

Идентификация генотипов *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с резистентностью и чувствительностью к лекарственным препаратам*.

Дымова М.А.¹, Альховик О.И.², Чередниченко А.Г.², Кожамкулов У.А.³, Петренко Т. И.²,
Раманкулов Е.М.², Филипенко М.Л.¹

Dymova M.A., Alkhovik O.I., Cherednichenko A.G., Kozhamkulov U.A., Petrenko T.I., Ramankulov
E.M., Filipenko M.L.

¹ *Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН*

630090 г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева 8;

² *Научно-исследовательский институт туберкулеза*

630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, 81 А;

³ *Национальный центр биотехнологии Казахстана*

010000, Республика Казахстан, Астана, ул. Валиханова, 13/1;

e-mail: maya.a.rot@gmail.com

Дымова Майя Александровна

*Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт №11.519.11.2013)

Резюме

Проведено молекулярно-генетическое исследование 1454-х изолятов *Mycobacterium tuberculosis* методом VNTR-типирования, циркулирующих на различных территориях (РФ, Киргизии, Казахстан, Перу) с целью выявления ассоциации между принадлежностью к определенному генетическому семейству и наличием, либо отсутствием множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Найдена ассоциация между наличием МЛУ и принадлежностью к типу M2 ($\chi^2=0.167$, $p=0.000$), типу M11 ($\chi^2=0.145$, $p=0.000$), группе MST типов №548 ($\chi^2=0.090$, $p=0.003$) семейства Beijing *M.tuberculosis*. Для группы изолятов MST типа №540 найдена ассоциация между принадлежностью к данной группе и отсутствием МЛУ ($\chi^2=0.081$, $p=0.008$). Аналогичные результаты были получены для семейства Haarlem ($\chi^2=0.138$, $p=0.000$), группы T65 ($\chi^2=0.096$, $p=0.001$), для семейства URAL ($\chi^2=0.102$, $p=0.001$), и для группы T16 ($\chi^2=0.114$, $p=0.000$). Таким образом, был проведен поиск ассоциативных связей между генетическими семействами и наличием широкой лекарственной устойчивости. Полученные данные будут способствовать лучшему пониманию молекулярной эпидемиологии туберкулеза, и принятию эффективных превентивных мер борьбы с этим заболеванием.

Identification of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes, associated with the drug resistance and the drug susceptibility*.

Summary

A molecular genetic study was performed using VNTR-typing of 1454 *Mycobacterium tuberculosis* isolates which circulating in different areas (Russia, Kyrgyzstan, Kazakhstan, Peru) in order to identify the association between belonging to a specific genetic family and the presence or absence of multidrug resistance (MDR). It was found an association between the presence of MDR and belonging to the type M2 ($\chi^2 = 0.167$, $p = 0.000$), type M11 ($\chi^2 = 0.145$, $p = 0.000$), a group of MST types № 548 ($\chi^2 = 0.090$, $p = 0.003$) of Beijing family *M. tuberculosis*. MST type № 540 was associated with the absence of MDR ($\chi^2 = 0.081$, $p = 0.008$). Similar results were obtained for the Haarlem family ($\chi^2 = 0.138$, $p = 0.000$), T65 group ($\chi^2 = 0.096$, $p = 0.001$), for the URAL family ($\chi^2 = 0.102$, $p = 0.001$), and for group T16 ($\chi^2 = 0.114$, $p = 0.000$). These data contribute to a better understanding of the molecular epidemiology of tuberculosis, and the adoption of effective preventive measures against the disease.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, лекарственная устойчивость, молекулярная эпидемиология

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, molecular epidemiology

Введение

В настоящее время серьезную проблему представляет собой появление микобактерий туберкулеза не только с множественной лекарственной устойчивостью (устойчивостью к изониазиду и рифампицину), но и с широкой лекарственной устойчивостью, то есть не только к изониазиду и рифампицину, но и к фторхинолонам, и трем инъекционным препаратам (капреомицину, канамицину, амикацину). Усугубляет ситуацию появление микобактерий туберкулеза с тотальной лекарственной устойчивостью (ТЛУ), когда бактерия устойчива ко всем известным противотуберкулезным препаратам.

Молекулярной основой резистентности микобактерий к лекарственным препаратам является возникновение мутаций в генах, кодирующих белки мишени, транспортные белки, ферменты активации и метаболизма этих препаратов.

Процесс возникновения и закрепления мутаций зависит от эффективности работы нескольких физиологических систем клетки (репарационной и антиоксидантной системы, транспорта низкомолекулярных соединений и т.п.). Можно предположить, что полиморфизм генома отдельных представителей микобактерий будет модифицировать работу этих систем и,

таким образом, оказывать значительное влияние на вероятность возникновения лекарственной резистентности. Например, наличие аллельных вариантов в 3R – генах (репарации, репликации, рекомбинации), в генах оксигеназ и супермутаза напрямую влияет на темп и тип возникновения мутаций. В частности, у изолятов генотипа Beijing были найдены уникальные нуклеотидные замены в предполагаемых генах (*mutT* и *ogt*), вовлеченных в репарацию ДНК, что может влиять на ускоренную адаптацию к противотуберкулезным препаратам или к неблагоприятным условиям внутриклеточной среды посредством увеличения спектра формируемых мутаций и отбором наиболее приспособленных мутантов.

До сих пор не раскрыты основные механизмы связи между генетическим разнообразием и ответом иммунной системы, или вирулентностью. Скорее всего, генетическое разнообразие играет свою роль в глобальном распространении МЛУ - и ШЛУ – ТБ. В частности, эпистатические взаимодействия различных мутаций, ассоциированных с возникновением устойчивости, с генетическим окружением и компенсаторными мутациями требуют дальнейших исследований. Таким образом, исследования генетического разнообразия *M.tuberculosis* будут необходимы для более правильного предсказания последствий будущих возможных эпидемий МЛУ - и ШЛУ - туберкулеза.

Целью данной работы являлось: выявить генетические семейства или группы микобактерий туберкулеза, которые ассоциированы с множественной лекарственной устойчивостью и, наоборот, ассоциированные с чувствительностью к противотуберкулезным препаратам.

Материалы и методы

Образцы ДНК клинических изолятов

В исследование вошли 968 образцов ДНК *M.tuberculosis*, циркулирующих в различных регионах (132 изолята - Республика Тыва; 30 изолятов - о. Сахалин; 96 изолятов - г. Красноярск; 113 изолятов - г. Кемерово; 229 изолятов - г. Иркутск; 104 изолята - г. Владивосток; 106 изолятов - г. Новосибирск, 158 изолятов - г. Астана). Инактивацию данных культур проводили по ранее описанной методике в соответствующих медицинских учреждениях .

VNTR – типирование

VNTR–типирование локусов MIRU2, MIRU4, MIRU10, MIRU16, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU26, MIRU27, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETRA, ETRB, ETRC проводили по ранее описанной методике, в конечном объеме 20 мкл, содержащем 65 mM трис-HCl (pH 8,9); 16 mM (NH₄)₂SO₄; 1,8 mM MgCl₂; 0,05% Твин 20; 0,2 mM дНТФ; 1 мкМ соответствующие олигонуклеотидные праймеры, 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы, 1-10 нг геномной ДНК *M.tuberculosis*. Реакцию выполняли на амплификаторе «iCycler» («Bio-Rad», США) с начальной

денатурацией при 96°C / 3 мин, далее в течение 33 циклов с денатурацией при 95° C / 5 с, отжигом при 60°C / 10 с и элонгацией при 72° C/ 20 с. Далее продукты амплификации анализировали в 1,5% агарозном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием. Выборочно структуру и число копий повторов для каждого локуса верифицировали прямым секвенированием амплифицированных фрагментов ДНК.

Анализ и статистическая обработка результатов

Статистическую обработку проводили с использованием программного пакета Statistica 6.0 (Statsoft Inc.). Кластерный анализ с построением дендрограммы проводили с использованием критерия UPGMA (unweighted pair-group average) и метода Neighbor Joining (метод объединения ближайших соседей). Пакет PHILoViZ был использован для построения минимально охватывающего дерева по алгоритму goeBURST. Индекс Хантера-Гастона (Hunter-Gaston Index, HGI) и индекс Симпсона были использованы для оценки генетического разнообразия каждого полиморфного локуса. Поиск ассоциаций проведен с помощью программного пакета SSPS16.0 (IBM). Для установления статистически достоверных различий использовали критерий хи-квадрат (χ^2), при этом для всех статистических расчетов при p-value <0.05 результат считали статистически значимым.

Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК

Секвенирование фрагментов ДНК проводить по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit («Perkin Elmer», США) согласно рекомендациям производителя.

Результаты исследования и обсуждение

Определение генетического профиля ДНК изолятов *M.tuberculosis* из сформированной коллекции

Коллекция ДНК *M.tuberculosis*, состоящая из 968-ти изолятов, циркулирующих на различных территориях была охарактеризована с помощью VNTR-типирования с использованием 15-ти полиморфных локусов. В результате чего, нами был получен генетический профиль каждого изолята, который представляет собой 15-значное число. Сравнивая полученные генетические профили с уже имеющимися в международной базе данных <http://miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>, мы определили принадлежность изолятов к тому или иному семейству.

Для увеличения мощности выборки и дополнительных контролей ассоциированности существующих семейств с лекарственной резистентностей, в коллекцию были включены 323 изолята *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории Перу, 115 изолятов *M.tuberculosis*,

циркулирующих в г. Москва, и 48 изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории Киргизии, все изоляты охарактеризованы с помощью VNTR-типирования по 12 или 15-ти локусам. Таким образом, совокупная коллекция состояла из 1454-х изолятов *M.tuberculosis*.

С помощью программы “MIRU-VNTR plus” было построено древо филогенетического родства. Изоляты, имеющие «расстояние объединения» (linkage distance) менее чем 0,05, обозначались согласно вошедшему в один кластер с ними референтному штамму, в противном случае применялась сквозная порядковая нумерация: T1, T2, T3...и т.д. для идентификации новых подсемейств, идентифицированных в процессе проведения настоящего исследования. Было выявлено, что наибольшая частота встречаемости (44%, 646 изолятов) наблюдалась у семейства Beijing *M.tuberculosis*, с меньшей частотой встречаемости выявлены: семейство LAM – 14,8% (216 изолятов), семейство Haarlem – 7,7% (112 изолятов), семейство URAL- 4,3% (63 изолята), группа изолятов T16 – 2,4% (36 изолятов), группа изолятов T65 – 1,8% (27 изолятов), группа изолятов T15 – 1,6% (24 изолята). Остальные изоляты встретились реже и входили в группы небольшого размера, помимо этого мы наблюдали изоляты с уникальным для данной выборки генетическим профилем.

Изоляты семейства Beijing, из нашей выборки, были идентифицированы до типов, согласно классификации, разработанной Мокроусовым И. Наибольшую частоту встречаемости среди анализируемых изолятов семейства Beijing имели типы M2 – 34,9% (226 изолятов), далее по частоте встречаемости следовал тип M11 – 17,6% (114 изолятов), тип M33 – 3,7% (24 изолятов), тип M5 – 2,9% (19 изолятов), тип M37 – 1,2% (9 изолятов), типы M42, M7, M87 – в равной доле по 1,1% (7 изолятов). Остальные известные типы (M70, M44, M8, M40, M88, M89, M94, M54, M16, M14, M21, M17) встречались реже. Помимо этого нам встретились изоляты, которые относились к семейству Beijing, но ранее не были описаны (31,4%, 203 изолята). Наиболее представительные их группы, согласно сквозной нумерации всей коллекции ДНК изолятов *M.tuberculosis*, были обозначены арабскими цифрами как №540 (8,5%, 55 изолятов), №548 (4,7%, 31 изолят). Остальные 117 изолятов (18,1%) входили в кластеры небольшого размера, либо встречались в единичном количестве.

Ранее выявлено несколько доминирующих типов изолятов семейства Beijing, обладающих эпидемиологической значимостью на территории Российской Федерации: Наибольшей частотой встречаемости обладали пять типов – M2, M8, M11, M28, M33. Было выявлено, что тип M11 является предковой линией, доминирует на территории Евразии, но отсутствует на территории Австралии и Южной Африки. Необходимо отметить, что изоляты типа M11 соответствуют вышеописанному типу B0 согласно RFLP-профилю. Другие типы преобладают в отдельных регионах, например, M12 – в Японии, M8 – в г. Вухане (Китай), M33 – в Шанхае и Вьетнаме, хотя присутствуют и в других регионах. Тип M2 больше встречается в

России, при этом в России профили M11 и M2 составляют, соответственно, 17,7% и 70%, в Европе – 39,6% и 11,7%, в Японии - 15,7% и 0,8%, соответственно . Совокупно тип M2 и тип M11 составляют около 88% всех изолятов семейства Beijing, циркулирующих на территории азиатской части РФ , и 77% — в европейской части РФ . Drobniowski с соавторами показали, что тип M11 больше распространен среди бывших заключенных, а тип M2 среди гражданского населения г. Самары (Приволжский Федеральный округ) . В данном исследовании нами также было выявлено доминирование этих двух типов, совокупно они составили 52,6% (340 изолятов). Известно, что изоляты этих типов обладают повышенной относительной приспособленностью и ростом в макрофагальных клетках THP-1, высокой способностью индуцировать синтез IL-10 и некроз макрофагов . Данные биологические характеристики микобактерий способствуют повышенной трансмиссивности и вирулентности, поэтому выявление таких штаммов с помощью молекулярно-генетических методов будет способствовать как более эффективному применению лекарственной терапии, так и решению стандартных молекулярно-эпидемиологических задач.

Для эпидемиологически значимого генотипа Beijing мы построили отдельное минимальное охватывающее древо по алгоритму eBurst с уровнем различий TLV (3 различия в генетическом профиле), для более точного определения филогенетических связей между его субкластерами (рис. 1).

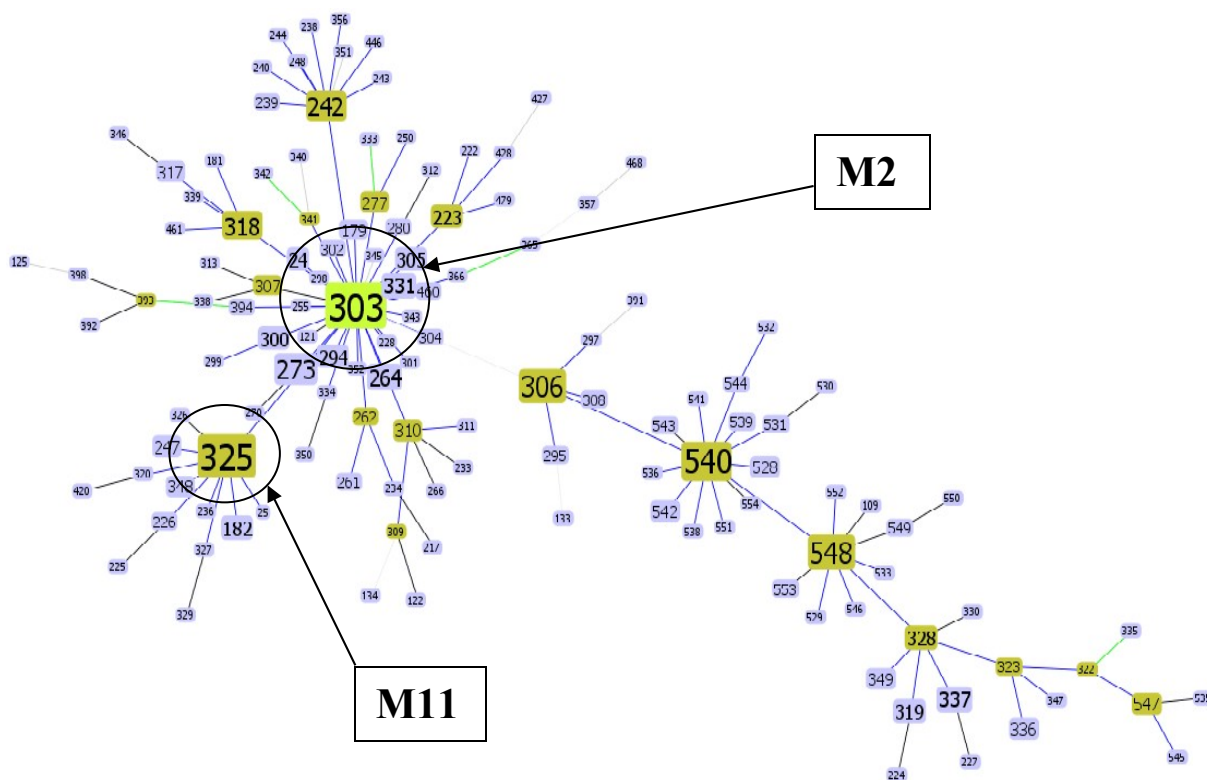


Рисунок 1 – Минимальное охватывающее дерево 646 изолятов семейства Beijing *M.tuberculosis* на основе профилей VNTR с указанием основных типов MST в узлах древа. Размер узла пропорционален количеству изолятов *M.tuberculosis*.

Видно, что доминирующими типами являются M2 и M11. Промежуточным звеном между ними и вариантами Beijing, MST – типами №540 и №548, является тип №306, он также относится к типу M2, но отличается от последнего по локусам (ETRA, ETRB, ETRC, MIRU20), которые не анализируются в классификации семейства Beijing у Мокроусова. Изоляты (типы MST №540 и №548) незначительно отличаются друг от друга в генетическом профиле. Оба варианта циркулируют в Иркутске, что может указывать на эндемичный характер распространения данных изолятов.

Поиск ассоциаций между принадлежностью к определенному семейству и наличием МЛУ

В данном исследовании обнаружено, что доля изолятов *M.tuberculosis*, имеющих множественную лекарственную устойчивость (МЛУ), составила 33,8% (492 изолятов), при этом доля изолятов, имеющих ШЛУ составила 14% (210 изолятов). Нами была найдена ассоциация между принадлежностью к семейству Beijing и наличием множественной лекарственной устойчивости у изолятов ($\chi^2=0.209$, $p=0.000$). Возможным объяснением наличия мутаций в генах, определяющих устойчивость к изониазиду и рифампицину у изолятов генотипа Beijing, могут являться уникальные нуклеотидные замены в предполагаемых генах (*mutT* и *ogt*), вовлеченных в репарацию ДНК, что отчасти может объяснить ускоренную адаптацию к противотуберкулезным препаратам или к неблагоприятным условиям внутриклеточной среды. Однако скорость приобретения точечной мутации в гене *rpoB* штаммов Beijing в присутствии рифампицина в экспериментах *in vitro* не отличается от скорости приобретения мутаций штаммами, не принадлежащими этому семейству. Кроме того, некоторые мутации, приводящие к лекарственной устойчивости, могут вызывать снижение вирулентности у микобактерий туберкулеза. Помимо этого была найдена ассоциация между принадлежностью к данному семейству и наличием широкой лекарственной устойчивости, в частности, устойчивости ко всем исследуемым препаратам – изониазиду, рифампицину, стрептомицину, фторхинолону, канамицину, эритромицину ($\chi^2=0.161$, $p=0.000$), что еще раз подтверждает эпидемиологическую значимость семейства Beijing.

Мы выявили отсутствие достоверно значимой ассоциации принадлежности к данным семействам/группам и наличием множественной лекарственной устойчивости для семейства LAM ($\chi^2=0.006$, $p=0.974$), для группы T15 ($\chi^2=0.060$, $p=0.076$). Стоит отметить, что ранее было показано наличие ассоциации между принадлежностью к семейству LAM и наличием множественной лекарственной устойчивости у изолятов, циркулирующих на территории Харьковской (Украина) и Тульской областей (РФ). В частности, у рифампицин–устойчивых

изолятов, циркулирующих в Тульской области было найдено доминирование мутации в 516 кодоне гена *rpoB* (GAC->GTC), у изолятов из Харьковской области в основном находили мутацию в 531 кодоне гена *rpoB* (TCG->TTG). При этом, Игнатовой и соавт. было высказано предположение о незначительном влиянии мутации в кодоне 516 гена *rpoB* (GAC->GTC) на трансмиссивность *M.tuberculosis* среди людей.

Для семейства Haarlem мы получили достоверно значимую ассоциацию между принадлежностью к данной группе и отсутствию МЛУ ($\chi^2=0.138$, $p=0.000$) и ШЛУ ($\chi^2=0.089$, $p=0.003$). Аналогичные результаты были получены для группы T65 – была выявлена достоверно значимая связь между принадлежностью к данному семейству и отсутствию МЛУ ($\chi^2=0.096$, $p=0.001$), ШЛУ ($\chi^2=0.074$, $p=0.019$), для семейства URAL – МЛУ ($\chi^2=0.102$, $p=0.001$), ШЛУ ($\chi^2=0.098$, $p=0.001$), и для группы T16 – МЛУ ($\chi^2=0.114$, $p=0.000$), ШЛУ ($\chi^2=0.100$, $p=0.001$). В отношении других семейств/групп говорить об ассоциативных связях не представлялось корректным из-за их малочисленности. Детальный анализ устойчивости наиболее больших по численности типов и групп семейства Beijing показал, что имеется ассоциация между наличием МЛУ и принадлежностью к типу M2 ($\chi^2=0.167$, $p=0.000$), типу M11 ($\chi^2=0.145$, $p=0.000$), группе MST типов №548 ($\chi^2=0.090$, $p=0.003$). Для группы изолятов MST типа №540 найдена ассоциация между принадлежностью к данной группе и отсутствию MDR ($\chi^2=0.081$, $p=0.008$).

Заключение

Таким образом, с помощью VNTR-типирования и последующего статистического анализа была показана ассоциированность определенных групп и семейств *M.tuberculosis* с лекарственной устойчивостью. В последующем нам кажется перспективным исследовать особенности геномов с помощью полногеномного секвенирования изолятов из вышеуказанных групп, в частности из группы изолятов семейства Beijing M2, M11 и MST типа №548, в связи с наличием ассоциации с МЛУ. А также изолятов семейства Haarlem, MST типа №540, группы T65 *M.tuberculosis* в связи с отсутствием ассоциации с МЛУ. Результаты подобных исследований помогут лучше понять механизмы, лежащие в основе формирования устойчивости к противотуберкулезным препаратам, а значит, опосредованно будут способствовать выбору более эффективных превентивных мер в борьбе с туберкулезом.

Список литературы

1. Lopez, B. *et al.* A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* **133**, 30–37 (2003).
2. Borrell, S. & Gagneux, S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* **13**, 1456–1466 (2009).

3. Gillespie, S. H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 267–274 (2002).
4. Lari, N., Rindi, L., Bonanni, D., Tortoli, E. & Garzelli, C. Mutations in *mutT* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of Beijing genotype. *J Med Microbiol* **55**, 599–603 (2006).
5. Parwati, I., van Crevel, R. & van Soolingen, D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis* **10**, 103–111 (2010).
6. Kocagoz, T. *et al.* Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 1768–1774 (1996).
7. Frothingham, R. & Meeker-O’Connell, W. A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **144** (Pt 5), 1189–1196 (1998).
8. Supply, P. *et al.* Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* **36**, 762–771 (2000).
9. Dymova, M. A. *et al.* Highest prevalence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates in patients newly diagnosed with tuberculosis in the Novosibirsk oblast, Russian Federation. *Journal of medical microbiology* **60**, 1003–9 (2011).
10. Francisco, A. P. *et al.* PHYLOViZ: Phylogenetic Inference and Data Visualization for Sequence Based Typing Methods. *BMC Bioinformatics* **13**, 87 (2012).
11. Hunter, P. R. & Gaston, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson’s index of diversity. *J Clin Microbiol* **26**, 2465–2466 (1988).
12. E. H. Simpson Measurement of Diversity. *Nature* **163**, 688 (1949).
13. Allix-Bügüec, 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. *Journal of clinical microbiology* **46**, 2692–9 (2008).
14. Taype, C. A. *et al.* Genetic diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **12**, 577–85 (2012).
15. Afanas’ev, M. V. *et al.* Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* circulated in Moscow, Russian Federation. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **30**, 181–91 (2011).
16. Mokrousov, I. *et al.* Penitentiary population of *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyzstan: exceptionally high prevalence of the Beijing genotype and its Russia-specific subtype. *Infect Genet Evol* **9**, 1400–1405 (2009).

17. Mokrousov, I. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem-repeat loci. *Journal of clinical microbiology* **46**, 3576–84 (2008).
18. Mokrousov, I. Genetic geography of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a multifacet mirror of human history? *Infect Genet Evol* **8**, 777–785 (2008).
19. Mokrousov, I. *et al.* 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* **42**, 2438–2444 (2004).
20. Mokrousov, I. *et al.* Origin and primary dispersal of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome Res* **15**, 1357–1364 (2005).
21. Mokrousov, I. *et al.* At Baltic crossroads: a molecular snapshot of Mycobacterium tuberculosis population diversity in Kaliningrad, Russia. *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**, 13–22 (2009).
22. Drobniewski, F. *et al.* Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *Jama* **293**, 2726–2731 (2005).
23. Lasunskaja, E. *et al.* Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect* **12**, 467–475 (2010).
24. Rindi, L., Lari, N., Cuccu, B. & Garzelli, C. Evolutionary pathway of the Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis based on genomic deletions and mutT genes polymorphisms. *Infect Genet Evol* **9**, 48–53 (2009).
25. Malik, A. N. & Godfrey-Faussett, P. Effects of genetic variability of Mycobacterium tuberculosis strains on the presentation of disease. *Lancet Infect Dis* **5**, 174–183 (2005).
26. 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. *Journal of medical microbiology* **55**, 1413–8 (2006).
27. Dymova, M. A. *et al.* Genetic variation of Mycobacterium tuberculosis circulating in Kharkiv Oblast, Ukraine. *BMC infectious diseases* **11**, 77 (2011).
28. Степаншина В.Н., Липин М.Ю., Дубилей С.А., Игнатова А.Н., Ш. И. Г. Доминирующие генотипы штаммов Mycobacterium tuberculosis, выделенных от заключенных в поселке Озерки. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология* **3**, 27–33 (2007).