

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ГИПЕРВИРУЛЕНТНОГО СУБТИПА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BEIJING 14717-15



И.В. Мокроусов<sup>1</sup>, А.А. Вязовая<sup>1</sup>, М.В. Бадлеева<sup>2</sup>, А.А. Герасимова<sup>1</sup>,  
О.Б. Белопольская<sup>3</sup>, А.Э. Машарский<sup>3</sup>, И.В. Костюкова<sup>4</sup>, С.Н. Жданова<sup>5</sup>,  
Р.С. Мударисова<sup>1</sup>, И. Авадэний<sup>1,6</sup>, Н.С. Соловьева<sup>6</sup>, Д.А. Найзабаева<sup>7,8</sup>,  
Ю.А. Скиба<sup>7</sup>, В.Ю. Журавлев<sup>6</sup>, О.А. Пасечник<sup>9</sup>, О.Б. Огарков<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия, Россия

<sup>3</sup> РЦ «Центр Биобанк» — Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> БУЗОО Клинический противотуберкулезный диспансер, г. Омск, Россия

<sup>5</sup> ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

<sup>6</sup> ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

<sup>7</sup> Филиал Национального центра биотехнологии в г. Алматы, г. Алматы, Казахстан

<sup>8</sup> Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

<sup>9</sup> ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия

**Резюме.** Цель исследования — разработка метода для выявления штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, относящихся к высоколетальному, гипервирулентному и мультирезистентному кластеру Beijing 14717-15 и его применение для скрининга ретроспективных коллекций *M. tuberculosis* из различных регионов России. Изученная коллекция включала образцы ДНК *M. tuberculosis*, собранные в результате популяционных исследований. Сполитотипирование и генотипирование 24 локусов вариабельного числа tandemных повторов проводили по стандартным протоколам. Филогенетический анализ проводили на основе данных полногеномного секвенирования. Полиморфизм в геномной позиции 2423040 A > G, специфический для кластера Beijing 14717-15 (согласно номенклатуре MIRU-VNTRplus.org), выявляли с использованием метода ПЦР-ПДРФ и рестриктазы *HhaI*. Проведенный биоинформационный и филогенетический анализ данных полногеномного секвенирования 205 штаммов ранней древней сублинии генотипа Beijing *M. tuberculosis* показал, что штаммы с профилем VNTR 14717-15 и близкие ему группировались в монофилетический кластер родственных штаммов, который мы определили как Beijing 14717-15-кластер. Среди SNP, специфичных для кластера 14717-15, мы выбрали функционально нейтральный SNP в геномной позиции 2423040 A > G (*Rv2161c* Val33Ala) и разработали метод его детекции в формате ПЦР-ПДРФ. Далее этот метод был применен для скрининга коллекций ДНК из регионов Европейской и Азиатской частей России и стран Азии. Результаты демонстрируют присутствие штаммов

#### Адрес для переписки:

Мокроусов Игорь Владиславович  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.  
Тел.: 8 (812) 644-63-80.  
E-mail: imokrousov@mail.ru

#### Contacts:

Igor V. Mokrousov  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,  
St. Petersburg Pasteur Institute.  
Phone: +7 (812) 644-63-80.  
E-mail: imokrousov@mail.ru

#### Для цитирования:

Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Бадлеева М.В., Герасимова А.А.,  
Белопольская О.Б., Машарский А.Э., Костюкова И.В., Жданова С.Н.,  
Мударисова Р.С., Авадэний И., Соловьева Н.С., Найзабаева Д.А.,  
Скиба Ю.А., Журавлев В.Ю., Пасечник О.А., Огарков О.Б. Молекулярная  
детекция и филогеография гипервирулентного субтипа *Mycobacterium  
tuberculosis* Beijing 14717-15 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1.  
С. 91–99. doi: 10.15789/2220-7619-MDA-2082

#### Citation:

Mokrousov I.V., Vyazovaya A.A., Badleeva M.V., Gerasimova A.A.,  
Belopolskaya O.B., Masharsky A.E., Kostyukova I.V., Zhdanova S.N.,  
Mударисова R.S., Avadenii I., Solovieva N.S., Naizabayeva D.A., Skiba Yu.A.,  
Zhuravlev V.Yu., Pasechnik O.A., Ogarkov O.B. Molecular detection and  
phylogeography of the hypervirulent subtype of *Mycobacterium tuberculosis*  
Beijing 14717-15 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya  
i immunitet, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 91–99. doi: 10.15789/2220-7619-MDA-2082

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант 19-14-00013).

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 19-14-00013).

кластера Beijing 14717-15 только в Азиатской части России с пиком в Бурятии (18%). Таким образом, нами разработан метод детекции гипervирулентного и высоколетального генетического кластера *M. tuberculosis* Beijing 14717-15 на основе выявления специфической мутации в гене *Rv2161c* с помощью ПЦР с последующей HhaI-рестрикцией продукта ПЦР и электрофорезом в агарозном геле для дискриминации дикого и мутантного аллелей. Преимуществами предлагаемого способа являются быстрота, простая и однозначная интерпретация результатов, возможность выявления контаминации и микст-инфекции, пригодность для производительного анализа больших коллекций штаммов *M. tuberculosis*.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, полногеномное секвенирование, вирулентность, генотип Beijing, множественная лекарственная устойчивость.

## MOLECULAR DETECTION AND PHYLOGEOGRAPHY OF THE HYPERVIRULENT SUBTYPE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BEIJING 14717-15

Mokrousov I.V.<sup>a</sup>, Vyazovaya A.A.<sup>a</sup>, Badleeva M.V.<sup>b</sup>, Gerasimova A.A.<sup>a</sup>, Belopolskaya O.B.<sup>c</sup>, Masharsky A.E.<sup>c</sup>, Kostyukova I.V.<sup>d</sup>, Zhdanova S.N.<sup>e</sup>, Mudarisova R.S.<sup>a</sup>, Avadenii I.<sup>a,f</sup>, Solovieva N.S.<sup>f</sup>, Naizabayeva D.A.<sup>g,h</sup>, Skiba Yu.A.<sup>g</sup>, Zhuravlev V.Yu.<sup>f</sup>, Pasechnik O.A.<sup>i</sup>, Ogarkov O.B.<sup>d</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Dorzhi Banzarov Buryat State University, Ulan-Ude, Buryatia, Russian Federation

<sup>c</sup> Resource Center "Bio-bank Center", Research Park of St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Clinical Anti-tuberculosis Dispensary, Omsk, Russian Federation

<sup>e</sup> Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

<sup>f</sup> St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>g</sup> Almaty Branch of National Center for Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

<sup>h</sup> Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

<sup>i</sup> Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

**Abstract.** Aim. To develop a method for detecting *Mycobacterium tuberculosis* strains belonging to highly lethal, hypervirulent, multidrug-resistant Beijing 14717-15-cluster to be applied to screen for *M. tuberculosis* retrospective collections obtained from various regions of Russia. The collection included *M. tuberculosis* DNA samples obtained during population studies. Spoligotyping and genotyping of 24 variable number tandem repeats loci were performed according to standard protocols. Phylogenetic analysis was based on the whole genome sequencing data. Polymorphism at the genomic position 2423040 A > G, specific for the Beijing 14717-15 cluster, was detected using PCR-RFLP and HhaI restriction enzyme. The bioinformatic and phylogenetic analysis of whole genome sequencing data for 205 strains of the early ancient sublineage of the *M. tuberculosis* Beijing genotype showed that strains with the VNTR 14717-15 profile (according to MIRU-VNTRplus.org) and those close to it were grouped into one monophyletic cluster of related strains, which we defined as Beijing 14717-15-cluster. Among the SNPs specific for the 14717-15 cluster, we chose a functionally neutral SNP at the genomic position 2423040 A > G (*Rv2161c* Val33Ala) and developed a method for its detection in the PCR-RFLP format. Next, we applied this method to screening DNA collections from the regions of the European and Asian parts of Russia and Asian countries. The data demonstrate the presence of strains of the Beijing 14717-15 cluster only in the Asian region of Russia peaking in Buryatia (18%). We have developed a method for detection of the hypervirulent and highly lethal genetic cluster *M. tuberculosis* Beijing 14717-15 based on detection of the specific mutation in the *Rv2161c* gene using PCR followed by HhaI restriction of the PCR product and agarose gel electrophoresis to discriminate between wild-type and mutant alleles. The advantages of the proposed method are the speed, simple and unambiguous data interpretation, opportunity to detect contamination and mixed infection, suitability for efficient analysis of large collections of *M. tuberculosis* strains.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, whole genome sequencing, virulence, Beijing genotype, multidrug resistance.

## Введение

Патобиология штамма (устойчивость к антибиотикам, вирулентность, выживаемость, иммуногенность) является ключевым фактором формирования структуры популяции *Mycobacterium tuberculosis*, которая, в свою очередь, определяет эпидемическую ситуацию по туберкулезу. Клиническая значимость структуры популяции *M. tuberculosis* состоит в том, что отдельные генетические варианты имеют

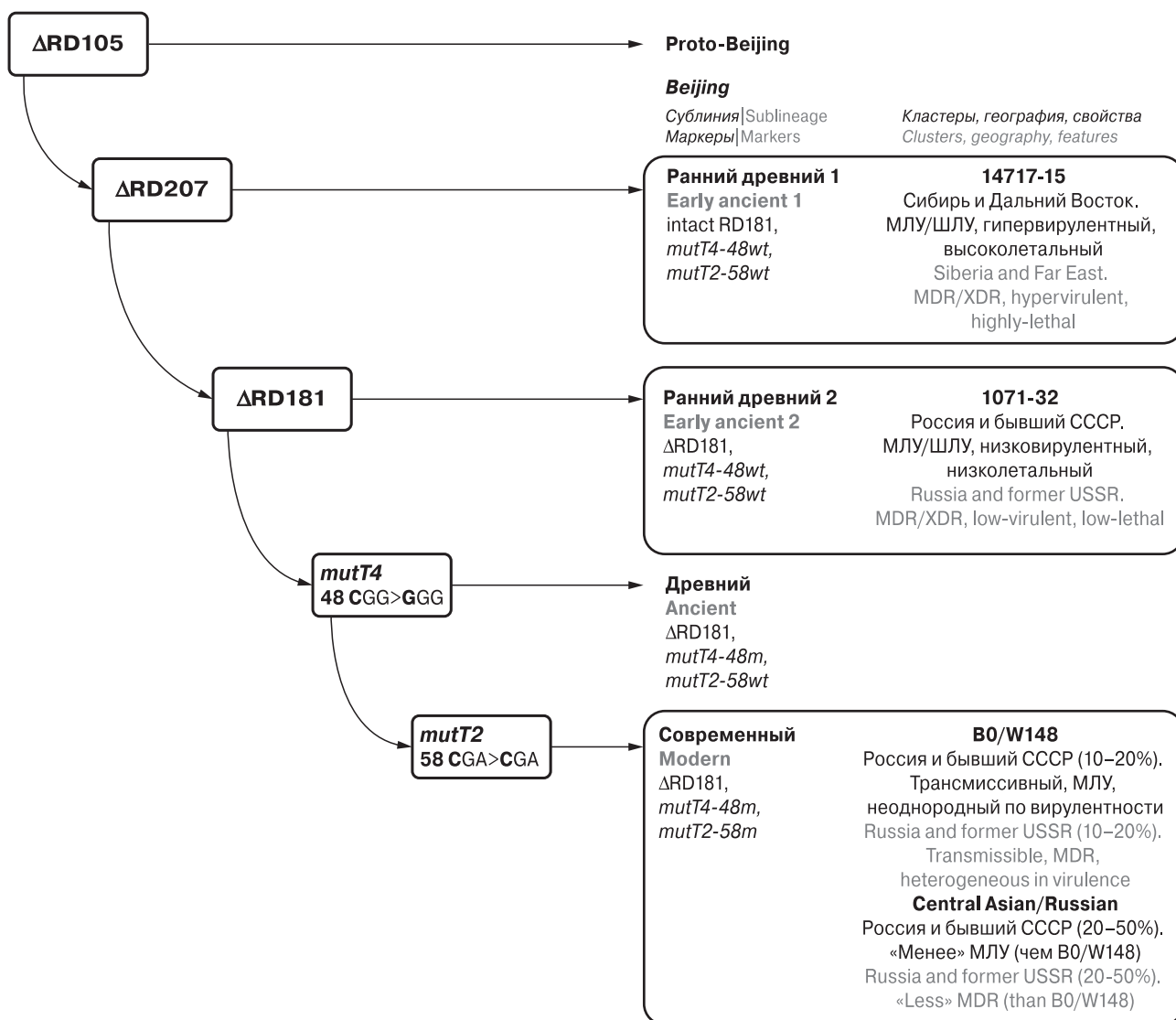
большее клиническое и/или эпидемиологическое значение, чем другие. Вид *M. tuberculosis* включает несколько крупных филогенетических линий, и генотип Beijing (основной компонент Восточно-Азиатской линии) является одним из наиболее изученных [6, 9, 11]. Генотип Beijing разделяют на две ветви или сублинии — более гетерогенную предковую/древнюю и эволюционно более молодую современную. Предыдущие исследования показали связь сублиний Beijing с различными патологическими

и клиническими проявлениями, которые влияют на трансмиссивность конкретных штаммов в человеческих популяциях. В рамках генотипа Beijing его древние и современные штаммы различаются по вирулентности, что также частично зависит от происхождения штамма.

Современная сублиния распространена по всему миру и включает несколько хорошо известных эпидемических или эндемических генетических кластеров штаммов. Напротив, штаммы древней сублинии генотипа Beijing редко встречаются за пределами Восточной Азии. Недавно два генетических кластера этой сублинии были обнаружены в азиатской части России (типы 1071-32 и 14717-15, согласно номенклатуре ресурса MIRU-VNTRplus.org), и оба были ассоциированы с множественной

лекарственной устойчивостью (МЛУ) [14]. Положение данных кластеров в рамках глобальной филогении генотипа Beijing показано на рис. 1. Один из кластеров, обозначенный как 1071-32, относительно распространен в Омске, Сибирь (7%), и встречается спорадически в разных регионах России с середины 1990-х гг., также его единичные изоляты выявлены в Восточной и Южной Европе [15]. Второй кластер 14717-15 был обнаружен только в азиатской части России, где он показал нарастающий градиент от 2,6% в Омске, Западная Сибирь, до 16% в Бурятии, Дальний Восток [13].

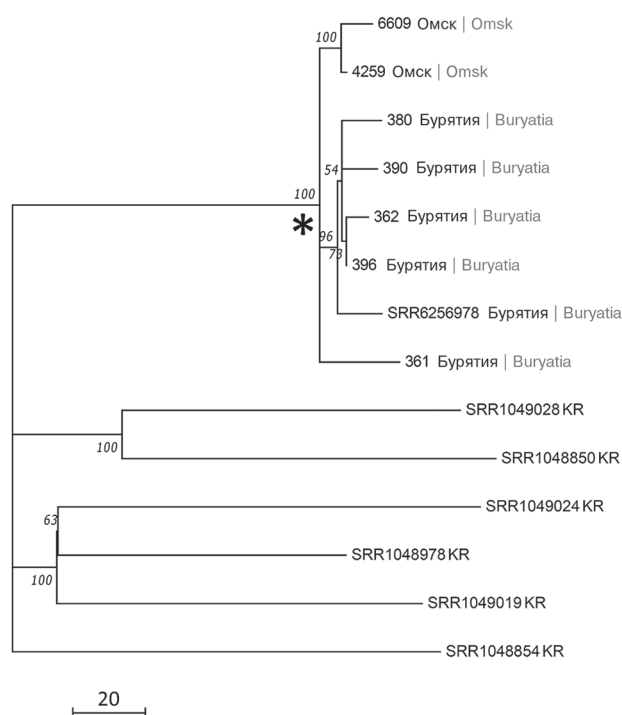
В мышинной модели штаммы этих кластеров проявили противоположные свойства [21]. Штамм 396 (14717-15-кластер из Бурятии, Дальний Восток) приводил к очень высокой смерт-



**Рисунок 1. Схема эволюции генотипа Beijing Mycobacterium tuberculosis, включая основные российские субтипы**

Figure 1. Scheme of the evolution of the Beijing *Mycobacterium tuberculosis* genotype, including the main Russian subtypes

ности, большей потере веса, более высокой бактериальной нагрузке и более тяжелой патологии легких. Сравнение с опубликованными данными по другим российским эпидемическим штаммам генотипа Beijing (B0/W148, CAO, Central Asian/Russian [1]), показало, что штамм 396 продемонстрировал наивысшую смертность, таким образом являясь наиболее летальным (в мышинной модели) российским штаммом *M. tuberculosis*. При этом ретроспективное исследование больных в Омской области показало, что группа пациентов, инфицированных кластером Beijing 14717-15, имела и самую высокую долю летального исхода по сравнению с другими группами [12].



**Рисунок 2. Дендрограмма штаммов древней сублинии генотипа Beijing из России и Кореи, построенная на основе полногеновых SNP с использованием алгоритма максимального правдоподобия**

Figure 2. Dendrogram of strains of the ancient sublineage of the Beijing genotype from Russia and Korea, built on the basis of whole genome SNPs based on the maximum likelihood algorithm

**Примечание.** Ветвь, включающая штаммы Beijing 14717-15-кластера, отмечена звездочкой. Шкала показывает количество SNP. Цифры курсивом рядом с узлами показывают процент бутстрапа. KR — Корея (в номере штамма).

Note. The branch containing strains of the Beijing 14717-15 cluster is marked with an asterisk. The scale shows the number of SNPs. The numbers in italics next to the nodes show the bootstrap percentage. KR — Korea (in the strain number).

Сейчас становится очевидным, что при внедрении персонализированного лечения туберкулеза следует учитывать не только лекарственную устойчивость, но и вирулентность штамма *M. tuberculosis*, что требует разработки методов быстрой детекции значимых гипервирулентных геновариантов. Выявление штаммов кластера Beijing 14717-15 возможно с использованием полногеномного секвенирования или генотипирования по 24 локусам VNTR с последующим сравнением с базой данных [www.MIRU-VNTRplus.org](http://www.MIRU-VNTRplus.org) [13, 14].

Цель исследования — разработка простого метода для выявления штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к высоколетальному, гипервирулентному и мультирезистентному кластеру Beijing 14717-15 и применение метода для скрининга ретроспективных коллекций ДНК *M. tuberculosis* из различных регионов России.

## Материалы и методы

Изученная коллекция включала образцы ДНК *M. tuberculosis*, собранные в период с 2015 по 2022 гг. в результате популяционных исследований. Выделение ДНК из культуры *M. tuberculosis*, выращенной на среде Левенштейна–Йенсена, проводили по *van Embden* и соавт. [20] с использованием лизоцима, протеиназы К, додецилсульфата натрия и цетилтриметиламмонийбромида с последующей экстракцией с использованием смеси фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1), центрифугированием, осаждением изопропанолом, промывкой 70% этанолом и растворением осадка в 30–50 мкл буфера TE x1.

Сполиготимирование проводили по стандартному протоколу с использованием изготовленной в нашей лаборатории мембраны с иммобилизованными 43 олигонуклеотидами [5]. Генотип Beijing был идентифицирован экспериментально или *in silico* на основе определения делеции RD207 (позиции 3120521–3127920 в геноме H37Rv, NC\_000962.3). Генотипирование 24 локусов MIRU-VNTR проводили по Supply и соавт. [19], полученные числовые профили сравнивали с ресурсом [MIRU-VNTRplus.org](http://MIRU-VNTRplus.org).

Филогенетический анализ штаммов древней сублинии генотипа Beijing на основе данных полногеномного секвенирования, полученных в нашей лаборатории (депонированы в SRA NCBI под номерами проектов PRJNA822891, PRJNA489691) или извлеченных из архива коротких прочтений SRA NCBI, был описан ранее [13]. Пакет Geneious 9.0 (Biomatters Ltd) использовали для картирования ридов на геном референтного штамма *M. tuberculosis* H37Rv (NC\_000962.3). Онлайн-ресурс SAM-TB (<https://samtb.uni-medica.com/index>) использовали для

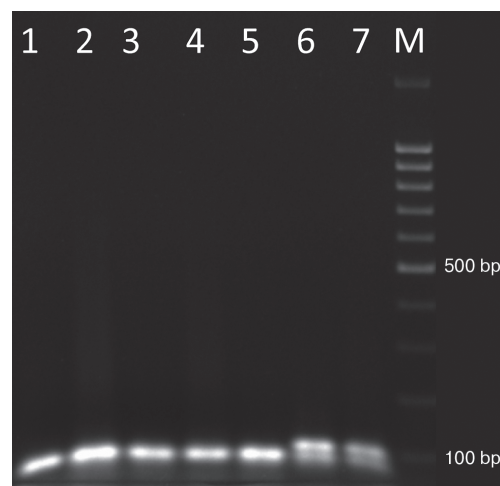
анализа геномных данных, определения SNP и филогенетического анализа. Пакет MEGA7 [7] использовали для визуализации дендрограмм.

Полиморфизм в геномной позиции 2423040 A > G (позиция в гене *Rv2161c* 98T > C, аминокислотная замена Val(s)33Ala GTG/GCG), специфический для кластера Beijing 14717-15 (рис. 2), определяли с использованием метода ПЦР-ПДРФ и рестриктазы *NhaI*. В случае данной мутации возникает дополнительный сайт рестрикции *NhaI* (сайт рестрикции GCGC). Длина продукта ПЦР — 150 пн. Размеры рестрикетов при аллеле дикого типа — 60 и 89 пн, при мутации — 21, 60 и 68 пн (рис. 3). Для ПЦР использовали два праймера GTCCGGCAGCTCTCCACCG и TGCAGTTCGTCACCGACCTGACC. ПЦР проводили при следующем температурном режиме: 95°C, 5 мин, 35 циклов 95°C, 40 с, 67°C, 20 с, 72°C, 20 с; 72°C, 5 мин. Продукт ПЦР обрабатывали рестриктазой *NhaI* (37°C, 2 ч), продукты рестрикции разделяли в 1,4% агарозном геле (рис. 3).

## Результаты и обсуждение

Проведенный нами биоинформационный и филогенетический анализ данных полногеномного секвенирования 205 штаммов ранней древней сублинии генотипа Beijing *M. tuberculosis* показал, что штаммы из Омска и Бурятии с профилем VNTR 14717-15 и близкие ему также группировались в один кластер родственных штаммов и на полногеномном дереве, который мы определили как Beijing 14717-15-кластер (рис. 2).

Следует отметить что этот кластер был монофилетическим, и сравнение его штаммов с соседними ветвями на дендрограмме позволило выявить 58 специфических полиморфизмов SNP. Среди SNP, специфичных для кластера 14717-15, мы выбрали функционально нейтральный SNP (PAM1 = 9867) в геномной позиции 2423040 A > G (*Rv2161c* Val33Ala) и разработали метод его детекции в формате ПЦР-ПДРФ. Фактически эволюционная нейтральность данной замены снижает риск ее селекции в процессе эволюции и адаптации и, таким образом, делает ее наиболее пригодной в качестве диагностического молекулярного маркера. Данная мутация приводит к появлению дополнительного сайта рестрикции *NhaI* и может быть выявлена с помощью анализа *NhaI*-ПДРФ амплифицированной ПЦР-области (рис. 3). Метод был оптимизирован с использованием ДНК изолятов с имевшейся информацией по их полным геномам, у которых в данной позиции был или аллель дикого типа, или мутантный аллель. Длина продукта ПЦР составляет 150 пн. Поскольку в данном участке гена при-



**Рисунок 3. *NhaI* ПЦР-ПДРФ детекция замены в геномной позиции 2423040 A > G (*Rv2161c* Val(s)33Ala)**

Figure 3. *NhaI* PCR-RFLP detection of substitution at genomic position 2423040 A > G (*Rv2161c* Val(s)33Ala)

**Примечание.** Дорожки 1–5 — Beijing 14717-15-кластер. Дорожки 6–7 — другие генотипы. М — маркер молекулярных весов 100 bp ladder (GE Healthcare).

Note. Lanes 1–5 — Beijing 14717-15-cluster. Lanes 6–7 — other genotypes. M, 100 bp ladder molecular weight marker (GE Healthcare).

существует дополнительный инвариантный сайт *NhaI*, размеры фрагментов рестрикции составляют 60 и 89 пн. в случае аллеля дикого типа и 60, 21, 68 пн. в случае мутации (рис. 3), верхний фрагмент хорошо различим при агарозном гель-электрофорезе даже при небольшом времени электрофореза и малой длине геля, что удобно практически.

Анализ ПЦР-ПДРФ был дополнительно применен к изолятам генотипа Beijing, которые представляли разные сублинии Beijing и имели разные профили VNTR. Все изоляты были ранее генотипированы методом мультилокусного VNTR-анализа, позволяющим точно определить принадлежность штамма к тому или иному VNTR-кластеру, в том числе к кластеру 14717-15. Эти валидационные коллекции включали изоляты из России, Центральной и Восточной Азии. Анализ ПЦР-ПДРФ корректно отнес все изоляты с известным профилем VNTR 14717-15 и родственными профилями к кластеру Beijing 14717-15. Метод имеет 100% чувствительность и 100% специфичность для обнаружения данного кластера.

Далее мы применили метод ПЦР-ПДРФ для скрининга всех имеющихся коллекций ДНК из регионов Европейской и Азиатской частей России и стран Азии. Эти коллекции были из Восточной Сибири и Дальнего Востока (регионы с различной долей штаммов Beijing и Beijing

14717-15 [24]), из Омской области Западной Сибири (регион с небольшим, но постоянным присутствием штаммов Beijing 14717-15 в локальной популяции [14]), из Китая, Вьетнама и Японии (страны с достаточно высокой долей штаммов древних сублиний генотипа Beijing [18, 22, 23]). Результаты по всем проверенным коллекциям приведены в таблице и демонстрируют четкий пик кластера 14717-15 в Бурятии.

Дополнительно мы рассмотрели географическое распространение основных российских кластеров современной сублинии генотипа Beijing (B0/W148 и Central Asian/Russian) и двух основных кластеров древней сублинии, включая Beijing 14717-15-кластер, на основании наших и ранее опубликованных данных [2, 3, 16, 17, 24] (рис. 4). Это сравнение показывает доминирование кластеров современной сублинии генотипа Beijing и относительно более широкое

распространение кластера Beijing 1071-32 (древняя сублиния), хотя и в небольшой доле, за исключением Омской области (рис. 4).

## Выводы

Клинически значимые штаммы могут возникать среди менее заметных геновариантов, и примером может служить недавно обнаруженный гипервирулентный и высоколетальный кластер Beijing 14717-15. Нами разработан метод его детекции на основе выявления специфической мутации в гене *Rv2161c* с помощью ПЦР с последующей рестрикцией продукта ПЦР и электрофорезом в агарозном геле для дискриминации дикого и мутантного аллелей. Преимуществами предлагаемого способа являются быстрота, простота и однозначная интерпретация результатов, возможность выявления

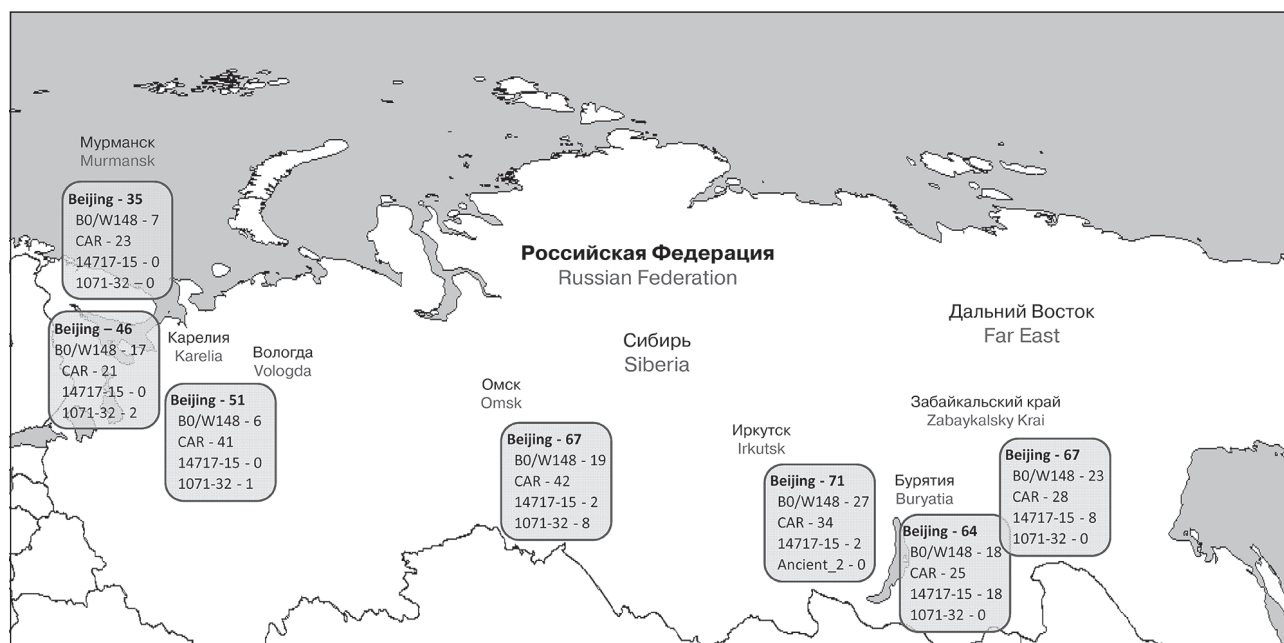
**Таблица. Детекция штаммов Beijing 14717-15 в региональных коллекциях**

Table. Detection of strains Beijing 14717-15 in regional collections

Регион РФ или страна Region of Russia, or country	Всего штаммов* Total number of strains*	Генотип Beijing** Beijing genotype**	Beijing 14717-15 кластер, количество штаммов и процент от всей коллекции Beijing 14717-15 cluster, number of strains and percent of all collection
<b>Вологодская область</b> Vologda	82	51	0
<b>Мурманская область</b> Murmansk	67	35	0
<b>Карелия</b> Karelia	67	36	0
<b>Калининградская область</b> Kaliningrad	73	46	0
<b>Омская область</b> Omsk	208	138	4 (2%)
<b>Иркутская область</b> Irkutsk	198	143	4 (2%)
<b>Бурятия</b> Buryatia	265	180	47 (18%)
<b>Забайкальский край</b> Zabaykalskyi krai	62	41	5 (8%)
<b>Монголия</b> Mongolia	143	107	0
<b>Китай</b> China	113	102	0
<b>Казахстан</b> Kazakhstan	97	71	0
<b>Япония</b> Japan	87	87	0

**Примечание.** \*Коллекция из Японии включала только штаммы генотипа Beijing. \*\*Генотип Beijing определяли на основании сполитотипирования или VNTR-типирования. Штаммы кластера Beijing 14717-15 определяли на основании разработанного метода детекции специфического SNP. Большинство штаммов этого кластера имели профили 14717-15 по 24-локусной схеме MIRU-VNTRplus.org.

Note. \*Collection from Japan included only Beijing genotype strains. \*\*The Beijing genotype was determined based on spoligotyping or VNTR typing. The strains of the Beijing 14717-15 cluster were detected based on the developed method for detecting a specific SNP. Most strains of this cluster had profiles 14717-15 according MIRU-VNTRplus.org.



**Рисунок 4. Ретроспективный анализ географического распространения штаммов Beijing 14717-15 и других субтипов Beijing в российских регионах**

Figure 4. Retrospective analysis of the geographical distribution of Beijing 14717-15 strains and other Beijing subtypes in Russian regions

**Примечание.** Показан процент в локальной популяции. CAR — Central Asian/Russian.

Note. The percentage in the local population is shown. CAR — Central Asian/Russian.

контаминации и микст-инфекции, пригодность для производительного анализа больших коллекций штаммов *M. tuberculosis*.

Следует отметить, что штаммы Beijing 14717-15 входят в крупную ветвь ранней древней сублинии генотипа Beijing с интактным локусом RD181 (рис. 1), которая весьма гетерогенна и включает штаммы с разнообразными профилями по VNTR. В этом смысле выявленный нами маркер является таковым только для специфического для России кластера Beijing, но не всей ветви RD181-intact.

Российские изоляты кластера 14717-15, включенные в данное исследование, были вы-

делены от больных в азиатской части России. Анализ большего количества штаммов (геномов) из Восточной Азии позволит провести более надежную реконструкцию эволюционной истории этого клинически значимого геноварианта *M. tuberculosis*, в то время как дальнейшие омиксные исследования дадут более информированное понимание его патобиологии.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов

### Список литературы/References

1. 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. [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., Ilina E.N. In vivo virulence of Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 173–182. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-173-182
2. Вязовая А.А., Гаврилова Н.Ю., Герасимова А.А., Бычкова А.О., Авадений И., Аникиева Е.В., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., Мокроусов И.В., Нарвская О.В. Молекулярно-генетический мониторинг популяции Mycobacterium tuberculosis в Мурманской области // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2022. Т. 40, № 2. С. 21–27. [Vyazovaya A.A., Gavrilova N.Yu., Gerasimova A.A., Bychkova A.O., Avadenii I., Anikieva E.V., Solovieva N.S., Zhuravlev V.Yu., Mokrousov I.V., Narvskaya O.V. Molecular-genetic monitoring of Mycobacterium tuberculosis population in Murmansk region. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2022, vol. 40, no. 2, pp. 21–27. (In Russ.)] doi: 10.17116/molgen20224002121
3. Вязовая А.А., Лебедева И.А., Ушакова Н.Б., Павлов В.В., Герасимова А.А., Соловьева Н.С., Журавлев В.Ю., Нарвская О.В. Молекулярно-генетический анализ популяции Mycobacterium tuberculosis в Вологодской области — регионе

- с низкой заболеваемостью туберкулезом // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 497–505. [Vyazovaya A.A., Lebedeva I.A., Ushakova N.B., Pavlov V.V., Gerasimova A.A., Solovieva N.S., Zhuravlev V.Yu., Narvskaya O.V. Molecular and genetic analysis of Mycobacterium tuberculosis population in the Vologda Region with low tuberculosis incidence. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 497–505. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MAG-1545
4. Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2018, vol. 16, pp. 202–213. doi: 10.1038/nrmicro.2018.8
  5. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, vol. 35, no. 4, pp. 907–914. doi: 10.1128/jcm.35.4.907-914.1997
  6. Kremer K., Glynn J.R., Lillebaek T., Niemann S., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N., Bifani P.J., van Soolingen D. Definition of the Beijing/W lineage of Mycobacterium tuberculosis on the basis of genetic markers. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 9, pp. 4040–4049. doi: 10.1128/JCM.42.9.4040-4049.2004
  7. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
  8. Luo T., Comas I., Luo D., Lu B., Wu J., Wei L., Yang C., Liu Q., Gan M., Sun G., Shen X., Liu F., Gagneux S., Mei J., Lan R., Wan K., Gao Q. Southern East Asian origin and coexpansion of Mycobacterium tuberculosis Beijing family with Han Chinese. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, no. 26, pp. 8136–8141. doi: 10.1073/pnas.1424063112
  9. Maeda S., Hang N.T., Lien L.T., Thuong P.H., Hung N.V., Hoang N.P., Cuong V.C., Hijikata M., Sakurada S., Keicho N. Mycobacterium tuberculosis strains spreading in Hanoi, Vietnam: Beijing sublineages, genotypes, drug susceptibility patterns, and host factors. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2014, vol. 94, no. 6, pp. 649–656. doi: 10.1016/j.tube.2014.09.005
  10. Mokrousov I., Ly H.M., Otten T., Lan N.N., Vyshnevskiy B., Hoffner S., Narvskaya O. Origin and primary dispersal of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome Res.*, 2005, vol. 15, no. 10, pp. 1357–1364. doi: 10.1101/gr.3840605
  11. Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., Steklova L., Vyshnevskiy B. Phylogenetic reconstruction within Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in northwestern Russia. *Res. Microbiol.*, 2002, vol. 153, no. 10, pp. 629–637. doi: 10.1016/s0923-2508(02)01374-8
  12. Mokrousov I., Pasechnik O., Vyazovaya A., Yarusova I., Gerasimova A., Blokh A., Zhuravlev V. Impact of pathobiological diversity of Mycobacterium tuberculosis on clinical features and lethal outcome of tuberculosis. *BMC Microbiol.*, 2022, vol. 22: 50. doi: 10.1186/s12866-022-02461-w
  13. Mokrousov I., Sinkov V., Vyazovaya A., Pasechnik O., Solovieva N., Khromova P., Zhuravlev V., Ogarkov O. Genomic signatures of drug resistance in highly resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the early ancient sublineage of Beijing genotype in Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2020, vol. 56, no. 2: 106036. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106036
  14. Mokrousov I., Vyazovaya A., Pasechnik O., Gerasimova A., Dymova M., Chernyaeva E., Tatarintseva M., Stasenko V. Early ancient sublineages of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: unexpected clues from phylogenomics of the pathogen and human history. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2019, vol. 25, no. 8, pp. 1039.e1–1039.e6. doi: 10.1016/j.cmi.2018.11.024
  15. Mokrousov I., Vyazovaya A., Sinkov V., Gerasimova A., Ioannidis P., Jiao W., Khromova P., Papaventsis D., Pasechnik O., Perdigão J., Rastogi N., Shen A., Skiba Y., Solovieva N., Suffys P., Tafaj S., Umpeleva T., Vakhrusheva D., Yarusova I., Zhdanova S., Zhuravlev V., Ogarkov O. Practical approach to detection and surveillance of emerging highly resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing 1071-32-cluster. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11: 21392. doi: 10.1038/s41598-021-00890-7
  16. Mokrousov I., Vyazovaya A., Solovieva N., Sunchalina T., Markelov Y., Chernyaeva E., Melnikova N., Dogonadze M., Starkova D., Vasilieva N., Gerasimova A., Kononenko Y., Zhuravlev V., Narvskaya O. Trends in molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Republic of Karelia, Russian Federation. *BMC Microbiol.*, 2015, vol. 15: 279. doi: 10.1186/s12866-015-0613-3
  17. Pasechnik O., Vyazovaya A., Vitriv S., Tatarintseva M., Blokh A., Stasenko V., Mokrousov I. Major genotype families and epidemic clones of Mycobacterium tuberculosis in Omsk region, Western Siberia, Russia, marked by a high burden of tuberculosis-HIV coinfection. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2018, vol. 108, pp. 163–168. doi: 10.1016/j.tube.2017.12.003
  18. Shamputa I.C., Lee J., Allix-Béguec C., Cho E.J., Lee J., Rajan V., Lee E.G., Min J.H., Carroll M.W., Goldfeder L.C., Kim J.H., Kang H.S., Hwang S., Eum S.Y., Park S.K., Lee H., Supply P., Cho S.-N., Via L.E., Barry C.E. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from a tertiary care tuberculosis hospital in South Korea. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, vol. 48, pp. 3873–3894. doi: 10.1128/jcm.02167-09
  19. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsch-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., Loch 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, pp. 4498–4510. doi: 10.1128/JCM.01392-06
  20. 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 on Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, pp. 406–409. doi: 10.1128/jcm.31.2.406-409.1993
  21. Vinogradova T., Dogonadze M., Zabolotnykh N., Badleeva M., Yarusova I., Vyazovaya A., Gerasimova A., Zhdanova S., Vitovskaya M., Solovieva N., Pasechnik O., Ogarkov O., Mokrousov I. Extremely lethal and hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain cluster emerging in Far East, Russia. *Emerg. Microbes Infect.*, 2021, vol. 10, no. 1, pp. 1691–1701. doi: 10.1080/22221751.2021.1967704
  22. Wada T., Iwamoto T., Maeda S., Genetic diversity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, vol. 291, no. 1, pp. 35–43. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01431.x



23. Yin Q.Q., Liu H.C., Jiao W.W., Li Q.J., Han R., Tian J.L., Liu Z.G., Zhao X.Q., Li Y.J., Wan K.L., Shen A.D., Mokrousov I. Evolutionary history and ongoing transmission of phylogenetic sublineages of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in China. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 34353. doi: 10.1038/srep34353
24. Zhdanova S., Mokrousov I., Orlova E., Sinkov V., Ogarkov O. Transborder molecular analysis of drug-resistant tuberculosis in Mongolia and Eastern Siberia, Russia. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2022, vol. 69, no. 5, pp. e1800-e1814. doi: 10.1111/tbed.14515

**Авторы:**

**Мокроусов И.В.**, д.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Вязовая А.А.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Бадлеева М.В.**, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО Бурятский государственный университет, г. Улан-Удэ, Россия;

**Герасимова А.А.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Белопольская О.Б.**, к.б.н., ведущий специалист РЦ «Центр Биобанк» — Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;

**Машарский А.Э.**, к.б.н., ведущий специалист РЦ «Центр Биобанк» — Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;

**Костюкова И.В.**, врач-бактериолог, зав. лабораторией БУЗОО Клинический противотуберкулезный диспансер, г. Омск, Россия;

**Жданова С.Н.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

**Мударисова Р.С.**, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Авадэний И.**, младший научный сотрудник, врач-бактериолог бактериологической лаборатории Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;

**Соловьева Н.С.**, к.м.н., зав. бактериологической лабораторией Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;

**Найзабаева Д.А.**, научный сотрудник лаборатории экспертизы и диагностики Филиала Национального центра биотехнологии в г. Алматы, г. Алматы, Казахстан; аспирант кафедры биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан;

**Скиба Ю.А.**, к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии, директор Алматинского филиала Национального центра биотехнологии, г. Алматы, Казахстан;

**Журавлев В.Ю.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник, координатор направления «Лабораторная диагностика» Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;

**Пасечник О.А.**, д.м.н., зав. кафедрой общественного здоровья и здравоохранения Омского государственного медицинского университета, г. Омск, Россия;

**Огарков О.Б.**, д.м.н., главный научный сотрудник, зав. отделом эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия.

**Authors:**

**Mokrousov I.V.**, DSc (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Vyazovaya A.A.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Badleeva M.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Buryat State University, Ulan-Ude, Russian Federation;

**Gerasimova A.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Belopolskaya O.B.**, PhD (Biology), Leading Expert, Resource Center “Bio-bank Center”, Research Park of St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Masharsky A.E.**, PhD (Biology), Leading Expert, Resource Center “Bio-bank Center”, Research Park of St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Kostyukova I.V.**, Bacteriologist, Head of the Bacteriology Laboratory, Clinical Antituberculosis Dispensary Omsk, Russian Federation;

**Zhdanova S.N.**, DSc (Medicine), Leading Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

**Mudarisova R.S.**, Research Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Avadenii I.**, Junior Researcher, Bacteriologist, Bacteriology Laboratory, St. Petersburg Research Institute of Phthysiology, St. Petersburg, Russian Federation;

**Solovieva N.S.**, PhD (Medicine), Head of the Bacteriology Laboratory, St. Petersburg Research Institute of Phthysiology, St. Petersburg, Russian Federation;

**Naizabayeva D.A.**, Researcher, Laboratory of Expertise and Diagnostics, Almaty Branch of the National Center for Biotechnology, Almaty, Kazakhstan; PhD Student, Department of Biotechnology, Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan;

**Skiba Yu.A.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology, Director of Almaty Branch of National Center for Biotechnology, Almaty, Kazakhstan;

**Zhuravlev V.Yu.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Coordinator of Laboratory Diagnostics Department, St. Petersburg Research Institute of Phthysiology, St. Petersburg, Russian Federation;

**Pasechnik O.A.**, DSc (Medicine), Head, Department of Public Health, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

**Ogarkov O.B.**, DSc (Medicine), Head of the Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.11.2022  
Отправлена на доработку 24.11.2022  
Принята к печати 03.12.2022

Received 24.11.2022  
Revision received 24.11.2022  
Accepted 03.12.2022