

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ, МЕТОДОМ MIRU-VNTR

К. В. Шур, Д. А. Маслов, О. Б. Беккер, В. Н. Даниленко ✉

Лаборатория генетики микроорганизмов, Отдел генетических основ биотехнологии, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

Под воздействием различных селективных факторов (применение антибиотиков, генетический полиморфизм и разнообразие иммунных статусов хозяина и др.) возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* постоянно эволюционирует. Возникают новые линии и сублинии, характеризующиеся набором значимых и незначимых мутаций. Анализ и мониторинг представленности различных линий и их особенностей является важным для понимания эволюции патогена. В данной работе была использована коллекция из 46 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных в Московском регионе. Была определена их генотипическая принадлежность к различным линиям и сублиниям типированием по 24 локусам MIRU-VNTR. Было показано преобладание изолятов линии Beijing в коллекции (60,9 %) и изолятов сублинии Beijing-B0/W148 (60,7 % внутри линии Beijing), характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью (88,2 % изолятов в данной выборке). Также использованный метод позволил определить один предполагаемый случай смешанной инфекции.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, генотипирование, филогенетика, эпидемиология, Beijing, MIRU-VNTR

Финансирование: работа выполнена в рамках двустороннего проекта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 13-04-91444 «Токсины-антитоксины и RpsA в лекарственной устойчивости и персистенции микобактерий туберкулеза»).

Благодарности: авторы благодарят коллектив отдела микробиологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза (Москва) и, в частности, д. б. н. Ларису Черноусову за помощь в создании коллекции клинических изолятов *M. tuberculosis*.

✉ **Для корреспонденции:** Даниленко Валерий Николаевич
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119333; valerid@vigg.ru

Статья получена: 01.02.2017 **Статья принята к печати:** 24.02.2017

MIRU-VNTR GENOTYPING OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CLINICAL ISOLATES FROM MOSCOW REGION

Shur KV, Maslov DA, Bekker OB, Danilenko VN ✉

Laboratory of Bacterial Genetics, Department of Genetics and Biotechnology, Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russia

Antibiotic selection pressure, genetic polymorphism as well as diversity of the immune status of the host and other selection factors continuously prompt *Mycobacterium tuberculosis*, the tuberculosis causative agent, to evolve. Significant or insignificant mutations shape new (sub)lineages of the pathogen whose evolution can be understood only through analyzing and monitoring its genotypic diversity and properties of its lineages. In our study we used a set of 46 *M. tuberculosis* clinical isolates from Moscow region. The samples were typed using the standard 24-loci MIRU-VNTR technique. Beijing family isolates were shown to prevail in the collection (60.9 %), as well as Beijing-B0/W148 subtype (60.7 % of total Beijing type samples); most of them (88.2 %) were multidrug-resistant resistant. The applied technique allowed us to detect one case of a mixed-strain infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping, phylogenetics, epidemiology, Beijing, MIRU-VNTR

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 13-04-91444 *Toxin-antitoxins and RpsA in TB drug resistance and persistence*).

Acknowledgements: the authors thank the research team of the Department of Microbiology of the Central TB Research Institute (Moscow) for their assistance in preparing a collection of *M. tuberculosis* isolates, with special thanks going to Larisa Chernousova, D. Sci. (Biol).

✉ **Correspondence should be addressed:** Valery Danilenko
ul. Gubkina, d. 3, Moscow, Russia, 119333; valerid@vigg.ru

Received: 01.02.2017 **Accepted:** 24.02.2017

Приобретение лекарственной устойчивости штаммами возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* — одна из самых значимых проблем фтизиатрии, в том числе в России, где ежегодно фиксируется 115 тыс. случаев заболевания туберкулезом (80 случаев на 100 тыс. человек), а 20 % всех впервые выявленных и 50 % ранее получавших противотуберкулезную терапию пациентов инфицированы штаммами с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [1]. Таким образом, для совершенствования

схем терапии, критически важным является поиск и определение особенностей наиболее распространенных на территории России штаммов *M. tuberculosis*.

Изоляты микобактерий туберкулеза относят к различным линиям, каждая из которых имеет определенное географическое происхождение [2] и характеризуется набором филогенетических маркеров, влияющих также на фенотип штамма [3]. В России наиболее часто встречаются представители линии Beijing, которая характеризуется

повышенной трансмиссивностью, вирулентностью, частотой мутаций в геноме и другими свойствами, способствующими их распространению [4].

В недавних исследованиях, проведенных в России [5], были обнаружены штаммы сублинии Beijing-B0/W148. Они характеризуются повышенной (по отношению к родительской линии Beijing) вирулентностью и множественной лекарственной устойчивостью (практически полным отсутствием лекарственно-чувствительных штаммов в данной сублинии). Mokrousov и соавт. назвали Beijing-B0/W148 «успешным клоном» *M. tuberculosis* [5].

Для определения принадлежности штамма/изолята *M. tuberculosis* к какой-либо линии применяют различные методы генотипирования: метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов мобильного элемента IS6110 (IS6110 restriction fragment length polymorphism, RFLP), сполитипирование [6], методы, основанные на маркерных однонуклеотидных полиморфизмах (single nucleotide polymorphism, SNP) генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes) [7] и систем токсин-антитоксин II типа [8]. Все эти методы различаются по стоимости и трудоемкости исследования, а также по своей дискриминирующей способности. Одним из наиболее быстрых, дешевых, но в то же время обладающих наибольшей дискриминирующей способностью является молекулярный метод генотипирования, основанный на анализе количества распределенных по геному *M. tuberculosis* повторов — MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units – variable number of tandem repeats) [9].

Ранее нами была проанализирована коллекция ДНК из 64 изолятов *M. tuberculosis* выделенных от пациентов Центрального НИИ туберкулеза (Москва). Изоляты были типированы методом сполитипирования, показавшим, что 70,3 % из них относятся к линии Beijing [10]. Для определения доли «успешных клонов» Beijing-B0/W148 среди штаммов линии Beijing, а также для более детального анализа филогенетической структуры коллекции нами проведено типирование доступных для анализа 46 образцов ДНК коллекции по 24 локусам MIRU-VNTR. Результаты представлены в этой работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коллекция ДНК клинических изолятов *M. tuberculosis*

В работе использовали коллекцию ДНК клинических изолятов *M. tuberculosis*, ранее детально описанную Maslov и соавт. [10]. В частности, были установлены сполитипы изолятов и их профиль лекарственной устойчивости к 8 противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда. На основании этого изоляты были разделены на две группы: 1) изоляты, устойчивые хотя бы к одному противотуберкулезному препарату (41 изолят); 2) контрольная группа лекарственно-чувствительных изолятов (23 изолята). В данной работе для анализа были доступны 46 изолятов, из которых к каждой группе относилась половина.

Генотипирование клинических изолятов *M. tuberculosis*

Генотипирование клинических изолятов проводили по 24 локусам MIRU-VNTR согласно стандартному протоколу [11]. Синтез праймеров для амплификации, описанных в [9], выполнила компания «Синтол» (Россия). Амплификацию проводили в 96-луночных планшетах с объемом лу-

нок 0,2 мл (Bio-Rad, США) с набором для проведения ПЦР «Амплификация» (Dialat, Россия) по протоколу, описанному в [9], на амплификаторе T100 (Bio-Rad, США). Полученные фрагменты разделяли в 2 % агарозном гель-электрофорезе в 1х трис-ацетат-EDTA (ТАЕ) буфере (трис-ацетат — 40 мМ, EDTA — 1 мМ, pH 7,6). Полученные результаты интерпретировали с помощью веб-приложения MIRU-VNTRplus [9, 12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Итоговое распределение изолятов *M. tuberculosis* по профилю MIRU-VNTR с использованием программы MIRU-VNTRplus было следующим: 60,9 % изолятов относятся к линии Beijing, 13,0 % — к LAM, 13,0 % — к T1 и T2, 4,3 % — к URAL, по одному изоляту (2,2 %) — к линиям Cameroon, S и NEW-1. Для одного изолята не удалось определить принадлежность к определенной линии. В изоляте 13-2078 были обнаружены два аллеля локуса QUB26 — 1 и 7, что может быть свидетельством смешанной инфекции [13].

На основе полученных MIRU-VNTR профилей мы построили дендрограмму (рисунок). На ней четко кластеризуются 17 изолятов, относящихся к сублинии B0/W148 (изолят 13-2078 представляет собой смесь двух штаммов, но оба относятся к сублинии B0/W148), составляя, таким образом, 60,7 % всех изолятов линии Beijing. Стоит отметить, что все они относятся к группе А — лекарственно-устойчивым изолятам, при этом 15 из них (88,2 %) обладают МЛУ, из которых, в свою очередь, 3 (20,0 %) обладают широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ).

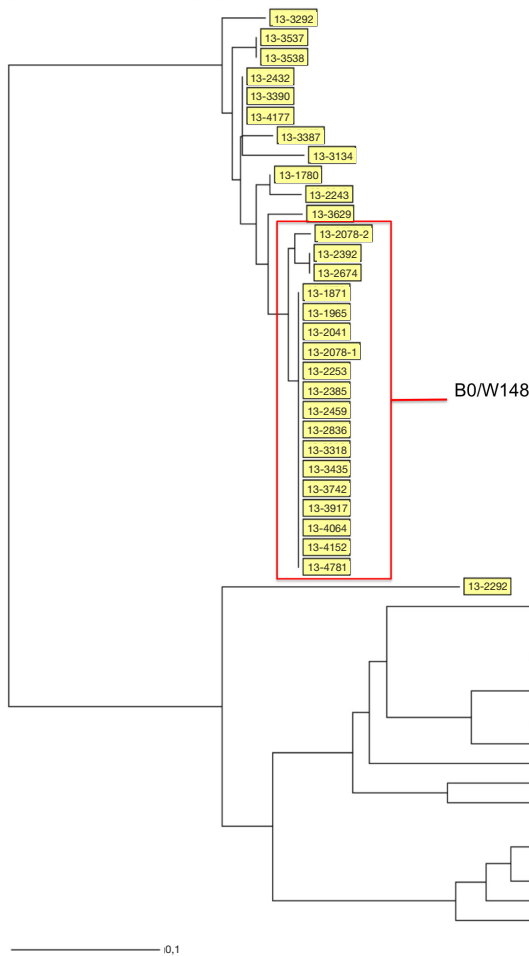
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В предыдущей работе [10] мы провели генотипирование изолятов *M. tuberculosis* с использованием сполитипирования. В результате изоляты разделились на 6 групп: 60,9 % изолятов принадлежат к линии Beijing, 21,7 % — к T1 и T2, 6,5 % — к LAM9, 6,5 % — к H4 (доли указаны для 46 изолятов, исследованных в данной работе). Пять изолятов имели уникальный генотип [10]. Это могло произойти в связи со случайной делецией или инсерцией спейсеров, что является довольно частым явлением из-за высокой вариабельности данного региона.

Проведенный анализ 24 локусов MIRU-VNTR позволил уточнить ранее полученные данные. Так, удалось отнести к различным линиям 4 изолята, ранее отнесенные к T-кластеру (два — к LAM, по одному — к S и Cameroon), и 3 изолята линии H4 (два — к Ural, один — к NEW1). В то же время удалось выявить представителей сублинии Beijing B0/W148 среди изолятов линии Beijing. Таким образом, MIRU-VNTR является более предпочтительным методом генотипирования *M. tuberculosis* в сравнении со сполитипированием за счет более высокой разрешающей способности и возможности установления случаев смешанной инфекции, хотя наилучшие результаты могут быть получены только при комбинировании различных методик генотипирования.

Все изоляты сублинии Beijing-B0/W148 оказались лекарственно-устойчивыми, преимущественно МЛУ (88,2 %), что характерно для этой группы и согласуется с данными, полученными ранее [5, 14]. Этот факт дополнительно подтверждает «успешность» данной сублинии. Открытым остается вопрос о факторах, способствующих отбору

NJ-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical (1), Spoligo: Categorical (1)



№	SpolDB4 тип	MIRU тип	MIRU-VNTR профиль по 24 локусам
13-3292	1	BEIJING 9866-32	2 4 2 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 6 3 8 2 3
13-3537	1	BEIJING 9844-32	2 4 5 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-3538	1	BEIJING 9844-32	2 4 5 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-2432	1	BEIJING 94-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-3390	1	BEIJING 94-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-4177	1	BEIJING 94-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-3387	1	BEIJING 9843-32	2 4 4 2 3 4 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-3134	1	BEIJING 96-146	2 4 4 2 3 3 3 5 1 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-1780	1	BEIJING 1066-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-2243	1	BEIJING 1066-133	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 1 5 1 5 3 3 5 3 6 2 3
13-3629	1	BEIJING 99-332	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 2 4 2 5 1 5 3 3 5 3 7 2 3
13-2078	1	BEIJING 10377-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 1 2 3
13-2392	1	BEIJING 1066-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 6 2 3
13-2674	1	BEIJING 1066-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 6 2 3
13-1871	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-1985	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2041	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2078	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2253	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2385	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2459	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2836	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-3318	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-3435	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-3742	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-3917	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-4064	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-4152	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-4781	1	BEIJING 100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2292		7-15	2 1 3 2 2 3 3 2 2 6 3 4 2 2 5 1 5 3 3 3 3 3 2 2
13-2586		7-66	2 3 4 2 3 3 3 5 2 2 3 4 2 1 5 1 5 3 3 2 3 3 8 2 2
13-3114	53	T1	2 3 4 2 4 3 1 2 1 3 1 4 2 2 5 1 5 3 3 5 3 5 2 2
13-9632	118	T2	2 3 2 1 4 3 1 2 2 3 3 4 2 2 5 1 5 3 3 3 3 3 2 2
13-3539	118	T2	2 3 4 2 4 3 1 2 2 2 2 4 2 2 5 1 5 3 3 3 6 3 2 2
13-3582	118	T2	2 3 4 2 4 3 1 2 2 3 2 2 4 2 2 5 1 5 3 3 3 5 5 0 1
13-3617	118	T2	2 3 4 2 3 3 1 2 2 2 2 2 2 2 5 1 5 3 4 3 5 5 2 2
13-4189		7-15	2 3 4 2 4 3 1 2 2 3 3 4 2 2 5 1 4 3 3 3 8 5 2 2
13-3896	1252	T1	2 4 4 2 4 3 3 2 1 5 3 4 2 2 5 1 5 3 3 3 3 5 2 2
13-3594		7-15	2 3 3 2 3 4 3 4 2 6 2 4 2 5 1 4 3 3 3 3 3 8 3 2
13-3055	127	H4	2 3 4 2 2 11 2 3 2 2 4 4 2 5 1 1 3 3 2 3 8 3 2
13-3147	262	H4	2 4 5 2 5 8 1 3 2 2 4 4 2 5 1 1 3 3 2 5 7 3 2
13-2978	42	LAMB9	042-52 1 4 2 2 6 4 3 3 2 2 2 4 1 2 5 1 5 3 3 2 2 6 2 2
13-3158	42	LAMB9	15916-51 1 4 2 2 4 4 2 3 2 2 2 4 1 2 5 1 5 3 3 2 2 6 2 2
13-3208	42	LAMB9	15572-52 1 4 2 2 4 4 3 3 2 2 2 4 1 2 5 1 5 3 3 2 2 4 2 2
13-3935	766	T1	7-52 1 4 2 2 4 4 3 3 2 2 2 4 1 2 5 1 5 3 3 2 2 5 2 2
13-3086		7-52	1 4 2 2 4 4 3 3 2 2 2 4 1 2 5 1 5 3 3 2 2 6 2 2
13-4178	264	T1	11418-51 1 3 2 2 5 5 3 3 2 2 2 4 1 2 5 1 5 3 3 2 2 5 2 2

Филогенетическое NJ-дерево изолятов *M. tuberculosis*, выделенных в Московском регионе. Дерево построено с использованием данных профиля MIRU-VNTR24 для каждой филогенетической группы. Красным выделена сублиния Beijing-B0/W148

именно этой филогенетической группы. Видимо, повышенная мутационная изменчивость привела к функциональным перестройкам, позволившим повысить вирулентность и выживаемость данной группы [4]. Ответы на эти вопросы предстоит получить в будущих исследованиях.

ВЫВОДЫ

Оценка и эпидемиологический контроль за распространением успешных линий *M. tuberculosis* являются важней-

шейшими задачами в рамках организации эффективной диагностики и лечения больных туберкулезом. Результаты, полученные в исследовании, позволяют говорить о тенденции распространения штаммов сублинии Beijing-B0/W148, для которых характерен МЛУ-фенотип, дополняют существующие эпидемиологические данные для центрального региона России, а также подчеркивают важность применения различных методик генотипирования для наиболее полной характеристики клинических изолятов *M. tuberculosis*.

Литература

- World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2015. Vol. 1. Geneva, Switzerland; 2015.
- Homolka S, Niemann S, Russell DG, Rohde KH. Functional genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. PLoS Pathog. 2010 Jul; 6 (7): e1000988. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000988.
- Mitchison DA, Wallace JG, Bhatia AL, Selkon JB, Subbiah TV, Lancaster MC. A comparison of the virulence in guinea-pigs of South Indian and British tubercle bacilli. Tubercle. 1960 Feb; 41: 1-22.
- Villellas C, Aristimuño L, Vitoria M-A, Prat C, Blanco S, García de Viedma D, et al. Analysis of mutations in streptomycin-resistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype. J Clin Microbiol. 2013 Jul; 51 (7): 2124-30. DOI: 10.1128/JCM.01944-12.
- Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Otten T, Jiao WW, Gomes LL, et al. Russian "successful" clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: A multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. J Clin Microbiol. 2012; 50 (11): 3757-9. DOI: 10.1128/JCM.02001-12.
- van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. J Clin Microbiol. 1995 Dec; 33 (12): 3234-8.
- Homolka S, Projahn M, Feuerriegel S, Ubben T, Diel R, Nubel U, et al. High resolution discrimination of clinical Mycobacterium tuberculosis complex strains based on single nucleotide polymorphisms. PLoS One. 2012; 7 (7): e39855. DOI:

- 10.1371/journal.pone.0039855.
8. Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. Mycobacterium tuberculosis Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. *PLoS One*. 2015 Dec 14; 10 (12): e0143682. DOI: 10.1371/journal.pone.0143682.
 9. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jul; 38 (Web Server issue): W326–31. DOI: 10.1093/nar/gkq351. Epub 2010 May 10.
 10. Maslov DA, Zaichikova MV, Chernousova LN, Shur KV, Bekker OB, Smirnova TG, et al. Resistance to pyrazinamide in Russian Mycobacterium tuberculosis isolates: PncA sequencing versus Bactec MGIT 960. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015 Sep; 95 (5): 608–12. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05013.
 11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2006 Dec; 44 (12): 4498–510. DOI: 10.1128/JCM.01392-06. Epub 2006 Sep 27.
 12. Allix-Béguec 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 Aug; 46 (8): 2692–9. DOI: 10.1128/JCM.00540-08. Epub 2008 Jun 11.
 13. Cohen T, van Helden PD, Wilson D, Colijn C, McLaughlin MM, Abubakar I, et al. Mixed-strain Mycobacterium tuberculosis infections and the implications for tuberculosis treatment and control. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct; 25 (4):708–19. DOI: 10.1128/CMR.00021-12.
 14. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015 Jun; 95 Supple 1: S167–76. DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.031. Epub 2015 Feb 24.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2015. Vol. 1. Geneva, Switzerland; 2015.
2. Homolka S, Niemann S, Russell DG, Rohde KH. Functional genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. *PLoS Pathog*. 2010 Jul; 6 (7): e1000988. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000988.
3. Mitchison DA, Wallace JG, Bhatia AL, Selkon JB, Subbiah TV, Lancaster MC. A comparison of the virulence in guinea-pigs of South Indian and British tubercle bacilli. *Tubercle*. 1960 Feb; 41: 1–22.
4. Villellas C, Aristimuño L, Vitoria M-A, Prat C, Blanco S, García de Viedma D, et al. Analysis of mutations in streptomycin-resistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype. *J Clin Microbiol*. 2013 Jul; 51 (7): 2124–30. DOI: 10.1128/JCM.01944-12.
5. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Otten T, Jiao WW, Gomes LL, et al. Russian “successful” clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: A multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (11): 3757–9. DOI: 10.1128/JCM.02001-12.
6. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. *J Clin Microbiol*. 1995 Dec; 33 (12): 3234–8.
7. Homolka S, Projahn M, Feuerriegel S, Ubben T, Diel R, Nubel U, et al. High resolution discrimination of clinical Mycobacterium tuberculosis complex strains based on single nucleotide polymorphisms. *PLoS One*. 2012; 7 (7): e39855. DOI: 10.1371/journal.pone.0039855.
8. Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. Mycobacterium tuberculosis Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. *PLoS One*. 2015 Dec 14; 10 (12): e0143682. DOI: 10.1371/journal.pone.0143682.
9. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jul; 38 (Web Server issue): W326–31. DOI: 10.1093/nar/gkq351. Epub 2010 May 10.
10. Maslov DA, Zaichikova MV, Chernousova LN, Shur KV, Bekker OB, Smirnova TG, et al. Resistance to pyrazinamide in Russian Mycobacterium tuberculosis isolates: PncA sequencing versus Bactec MGIT 960. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015 Sep; 95 (5): 608–12. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05013.
11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2006 Dec; 44 (12): 4498–510. DOI: 10.1128/JCM.01392-06. Epub 2006 Sep 27.
12. Allix-Béguec 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 Aug; 46 (8): 2692–9. DOI: 10.1128/JCM.00540-08. Epub 2008 Jun 11.
13. Cohen T, van Helden PD, Wilson D, Colijn C, McLaughlin MM, Abubakar I, et al. Mixed-strain Mycobacterium tuberculosis infections and the implications for tuberculosis treatment and control. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct; 25 (4):708–19. DOI: 10.1128/CMR.00021-12.
14. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015 Jun; 95 Supple 1: S167–76. DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.031. Epub 2015 Feb 24.