейна-Йенсена (2). Генотипирование ДНК штаммов МБТ осуществляется в специализированных лабораториях, использующих диагностический метод полимеразной цепной реакции (3).

Генотипирование штаммов МБТ включает несколько основных этапов (Рис. 1):

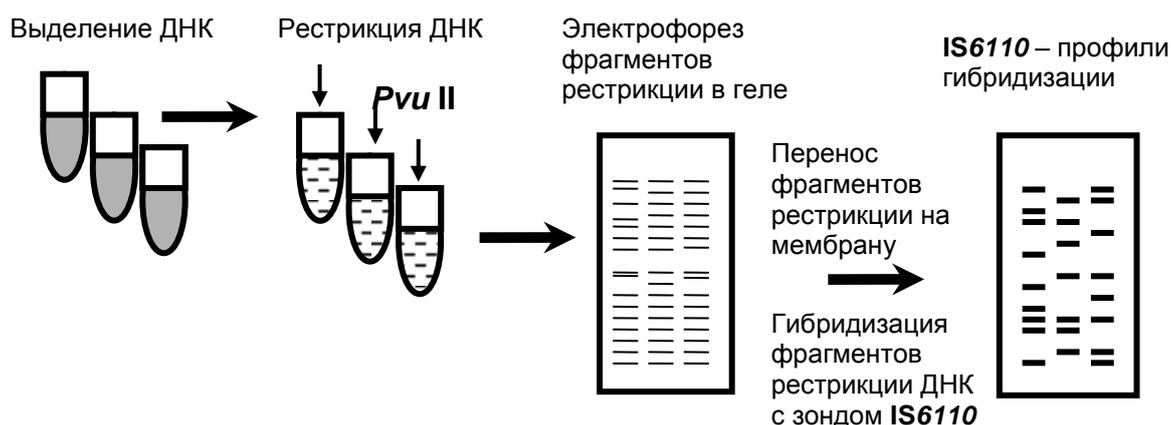


Рис. 1. Этапы генотипирования МБТ с помощью метода IS6110-RFLP (схема).

IS6110-профили гибридации изолятов МБТ представляют собой наборы фрагментов рестрицированной ДНК, содержащих специфический участок нуклеотидной последовательности IS6110, и могут различаться как по количеству, так и молекулярной массе фрагментов.

В целом, генотипирование штаммов МБТ с помощью метода IS6110-RFLP занимает 6 дней.

Выделение хромосомной ДНК из культур МБТ

Исходным материалом для выделения хромосомной ДНК служат культуры МБТ, полученные от больных, и штамм *M. tuberculosis* H37Rv, выращенные на среде Левенштейна-Йенсена.

1-й день. Полную бактериологическую петлю каждой из исследуемых культур МБТ вносят в микропробирки объемом 1,5 мл, содержащие 400 мкл буферного раствора 1xTE (10 mM Tris, pH 8.0 и 1mM EDTA). Культуру *M. tuberculosis* H37Rv вносят в отдельную пробирку. После перемешивания и обеззараживания материала при 80°C на водяной бане в течение 0,5 часа проводят дезинтеграцию клеток. Для этого в каждую пробирку добавляют 50 мкл лизоцима (10 мг/мл), инкубируют при 37°C в течение 18-20 часов.

2-й день. Пробирки встряхивают на вортексе 30 секунд, добавляют 70 мкл 10% SDS и 5 мкл протеиназы К (10 мг/мл), инкубируют при 65°C - 30 минут, добавляют 100 мкл 5M NaCl и 100 мкл раствора СТАВ/NaCl (4,1 г NaCl, 80 мл дистиллированной воды, 10 г СТАВ), предварительно прогретого на водяной бане при 65°C не менее 10 минут. Пробирки встряхивают на вортексе 30 секунд, инкубируют при 65°C 40 минут. В результате продукты денатурации белков и полисахариды образуют стойкий комплекс со СТАВ, а ДНК остается в растворе.

В каждую пробирку добавляют смесь хлороформа и изоамилового спирта (24:1) в соотношении: 1 объем содержимого пробирки к 1 объему смеси. После центрифугирования при 13200 об/мин в течение 20 минут при 6°C содержимое пробирки расслаивается. Прозрачную надосадочную жидкость, содержащую ДНК, отбирают в новые пробирки и добавляют равный объем охлажденного до -18°C изопропанола. Пробирки выдерживают при -18°C 18-20 часов, что приводит к осаждению ДНК в виде белых нитей.

3-й день. Очистку ДНК проводят путем обработки 70% этанолом и центрифугированием при тех же условиях (см. выше). Осадок ДНК растворяют в 20 мкл 1xTE и хранят при 4°C до года.

Контроль выделения ДНК осуществляют путем электрофореза. Пробы ДНК (4 мкл) вносят в лунки 0,8% геля агарозы (0,8 г агарозы, 100 мл дистиллированной воды, 2,5 мкл 10% бромистого этидия). Электрофорез проводят в растворе 1xTBE (89 мМ Tris, 89 мМ борной кислоты, 2.5 мМ EDTA) в течение 20 минут при постоянном напряжении 100 В. По окончании электрофореза гель помещают на трансиллюминатор. Присутствие ДНК в пробе оценивают визуально по наличию светящейся полосы в ультрафиолетовом излучении.

Рестрикция ДНК, выделенной из культур МБТ

4-й день. Энзиматическое расщепление (рестриксию) ДНК осуществляют с помощью фермента – рестриктазы *Pvu II* на участках короткой последовательности нуклеотидов CAGGTC (сайт рестрикции), которые во множестве представлены на хромосоме МБТ, в частности, входят в состав элемента *IS6110* (Рис. 1, 2).

В микропробирки (по числу проб) объемом 0,5 мл вносят по 20 мкл смеси, содержащей 12 мкл раствора рестриктазы *Pvu II*, приготовленного в соответствии с инструкцией производителя, и 8 μ л пробы ДНК. Пробирки инкубируют 3 часа при 37°, охлаждают, погружая в ледяную крошку на 10 минут. К содержимому пробирок (продукты рестрикции ДНК) добавляют 2 мкл бромфенолового синего, перемешивают пипетированием и вносят по 20 мкл в лунки приготовленного заранее 0,83% геля¹. (1,98 г агарозы, 240 мл раствора 1xTBE, 25 мкл 10% бромистого этидия). Электрофорез проводят в растворе 1xTBE в течение 20 часов при постоянном напряжении 40 В для разделения фрагментов рестрикции, различающихся по молекулярной массе.

5-й день. Гель помещают на трансиллюминатор. Множество светящихся полос - фрагментов рестрикции во всех дорожках геля свидетельствует о хорошем качестве рестрикции проб ДНК.

Перенос на мембрану фрагментов ДНК МБТ, разделенных в геле

¹ Гель готовят за 3 часа до внесения проб рестрицированной ДНК. Оптимальные размеры геля - 20x25 см с количеством лунок – 24.

Гель выдерживают в денатурирующем растворе (0,5М NaOH и 1,5М NaCl) при комнатной температуре в течение 30 минут, накладывают на положительно заряженную мембрану Hybond N⁺ размером 17,5x20 см, помещенную на подложку из специальной бумаги для блоттера размером 18,5x20,5 см и фиксируют в блоттере. Гель увлажняют раствором 2xSSC (0,3М натрия хлорид и 0,03М натрия цитрат). Перенос ДНК из геля на мембрану осуществляют в течение 1,5 – 2 часов, установив регулятор вакуумного насоса в положении, соответствующем давлению 50-55 мм водного столба, и постоянно увлажняя гель раствором 2xSSC (всего должно быть израсходовано 100 мл). По окончании переноса ДНК гель удаляют, мембрану однократно промывают тем же раствором и подсушивают при комнатной температуре на листе фильтровальной бумаги. ДНК фиксируют, на мембране, облучая ультрафиолетом на трансиллюминаторе в течение 4 минут.

Гибридизация фрагментов рестрикции ДНК МБТ с зондом IS6110

Зонд IS6110 получают с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя ДНК штамма *M. tuberculosis* H37Rv в качестве матрицы, и специфические праймеры INS-1 и INS-2 (Рис. 2). Праймеры представляют собой короткие нуклеотидные последовательности, комплементарные участкам элемента IS6110 в позициях нуклеотидов 631-650 и 856-875, соответственно.

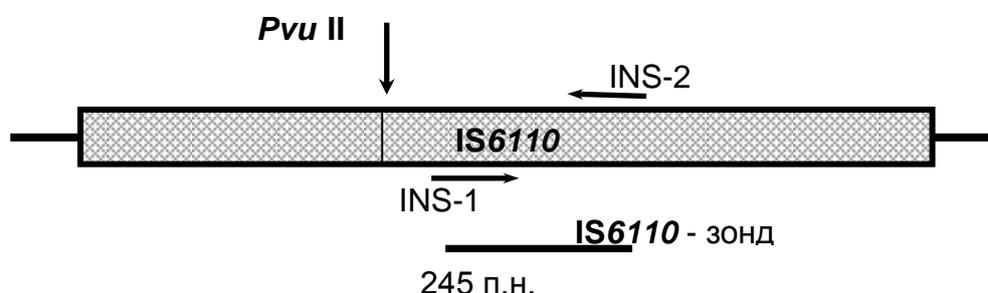


Рис. 2. Рестрикция ДНК МБТ в области элемента IS6110 и получение зонда IS6110 (схема). Вертикальная стрелка показывает сайт рестрикции (последовательность CAGGTC); горизонтальные противоположно направленные стрелки показывают взаимную ориентацию праймеров INS-1

и INS-2, амплифицирующих участок ДНК в ходе ПЦР; жирной линией показан продукт ПЦР размером 245 п.н., используемый в качестве зонда IS6110.

ПЦР проводят со смесью реактивов: буфер для ПЦР 10x – 3 мкл; MgCl₂ - 1,8 мкл (конечная конц. 1,5 мМ); dNTP – 4,8 мкл (конечная конц. 200 мкМ); INS1 – 0,5 мкл (50 pmole); INS2 - 0,5 мкл (50 pmole); *Taq*-полимераза – 0,2 мкл (1 ед.); ДНК – 0,5 мкл; стерильная дистиллированная вода до 30 мкл). Суть реакции заключается в увеличении количества копий (амплификации) участка IS6110 ДНК *M. tuberculosis* H37Rv размером 245 пар нуклеотидов (п.н.) с помощью фермента термостабильной ДНК-полимеразы при смене температуры реакции в диапазоне: 95°C 3 мин; 35 циклов со сменой температур в рабочем режиме - 94°C 1 мин, 65°C 50 сек, 72°C 1 мин; 72°C 4 мин.

Продукт ПЦР подвергают электрофорезу в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, и наблюдают в геле в виде светящейся полосы при ультрафиолетовом излучении. ДНК вырезают из геля скальпелем, очищают от остатков агарозы и примесей, используя набор микроколонок WizardTM. Мечение продукта ПЦР пероксидазой и использование его в качестве комплементарного ДНК-зонда для гибридизации с фиксированными на мембране фрагментами рестрикции хромосомной ДНК микобактерий, содержащими участок элемента IS6110, осуществляют при 42°C с помощью набора реагентов для мечения ECLTM в соответствии с инструкцией производителя. Мембрану обрабатывают с помощью набора реагентов ECLTM, содержащих субстрат пероксидазы, и экспонируют в течение часа на светочувствительной пленке Hyperfilm ECL, помещенной в кассету, для выявления IS6110-профилей гибридизации ДНК МБТ. Пленку проявляют, фиксируют, используя реактивы KODAK, и высушивают при комнатной температуре.

IS6110-профили гибридизации штаммов МБТ на пленке сравнивают между собой визуально, отмечая сходства или различия, касающиеся как количества, так и взаиморасположения фрагментов ДНК. Эпидемиологически несвязанные штаммы МБТ имеют индивидуальные профили гибридизации. Идентичность IS6110-профилей штаммов, выделенных в очаге туберкулеза, подтверждает наличие эпидемиологических связей между заболеваниями, позволяя эпидемиологу установить источник инфекции в очагах, выявить скрытые контакты и факторы риска, идентифицировать эпидемический штамм и следить за его распространением на определенной территории и в группах риска.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод позволяет осуществлять генетическое маркирование любых штаммов *M. tuberculosis* complex. Результаты генотипирования являются высоко воспроизводимыми, стабильность IS6110-профилей штаммов МБТ как *in vitro*, так и *in vivo* измеряется несколькими годами и не зависит от формирования у МБТ лекарственной устойчивости в процессе лечения (10-14).

В период 1996-2001 гг. в Санкт-Петербурге изучено 49 (в т.ч., два внутрибольничных) очагов впервые диагностированного туберкулеза. Метод IS6110-RFLP использован для генотипирования 155 культур МБТ, выделенных от 133 больных в этих очагах. В 19 очагах эпидемиологическое обследование выявило наличие тесной родственной связи (муж и жена, дети и родители, братья и сестры) или совместное проживание вновь заболевших с источниками МБТ. В остальных очагах больные имели разные по продолжительности контакты с предполагаемыми источниками вне семьи по месту жительства, работы или в период пребывания в туберкулезных стационарах. Результаты генотипирования позволили установить идентичность культур, выделенных в 14 из 19 (74%) семейных очагов, подтвердив, тем самым, инфицирование от предполагаемого источника. В

пяти случаях из 19 проведено дополнительное эпидемиологическое расследование, позволившее в двух очагах выявить другие источники заражения по месту жительства. В 5 из 30 остальных очагов, в которых не было выявлено тесной связи между заболевшими туберкулезом, обоснованы источники МБТ, которыми оказались больные соседи по дому из числа социально-дезадаптированных лиц (7).

В связи с расследованием двух предполагаемых внутрибольничных случаев заражения персонала штаммами с множественной лекарственной устойчивостью проведено генотипирование 55 культур МБТ, выделенных от 33 больных в двух туберкулезных стационарах города (8). В одном из этих стационаров доказано групповое заражение четырех человек, вызванное мультирезистентным к антибиотикам эпидемическим штаммом широко распространенного генотипа Beijing (Рис. 3). Путем сопоставления IS6110-профилей 35 изолятов МБТ, полученных от 20 обследованных больных стационара, достоверно установлен общий источник заражения не только медицинской сестры, но и трех больных с рецидивом туберкулеза. У этих больных, проходивших курс лечения в стационаре, на фоне ухудшения состояния с возобновлением бактериовыделения, выявлена смена генотипа МБТ, подтвердившая экзогенную суперинфекцию.

В другом стационаре путем сопоставления IS6110-профилей 18 изолятов, полученных от 13 больных, удалось выявить источник инфицирования врача.

Некоторые результаты применения метода приведены на Рис. 3.

Таким образом, метод IS6110-RFLP позволяет обосновать эпидемиологическую связь между заболеваниями, оценить условия заражения в очагах и дать эпидемиологическую оценку конкретных штаммов МБТ. В целом, метод направлен на повышение эффективности эпидемиологической диагностики очагов и контроля туберкулеза.

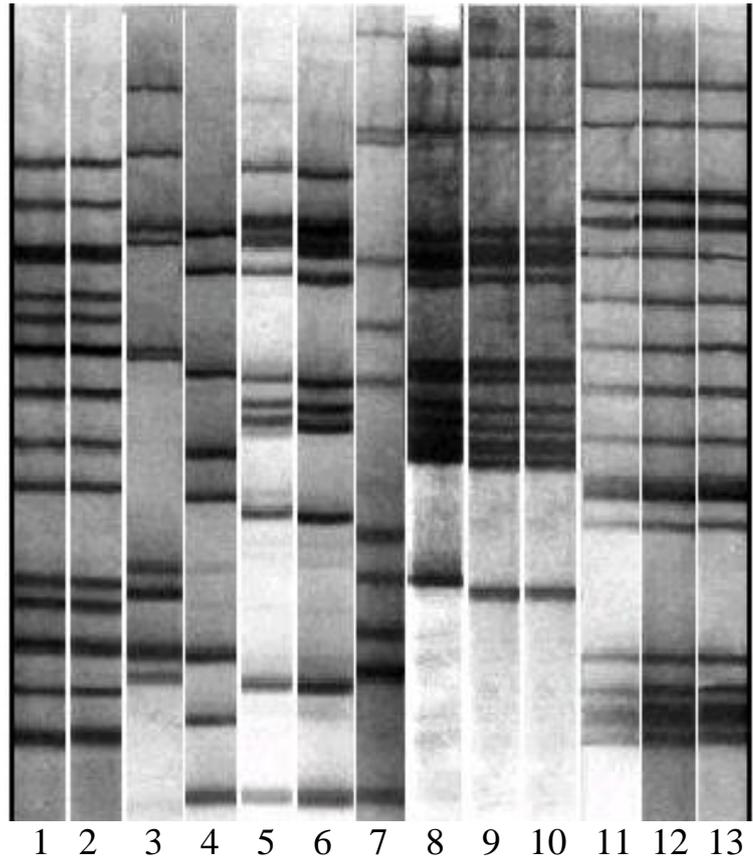


Рис. 3. IS6110-профили штаммов МБТ.

Дорожки: 1 и 2, 5 и 6 – штаммы с идентичными профилями из двух семейных очагов (эпидемиологически связанные случаи); 3, 4 и 7 - штаммы с различными профилями (эпидемиологически несвязанные случаи); 8-13 - серийные изоляты, полученные от впервые выявленного больного: 8-10 - исходные изоляты, 11-13 - изоляты, представляющие эпидемический штамм генотипа Beijing, который явился причиной рецидива (за счет экзогенной реинфекции) у больного Г., и вызвал внутрибольничное заражение еще трех пациентов и медицинской сестры в туберкулезном стационаре.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 8 июня 1978 г. №558 «Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулезе».
2. Методические указания «Организация и содержание противоэпидемических мероприятий в очагах туберкулеза» № 2000/185. Утв. МЗ РФ 21.04.01.
3. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции № 01-19/52-17. Утв. Госкомсанэпиднадзором 22.06.95.
4. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Вишневский Б.И. Генетическое маркирование полирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на Северо-западе России // Пробл. туберк. - 1999. - N 3. - С. 39-41.
5. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Лимещенко Е.В. и др. Молекулярная эпидемиология туберкулеза // Большой Целевой Журнал о туберкулезе. - 2000. - N 7-8. - С. 4-6.
6. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Е.В. Лимещенко и др. Молекулярно-генетическая характеристика микобактерий туберкулеза, выделенных в Северо-западном регионе России // Туберкулез сегодня: проблемы и перспективы: Сб. науч. тр. конф. - М., 2000. – С. 210-211.
7. Оттен Т.Ф., Нарвская О.В., Гращенкова О.В. и др. Обследование очагов туберкулезной инфекции с использованием молекулярно-генетических методов // Туберкулез сегодня: проблемы и перспективы: Сб. науч. тр. конф. - М., 2000. – С. 213-214.
8. Оттен Т.Ф., Нарвская О.В., Мокроусов И.В. и др. Расследование очагов нозокомиальной туберкулезной инфекции методом геномной дактилоскопии // Нозокомиальная туберкулезная инфекция: Тез. докл. I Российск. науч.-практ. конф. с межд. участ. 14-16 июня 2001 г. – Москва, 2001. – С. 53.

9. Шагинян И.А., Нестеренко Л.Н., Гришина Т.Д. и др. Исследование геномного полиморфизма штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // Журн. микробиол. - 1996. - N 3. – С. 65-68.
10. Cave M., Eisenach K., Templton M. et al. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. – 1994. - Vol. 32. – N 1. – P. 262-266.
11. Neimann S., Rush-Gerdes S., Richter E. et al. Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains in actual chains of transmission // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38. - N 7. - P. 2563-2567.
12. Rigouts L., Portaels F. DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* do not change during the development of resistance to various antituberculous drugs // Tuberc. Lung Dis. – 1994. - Vol. 75. – N 2. – P. 160-164.
13. Van Embden J., Cave D., Crawford J. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – N 2. – P. 406-409.
14. Yeh R., Ponce de Leon A., Agasino C. et al. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes // J. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 177. – N 4. – P. 1107-1111.

Содержание:

	Стр.
Аннотация	2
Введение	3
Показания и противопоказания к применению метода	5
Материально-техническое обеспечение метода	5
Описание метода	8
Эффективность использования метода	13
Рекомендуемая литература	16