

# МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ГЕНОТИПИРОВАНИЮ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ДЛЯ ЭВОЛЮЦИОННЫХ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

И.В. Мокроусов

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

**Резюме.** Современная эволюция генома возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* отличается отсутствием латерального генетического переноса, что приводит к клональной популяционной структуре данного вида, состоящего из отдельных генетических семейств. Стандартные методы типирования, основанные на мобильных (IS6110-ПДРФ типирование) или повторяющихся (сполиготипирование и MIRU-VNTR) элементах ДНК, обеспечивают высокую дискриминацию штаммов, необходимую для выявления недавней передачи, лабораторной контаминации, микст-инфекции, различения между эндогенной реактивацией и суперинфекцией при рецидиве туберкулеза. В то же время, слишком быстрая эволюция иногда может приводить к появлению идентичных профилей у неродственных штаммов (гомоплазия) в результате конвергентной эволюции. Использование различных несвязанных маркеров может разрешить эту проблему. Регулярно обновляемые базы генотипических данных доступны для глобального и локального анализа циркулирующих штаммов, они имеют также исключительное значение и для разработки стандартизированной терминологии для обозначения генотипов возбудителя туберкулеза. Некоторые из генетических семейств *M. tuberculosis* продолжают циркулировать на ограниченных территориях в то время как другие семейства широко распространились в мире, вероятно, по причине повышенной вирулентности и трансмиссивности (например, Beijing и LAM). Наиболее часто встречаемый российский вариант Beijing B0/W148 отличается существенно более быстрым ростом субпопуляции по сравнению с популяцией Beijing в целом, что показывает «успешность» этого варианта *M. tuberculosis* в России. Последние достижения в геномике микобактерий выявили более существенный уровень генетической вариативности при сравнении полных геномов даже родственных изолятов. Таким образом, полногеномное секвенирование может стать рутинным методом молекулярной эпидемиологии при условии снижения его стоимости до таковой традиционных методов генотипирования. Аккумуляция данных по различным, в том числе новым, маркерам, разработка и применение новых математических алгоритмов для их обработки и анализа позволяют провести более точное моделирование эволюции *M. tuberculosis* и его семейств на различных отрезках времени, эпидемиологический мониторинг их циркуляции внутри стран и в глобальном масштабе.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, эволюция, молекулярная эпидемиология, генотипирование, IS6110, делеции, полиморфизм, VNTR, CRISPR.

## METHODOLOGICAL APPROACHES TO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* GENOTYPING FOR EVOLUTIONARY AND EPIDEMIOLOGICAL RESEARCH

Mokrousov I.V.

**Abstract.** Current genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis* is marked by virtual absence of the lateral gene transfer leading to the clonal population of this species consisting of separate genetic families. Standard typing method of *M. tuberculosis* (IS6110-RFLP, spoligo- and VNTR-typing) are based on variation of mobile and repetitive

поступила в редакцию 11.06.2011  
принята к печати 28.09.2011

### Адрес для переписки:

Мокроусов Игорь Владиславович,  
д.б.н., ведущий научный сотрудник  
лаборатории молекулярной  
микробиологии ФБУН НИИ эпидемиологии  
и микробиологии имени Пастера

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
НИИЭМ имени Пастера.  
Тел./факс: (812) 233-21-49 (служебн.).  
E-mail: imokrousov@mail.ru

© Мокроусов И.В., 2012

elements and provide sufficient strain discrimination for epidemiological purposes such as, estimation of recent transmission versus reactivation of latent tuberculosis, laboratory contamination, mixed infection. At the same time, rapid evolution of some markers may lead to emergence of identical profiles in the non-related strains (homoplasy) due to convergent evolution. Use of different independent markers may help solve this problem. Regularly updated databases are available for global and local analysis and are also important for standardised terminology and designation of the genotypes. Some of the *M. tuberculosis* genetic families continue to circulate in the limited areas while other families have become omnipresent due to their likely increased transmissibility and pathogenicity (e.g., Beijing and LAM). The most frequently isolated Russian subvariant Beijing B0/W148 is marked by significantly higher population growth compared to the Russian Beijing population as a whole and hence may be defined as a successful clone in Russia. Recent years revealed higher than previously thought level of genome variation in *M. tuberculosis* even between related isolates. The whole-genome sequencing may become a useful typing method if its cost is reduced to be similar to that of the traditional typing methods. Accumulation of the data on old and new markers, development and use of new algorithms of their analysis will help to refine our knowledge about evolution of *M. tuberculosis* and its families, will provide better tools for epidemiological monitoring of the circulating strains on local and global scale. (*Infekc. immun.*, 2012, vol. 2, N 3, p. 603–614)

*Key words:* *Mycobacterium tuberculosis*, evolution, molecular epidemiology, genotyping, IS6110, deletions, polymorphism, VNTR, CRISPR.

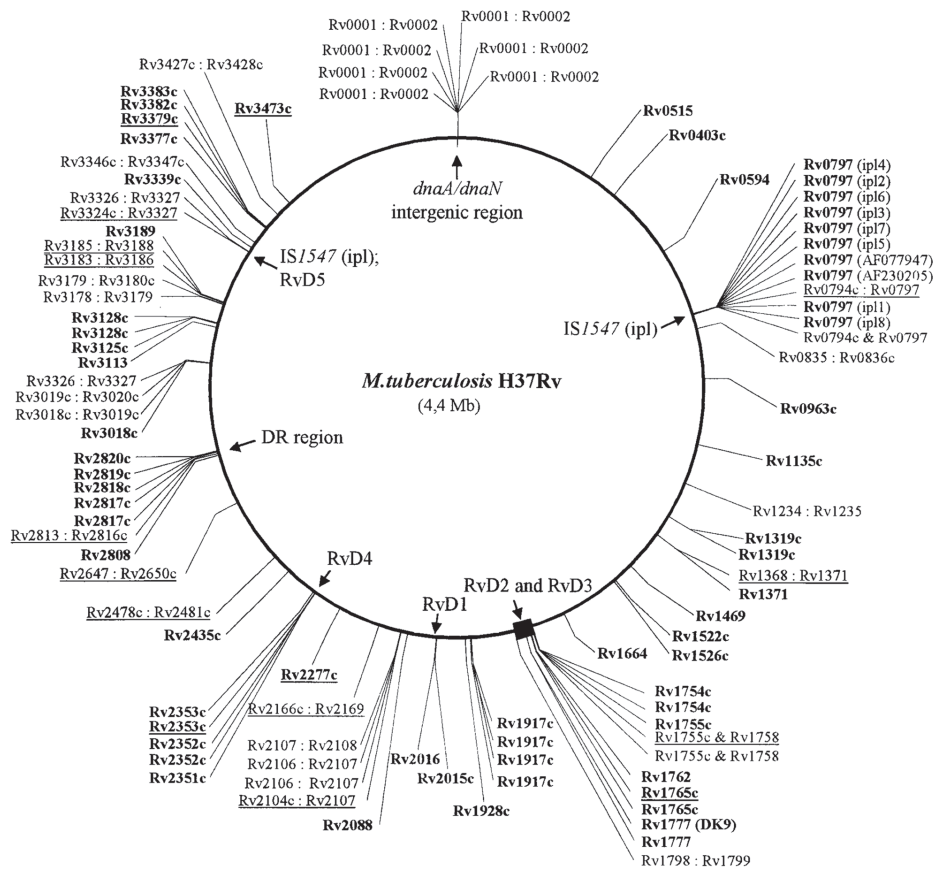
## Молекулярно-эпидемиологические маркеры *M. tuberculosis*

Развитие методов молекулярной эпидемиологии в последние 15 лет вскрыло различные аспекты популяционной генетики возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis*, позволив впервые провести надежную идентификацию и дискриминацию штаммов. Высокая степень геномного консерватизма характерна для *M. tuberculosis* и затрудняет разработку мультилокусного типирования на основе анализа SNP в различных конститутивных генах для тонкой дифференциации штаммов, хотя этот подход успешно развивается для филогенетического анализа *M. tuberculosis*. Поэтому применение других маркеров, основанных на полиморфизме повторяющейся ДНК, представлялось и было до последнего времени весьма многообещающим. Методами, наиболее часто применяемыми для анализа различных уровней межштаммовой дивергенции, являются в настоящее время анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов, содержащих инсерционный элемент IS6110 (рис. 1, 2), VNTR (variable number of tandem repeats, вариабельное число tandemных повторов) и сполиготипирование (spacer oligonucleotide typing), основанное на анализе наличия/отсутствия 43 вариабельных спейсеров в локусе DR (рис. 3) [26, 49, 86, 87].

Локус DR длительное время считался уникальным локусом, присутствующим только в геноме *M. tuberculosis* [27, 40, 44], а сполиготипирование до сих пор широко использовалось только для анализа *M. tuberculosis* complex [17, 49]. В последние годы накопление новой информации о геномах микроорганизмов позволило обнаружить подобные локусы, состоящие из чередующихся идентичных прямых повторов и уникальных вариабельных спейсеров (CRISPR), в геномах 40% эубактерий и 90% ар-

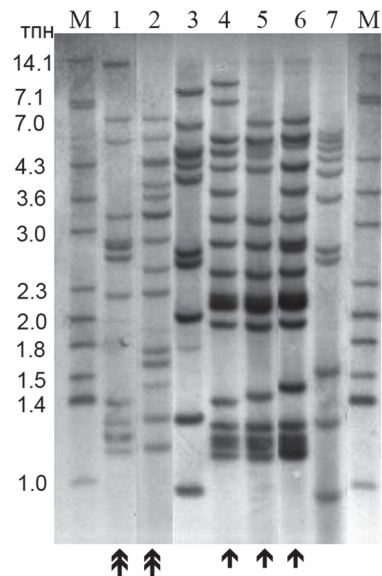
хеобактерий [3, 48, 61, 62, 78, 84]. Подробное рассмотрение происхождения и функции CRISPR выходит за рамки данного обзора. В отличие, например, от *Y. pestis* [16], у *M. tuberculosis* этот локус утратил свою активность, добавления новых спейсеров не происходит, и его изменения, вероятно, нейтральны и происходят за счет делеций отдельных спейсеров (и повторов) или, реже, их блоков, с участием, в некоторых случаях, рекомбинации, опосредованной элементом IS6110 [27]. Коротко отметим, что CRISPR локусы, очевидно, представляют один из древнейших механизмов клеточной защиты против чужеродной ДНК за счет встраивания фрагментов этой ДНК между повторами в виде спейсеров и последующего ее разрушения с помощью механизма, подобного РНК-интерференции [84]. Если еще в 2000 году недостаточность данных в GenBank позволяла считать этот локус уникальным для *M. tuberculosis*, в последние годы было показано, что спейсеры имеют гомологию с различными генными последовательностями других видов бактерий и фагов, что подчеркивает роль горизонтального переноса генов в эволюции CRISPR локусов. Практически полное отсутствие горизонтального генного переноса у современных видов *M. tuberculosis* complex объясняет завершение расширения их DR-локуса и переход к его нейтральной эволюции путем последовательных делеций.

В то время как анализ полиморфизма расположения и количества копий инсерционного элемента IS6110 обеспечивает высокую дифференциацию штаммов, но трудно стандартизуем и трудоемок, VNTR локусы (исторически также называемые MIRU, QUB, или ETR у *M. tuberculosis*) занимают все более ведущую позицию в качестве основного метода генотипирования. Первоначально метод был основан на использовании 6 локусов ETR [32], далее схема VNTR-типирования расширилась до 12 локусов



**Рисунок 1. Разнообразие локализации сайтов инсерции IS6110 в клинических изолятах *M. tuberculosis* относительно хромосомы штамма H37Rv**  
 Открытые рамки считывания «разорванных» генов выделены жирным шрифтом [80].

MIRU [87], которых было, тем не менее, явно недостаточно для полноценной дискриминации штаммов [13, 54, 64, 65, 67, 88]. Наконец, последний предложенный формат включает 24 локуса, 15 из которых составляют дискриминирующий набор, а полный набор из 24 локусов предлагается для максимальной дифференциации штаммов [76, 86]. При этом существуют и другие локусы VNTR, которые были исключены из нового стандарта как недостаточно воспроизводимые или гипервариабельные [86], хотя вопрос об их нестабильности остается спорным [47, 67]. Ранее нами была предложена оптимизированная схема только из 7 локусов VNTR для скринингового типирования штаммов Beijing, циркулирующих в России, при этом 4 из этих локусов представляли 24-локусную схему, а три локуса были так называемыми гипервариабельными локусами [67]. Гипервариабельные локусы QUB-3232, VNTR-3820, VNTR-4120 были успешно применены нами и при анализе популяции *M. tuberculosis* в Кыргызстане [68]. Количество копий в конкретном локусе может варьировать, и использование множества локусов позволяет получить числовой и, возможно, уникальный профиль штамма (комплексный гаплотип), который можно легко разместить в базах данных и автоматически сравнивать с другими подоб-

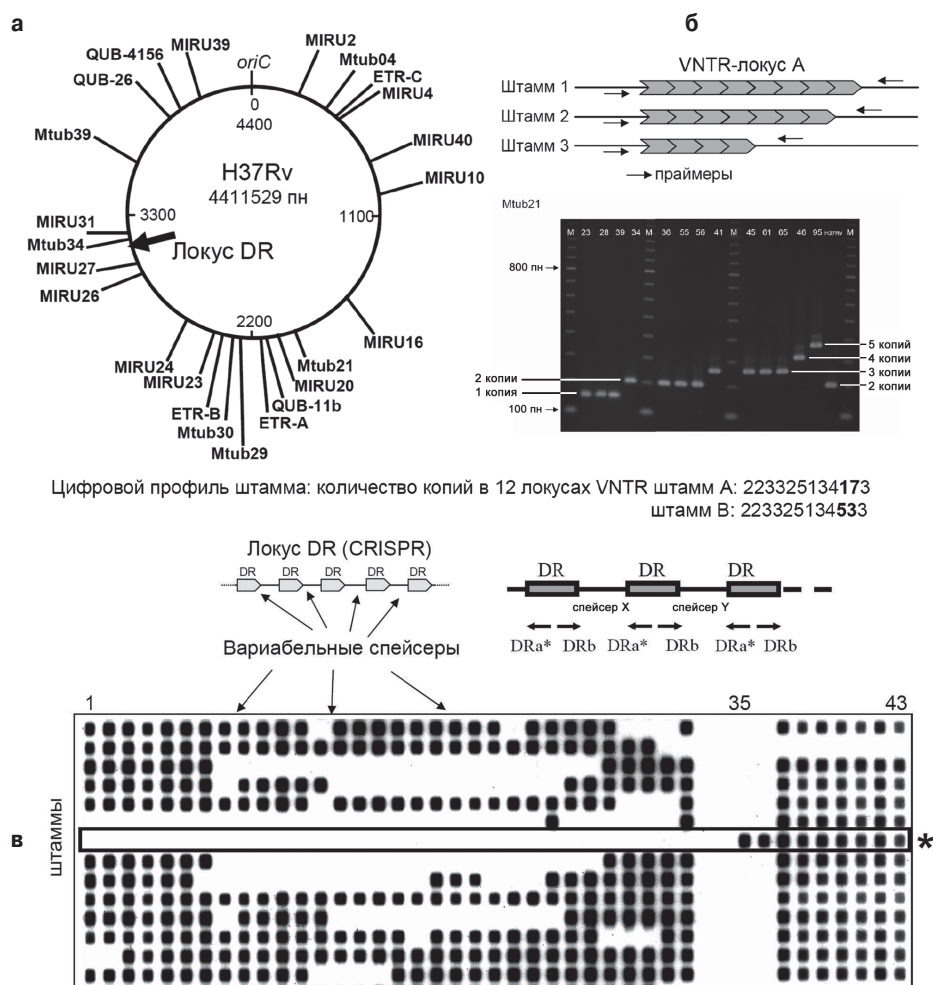


**Рисунок 2. Пример профилей гибридизации по Саузерну хромосомной ДНК штаммов *M. tuberculosis*, разрезанной рестриктазой PvuII с меченой пробой IS6110**  
 Одинарные и двойные стрелки показывают типичные и атипичные штаммы Beijing, соответственно; профиль Beijing/B0 — дорожка 4. M — маркер длин фрагментов рестрикции (ДНК штамма Mt14323/PvuII) [66].

ными профилями. Локусы MIRU представляют множественные независимые генетические маркеры, которые идеально подходят для филогеографического анализа.

Стандартные методы типирования основанные на мобильных (напр., IS6110) или повторяющихся (сполиготипирование и MIRU-VNTR) элементах ДНК, которые могут меняться достаточно быстро, обеспечивают высокую дискриминацию штаммов, необходимую для выявления недавней передачи, лабораторной контаминации, микст-инфекции, различия между эндогенной реактивацией и суперинфекцией при рецидиве туберкулеза [14, 21, 72, 83]. В то же время, слишком быстрая эволюция иногда (хотя и редко) может приводить к появлению идентичных профилей у неродственных штаммов (гомоплазия) в результате конвергентной эволюции [31, 41, 95], что, очевидно, затрудняет филогенетический анализ. Использование различных несвязанных маркеров может разрешить эту проблему.

Повторяющиеся и инсерционные последовательности успешно применяют в качестве маркеров в эпидемиологии и филогенетике *M. tuberculosis* [34, 36, 82] и регулярно обновляемые базы генотипических данных доступны для глобального и локального анализа циркулирующих штаммов [11, 17, 25, 29, 30]. Международная база данных сполиготипов SpolDB4 [17] включает на данный момент более 75 000 профилей и позволяет проведение сравнительного анализа штаммов в глобальном и локальном контексте. База данных MIRU-VNTRplus включает информацию о профилях VNTR, IS6110-RFLP и др. [11], хотя ее ограничением является небольшой размер выборки (только 186 штаммов, представляющих различные семейства) и недостаточная географическая представительность. Крупные базы данных профилей IS6110-RFLP, созданные в Национальном институте здравоохранения и окружающей среды (Бильтховен, Нидерланды) и Исследовательском институте здравоохранения (Нью-Йорк, США), не име-



Цифровой профиль штамма: количество копий в 12 локусах VNTR штамм А: 223325134173  
штамм В: 223325134533

**Рисунок 3. Положение 24 локусов MIRU-VNTR и локуса DR в геноме *M. tuberculosis* H37Rv (а), структура и анализ локуса VNTR методом ПЦР и гель-электрофореза (б) структура локуса DR/CRISPR и пример сполигопрофилей как результат гибридизационного анализа с 43 спейсерами локуса DR (в)**

Звездочкой отмечен генотип Beijing.



ют Интернет-версий и закрыты для свободного доступа. Созданная нами и регулярно пополняемая глобальная база данных по 11 локусам MIRU-VNTR генотипа Beijing включала на 30 мая 2011 г. данные по 2600 штаммам [4, 63, 64]. Эта база позволила провести классификацию профилей и их разделение на типы с идентичными профилями; предложенная номенклатура MIRU-типов Beijing используется и другими исследователями [22, 24, 46, 51, 74, 90]. Следует отметить, что наличие доступных, обновляющихся и представительных баз данных имеет также исключительное значение и для разработки стандартизированной терминологии для обозначения циркулирующих вариантов (генотипов) возбудителя туберкулеза.

Низкий уровень нуклеотидного полиморфизма *M. tuberculosis* [70, 85] в течение длительного времени препятствовал применению мультилокусного секвенс-типирования этого патогена. Однако развитие и начало широкого применения новых технологий полногеномного секвенирования (Illumina, 454) выявили больший чем было принято считать уровень однонуклеотидного полиморфизма на межштаммовом уровне. Недавнее исследование генов ДНК репарации, рекомбинации и репликации (генов 3R), ответственных за эволюцию второго порядка, выявил их существенно больший полиморфизм в сравнении с конститутивными существенными генами ('housekeeping genes') [94]. Также была показана возможность успешного применения генов 3R для биологически значимых филогенетических построений внутри *M. tuberculosis* complex. Субоптимальная активность генов 3R genes (в результате негативной/очищающей селекции) проявляется в виде их пониженной точности при исправлении ошибок репликации, что ведет к увеличению частоты и спектра спонтанных мутантов и появлению новых адаптированных вариантов. Niemann et al. [74] сравнили полные геномы двух генетически родственных штаммов генотипа Beijing из региона с высоким уровнем заболеваемости туберкулезом (Каракалпакия, Узбекистан). Один из этих штаммов был полностью чувствительным и выделен в 2001 г., а другой штамм был мультирезистентным и выделен в 2004 г. Оба изолята имели идентичные профили IS6110-RFLP, идентичные аллели по 23 из 24 локусов MIRU-VNTR, но отличались по 130 SNP и одной крупной делеции. Чувствительный и мультирезистентный изоляты имели 55 и 75 специфичных SNP соответственно. Это показывает, что идентичный генотипический профиль (по IS6110-RFLP, VNTR) не обязательно отражает истинную клональность даже при использовании множественных независимых маркеров (локусов). Различия, выявляемые с использованием дополнительных маркеров (например, секвенирование) вскрыв-

ают удаленные связи во время ранней трансмиссии. Кроме этого, некоторые из штамм-специфических SNP в резистентных штаммах могут быть мутациями, компенсирующими действие мутаций резистентности, приводящих к сниженной приспособленности.

## Популяционная структура *M. tuberculosis* и коадаптация с *H. sapiens*

Современная эволюция генома возбудителя туберкулеза отличается отсутствием латерального генетического переноса что приводит к клональной популяционной структуре вида *M. tuberculosis*, состоящего из отдельных генетических семейств. Эти семейства представляют монофилетические кластеры генетически родственных штаммов, их эволюционный сценарий однонаправленный, а филогении строго иерархические. Очевидно, что они возникли на отдельных территориях и были, как правило, названы согласно географическому, историческому или культурологическому названию. Некоторые из генетических семейств *M. tuberculosis* продолжают циркулировать на ограниченных территориях, например, кластер Carabobo в Венесуэле [10] в то время как другие семейства широко распространились в мире, вероятно, по причине повышенной вирулентности и трансмиссивности. Было показано, что штаммы *M. tuberculosis*, ответственные за местные эпидемии, различаются по вирулентности при использовании моделей зараженных ими животных, что в свою очередь, связано с их способностью подавлять иммунный ответ. Однако неясно, как эти межштаммовые различия проявляются в особенностях развития заболевания туберкулезом [73].

Взаимодействие между геномом человека и давлением микроорганизмов привели к взаимной адаптации *Homo sapiens* и его микробиомы. Во вьетнамской популяции носители аллеля T597C гена TLR-2 имели большую предрасположенность к инфицированию штаммами *M. tuberculosis* генотипа East-Asian/Beijing [19]. В славянской популяции восточной Сибири аллель -336G гена CD209, кодирующего DC-SIGN, чаще встречался у пациентов, инфицированных генотипом Beijing [77].

Приобретение особых патогенных свойств различными генетическими линиями *M. tuberculosis* complex может приводить к локальному преобладанию определенных клонов, лучше адаптированных к местным человеческим популяциям. В качестве примеров можно привести подварианты генотипа Beijing в Южной Африке [42]. В то же время на эволюцию других вариантов *M. tuberculosis* могло оказать влияние селективное давление вакцинации BCG, например, на генотип Beijing во Вьетна-

ме [51] и генотип Haarlem в Тунисе [71]. Генотип Beijing является наиболее изученным вариантом *M. tuberculosis*, отмеченным многочисленными волнами распространения за пределы региона его возникновения — Северного Китая (см. ниже) [63, 83]. Некоторые другие глобально распространенные варианты (линии) *M. tuberculosis* начинают привлекать все большее внимание, например, Central-Asian (CAS), East-African Indian (EAI), Haarlem and Latin-American-Mediterranean (LAM) по причине их глобального присутствия и вовлеченности в локальные вспышки.

Локальная специфичность клональных вариантов может быть объяснена (1) недавним заносом штамма и его быстрым распространением в «наивной» популяции благодаря патогенным свойствам штамма (например, первоначальное проникновение *M. tuberculosis* в Японию 2000 лет назад [89]) или, напротив, (2) вследствие длительной циркуляции на данной территории. Генотипы Beijing и LAM представляют известные примеры первого случая гетерогенных глобальных семейств, состоящих из локально специфических субклонов. Например, гетерогенное семейство *M. tuberculosis* LAM отличается, как было показано в географически удаленных популяциях, особыми патогенными свойствами. Во-первых, в Бразилии, сублиния LAM\_RDRio выявлена в 37% случаев и ассоциирована с кавернозным туберкулезом легких. Поскольку кавернозный ТБ связан с большим бактериовыделением, было высказано предположение что связь LAM\_RDRio с более тяжелой формой заболевания представляет эволюционную стратегию патогена через увеличение трансмиссии, по крайней мере в некоторых этнических группах [56]. Во-вторых, вариант, названный авторами LAM-RUS преобладает в центральной России (наряду с генотипом Beijing) и как было показано, ассоциирован с множественной лекарственной устойчивостью и кластеризацией; в частности, уровень кластеризации среди нововыявленных больных был почти в два раза выше, чем средний уровень по России [23]. Еще более известным примером ассоциации не только с мульти-, но и с экстрарезистентностью (XDR, extremely drug resistance) является штамм KZN, преобладающий в Квазулу-Наталь (Южная Африка) с начала 1990-х гг. Было показано, что штаммы Beijing и KZN характеризуются большей способностью, чем уникальные генотипы ( $P < 0,05$ ), связываться с человеческими альвеолярными (A549) и бронхиальными (BBM) эпителиальными клетками [12]. Эти результаты показывают, что успешное распространение штаммов Beijing и KZN может быть связано с их взаимодействием с альвеолярным эпителием.

В качестве примеров локально преобладающих, но лекарственно-чувствительных клонов *M. tuberculosis* можно привести как континентальные, так и островные популяции. В Японии крупное исследование штаммов генотипа Beijing установило рост распространения высокотрансмиссивного «современного» варианта этого генотипа, в то время как распространение «древней» сублинии существенно замедлилось среди молодого поколения [46]. В исследовании, проведенном на острове Тринидад в Карибском море, было показано, что больше половины случаев заболеваемости туберкулезом в молодых возрастных группах было вызвано штаммами одного сполитотипа SIT566. Сравнение с доступными данными по другим карибским странам показало исключительное преобладание этого генотипа на Тринидаде. Филогенетически, SIT566 относится к семейству LAM и подсемейству LAM-CAM [59], которое характерно для Камеруна и соседних стран западной Африки. Его ассоциация с кластеризацией в африканских выборках показывает существенную роль в недавней трансмиссии в Камеруне и Буркина-Фасо [39, 75]. Интересно отметить, что  $3/4$  пациентов на Тринидаде, инфицированных SIT566/LAM-CAM, имели африканское происхождение [59].

В Болгарии сполитотип ST125 генетического семейства S выделяют в 14% случаев, при этом единичные изоляты ST125 описаны в других странах. Ранее было высказано предположение о его филогеографической специфичности для Болгарии и предложено уточнение его наименования как ST125\_BGR [93]. В то же время, штаммы ST125 не были ассоциированы ни с лекарственной устойчивостью [92], ни с ускоренным ростом в мышинных макрофагах (N. Markova, личное сообщение). Таким образом, заметное присутствие ST125\_BGR в Болгарии не связано с его особыми фенотипическими патогенными свойствами, а скорее обусловлено циркуляцией в стране в течение длительного исторического периода, вероятно приведшего в адаптации к местной человеческой популяции.

Как было отмечено выше для вариантов Beijing и KZN в Южной Африке, локально доминирующие клоны могут развивать устойчивую ассоциацию с данной популяцией, что приводит к их локальной неконкурирующей циркуляции. Namouchi et al. [71] показали, что более 60% туберкулеза в Тунисе вызвано одним генотипом из каждого основного семейства. При этом вариант ST50/Haarlem преимущественно циркулирует на севере, а более широко распространенный вариант ST42/LAM имеет низкий индекс трансмиссии и кластеризации, что отражает его стабильную ассоциацию с человеческой популяцией Туниса.

## Генетическое семейство Beijing вида *M. tuberculosis*

Среди генетических семейств, выделяемых внутри вида *M. tuberculosis* [17, 29, 33, 43, 82], генотип Beijing характеризуется, в целом, генетической однородностью и широким географическим распространением, что, как полагают, может свидетельствовать о его относительно недавней глобальной диссеминации [15, 38]. Впервые этот генотип был выявлен у штаммов, выделенных в 1992–1994 годах в Пекинском регионе Китая, что и объясняет его название [83]. Последующие исследования показали эндемичность этого генотипа для стран бывшего СССР, Южной Африки и Восточной Азии [1, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 38, 45, 46, 58, 60] и его нарастающее проникновение в новые удаленные регионы [35, 55, 69, 90]. В отличие от многих других генетических семейств внутри *M. tuberculosis*, для идентификации которых необходимо применение достаточно сложных и не всегда очевидных биоинформационных алгоритмов [28, 81], генотип Beijing имеет характерную особенность, а именно, «усеченный» локус DR, состоящий из девяти спейсеров с 35 по 43, и легко выявляемый при стандартном сполитипировании в виде характерного профиля гибридизации (рис. 3в) [51]. У штаммов генотипа Beijing большинство спейсеров в локусе DR, вероятно, было утрачено в результате малого количества делеционных событий, по крайней мере одно из которых было связано с рекомбинацией и транспозицией IS6110.

В настоящее время генотип Beijing привлекает внимание и с клинической точки зрения, поскольку его штаммы демонстрируют важные патогенные свойства, например повышенную вирулентность в организме мышей, вакцинированных БЦЖ [57], ассоциацию с лекарственной устойчивостью [5, 20, 52, 91], способность быстро размножаться в человеческих макрофагах [8, 96] и высокую трансмиссивность [18, 72]. Высокий уровень варибельности генов репликации, репарации и рекомбинации штаммов Beijing может обеспечивать их лучшую адаптацию к изменениям окружающей среды посредством механизмов селекции второго порядка [79, 94]. В то же время следует отметить, что патогенные свойства могут варьировать у различных штаммовых вариантов внутри генотипа, как было показано в исследованиях на мышинной модели [1, 2]. Текущая эпидемия туберкулеза в России, как предполагали ранее, в значительной степени связана с активным распространением мультирезистентных штаммов генотипа Beijing в популяции, иммунизированной БЦЖ [15]. Клональное распространение преобладающих типичных штаммов этого генотипа может быть объяснено геномными перестройками, обусловленными транспозицией элементов IS6110 и их

возможной вставкой в промоторные области определенных генов, что может представлять специфический путь адаптации к организму хозяина у IS6110-высококопийных штаммов Beijing. Таким образом, наблюдаемое сейчас широкое распространение штаммов Beijing представляет серьезную угрозу успешной реализации национальных программ борьбы с туберкулезом.

Говоря о наиболее значимых вариантах генотипа Beijing необходимо упомянуть вариант IS6110-RFLP Beijing/B0 [5, 6, 66, 67] (см. рис. 2, дорожка 4). B0, иначе называемый W148 (согласно базе данных Public Health Research Institute, Нью Йорк, США), наиболее часто встречаемый российский вариант Beijing, который широко циркулирует на территории постсоветского пространства и доминирует в США и Германии среди штаммов, выделенных от иммигрантов из бывшего СССР [5, 6, 7, 8, 9, 15, 20, 52, 53, 88]. Опубликованный нами филогенетический анализ штаммов Beijing, выделенных на Северо-Западе России в разные годы, показал, что штаммы с IS6110-RFLP профилем B0 кластеризовались также и на VNTR-дендрограмме, что подчеркивает их истинную клональность. В то же время, «звездная» VNTR-филогения штаммов B0-кластера, при которой центральный крупный тип связан короткими лучами с его однолокусными производными, свидетельствует о взрывной диссеминации штаммов этого кластера, который может представлять «успешный» клон, широко и исторически недавно распространившийся по всей России, благодаря своим особым патогенным свойствам [4, 67]. Проведенное нами компьютерное моделирование эволюции и коалесценции 17 полиморфных локусов VNTR российских штаммов Beijing с использованием Байесовой статистики позволило оценить темпы роста популяций кластера B0 и российской популяции Beijing в целом [4]. Полученные результаты показывают существенно более быстрый (в 10,6 раза) рост субпопуляции B0 в сравнении с популяцией Beijing в целом и, в свою очередь, подтверждают «успешность» этого клонального варианта *M. tuberculosis* в России.

## Заключение

Последние достижения в геномике микобактерий выявили более существенный уровень генетической варибельности при сравнении полных геномов даже родственных изолятов. Таким образом, полногеномное секвенирование может стать рутинным методом молекулярной эпидемиологии при условии снижения его стоимости до таковой традиционных методов генотипирования.

В то время как глобальные базы молекулярных данных *M. tuberculosis* содержат совокупные данные по огромному количеству штаммов,



существующие несовпадения принципов их создания затрудняют обмен информацией. Таким образом, синхронизация доступа к базам данных и поддержания в них информации на-сущно необходима для выявления одинаковых генотипов в различных базах, своевременного слежения за циркуляцией штаммов и установления общей номенклатуры.

Аккумуляция данных по различным, в том числе, новым маркерам, разработка и применение новых математических алгоритмов для их обработки и анализа позволяют провести более точное моделирование эволюции *M. tuberculosis* и его семейств на различных отрезках времени, эпидемиологический мониторинг их циркуляции внутри стран и в глобальном масштабе.

## Список литературы

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. — № 7. — С. 45–50.
2. Вишневский Б.И., Нарвская О.В., Васильева С.Н., Сапожникова Н.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф. Вирулентность микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза. — 2002. — № 10. — С. 33–36.
3. Дмитриев А.В., Шен А.Д., Тотолян А.А. TR Прямые повторы и спейсеры гена sak0192 *Streptococcus agalactiae* — генетические маркеры для характеристики штаммов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2007. — № 4. — С. 37–41.
4. Мокроусов И.В. Генетическое разнообразие и эволюция *Mycobacterium tuberculosis*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — СПб., 2009. — 40 с.
5. Нарвская О.В. Геномный полиморфизм *Mycobacterium tuberculosis* и его роль в эпидемическом процессе: Дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 2003. — 173 с.
6. Нарвская О.В., Вишневский Б.И., Елькин А.В., Мокроусов И.В., Лимещенко Е.В., Оттен Т.Ф., Осташко О.М., Ариэль Б.М. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных, оперированных по поводу туберкулеза легких // Проблемы туберкулеза. — 2002. — № 3. — С. 50–53.
7. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Вишневский Б.И. Генетическое маркирование полирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на Северо-Западе России // Проблемы туберкулеза. — 1999. — № 3. — С. 39–41.
8. 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. — № 10. — С. 45–50.
9. Шемякин И.Г., Степаншина В.Н., Иванов И.Ю., Липин М.Ю., Коробова О.В., Анисимова В.А. Характеристика клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием молекулярно-биологических методов // Молекулярная генетика микробиология и вирусология. — 2003. — № 1. — С. 32–40.
10. Abadia E., Zhang J., Vultros T. dos, Ritacco V., Kremer K., Aktas E., Matsumoto T., Refregier G., Soolingen D. van, Gicquel B., Sola C. Resolving lineage assignment on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method // Infect. Genet. Evol. — 2010. — Vol. 10. — P. 1066–1074.
11. Allix-Beguec C., Harmsen D., Weniger T., Supply P., Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46. — P. 2692–2699.
12. Ashiru O.T., Pillay M., Sturm A.W. Adhesion to and invasion of pulmonary epithelial cells by the F15/LAM4/KZN and Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Med. Microbiol. — 2010. — Vol. 59. — P. 528–533.
13. Banu S., Gordon S.V., Palmer S., Islam M.R., Ahmed S., Alam K.M., Cole S.T., Brosch R. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and prevalence of the Beijing strain // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42. — P. 674–682.
14. Barnes P.F., Cave M.D. Molecular epidemiology of tuberculosis // N. Engl. J. Med. — 2003. — Vol. 349. — P. 1149–1156.
15. Bifani J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains // Trends Microbiol. — 2002. — Vol. 10. — P. 45–52.
16. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // Microbiology. — 2005. — Vol. 151. — P. 2551–2561.
17. Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L., Prodinger W.M., Gori A., Al-Hajj S.A., Allix C., Aristimuno L., Aro-ra J., Baumanis V., Binder L., Cafrune P., Cataldi A., Cheong S., Diel R., Ellermeier C., Evans J.T., Fauville-Dufaux M., Ferdinand S., Garcia de Viedma D., Garzelli C., Gazzola L., Gomes H.M., Gutierrez M.C., Hawkey P.M., Helden P.D. van, Kadival G.V., Kreiswirth B.N., Kremer K., Kubin M., Kulkarni S.P., Liens B., Lillebaek T., Ly H.M., Martin C., Mokrousov I., Narvskaya O., Ngeow Y.F., Naumann L., Niemann S., Parwati I., Rahim M.Z., Rasolofoa-Razanamparany V., Rasolonalona T., Rossetti M.L., Rusch-Gerdes S., Sajduda A., Samper S., Shemyakin I., Singh U.B., Somoskovi A., Skuce R., Soolingen D. van, Streicher E.M., Suffys P.N., Tortoli E., Tracevska T., Vincent V., Victor T.C., Warren R., Yap S.F., Zaman K., Portaels F., Rastogi N., Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diver-



- sity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology // *BMC Microbiol.* — 2006. — Vol. 6. — P. 23.
18. Caminero J.A., Pena M.J., Campos-Herrero M.I., Rodriguez J.C., Garcia I., Cabrera P., Lafoz C., Samper S., Takiff H., Afonso O., Pavon J.M., Torres M.J., Soolingen D. van, Enarson D.A., Martin C. Epidemiological evidence of the spread of a Mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. 164. — P. 1165–1170.
  19. Caws M., Thwaites G., Dunstan S., Hawn T.R., Lan N.T., Thuong N.T., Stepniewska K., Huyen M.N., Bang N.D., Loc T.H., Gagneux S., Soolingen D. van, Kremer K., Sande M. van der, Small P., Anh P.T., Chinh N.T., Quy H.T., Duyen N.T., Tho D.Q., Hieu N.T., Torok E., Hien T.T., Dung N.H., Nhu N.T., Duy P.M., Vinh Chau N. van, Farrar J. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *M. tuberculosis* // *PLoS Pathog.* — 2008. — Vol. 4. — P. e1000034.
  20. Cox H.S., Kubica T., Doshetov D., Kebede Y., Rъsch-Gerdess S., Niemann S.. The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia // *Respir. Res.* — 2005. — Vol. 6. — P. 134.
  21. Daley C.L. Molecular epidemiology: a tool for understanding control of tuberculosis transmission // *Clin. Chest Med.* — 2005. — Vol. 26. — P. 217–231.
  22. Drobniewski F., Balabanova Y., Nikolayevsky V., Ruddy M., Kuznetsov S., Zakharova S., Melentyev A., Fedorin I. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia // *JAMA.* — 2005. — Vol. 293. — P. 2726–2731.
  23. Dubiley S., Ignatova A., Mukhina T., Nizova A., Blagodatskikh S., Stepanshina V., Shemyakin I. Molecular epidemiology of tuberculosis in Tula area, central Russia, before Directly Observed Therapy Strategy // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2010. — Vol. 16, N 9. — P. 1421–1426.
  24. Dymova M.A., Liashenko O.O., Poteiko P.I., Krutko V.S., Khrapov E.A., Filipenko M.L. Genetic variation of Mycobacterium tuberculosis circulating in Kharkiv Oblast, Ukraine // *BMC Infect. Dis.* — 2011. — Vol. 11. — P. 77.
  25. El Sahly H.M., Wright J.A., Soini H., Bui T.T., Williams-Bouyer N., Escalante P., Musser J.M., Graviss E.A. Recurrent tuberculosis in Houston, Texas: a population-based study // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 2004. — Vol. 8. — P. 333–340.
  26. Embden J. van, Cave M., Crawford J., Dale J., Eisenach K., Gicquel B., Hermans P., Martin C., McAdam R., Shinnick T., Small P. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: Recommendation for a standardized methodology // *J. Clin. Microbiol.* — 1993. — Vol. 31. — P. 406–409.
  27. Embden J.D.A. van, Gorkom T. van, Kremer K., Jansen T., Zeijst B.A.M. van der, Schouls L.M. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria // *J. Bacteriol.* — 2000. — Vol. 182. — P. 2393–2401.
  28. Ferdinand S., Valetudie G., Sola C., Rastogi N. Data mining of Mycobacterium tuberculosis complex genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validates the clonal structure of spoligotyping-defined families // *Res. Microbiol.* — 2004. — Vol. 155, N 8. — P. 647–654.
  29. Filliol I., Driscoll J.R., Soolingen D. van, Kreiswirth B.N., Kremer K., Valetudie G., Anh D.D., Barlow R., Banerjee D., Bifani P.J., Brudey K., Cataldi A., Cooksey R.C., Cousins D.V., Dale J.W., Delagostin O.A., Drobniewski F., Engelmann G., Ferdinand S., Gascoyne-Binzi D., Gordon M., Gutierrez M.C., Haas W.H., Heersma H., Kallenius G., Kassa-Kelembho E., Koivula T., Ly H.M., Makristathis A., Mammina C., Martin G., Mostrom P., Mokrousov I., Narbonne V., Narvskaya O., Nastasi A., Niobe S.-Eyngoh N., Pape J.W., Rasoloflo-Razanamparany V., Ridell M., Rossetti M.L., Stauffer F., Suffys P.N., Takiff H., Texier-Maugein J., Vincent V., Waard J.H. de, Sola C., Rastogi N. Global distribution of Mycobacterium tuberculosis spoligotypes // *Emerg. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 8. — P. 1347–1349.
  30. Filliol I., Driscoll J.R., Soolingen D. van, Kreiswirth B.N., Kremer K., Valetudie G., Dang D.A., Barlow R., Banerjee D., Bifani P.J., Brudey K., Cataldi A., Cooksey R.C., Cousins D.V., Dale J.W., Delagostin O.A., Drobniewski F., Engelmann G., Ferdinand S., Gascoyne-Binzi D., Gordon M., Gutierrez M.C., Haas W.H., Heersma H., Kassa-Kelembho E., Ho M.L., Makristathis A., Mammina C., Martin G., Mostrom P., Mokrousov I., Narbonne V., Narvskaya O., Nastasi A., Niobe-Eyngoh S.N., Pape J.W., Rasoloflo-Razanamparany V., Ridell M., Rossetti M.L., Stauffer F., Suffys P.N., Takiff H., Texier-Maugein J., Vincent V., Waard J.H. de, Sola C., Rastogi N. Snapshot of moving and expanding clones of Mycobacterium tuberculosis and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 1963–1970.
  31. Filliol I., Motiwala A.S., Cavatore M., Qi W., Hazbyn M.H., Bobadilla del Valle M., Fyfe J., Garcha-Garcha L., Rastogi N., Sola C., Zozio T., Guerrero M.I., Leyn C.I., Crabtree J., Angiuoli S., Eisenach K.D., Durmaz R., Joloba M.L., Rendyn A., Sifuentes-Osornio J., Ponce de Leyn A., Cave M.D., Fleischmann R., Whittam T.S., Alland D. Global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: Insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set // *J. Bacteriol.* — 2006. — Vol. 188. — P. 759–772.
  32. Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats // *Microbiology.* — 1998. — Vol. 144. — P. 1189–1196.

33. Gagneux S., Small P.M. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development // *Lancet Infect. Dis.* — 2007. — Vol. 7. — P. 328–337.
34. Gagneux S., DeRiemer K., Van T., Kato-Maeda M., Jong B.C. de, Narayanan S., Nicol M., Niemann S., Kremer K., Gutierrez M.C., Hilty M., Hopewell P.C., Small P.M. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — Vol. 103. — P. 2869–2873.
35. Garcia de Viedma D., Chaves F., Inigo J., for the Tuberculosis molecular epidemiology study group. New route of importation of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype // *Emerg. Infect. Dis.* — 2006. — Vol. 12. — P. 169–170.
36. Gillespie S.H. Tuberculosis: evolution in millennia and minutes // *Biochem. Soc. Trans.* — 2007. — Vol. 35. — P. 1317–1320.
37. Glynn J.R., Crampin A.C., Traore H., Yates M.D., Mwaungulu F.D., Ngwira B. M., Chaguluka S.D., Mwafulirwa D.T., Floyd S., Murphy C., Drobniewski F. A., Fine P.E. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype, northern Malawi // *Emerg. Infect. Dis.* — 2005. — Vol. 11. — P. 150–153.
38. Glynn J.R., Whiteley J., Bifani P.J., Kremer K., Soolingen D. van. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review // *Emerg. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 8. — P. 843–849.
39. Godreuil S., Torrea G., Terru D Chevenet F., Diagbouga S., Supply P., Perre P. van de, Carriere C., Baculs A.L. First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Burkina Faso // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45. — P. 921–927.
40. Groenen P.M., Bunschoten A.E., Soolingen D. van, Embden J.D. van. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method // *Mol. Microbiol.* — 1993. — Vol. 10, N 5. — P. 1057–1065.
41. Gutacker M.M., Mathema B., Soini H., Shashkina E., Kreiswirth B.N., Graviss E.A., Musser J.M. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites // *J. Infect. Dis.* — 2006. — Vol. 193. — P. 121–128.
42. Hanekom M., Spuy G.D. van der, Gey van Pittius N.C., McEvoy C.R., Ndabambi S.L., Victor T.C., Hoal E.G., Helden P.D. van, Warren R.M. Evidence that the spread of *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype is human population dependent // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45. — P. 2263–2256.
43. Helden P.D. van, Warren R.M., Victor T.C., Spuy G. van der, Richardson M., Hoal van Helden E. Strain families of *Mycobacterium tuberculosis* // *Trends Microbiol.* — 2002. — Vol. 10. — P. 167–168.
44. Hermans P.W.M., Soolingen D. van, Bik E.M., Haas P.E.W. de, Dale J.W., Embden J.D.A. van. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains // *Infect. Immun.* — 1991. — Vol. 59. — P. 2695–2705.
45. Ignatova A., Dubiley S., Stepanshina V., Shemyakin I. Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia // *J. Med. Microbiol.* — 2006. — Vol. 55, N 10. — P. 1413–1418.
46. Iwamoto T., Fujiyama R., Yoshida S., Wada T., Shirai C., Kawakami Y. Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan // *J. Clin. Microbiol.* — 2009. — Vol. 47. — P. 3340–3343.
47. Iwamoto T., Yoshida S., Suzuki K., Tomita M., Fujiyama R., Tanaka N., Kawakami Y., Ito M. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2007. — Vol. 272. — P. 282–283.
48. Jansen R., Embden J.D.A. van, Gaastra W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // *Mol. Microbiol.* — 2002. — Vol. 43. — P. 1565–1575.
49. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., Agterveld M. van, Soolingen D. van, Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., Embden J. van. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control // *J. Clin. Microbiol.* — 1997. — Vol. 35. — P. 907–914.
50. Kremer K., Glynn J.R., Lillebaek T., Niemann S., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N., Bifani P.J., Soolingen D. van, Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — Vol. 42. — P. 4040–4049.
51. Kremer K., Werf M.J. van der, Au B.K., Anh D.D., Kam K.M., Doorn H.R. van, Borgdorff M.W., Soolingen D. van. Vaccine-induced immunity circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains // *Emerg. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 15. — P. 335–339.
52. Krüüner A., Hoffner S.E., Sillastu H., Danilovits M., Levina K., Svenson S.B., Ghebremichael S., Koi-vula T., Källenius G. Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 3339–3345.
53. Kubica T., Rusch-Gerdes S., Niemann S. The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 2004. — Vol. 8. — P. 1107–1113.
54. Kwara A., Schiro R., Cowan L.S., Hyslop N.E., Wiser M.F., Harrison S.R., Kissinger P., Diem L., Crawford J.T. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 2683–2685.

55. Lavender C., Globan M., Sievers A., Billman-Jacobe H., Fyfe J. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Australia // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2005. — Vol. 49. — P. 4068–4074.
56. Lazzarini L.C., Spindola S.M., Bang H., Gibson A.L., Weisenberg S., Silva Carvalho W. da, Augusto C.J., Huard R.C., Kritski A.L., Ho J.L. RDRio *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitary pulmonary disease // *J. Clin. Microbiol.* — 2008. — Vol. 46. — P. 2175–2183.
57. Lopez B., Aguilar D., Orozco H., Burger M., Espitia C., Ritacco V., Barrera L., Kremer K., Hernandez-Pando R., Huygen K., Soolingen D. van. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes // *Clin. Exp. Immunol.* — 2003. — Vol. 133. — P. 30–37.
58. Marais B.J., Victor T.C., Hesselting A.C., Barnard M., Jordaan A., Brittle W., Reuter H., Beyers N., Helden P.D. van, Warren R.M., Schaaf H.S. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44. — P. 3539–3543.
59. Millet J., Baboolal S., Akpaka P.E., Ramoutar D., Rastogi N. Phylogeographical and molecular characterization of an emerging *Mycobacterium tuberculosis* clone in Trinidad and Tobago // *Infect. Genet. Evol.* — 2009. — Vol. 9. — P. 1336–1344.
60. Millet J., Miyagi-Shiohira C., Yamane N., Sola C., Rastogi N. Assessment of mycobacterial interspersed repetitive unit-QUB markers to further discriminate the Beijing genotype in a population-based study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Okinawa, Ryukyu Islands, Japan // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45. — P. 3606–3615.
61. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // *J. Mol. Evol.* — 2005. — Vol. 60. — P. 174–182.
62. Mokrousov I. *Corynebacterium diphtheriae*: genome diversity, population structure and genotyping perspectives // *Infect. Genet. Evol.* — 2009. — Vol. 9. — P. 1–15.
63. Mokrousov I. Genetic geography of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multifacet mirror of human history? // *Infection, Genetics and Evolution.* — 2008. — Vol. 8. — P. 777–785.
64. 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. — P. 1357–1364.
65. Mokrousov I., Narvskaya O., Limeschenko E., Vyazovaya A., Otten T., Vyshnevskiy B. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — Vol. 42. — P. 2438–2444.
66. Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., Steklova L., Vyshnevskiy B. Phylogenetic reconstruction within *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in northwest Russia // *Res. Microbiol.* — 2002. — Vol. 153. — P. 629–637.
67. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Millet J., Otten T., Vishnevsky B., Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in search of informative VNTR loci // *J. Clin. Microbiol.* — 2008. — Vol. 46. — P. 3576–3584.
68. Mokrousov I., Valcheva V., Sovhozova N., Aldashev A., Rastogi N., Isakova J. Penitentiary population of *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyzstan: Exceptionally high prevalence of the Beijing genotype and its Russia-specific subtype // *Infect. Genet. Evol.* — 2009. — Vol. 9. — P. 1400–1405.
69. Morcillo N., Di Giulio B., Chirico C., Kuriger A., Dolmann A., Alito A., Zumarraga M., Soolingen D. van, Kremer K., Cataldi A. First description of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Argentina // *Rev. Argent. Microbiol.* — 2005. — Vol. 37. — P. 92–95.
70. Musser J.M., Amin A., Ramaswamy S. Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure // *Genetics.* — 2000. — Vol. 155. — P. 7–16.
71. Namouchi A., Karboul A., Mhenni B., Khabouchi N., Haltiti R., Ben Hassine R., Louzir B., Chabbou A., Mardassi H. Genetic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* in Tunisia: predominance and evidence for the establishment of a few genotypes // *J. Med. Microbiol.* — 2008. — Vol. 57. — P. 864–872.
72. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Sapozhnikova N., Graschenkova O., Steklova L., Nikonova I., Filipenko M.L., Mokrousov I., Vyshnevskiy B. Nosocomial outbreak of multidrug resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strain in St. Petersburg, Russia // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 21. — P. 596–602.
73. Nicol M.P., Wilkinson R.J. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis* // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* — 2008. — Vol. 102. — P. 955–965.
74. Niemann S., Diel R., Khechinashvili G., Gegia M., Mdivani N., Tang Y.W. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia // *J. Clin. Microbiol.* — 2010. — Vol. 48. — P. 3544–3550.
75. Niobe-Eyangoh S.N., Kuaban C., Sorlin P., Cunin P., Thonnon J., Sola C., Rastogi N., Vincent V., Gutierrez M.C. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 2547–2553.
76. Oelemann M.C., Diel R., Vatin V., Haas W., Rusch-Gerdes S., Loch C., Niemann S., Supply P. Assess-



- ment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45. — P. 691–697.
77. Ogarkov O.B., Medvedeva T.V., Nekipelov O.M., Antipina S.L., Men'shikov M.L. Study of DC-SIGN gene polymorphism in patients infected with *Mycobacterium tuberculosis* strains of different genotypes in the Irkutsk Region // *Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.* — 2007. — N 11. — P. 37–42.
  78. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies // *Microbiology.* — 2005. — Vol. 151. — P. 653–663.
  79. Rad M.E., Bifani P., Martin C., Kremer K., Samper S., Rauzier J., Kreiswirth B., Blazquez J., Jouan M., Soolingen D. van, Gicquel B. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family // *Emerg. Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 9. — P. 838–845.
  80. Sampson S., Warren R., Richardson M., Spuy G. van der, Helden P. van. IS6110 insertions in *Mycobacterium tuberculosis*: predominantly into coding regions // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39, N 9. — P. 3423–3424.
  81. Sebban M., Mokrousov I., Rastogi N., Sola C. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis* // *Bioinformatics.* — 2002. — Vol. 18, N 2. — P. 235–243.
  82. Sola C., Filliol I., Legrand E., Mokrousov I., Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades // *J. Mol. Evol.* — 2001. — Vol. 53. — P. 680–689.
  83. Soolingen D. van, Qian L., Haas P.E.W. de, Douglas J.T., Traore H., Portaels F., Quing Z., Enkhasaikhan D., Nymadawa P., Embden J.D.A. van. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia // *J. Clin. Microbiol.* — 1995. — Vol. 33. — P. 3234–3238.
  84. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2008. — Vol. 6. — P. 181–186.
  85. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K., Connell N., Kreiswirth B., Whittam T., Musser J.M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 97. — P. 9869–9874.
  86. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rusch-Gerdes S., Willery E., Savine E., Haas P. de, Deutekom H. van, Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez C.M., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C., Soolingen D. van. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44. — P. 4498–4510.
  87. Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., Soolingen D. van, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 3563–3571.
  88. Surikova O.V., Voitech D.S., Kuzmicheva G., Tatkov S.I., Mokrousov I.V., Narvskaya O.V., Rot M.A., Soolingen D. van, 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, N 11. — P. 963–974.
  89. Suzuki T., Inoue T. Earliest Evidence of spinal tuberculosis from the Aneolithic Yayoi period in Japan // *Int. J. Osteoarchaeol.* — 2007. — Vol. 17. — P. 392–402.
  90. Taype Perez C. Host and pathogen genetics in tuberculosis and leishmaniasis. PhD thesis. — Leeds, UK: University of Leeds, 2007.
  91. Toungousova O., Sandven P., Mariandyshev A., Nizovtseva N., 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. — P. 1930–1937.
  92. Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Rastogi N., Markova N. Molecular snapshot of drug-resistant and drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in Bulgaria // *Infect. Genet. Evol.* — 2008. — Vol. 8. — P. 657–663.
  93. Valcheva V., Mokrousov I., Panaiotov S., Bachiiska E., Zozio T., Sola C., Markova N., Rastogi N. Bulgarian specificity and controversial phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype ST125\_BGR // *FEMS Immunol. Clin. Microbiol.* — 2010. — Vol. 59. — P. 90–99.
  94. Vultos T. dos, Mestre O., Rauzier J., Golec M., Rastogi N., Rasololofo V., Tonjum T., Sola C., Matic I., Gicquel B. Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis* // *PLoS One.* — 2008. — Vol. 3. — P. e1538.
  95. Warren R.M., Streicher E.M., Sampson S.L., Spuy G.D. van der, Richardson M., Nguyen D., Behr M.A., Victor T.C., Helden P.D. van. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 4457–4465.
  96. Zhang M., Cong J., Yang Z., Samten B., Barnes P.F. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages // *J. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 179. — P. 1213–1217.