

# ВИРУЛЕНТНОСТЬ *Mycobacterium tuberculosis* ГЕНОТИПА BEIJING В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

Ю.А. Беспятых<sup>1</sup>, Т.И. Виноградова<sup>2</sup>, О.А. Маничева<sup>2</sup>, Н.В. Заболотных<sup>2</sup>,  
М.З. Догондзе<sup>2</sup>, М.Л. Витовская<sup>2</sup>, А.С. Гуляев<sup>1</sup>, В.Ю. Журавлев<sup>2</sup>,  
Е.А. Шитиков<sup>1</sup>, Е.Н. Ильина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** В структуре популяции возбудителя туберкулеза в России доля штаммов генетического семейства Beijing составляет от 50 до 80%. На основании VNTR- и SNP-анализа представители семейства разделяются на несколько доминирующих кластеров: B0/W148, CladeA и CAO. Следует отметить, что описываемые группы принадлежат к «современным» Beijing и очень близки филогенетически. Как правило, такие изоляты демонстрируют высокую трансмиссивность, ассоциацию с лекарственной устойчивостью и преобладают среди пациентов с тяжелыми формами заболевания. Немногочисленные исследования вирулентности штаммов отдельных кластеров носят противоречивый характер. Целью данной работы было сравнительное исследование вирулентности штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, относящихся к основным кластерам семейства Beijing на животной модели. В исследование включены клинические штаммы, относящиеся к кластерам семейства Beijing B0/W148, CladeA, CAO и некластеризующийся штамм NK, а также лабораторный штамм H37Rv. В ходе исследований по оценке выживаемости инфицированных мышей линии C57BL/6 (по 20 мышей на штамм) было установлено, что наибольшая смертность наблюдалась в группе животных, инфицированных штаммами NK и B0/W148. При этом наименьшей вирулентностью обладал штамм CladeA. Анализ патоморфологической картины экспериментального туберкулеза показал, что все штаммы имели характерные патогенные свойства, то есть были способны вызывать специфический туберкулезный процесс. В ходе оценки динамики патоморфологических изменений (1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 и 120 день после заражения) в легких и селезенке выявлены достоверные различия между штаммами. Прогрессивное развитие туберкулезного процесса наблюдалось у мышей, инфицированных изолятами B0/W148 и NK. В то же время при инфекции штаммами CladeA, CAO и H37Rv наблюдалась стабилизация процесса и менее серьезное повреждение органов. Согласно полученным данным, бактериальная нагрузка после заражения кластеризующимися штаммами семейства Beijing была ниже таковой для штамма H37Rv, который использовался как референсный. Исключением являлся штамм NK, бактериальная нагрузка для которого являлась самой высокой среди семейства Beijing и была сопоставима с H37Rv к 120 дню инфицирования. Показано, что кластер B0/W148, известный как наиболее вирулентный, обладает схожим уровнем вирулентности со штаммом NK. Суммарно, полученные данные свидетельствуют, что штаммы семейства Beijing демонстрируют различный спектр фенотипической вирулентности.

**Ключевые слова:** туберкулез, вирулентность, *Mycobacterium tuberculosis*, микобактерии, мышинные модели, Beijing B0/W14.

## Адрес для переписки:

Беспятых Юлия Андреевна  
119435, Россия, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а,  
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.  
Тел.: 8 (909) 961-18-46. Факс: 8 (499) 246-44-09.  
E-mail: juliabes@rcpcm.org

## Contacts:

Julia A. Bespyatykh  
119435, Russian Federation, Moscow, Malaya Pirogovskaya str., 1a,  
Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine.  
Phone: +7 (909) 961-18-46. Fax: +7 (499) 246-44-09.  
E-mail: juliabes@rcpcm.org

## Библиографическое описание:

Беспятых Ю.А., Виноградова Т.И., Маничева О.А., Заболотных Н.В.,  
Догондзе М.З., Витовская М.Л., Гуляев А.С., Журавлев В.Ю.,  
Шитиков Е.А., Ильина Е.Н. Вирулентность *Mycobacterium tuberculosis*  
генотипа Beijing в условиях *in vivo* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9,  
№ 1. С. 173–182. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-173-182

## Citation:

Bespyatykh J.A., Vinogradova T.I., Manicheva O.A., Zabolotnykh N.V.,  
Dogonadze M.Z., Vitovskaya M.L., Guliaev A.S., Zhuravlev V.Yu., Shitikov E.A.,  
Ilyina E.N. In vivo virulence of Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* //  
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019,  
vol. 9, no. 1, pp. 173–182. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-173-182

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 17-15-01412)

**IN VIVO VIRULENCE OF BEIJING GENOTYPE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS****Bespyatykh J.A.<sup>a</sup>, Vinogradova T.I.<sup>b</sup>, Manicheva O.A.<sup>b</sup>, Zabolotnykh N.V.<sup>b</sup>, Dogonadze M.Z.<sup>b</sup>, Vitovskaya M.L.<sup>b</sup>, Guliaev A.S.<sup>a</sup>, Zhuravlev V.Yu.<sup>b</sup>, Shitikov E.A.<sup>a</sup>, Ilina E.N.<sup>a</sup>**<sup>a</sup> *Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation*<sup>b</sup> *St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains comprise 50–80% in Russian Federation, which are divided into the main B0/W148, CladeA, and CAO clusters based on VNTR and SNP analysis. It should be noted that such phylogenetically highly close MTB strains belong to the modern Beijing family, generally demonstrating high transmissibility, association with drug resistance, and prevalence among patients with severe forms of the disease. However, studies on MTB genetic cluster strain-related virulence are scarce and contradictory. Here, we investigated virulence of diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains belonging to the B0/W148, CladeA and CAO clusters and nonclustered strain NK of the Beijing family as well as laboratory strain H37Rv in C57BL/6 mice. It was found that mice infected with NK and B0/W148 vs. CladeA strains revealed the peak and the lowest mortality, respectively, while assessing survival rate in various groups (20 mice per MTB strain examined). Analyzing experimental data in mice demonstrated that all MTB strains were able to cause typical tuberculosis-related pathogenic signs. In particular, time-dependent evaluation of pathological changes (on 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 and 120 day post infection) in the lungs and spleen revealed significant differences among various strains. Tuberculosis progression was observed in the mice infected with B0/W148 and NK strains, whereas CladeA, CAO and H37Rv strains resulted in stabilized course and less marked organs damage. Moreover, we found that bacterial load after infection with Beijing family clustering strains was lower compared to that of the reference H37Rv strain, except NK strain demonstrating the peak bacterial load among the Beijing family comparable to H37Rv strain at 120 dpi. Thus, it was found that the level of virulence between most virulent B0/W148 cluster strain vs. NK strain was similar. Overall, the data obtained indicate that Beijing genotype strains are characterized by a diverse range of phenotypic virulence *in vivo*.

**Key words:** *tuberculosis, virulence, Mycobacterium tuberculosis, mycobacteria, murine model, Beijing B0/W148*

**Введение**

В Российской Федерации (РФ) туберкулез остается одной из основных проблем здравоохранения. Несмотря на общую тенденцию к снижению заболеваемости впервые выявленными активными формами туберкулеза, ситуация остается напряженной. В 2017 г. заболеваемость туберкулезом составила 53,3 человек на 100 тыс. населения, а всего за год в РФ было зарегистрировано около 71 тыс. новых случаев заболевания [6].

Стоит отметить, что структура популяции *M. tuberculosis* в России имеет свои особенности. Штаммы семейства Beijing преобладают на территории страны, составляя 50–80% случаев [27]. Для этого генетического семейства доказана строгая ассоциация с формированием лекарственной устойчивости [10, 21, 37] и большая вирулентность по сравнению с другими генотипами [14]. Последнее подтверждается как на уровне макрофагальных моделей, так и на уровне эпидемиологических исследований. В свою очередь повышенная представленность факторов вирулентности продемонстрирована для штаммов семейства Beijing и на молекулярном уровне [29]. При этом стоит отметить, что гипервирулентность не является характерной особенностью семейства, а лишь присуща определенным генетическим сублиниям внутри Beijing, зачастую ассоциированным со вспышками заболеваний в том или ином регионе [10, 17].

Одной из таких сублиний является кластер Beijing B0/W148. По литературным данным кло-

нальная группа составляет около четверти всех изолятов генотипа Beijing, циркулирующих в разных регионах России и бывшего Советского Союза [25]. Представители кластера часто выявляются среди российских иммигрантов в Соединенных Штатах Америки и Европе [5, 10, 13, 19]. В экспериментах на мышинных макрофагальных моделях была показана повышенная вирулентность штаммов Beijing B0/W148 по сравнению с другими вариантами генотипа Beijing [1, 2]. Схожие результаты были продемонстрированы Lasunskaja с соавт. [20] на моноцитоподобной линии клеток ТНР-1. В то же время работы, проведенные на животных моделях, продемонстрировали разнящиеся результаты [3, 4, 7, 30]. Так, на линии белых неинбредных мышей была показана повышенная вирулентность изолятов кластера Beijing B0/W148 по сравнению с другими штаммами семейства [3]. Схожие результаты продемонстрированы в одной из последних работ Ribeiro с соавт., где показана повышенная вирулентность современных Beijing, и в частности Beijing B0/W148, по сравнению с древними [30]. В свою очередь, в работах ЦНИИ туберкулеза была показана неоднородность изолятов генотипа Beijing при исследовании выживаемости инбредной линии мышей C57BL/6 и отсутствие особых вирулентных свойств у Beijing B0/W148 [4, 7].

Другими кластерами, широко распространенными на территории страны, являются CladeA и CAO (Central Asia Outbreak) [12]. Данные кластеры филогенетически близки к Beijing B0/W148

и относятся к «современным» Beijing [23, 33]. Согласно международной базе данных MIRU-VNTRplus, CladeA и CAO относятся к VNTR-типу 94–32. В свою очередь согласно недавнему исследованию большой коллекции VNTR-паттернов генотипа Beijing кластеры принадлежат к группе CC1 [23]. Показано, что для штаммов кластеров характерен высокий уровень устойчивости к противотуберкулезным препаратам [12], однако, какие-либо данные об их вирулентности и трансмиссивности в литературе отсутствуют. Вероятно, это обусловлено тем, что не разработан стандартизованный метод их типирования.

В связи с этим целью данного исследования было сравнительное изучение вирулентных свойств штаммов *M. tuberculosis* семейства Beijing, относящихся к различным кластерам, в условиях *in vivo*.

## Материалы и методы

**Бактерии.** В исследование включено 5 штаммов *M. tuberculosis* из охарактеризованной коллекции СПб НИИФ. Выборка состояла из 4 штаммов семейства Beijing: 1 штамм Clade A, 1 штамм B0/W148, 1 штамм CAO, 1 штамм некластеризующийся (NK). Также в работу был включен референсный лабораторный штамм H37Rv. Культивирование штаммов проводили на среде Левенштейна–Йенсена (Becton, Dickinson and Company, США). Выделение ДНК осуществляли по методу van Embden с соавт. [38].

Бактериологическое исследование культур на чувствительность к противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда было проведено методом абсолютных концентраций и на приборе Bactec MGIT 960. Обнаружение генетических маркеров ЛУ проводилось с использованием биочипов «ТБ-ТЕСТ» согласно методике производителя.

VNTR-типирование штаммов по 24 локусам генома проводили согласно стандартной методике [35]. Результаты исследования сравнивали с профилями, представленными в международной базе данных MIRU-VNTRplus ([www.miru-vntrplus.org](http://www.miru-vntrplus.org)).

**Животные.** В работе были использованы мыши линии C57BL/6, самцы в возрасте двух месяцев к началу инфицирования. Мыши получены из питомника филиала «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА (г. Красногорск, Московская область, Россия) и содержались в виварии ФГБУ Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии (СПб НИИФ, Санкт-Петербург, Россия) в соответствии со всеми нормами ухода за животными. Всего в работе было использовано 350 мышей.

Все процедуры с модельными животными были рассмотрены и утверждены локальными этическими комитетами СПб НИИФ (Приказ Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23.08.2010)

и ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России) (протокол заседания № 2018/08) на предмет соответствия Правилам лабораторной практики.

**Заражение.** Микобактериальную суспензию для инфицирования мышей готовили *ex tempore* из трехнедельных штаммов второй генерации. Заражающая доза —  $10^6$  КОЕ/мышь в 0,2 мл физиологического раствора. Суспензию микобактерий инокулировали модельным животным в латеральную хвостовую вену.

**Дизайн эксперимента.** Модельные животные были разделены на две группы: 1 — для исследования выживаемости животных, зараженных микобактериями; 2 — для исследования вирулентности штаммов.

Первая группа включала 100 мышей, по 20 особей на каждый изучаемый штамм. Перед введением возбудителей туберкулеза мышей взвешивали 3 раза. После заражения еженедельно проводился мониторинг массы тела (взвешивание) с использованием электронных весов модели Adventurer™ (ОНАУС Corporation, США). Проводилась регистрация даты гибели животных. Погибших в ходе исследования животных подвергали вскрытию с осмотром внутренних органов.

Вторая группа включала 250 мышей, по 50 особей на каждый из 5 изучаемых штаммов *M. tuberculosis*. Животные выводились из эксперимента по 6 особей на 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 и 120 день после заражения для определения биометрических показателей. Эвтаназию модельных животных осуществляли методом цервикальной дислокации. Далее проводилось вскрытие животного и стерильный забор легких и селезенки. Оценку пораженности извлеченных органов проводили визуально, после чего оценивали линейные размеры, снимали биометрические показатели и проводили высеив микобактерий.

**Биометрические показатели.** Коэффициенты массы органов для легких и селезенки вычисляли, исходя из соотношения массы органа и массы тела животного, и выражали в условных единицах:

$$\text{Коэффициент} = \frac{\text{масса органа (г)} \times 100}{\text{масса тела животного (г)}}$$

Индекс поражения легких устанавливали по совокупности экссудативных и продуктивных изменений в условных единицах.

**Экссудативные изменения:**

- легкие воздушны — 0;
- единичные безвоздушные очаги — 0,25;
- легкие безвоздушны на  $1/2$  — 0,5;
- легкие безвоздушны на  $2/3$  — 0,75;
- легкие безвоздушны на всем протяжении — 1,0.

**Продуктивные очаги:**

- единичные субмилиарные очаги — 0,5;
- многочисленные (не более 20) — 1,0;

**Таблица 1. Характеристики изучаемых штаммов семейства Beijing**  
Table 1. Characteristics of experimental Beijing family strains

Кластер Cluster	Год Year	Регион Geographic region	24-VNTR*	Профиль резистентности Resistance profile	Антибиотик** (Мутация устойчивости) Antibiotic** (Resistance mutation)												
					STR (RpsL/rfs)	INH (KatG)	RIF (RpoB)	EMB (EmbB)	ETH (EthA)	OFX (GyrA/GyrB)	KAN	CPM	AM (p.eis/rfs)	AM (PncA)	PASK	CS	
CladeA	2010	Санкт-Петербург St. Petersburg	223325153533424682454433	МЛУ MDR	s (-/c517t)	r (S315T)	r (S450L)	s	s	s	s	s	s	s (-/c517t)	r (T135P)	s	s
Clade B0/W148	2010	Новосибирск Novosibirsk	223325173533424672454433	МЛУ MDR	r (K43R/-)	r (S315T)	r (S450L)	r (M306V)	r (TA704T)	s	s	s	s	r (c-10t/-)	r (A171V)	s	s
CAO	2011	Санкт-Петербург St. Petersburg	223325153533424682454433	МЛУ MDR	r (K43R/-)	r (S315T)	r (S450L)	r (M306I)	s	s	s	s	s	s	r (T135P)	s	s
NK	2011	Санкт-Петербург St. Petersburg	223325163533424682454433	МЛУ MDR	r (K43R/-)	r (S315T)	r (S450L)	r	s	s	s	s	s	s	nd	s	s

**Примечание.** \*24 — VNTR: MIRU 2, MIRU 4, MIRU 10, MIRU 16, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 26, MIRU 27, MIRU 31, MIRU 39, MIRU 40, ETR A, ETR B, ETR C, QUB 11b, QUB 26, QUB 4156, Mtbub 04, Mtbub 21, Mtbub 29, Mtbub 30, Mtbub 34, Mtbub 39 [24]. \*\*STR — стрептомицин, INH — изониазид, RIF — рифампицин, EMB — этамбутол, ETH — этионамид, OFX — офлоксацин, KAN — канамицин, CPM — капреомидин, AM — амикацин, PASK — пара-аминосалициловая кислота, CS — циклосерин.  
Note. \*\*STR — streptomycin, INH — isoniazid, RIF — rifampicin, EMB — ethambutol, ETH — ethionamide, OFL — ofloxacin, KAN — kanamycin, CPM — capreomycin, AM — amikacin, PASK — para-aminosalicylate acid, CS — cycloserine.

- многочисленные субмилиарные (более 20) — 1,5;
- единичные милиарные — 1,75;
- многочисленные сливающиеся субмилиарные и единичные милиарные — 2,0;
- многочисленные милиарные (не более 10) — 2,25;
- многочисленные милиарные, сливающиеся — 2,75;
- появление мелких казеозных некротических фокусов — 3,0;
- обширный казеоз — 4,0;
- сплошное поражение легких — 5,0.

**Бактериологическое исследование.** Для определения высеваемости микобактерий осуществляли дозированный посев гомогенатов легких (0,1 г) и селезенки (целиком) на плотную яичную среду Левенштейна–Йенсена (Becton Dickinson, США) методом серийных разведений. Количество выросших колоний *M. tuberculosis* учитывали через 4 недели инкубации посевов при +37°C. Массивность роста микобактерий выражали в десятичных логарифмах (lg) от КОЕ на массу легких.

**Статистическая обработка.** Обработку результатов проводили с использованием пакета программ MS Excel 2010 (Microsoft). Достоверность различий оценили по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Бактериальные штаммы.** Суммарные характеристики включенных в исследование клинических штаммов генетического семейства Beijing приведены в таблице 1. Представленные образцы относились к «современным» Beijing внутри линии 2.2.1 по Coll с соавт. Проведенное VNTR-типирование позволило отнести штамм B0/W148 к типу 100–32, согласно международной базе данных MIRU-VNTRplus (www.miru-vntrplus.org). VNTR-профили штаммов CladeA и CAO не отличались друг от друга и относились к типу 94–32. Профиль некластеризующегося штамма отличался от профиля CladeA и CAO по локусу MIRU 26 и соответствовал типу 1076–32. В свою очередь согласно анализу профилей по 12-локусной системе [28] исследуемые образцы B0/W148, CladeA, CAO и NK относились к типам M11, M2, M2 и M33 соответственно.

Согласно проведенному бактериологическому тестированию все штаммы проявляли множественную лекарственную устойчивость, что в большинстве случаев подтвердилось генетически. В случае некластеризующегося штамма, проявившего фенотипическую резистентность к этамбутолу, наблюдалось несоответствие фенотипических и генетических данных. Известных генетических маркеров устойчивости к данному антибиотику выявлено не было.

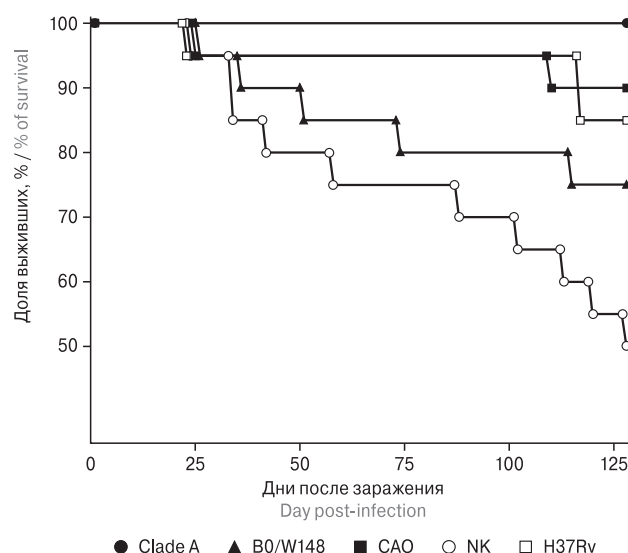


**Исследования выживаемости животных.** На мышах линии C57BL/6 проведена оценка выживаемости животных после заражения клиническими штаммами *M. tuberculosis* (n = 4) и лабораторным штаммом H37Rv. Естественную гибель животных регистрировали с первого по 128 день; кривые смертности в каждой группе мышей представлены на рисунке 1. Гибель мышей, инфицированных штаммами B0/W148, CAO, NK и H37Rv, начиналась с четвертой недели (23–25 дней). В то же время мыши, инфицированные штаммом CladeA, выживали спустя более 4 месяцев (128 дней). К концу наблюдения наибольшая гибель животных была зарегистрирована в группе мышей, зараженных штаммами NK и B0/W148.

Согласно общей оценке экспериментального туберкулеза, на 128 день наиболее тяжелое течение процесса наблюдалось у мышей, зараженных штаммом NK (3,81; p < 0,05). Значения индексов поражения легких у мышей, инфицированных штаммами B0/W148 (3,70) и H37Rv (3,69), были одинаковыми, но менее выражены, чем для штамма NK (p < 0,05). Соответствующий индекс поражения штаммом CladeA имел наименьшее значение по сравнению с другими исследуемыми штаммами (3,49; p < 0,05).

**Исследование вирулентности штаммов.** Согласно схеме, представленной в разделе «Материалы и методы», проведена сравнительная оценка вирулентности клинических штаммов *M. tuberculosis* (n = 4) и лабораторного штамма H37Rv. Группы мышей линии C57BL/6, инфицированные пятью различными бактериальными культурами, выводили из эксперимента на определенном сроке после заражения, предварительно проводя их взвешивание.

Анализ динамики изменения массы мышей показал, что заражение штаммами CladeA, B0/W148 и CAO не вызывало снижение массы животных, тогда как мыши, зараженные штаммами NK и H37Rv, первоначально набирали вес, а к 120 дню наблюдалось резкое снижение массы (табл. 2).



**Рисунок 1. Динамика смертности мышей линии C57BL/6, инфицированных исследуемыми штаммами микобактерий**

Figure 1. Survival of C57BL/6 mice infected with experimental mycobacterium strains. Mice were evaluated during 128 days post-infection

**Примечания.** Срок наблюдения — 128 дней. Данные представлены в % к исходному числу мышей в группах наблюдения.

Notes. Data are presented as percentage of mice relative to the baseline assessed in experimental groups

Согласно результатам анализа экссудативных изменений все штаммы вызывали появление единичных безвоздушных очагов в легких начиная с третьего дня после заражения. Данная картина сохранялась без существенных изменений до 120 дня заболевания для штамма B0/W148. В случае заражения штаммом CAO легкие мыши становились безвоздушными на  $\frac{1}{2}$  и  $\frac{2}{3}$ , начиная с 60 дня после заражения. При инфицировании штаммом NK такие же изменения регистрировались с 21 дня, а для штамма CladeA лишь на 120 день. В свою очередь, для штамма H37Rv

**Таблица 2. Динамика изменения массы тела у мышей линии C57BL/6 на разных сроках после заражения исследуемыми штаммами *M. tuberculosis***

Table 2. Dynamics of body mass change of the C57BL/6 mice at different days after infection with the *M. tuberculosis* studied strains

Дни после заражения Days after infection	Масса тела мышей, г/Mice body mass, g				
	Штаммы <i>M. tuberculosis</i> /M. tuberculosis strains				
	Clade A	Clade B	Clade C	NK	H37Rv
1	21,4±0,8	22,2±0,6	20,5±0,04	21,1±0,66	19,86±0,48
3	20,4±0,6	21,4±0,8	20,7±0,74	20,6±0,59	19,47±0,55
7	22,4±0,3	22,1±0,8	20,5±0,21	18,3±1,2	20,33±0,64
14	23,0±0,5	22,0±0,9	21,4±0,35	22,2±0,3	20,4±0,66
21	24,5±0,5	23,2±0,7	22,5±0,27	22,4±0,57	21,8±0,44
28	24,5±0,6	26,1±0,4	24,1±0,50	23,8±0,8	22,5±0,66
60	27,4±0,66	25,7±1,21	23,2±0,59	28,1±0,62	25,3±0,87
120	27,3±0,64	28,5±0,82	24,2±0,75	19,7±1,38	22,8±1,17

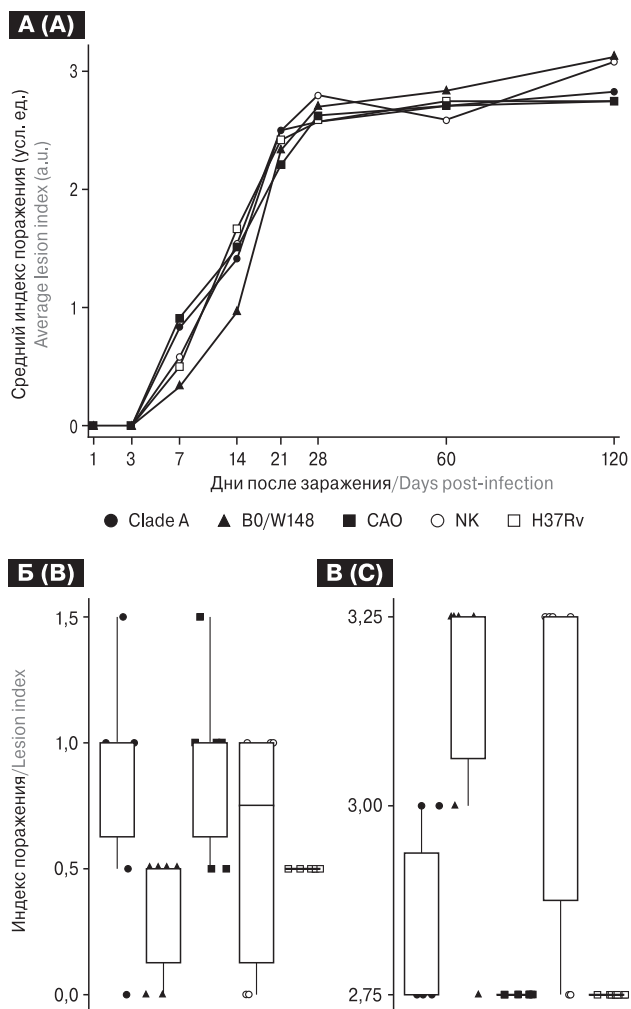
у части мышей легкие были воздушны до 28 дня, однако на 120 день у всех наблюдались сильные изменения, вплоть до полной безвоздушности легкого.

Продуктивные изменения в легких протекали одинаково в первую неделю развития инфекционного процесса (рис. 2). При этом в случае инфицирования штаммами CladeA, CAO и NK в легких выявлялись многочисленные субмилиарные очаги, а при заражении штаммами B0/

W148 и H37Rv — единичные. В дальнейшем для всех штаммов наблюдалось прогрессирование инфекционного процесса с образованием многочисленных милиарных очагов на 21 день после заражения, которые начинали сливаться к 28 дню.

Наиболее выраженные продуктивные изменения в легких регистрировались в случае инфицирования штаммами B0/W148 и NK. На 60 день было выявлено преобладание казеозных некротических фокусов, а к 120 дню обнаруживались крупные фокусы казеозной пневмонии. У мышей, зараженных штаммами CladeA, CAO и H37Rv, наблюдались менее выраженные некротические изменения в легких. Развитие процесса к 120 дню характеризовалось появлением милиарных сливающихся очагов, а в случае CladeA наблюдалось появление мелких казеозных некротических фокусов.

Высеваемость *M. tuberculosis* из легких зараженных мышей на 21 день достоверно отличалась для всех штаммов (рис. 3). Согласно полученным данным, бактериальная нагрузка увеличивалась до 21 дня и затем сохранялась до 60 дня в случае инфицирования штаммами CladeA и B0/W148, что указывало на временное ингибирующее действие приобретенного иммунитета хозяина (мыши), устанавливающегося через 3–4 недели после заражения. В случае заражения штаммами CAO, NK и H37Rv бактериальная нагрузка в легких непрерывно увеличивалась, начиная с 7 дня заражения. При этом бактериальная нагрузка в селезенке для штаммов CAO и H37Rv увеличивалась до 21 дня, а затем снижалась. В свою очередь, для штамма NK бактериальная нагрузка в селезенке также увеличивалась до 21 дня, после чего наблюдалась стабилизация, а затем вновь повышалась к 120 дню заражения. Суммарно максимальная бактериальная нагрузка как в легких, так и в селезенке на терминальной стадии заражения наблюдалась в случае инфицирования штаммами NK и H37Rv.



**Рисунок 2. Значения индексов продуктивных изменений (условные единицы) легких у мышей линии C57BL/6 после заражения исследуемыми штаммами *M. tuberculosis***

Figure 2. Productive changes index (arbitrary units) in the lungs of C57BL/6 mice infected with *M. tuberculosis* strains

A) Средние значения индексов поражений с первого по 120 день после инфицирования. Значения индексов поражений на Б) 7 день после заражения и В) 120 день после заражения. Каждый символ соответствует значению для одной мыши.

A) Average lesion intensity examined within 1–120 dpi.

B) Average lesion intensity examined on 7 and

C) 120 dpi. Each symbol denotes an individual mouse.

## Обсуждение

Впервые представители генотипа Beijing были обнаружены в 90-х гг. XX в., в двух независимых исследованиях, проведенных группами исследователей из Голландии и Америки [10, 39]. При этом название как нельзя лучше отражает реальное место зарождения генотипа. Штаммы генотипа Beijing наиболее часто встречаются в Восточной Азии [25], а также ассоциированы с многочисленными вспышками заболеваний во всем мире, многие из которых были вызваны лекарственно устойчивыми клонами [8, 17]

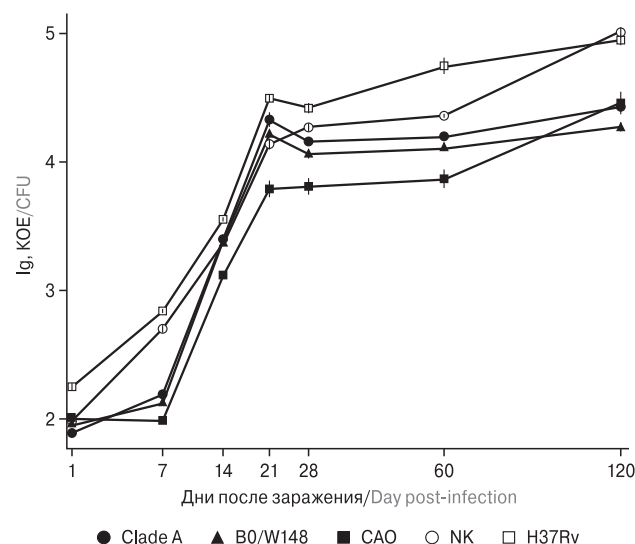
Как упоминалось ранее, доля Beijing в структуре популяции патогена в России занимает 50–80%. На основании VNTR- и SNP-анализа представители данного генотипа могут быть разделены на несколько превалирующих кластеров:

B0/W148, CladeA и CAO [23, 26, 33, 36]. При этом CladeA и CAO относятся к одному VNTR-типу 94–32 и зачастую объединяются в единый кластер Central Asia [12, 23]. В свою очередь, кластер B0/W148 относится к типу 100–32. Изоляты описываемых групп зачастую демонстрируют высокую трансмиссивность, ассоциацию с лекарственной устойчивостью и преобладают среди пациентов с тяжелыми формами заболевания. При этом работы по исследованию вирулентности штаммов кластеров противоречивы либо совсем отсутствуют.

В исследовании были использованы 3 клинических штамма *M. tuberculosis*, относящиеся к кластерам B0/W148, CladeA и CAO. В работу также вошли лабораторный штамм H37Rv и некластеризующийся штамм NK генотипа Beijing. Последний относился к VNTR-типу 1076–32. Надо отметить, что генетически образец NK принадлежал кластеру Central Asia, но не относился к CladeA и CAO, а также не соответствовал высокотрансмиссивным штаммам.

Включенные в исследование клинические штаммы генотипа Beijing обладали схожим профилем фенотипической и генетической лекарственной устойчивости, что позволило минимизировать диспропорцию в экспериментальных данных, вызванную снижением жизнеспособности лекарственно-устойчивых бактерий. В частности, в модельных экспериментах на морских свинках было продемонстрировано снижение вирулентности у изониазид-устойчивых штаммов [9, 33], схожие закономерности были найдены в случае устойчивости к рифампицину [16, 24], аминогликозидам [15, 34] и фторхинолонам [31].

В ходе исследований по оценке выживаемости было установлено, что наибольшая смертность наблюдалась в группе животных, инфицированных штаммами NK (50%) и B0/W148 (25%) (рис. 1). В то же время все мыши, инфицированные штаммом CladeA, оставались живыми до финального дня эксперимента (128 день), что свидетельствует о наименьшей вирулентности штамма. Анализ распространенности специфического поражения легких у мышей с экспериментальным туберкулезом на 128 день показал, что все штаммы имели характерные патогенные свойства, то есть были способны вызывать туберкулезный процесс. Стоит отметить, что наиболее тяжелое течение заболевания наблюдалось в случае инфицирования штаммом NK, что согласуется с данными летальности. В свою очередь, наименьшие изменения были выявлены в случае заражения штаммами CladeA и CAO. Тяжесть течения экспериментального туберкулеза при заражении штаммами B0/W148 и H37Rv была несколько ниже, чем в случае NK, за счет меньшей выраженности некротических процессов в легких мышей. Полученные результаты разнятся с ис-



**Рисунок 3. Динамика обсемененности (lg числа КОЕ) легких у мышей линии C57BL/6 на разных сроках после заражения исследуемыми штаммами *M. tuberculosis***

Figure 3. Time-dependent lung bacterial burden in C57BL/6 mice infected with *M. tuberculosis* strains

следованием Ribeiro с соавторами, согласно которому штамм H37Rv обладал наименьшими вирулентными свойствами по отношению к представителям генотипа Beijing и не вызывал столь значительных патологических изменений [30]. Объяснением может служить тот факт, что в исследованиях различных лабораторий могут использоваться субпопуляции референсного штамма, немного отличающиеся генетически, и, как следствие, фенотипически [11, 32].

Оценка динамики развития очагов специфического воспаления в легких также выявила различия между штаммами. Прогрессивное развитие туберкулезного процесса наблюдалось у мышей, инфицированных изолятами B0/W148 и NK. Через 60 дней после заражения штаммами были выявлены многочисленные милиарные сливающиеся очаги. К 120 дню крупные фокусы казеозной пневмонии, сливаясь, занимали целые доли легкого. В то же время при инфицировании штаммами CladeA, CAO и H37Rv наблюдалась стабилизация процесса и менее выраженное повреждение органов.

Согласно полученным данным, бактериальная нагрузка после заражения кластеризующимися штаммами семейства Beijing была ниже таковой для штамма H37Rv, который использовался как референсный. Исключением являлся штамм NK, бактериальная нагрузка для которого являлась самой высокой среди семейства Beijing и была сопоставима с H37Rv к 120 дню инфицирования. Следует отметить, что обсемененность легких была наименьшей в случае с B0/W148. При этом высеваемость данного штамма из органов мыши была стабильной с 21

по 120 день инфицирования. Принимая во внимание высокую летальность мышей, прогрессирование и тяжесть инфекции, можно сделать предположение, что высокая вирулентность B0/W148 обусловлена в большей степени способностью штамма вызывать патологические изменения в органах и тканях, чем нарастанием бактериальной нагрузки.

Таким образом, результаты экспериментов *in vivo* показали, что штаммы семейства Beijing различаются между собой и могут быть как более, так и менее вирулентными, чем лабораторный штамм H37Rv. При этом, к нашему удивлению, наибольшую вирулентность продемонстрировал штамм НК, по литературным данным относящийся к нетрансмиссивным штаммам. Полученный результат разнится с исследованиями зарубежных коллег [8, 18, 22], в которых показана высокая вирулентность трансмиссивных штаммов по отношению к спорадическим. В свою очередь, в исследовании Ribeiro с соавт. [30] было показано, что некоторые штаммы Beijing из стран с низкой встречаемостью гено-

типа могут демонстрировать вирулентные свойства, схожие с эндемичными высокотрансмиссивными штаммами того же семейства.

## Заключение

Представленное исследование подтверждает, что штаммы генотипа Beijing демонстрируют различный спектр фенотипической вирулентности. Последнее свидетельствует о том, что в разных субпопуляциях могут существовать как более, так и менее трансмиссивные штаммы. Более того, нами показано, что кластер B0/W148, известный как наиболее вирулентный, обладает схожим уровнем вирулентности со штаммом НК. В то же время механизмы, за счет которых штаммами реализуется различный уровень вирулентности и трансмиссивности, не до конца расшифрованы. В связи с этим необходимы дальнейшие сравнительные геномные, протеомные и транскриптомные исследования, которые позволят объяснить механизмы, лежащие в основе наблюдаемых различий.

## Список литературы/References

1. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. Влияние генотипа *M. tuberculosis* на выживаемость мышей при экспериментальном туберкулезе // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2007. Т. 84, № 7. С. 45–50. [Andreevskaya S.N., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Kuz'min A.V. Impact of *Mycobacterium tuberculosis* genotype on survival in mice with experimental tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2007, vol. 84, no. 7, pp. 45–50. (In Russ.)]
2. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. Изучение *ex vivo* роста в макрофагах штаммов разных генотипических кластеров // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2006. Т. 83, № 12. С. 43–48. [Andreevskaya S.N., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Kuz'min A.V. Examining the *ex vivo* growth in the macrophages of *Mycobacterium tuberculosis* of various genotypic clusters. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2006, vol. 83, no. 12, pp. 43–48. (In Russ.)]
3. Вишневецкий Б.И., Нарвская О.В., Васильева С.Н., Сапожникова Н.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф. Вирулентность микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза. 2002. Т. 79, № 10. С. 33–36. [Vishnevskiy B., Narvskaya O.V., Vasil'eva S.N., Sapozhnikova N.V., Mukrousov I.V., Otten T.F. Virulence of *Mycobacteria tuberculosis*. *Problemy tuberkuleza = Problems of Tuberculosis*, 2002, vol. 79, no. 10, pp. 33–36. (In Russ.)]
4. Земскова З.С., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н. Экспериментальный туберкулез, вызванный штаммами *M. tuberculosis* генотипических кластеров W, AI и HD. Туберкулез и болезни легких. 2010. Т. 87, № 3. С. 41–46. [Zemskova Z.S., Andreyevskaya S.N., Smirnova T.G., Larionova Y.Y., Chernousova L.N. Experimental tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* strains of genotypical W, AI, and HD clusters. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2010, vol. 87, no. 3, pp. 41–46. (In Russ.)]
5. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Вишневецкий Б.И. Генетическое маркирование полирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на Северо-Западе России // Проблемы туберкулеза. 1999. Т. 79, № 3. С. 39. [Narvskaya O.V., Mukrousov I.V., Otten T.F., Vishnevskiy B.I. Genetic labeling of *Mycobacterium tuberculosis* poliresistant strains isolated in North-West Russia. *Problemy tuberkuleza = Problems of Tuberculosis*, 1999, vol. 79, no. 3, p. 39. (In Russ.)]
6. Нечаева О.Б. Основные показатели по туберкулезу в Российской Федерации. 2017. [Nechaeva O.B. The main indicators for tuberculosis in the Russian Federation. 2017. (In Russ.)]
7. Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Земскова З.С., Ларионова Е.Е. Биологические свойства штаммов *M. tuberculosis* кластера W // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2008. Т. 85, № 10. С. 45–50. [Chernousova L.N., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Zemskova Z.S., Larionova E.E. Biological properties of *Mycobacterium tuberculosis* W cluster strains. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2008, vol. 85, no. 10, pp. 45–50. (In Russ.)]
8. Aguilar L.D., Hanekom M., Mata D., Gey van Pittius N.C., van Helden P.D., Warren R.M., Hernandez-Pando R. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis*, 2010, vol. 90, no. 5, pp. 319–325.
9. Barnett M., Busby S.R., Mitchison D.A. Tubercle bacilli resistant to isoniazid: virulence and response to treatment with isoniazid in guinea-pigs and mice. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1953, vol. 34, no. 5, pp. 568–81.
10. Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.*, 2002, vol. 10, no. 1, pp. 45–52.



11. Borrell S., Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, vol. 17, no. 6, pp. 815–820.
12. Casali N., Nikolayevskyy V., Balabanova Y., Harris S.R., Ignatyeva O., Kontsevaya I., Corander J., Bryant J., Parkhill J., Nejentsev S., Horstmann R.D., Brown T., Drobniewski F. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat. Genet.*, 2014, vol. 46, no. 3, pp. 279–286.
13. Cox H.S., Kubica T., Doshetov D., Kebede Y., Rüsç-Gerdess S., Niemann S. The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia. *Respir. Res.*, 2005, vol. 6, no. 1, p. 134.
14. Dormans J., Burger M., Aguilar D., Hernandez-Pando R., Kremer K., Roholl P., Arend S.M., van Soolingen D. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, vol. 137, no. 3, pp. 460–468.
15. Freihofer P., Akbergenov R., Teo Y., Juskeviciene R., Andersson D.I., Böttger E.C. Nonmutational compensation of the fitness cost of antibiotic resistance in mycobacteria by overexpression of tlyA rRNA methylase. *RNA*, 2016, vol. 22, no. 12, pp. 1836–1843.
16. Gagneux S., Long C.D., Small P.M., Van T., Schoolnik G.K., Bohannan B.J. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2006, vol. 312, no. 5782, pp. 1944–1946.
17. Hanekom M., Gey van Pittius N.C., McEvoy C., Victor T.C., Van Helden P.D., Warren R.M. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis*, 2011, vol. 91, no. 6, pp. 510–523.
18. Kozak R.A., Alexander D.C., Liao R., Sherman D.R., Behr M.A. Region of difference 2 contributes to virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, no. 1, pp. 59–66.
19. Kubica T., Rüsç-Gerdess S., Niemann S. The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2004, vol. 8, no. 9, pp. 1107–13.
20. Lasunskaja E., Ribeiro S.C.M., Manicheva O., Gomes L.L., Suffys P.N., Mokrousov I., Ferrazoli L., Andrade M.R.M., Kritski A., Otten T., Kipnis T.L., da Silva W.D., Vishnevsky B., Oliveira M.M., Gomes H.M., Baptista I.F., Narvskaya O. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect.*, 2010, vol. 12, no. 6, pp. 467–475.
21. Lipin M.Y., Stepanshina V.N., Shemyakin I.G., Shinnick T.M., Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007, vol. 13, no. 6, pp. 620–626.
22. Marquina-Castillo B., García-García L., Ponce-de-León A., Jimenez-Corona M.-E., Bobadilla-del Valle M., Cano-Arellano B., Canizales-Quintero S., Martínez-Gamboa A., Kato-Maeda M., Robertson B., Young D., Small P., Schoolnik G., Sifuentes-Osornio J., Hernandez-Pando R. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology*, 2009, vol. 128, no. 1, pp. 123–133.
23. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E., Blum M.G., Rüsç-Gerdess S., Mokrousov I., Aleksic E., Allix-Béguec C., Antierens A., Augustynowicz-Kopec E., Ballif M., Barletta F., Beck H.P., Barry C.E., Bonnet M., Borroni E., Campos-Herrero I., Cirillo D., Cox H., Crowe S., Crudu V., Diel R., Drobniewski F., Fauville-Dufaux M., Gagneux S., Ghebremichael S., Hanekom M., Hoffner S., Jiao W.W., Kalon S., Kohl T.A., Kontsevaya I., Lillebæk T., Maeda S., Nikolayevskyy V., Rasmussen M., Rastogi N., Samper S., Sanchez-Padilla E., Savic B., Shamputa I.C., Shen A., Sng L.H., Stakenas P., Toit K., Varaine F., Vukovic D., Wahl C., Warren R., Supply P., Niemann S., Wirth T. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat. Genet.*, 2015, vol. 47, no. 3, pp. 242–249.
24. Middlebrook G., Cohn M.L. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science*, 1953, vol. 118, no. 3063, pp. 297–299.
25. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 2, pp. 342–360.
26. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Millet J., Otten T., Vishnevsky B., Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem-repeat loci. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 11, pp. 3576–3584.
27. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., Filipenko M.L., Sola C., Rastogi N., Steklova L., Vishnevskiy B., Narvskaya O. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2003, vol. 22, no. 6, pp. 342–348.
28. Mokrousov I., Nash O. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis*, 2015, vol. 95, pp. 167–176.
29. Pheiffer C., Betts J.C., Flynn H.R., Lukey P.T., van Helden P. Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*, 2005, vol. 151, no. 4, pp. 1139–1150.
30. Ribeiro S.C.M., Gomes L.L., Amaral E.P., Andrade M.R.M., Almeida F.M., Rezende A.L., Lanes V.R., Carvalho E.C.Q., Suffys P.N., Mokrousov I., Lasunskaja E.B. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 7, pp. 2615–2624.
31. Sander P., Springer B., Prammananan T., Sturmfels A., Kappler M., Pletschette M., Böttger E.C. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, no. 5, pp. 1204–1211.
32. Senaratne R.H., Sidders B., Sequeira P., Saunders G., Dunphy K., Marjanovic O., Reader J.R., Lima P., Chan S., Kendall S., McFadden J., Riley L.W. *Mycobacterium tuberculosis* strains disrupted in mce3 and mce4 operons are attenuated in mice. *J. Med. Microbiol.*, 2008, vol. 57, no. 2, pp. 164–170.
33. Shitikov E., Kolchenko S., Mokrousov I., Bespyatykh J., Ischenko D., Ilina E., Govorun V. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1.
34. Song T., Park Y., Shamputa I.C., Seo S., Lee S.Y., Jeon H.S., Choi H., Lee M., Glynne R.J., Barnes S.W., Walker J.R., Batalov S., Yusim K., Feng S., Tung C.S., Theiler J., Via L.E., Boshoff H.I., Murakami K.S., Korber B., Barry C.E., Cho S.N. Fitness costs of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* are amplified under conditions of nutrient starvation and compensated by mutation in the  $\beta'$  subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.*, 2014, vol. 91, no. 6, pp. 1106–1119.

35. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsche-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C., van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 12, pp. 4498–4510.
36. Surikova O.V., Voitech D.S., Kuzmicheva G., Tatkov S.I., Mokrousov I.V., Narvskaya O.V., Rot M.A., van Soolingen D., Filipenko M.L. Efficient differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci. *Eur. J. Epidemiol.*, 2005, vol. 20, no. 11, pp. 963–974.
37. Toungousova O.S., Sandven P., Mariandyshv A.O., Nizovtseva N.I., Bjune G., Caugant D.A. Spread of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, vol. 40, no. 6, pp. 1930–1937.
38. Van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P., Martin C., McAdam R., Shinnick T.M. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 2, pp. 406–409.
39. Van Soolingen D., Qian L., de Haas P.E., Douglas J.T., Traore H., Portaels F., Qing H.Z., Enkhsaikan D., Nymadawa P., van Embden J.D. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, no. 12, pp. 3234–3238.

**Авторы:**

**Беспятых Ю.А.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины (ФНКЦ ФХМ) ФМБА России, Москва, Россия;

**Виноградова Т.И.**, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, координатор направления «Экспериментальный туберкулез и инновационные технологии», Санкт-Петербург, Россия;

**Маничева О.А.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Заболотных Н.В.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Догондзе М.З.**, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Витовская М.Л.**, к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Гуляев А.С.** к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия;

**Журавлев В.Ю.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, координатор направления «Лабораторная диагностика», Санкт-Петербург, Россия;

**Шитиков Е.А.**, к.б.н., и.о. зав. лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия;

**Ильина Е.Н.**, д.б.н., профессор РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия.

**Authors:**

**Bespyatykh J.A.**, PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation;

**Vinogradova T.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

**Manicheva O.A.**, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

**Zabolotnykh N.V.**, PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

**Dogonadze M.Z.**, PhD (Biology), Senior Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

**Vitovskaya M.L.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

**Guliaev A.S.**, PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation;

**Zhuravlev V.Yu.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

**Shitikov E.A.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation;

**Iilina E.N.**, PhD, MD (Biology), RAS Professor, Deputy Director for Science, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation.