

УДК 579.25-871.9:

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 35 ВАРИАБЕЛЬНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ И ШЕСТИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

А.Г. Богун, С.А. Благодатских, Т.Н. Мухина, Н.В. Майская, И.Г. Шемякин
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора, г. Оболensk

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CLINICAL ISOLATES USING 35 VARIABILITY TANDEM REPEATS AND SIX SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS

A.G. Bogun, S.A. Blagodatskikh, T.N. Mukhina, N.V. Maiskaya, I.G. Shemyakin

Клинические изоляты *M. tuberculosis* (n 330) исследованы методами MIRU-VNTR, основанном на анализе 35 локусов, и анализе точечных мутаций. Показано, что каждая ветвь дендрограммы молекулярно-генетического родства клинических изолятов *M. tuberculosis* содержит изоляты, относящиеся только к одной кластерной группе, определённой на основании анализа точечных мутаций. Все изоляты *M. tuberculosis*, относящиеся к сполигосемейству Beijing, входят в состав одной ветви дендрограммы. Изоляты из других сполигосемейств в данной группе отсутствуют. Изоляты, принадлежащие к сполигосемейству LAM, входят в состав одной ветви дендрограммы, в которую входят также изоляты, принадлежащие к сполигосемействам T и S. Изоляты, принадлежащие к сполигосемействам T и Haarlem, входят в состав нескольких ветвей дендрограммы, причем изоляты из сполигосемейства T принадлежат к трём SNP группам, в то время как изоляты Haarlem принадлежат только к одной группе, идентифицированным на основании анализа точечных мутаций.

Ключевые слова: туберкулез, филогенетический анализ, SNP-типирование, метод MIRU-VNTR

Введение

Согласно оценкам ВОЗ, в 2011 году во всём мире туберкулёзом заболело порядка 8,7 миллиона человек, а 1,4 миллиона умерли от этого заболевания [10]. В Российской Федерации во многих случаях туберкулез с лекарственной устойчивостью возбудителя регистрируют у лиц с впервые диагностированным заболеванием. В связи с тем, что лечение этих пациентов сопряжено с большими трудностями, выявление источников распространения таких штаммов является важной задачей. Поскольку туберкулёз является заболеванием, которое развивается сравнительно медленно, а возбудитель туберкулёза – *M. tuberculosis* – является клональным микроорганизмом, для которого возможна однозначная идентификация предковых штаммов, использование молекулярно-

Clinical isolates of *M. tuberculosis* (n 330) were studied using MIRU-VNTR methods, based on the analysis of 35 loci and analysis of point mutations. It is shown that each branch of the dendrogram of the molecular genetic relatedness of *M. tuberculosis* clinical isolates contains isolates relating to the only one cluster group, defined by the point mutations analysis. All isolates of *M. tuberculosis*, relating to Beijing spoligofamily are in the same branch of the dendrogram. Isolates from the other spoligofamilies are missing in the group. Isolates, belonging to LAM spoligofamily, are in the same branch of the dendrogram, which also includes isolates, belonging to T and S spoligofamilies. Isolates from T and Haarlem spoligo families comprise into several branches of the dendrogram, and T spoligofamily isolates belong to three SNP groups, while Haarlem isolates belong to the only one group, identified on the basis of point mutations analysis.

Keywords: tuberculosis, phylogenetic analysis, SNP-typing, MIRU-VNTR method

генетических методов штаммовой идентификации позволяет значительно увеличить эффективность эпидемических исследований [2].

Предложенный в 2006 году вариант метода MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repetitive units – variable number of tandem repeats*), основанный на анализе 24 локусов в геноме туберкулёзного микроба, часто позиционируется как новый «золотой стандарт» генотипирования микобактерий туберкулёзного комплекса [16]. Однако для исследований продолжают применяться варианты метода, в которых используется анализ 6, 12, 15 и 24 локусов. В ряде исследований показано, что разрешающая способность метода MIRU-VNTR, основанного на анализе 24 локусов оказывается недостаточной, и может быть увеличена при использовании гипервариабельных

Таблица 1. Олигонуклеотиды и наборы локусов, применяющиеся для MIRU-VNTR типирования в разных вариантах

Локус	Синоним	Праймеры	Количество локусов			
			35	24	15	12
VNTR 0154	MIRU 02	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGTCTCAAAT	+	+		+
VNTR 0424		CTTGCCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC	+	+	+	
VNTR 0569		TCAGCGTGTGGTTACCC CTCTCGCCCATACCGGA	+			
VNTR 0577	ETR-C	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACCGCAAAATTGTGA	+	+	+	
VNTR 0580	ETR-D, MIRU 04	GCGCGAGAGCCCGAATGC GCGCAGCAGAAACGCTCAGC	+	+	+	+
VNTR 0595	msx.4	GGCGATGTTGATCGGGAT TCTAGACGCCAATCACGC	+			
VNTR 0802	MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	+	+	+	+
VNTR 0960	MIRU10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	+	+	+	+
VNTR 1443	Mtub16	GGTAATCCTGGTCGCTTGTC ACCCAAATTGCCCTGGTC	+			
VNTR 1644	MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCCTCGTGACGCCCTGGTAC	+	+	+	+
VNTR 1895	QUB-1895	GTGAGCAGGCCAGCAGACT CCACGAAATGTTCAAACACCTCAAT	+			
VNTR 1955	Mtub21	AGATCCCAGTTGTCGTCGT CAACATCGCCTGGTTCTGTA	+	+	+	
VNTR 1982	QUB-18	CCGGAATCTGCAATGGCGGCAAAATAAAAG TGATCTGACTCTGCCCGCGCTGCAAATA	+			
VNTR 2059	MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	+	+		+
VNTR 2163a	QUB 11a,pUCDIa	CCCATCCCGCTTAGCACATTCGTA TTCAGGGGGGATCCGGGA	+			
VNTR 2163b	QUB 11b,pUCDIb	CGTAAGGGGGATCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGCCAT	+	+	+	
VNTR 2165	ETR-A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	+	+	+	
VNTR 2347	Mtub29	GCCAGCCCGCTGCATAAACCT AGCACCCCGGTGTCCTTGATGAC	+	+		
VNTR 2401	Mtub30	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA	+	+	+	
VNTR 2461	ETR-B	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT CGACGGGCCATCTGGATCAGCTAC	+	+		
VNTR 2531	MIRU23	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG AGCTAACGGGTTGCGCCTTTTGTGTC	+	+		+
VNTR 2687	MIRU24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	+	+		+
VNTR 2996	MIRU26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG	+	+	+	+
VNTR 3007	MIRU27QUB-5	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA	+	+		+
VNTR 3171	Mtub34	GGTGGCACCTGCTCCAGATAA GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC	+	+		
VNTR 3192	ETR-E, MIRU31	ACTGATTGGCTTACATCGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	+	+	+	+
VNTR 3232	QUB-3232	TGCCGCCATGTTTCATCAGGATTA GCAGACGTCGTGCTCATCGATACA	+			
VNTR 3239	ETR-F	CTCGGTGATGGTCCGGCCGGTCAC GGAAGTGCTCGACAACGCCATGCC	+			
VNTR 3336	QUB-3336	ATCCCCGCGGTACCCATC TTCTACGACTTCGCAACCAAGTATC	+			
VNTR 3690	Mtub39	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	+	+	+	
VNTR 3820		TGCGCGGTGAATGAGACG ACCTTCATCCTTGGCGAC	+			
VNTR 4052	QUB-26	AACGCTCAGCTGTCCGAT GGCCAGTCTTCCCGAT	+	+	+	
VNTR 4120		GTTACCCGGAGCCAACC GAGGTGGTTTCGTGGTCG	+			
VNTR 4156	OUB-4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT	+	+	+	
VNTR 4348	MIRU 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCACACAT	+	+		+

локусов [14, 11, 17]. Установлено также, что филогенетическая информативность метода MIRU-VNTR, основанного на анализе 24 локусов, оказывается недостаточной [4].

Целью исследования явилось изучение возможности использования дополнительных локусов MIRU-VNTR для увеличения разрешающей способности и повышения филогенетической информативности метода. В работе использовали 24 локуса, предложенные в 2006 году, а также 11 локусов, для которых по данным литературы был обнаружен высокий уровень полиморфизма.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Исследовано 330 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от больных с диагнозом «туберкулёз лёгких», обратившихся в медицинские учреждения г. Тулы в период с июня 2001 г. по июнь 2002 г.

Анализ MIRU-VNTR. Последовательности олигонуклеотидов, использованных для анализа MIRU-VNTR представлены в таблице 1. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad фирмы «Bio-Rad» (США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМKCl, 10 мМTris-HCl, pH 8,8, 0,08 % Nonidet P40, 1,5-3,0 мМ MgCl2, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеотида, 0,4 мМ каждого олигонуклеотида, 1 ед. активности рекомбинантной Taq-полимеразы (Хеликон, Россия). Режим амплификации: 95 °C – 10 мин; 30 циклов: 95 °C – 1 минута, 59 °C – 1 мин, 72 °C – 2 мин; 72 °C – 10 мин.

Размер ампликона определяли с помощью электрофореза в 2 %-ном агарозном геле при окрашивании бромистым этидием с использованием маркеров размеров ДНК «O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder» (Fermentas, Литва) и 50 Base-PairLadder (Amersham Pharmacia BiotechInc, США).

Оценку аллельного разнообразия и разнообразия генотипов проводили по коэффициенту Hunter-Gaston [12]. Филогенетический анализ изолятов осуществляли с помощью программы Populations 1.2.30. Для работы с дендрограммами использовали программу Njplot.

Сполиготипирование. Сполиготипирование проводили в соответствии с общепринятой методикой [13] с использованием набора для сполиготипирования «Spoligotyping

Kits» (Isogen Biosolutions). Принадлежность изолята к сполигосемейству определяли на основании данных, представленных в международной базе данных Spol4 [3]. Если сполиготип отсутствовал в базе данных, то принадлежность к сполигосемейству определяли на основании алгоритма предложенного в 2002 году [15].

Анализ точечных мутаций в геноме *M. tuberculosis*. Принадлежность клинических изолятов к геногруппам, идентифицированным на основании SNP-типирования, осуществляли в соответствии с классификацией, предложенной в 2006 году [7]. Анализировали нуклеотиды, имеющие в геноме H₃₇Rv координаты 0192197, 0473678, 1920118, 2460626, 3111473 и 3352929. Анализ данных нуклеотидов позволяет установить принадлежность к одной из семи кластерных групп, выявленной на основании анализа точечных мутаций, но не позволяет определить принадлежность к подгруппам. Изучение SNP проводили с использованием мультиплексной аллельспецифичной ПЦР [6].

Результаты и обсуждение

На основании анализа 35 локусов MIRU-VNTR установлено, что большая часть изученных клинических изолятов *M. tuberculosis* (291 – 89 %) является чистыми культурами; 28 клинических изолятов (8 %) являются смесью нескольких штаммов, поскольку содержат большое количество двойных аллелей; а 11 изолятов (3 %) имеют два аллеля только для одного из изученных локусов. В дальнейшем анализировали только изоляты, не имеющие двойных аллелей у изученных локусов (291). При их анализе по 35 локусам MIRU-VNTR обнаружено 186 паттернов (профилей) MIRU-VNTR. Количество повторов варьирует от 0 (для локусов ETR-F и VNTR 0569) до 28 (для локуса VNTR 1895). Значения индекса полиморфизма локусов варьируют для данной выборки штаммов от 0 до 0,8 (табл. 2), индекс разнообразия профилей MIRU-VNTR равен 0,96. Всего обнаружено 185 профилей MIRU-VNTR: 158 изолятов имеют уникальные MIRU-VNTR профили, а 133 изолята входят в состав 27 кластеров.

На основании данных о числе tandemных повторов в 35 локусах составлена дендрограмма генетического родства (рис. 1). На ней штаммы сформировали четыре группы, обозначенные как MIRU-VNTR-1, MIRU-VNTR-2, MIRU-VNTR-3, MIRU-VNTR-4.

Таблица 2. Индексы полиморфизма локусов MIRU-VNTR

Локус	h	Локус	h	Локус	h	Локус	h	Локус	h
MIRU 02	0,49	MIRU 26	0,53	QUB 26	0,73	VNTR 0595	0,01	VNTR 3171	0,06
MIRU 04	0,11	MIRU 27	0,03	ETR A	0,63	VNTR 1443	0,52	VNTR 3232	0,80
MIRU 10	0,64	MIRU 31	0,66	ETR B	0,05	VNTR 1895	0,31	VNTR 3336	0,71
MIRU 16	0,29	MIRU 39	0,48	ETR C	0,69	VNTR 1955	0,60	VNTR 3690	0,58
MIRU 20	0,06	MIRU 40	0,69	ETR-F	0,56	VNTR 1982	0,72	VNTR 3820	0,70
MIRU 23	0,19	QUB-11a	0,71	VNTR 0424	0,59	VNTR 2347	0,07	VNTR 4120	0,68
MIRU 24	0	QUB-11b	0,66	VNTR 0569	0,12	VNTR 2401	0,60	VNTR 4156	0,28

Примечание: h – индекс полиморфизма

На основании анализа точечных мутаций методом аллель-специфичной ПЦР определена принадлежность 291 клинического изолята *M. tuberculosis* к кластерным группам [7]. Показано, что в данной выборке присутствуют изоляты, принадлежащие ко второй (98 – 33,7 %), третьей (41 – 14,1 %), пятой (127 – 43,6 %), и шестой (25 – 8,6 %) кластерным группам SCG. При анализе дендрограммы показано, что группа MIRU-VNTR-1 состоит из 98 штаммов, принадлежащих к сполигосемейству Beijing и относящихся к SCG-2.

Группа MIRU-VNTR-2 состоит из 19 изолятов, принадлежащих к сполигосемействам T (11) и Haarlem (8). Все клинические изоляты принадлежали к SCG-3.

Группа MIRU-VNTR-3 состоит из двух отдельных подгрупп. В группу MIRU-VNTR-3a входят 127 изолятов, принадлежащих к SCG-5. Изоляты, входящие в SCG-5, принадлежат к пяти сполигосемействам. К сполигосемейству LAM принадлежат 83,4 %

изолятов (107), а к сполигосемействам LAM3-S-conv, S, T, и U относятся 0,8 % (один), 1,6 % (два), 11,8 % (15) и 1,6 % (два) изолятов соответственно. В группу MIRU-VNTR-3b входят 25 изолятов. Все они принадлежат к SCG-6. К сполигосемейству T принадлежит 92,0 % (n 23), а к сполигосемействам U и X принадлежит по одному изоляту.

Группа MIRU-VNTR-4 состоит из 22 изолятов, принадлежащих к SCG-3. Из них к сполигосемейству Haarlem принадлежит 86,5 % изолятов (19), к сполигосемейству T принадлежит 9 % изолятов (два), 4,5 % изолятов принадлежит к сполигосемейству Beijing-like (один).

Таким образом, только группа MIRU-VNTR-1 оказалась сформирована из клинических изолятов, относящихся к одной филогенетической группе, определённой как на основании анализа точечных мутаций, так и на основании сполиготипирования. Все остальные группы MIRU-VNTR, хотя и

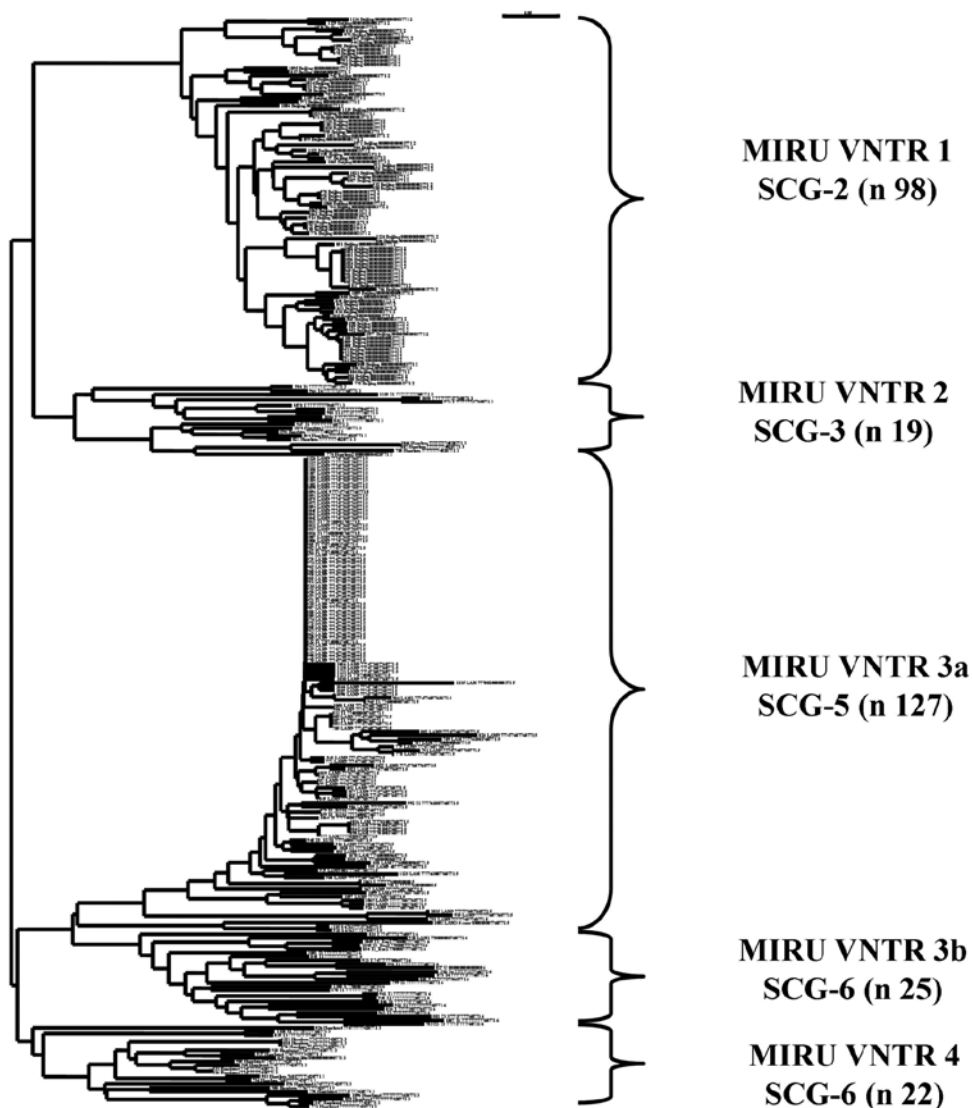


Рис. 1. Дендрограмма генетического родства 291 клинического изолята *M. tuberculosis*, построенная на основании анализа 35 локусов MIRU-VNTR.

Таблица 3. Сравнение вариантов методов MIRU-VNTR, основанных на анализе 24 и 35 локусов

Показатель	24 локуса	35 локусов
Hunter-Gaston	0,94	0,96
Изолятов в кластере	61	55
Уникальных генотипов	106	158

состояли из изолятов, принадлежащих к одной SCG, но содержали также изоляты, принадлежащие к разным сполигосемействам. Это позволяет сделать вывод, что определение принадлежности штамма к филогенетической линии, на основании его сполиготипа может оказаться ошибочным [1, 8].

В группе MIRU-VNTR-3a (изоляты, принадлежащие к SCG-5) обнаружены 55 изолятов, имеющих одинаковый профиль MIRU-VNTR при анализе 35 локусов. Однако изоляты этой группы имеют различные сполиготипы: 45 изолятов имеют сполиготип 777477607760771, четыре изолята – сполиготип 77777607760771, пять изолятов – 775740003760771, а один изолят – 77400000760771, причем все эти сполиготипы также обнаружены у изолятов, не входивших в данный кластер.

Для того чтобы выяснить, не привело ли использование гипервариабельных локусов к построению неверной филогенетической схемы, была построена дендрограмма на основании анализа 24 локусов [16]. Эта дендрограмма оказалась очень близка к дендрограмме, построенной на основании анализа 35 локусов. Отличия заключались в том, что при использовании 24-х локусов размер кластера увеличился с 55 до 61 изолята. Количество уникальных типов MIRU-VNTR снизилось с 158 до 106, индекс разнообразия профилей снизился с 0,96 до 0,94 (табл. 3). Кроме того, обнаружено, что три клинических изолята, принадлежавшие к SCG-5, оказались сгруппированными вместе с изолятами, принадлежавшими к SCG-6. При этом клинические изоляты, принадлежащие к SCG-3, также сформировали две ветви – группу MIRU-VNTR-2 и группу MIRU-VNTR-4. На основании этих данных был сделан вывод, что анализ гипервариабельных локусов не приводит к искажению филогенетической информации.

При сполиготипировании установлено, что сполигопаттерны 37773777760771, 77777377760771 и 77777777760771 обнаружены у изолятов *M. tuberculosis*, входящих в группу MIRU-VNTR-2 (SCG-3) и группу MIRU-VNTR-3b (SCG-6). Одинаковых сполигопаттернов у клинических изолятов из групп MIRU-VNTR-2 (SCG-3) и MIRU-VNTR-4 (SCG-3) обнаружено не было, несмотря на то, что изоляты в обеих группах относились к сполигосемействам Haarlem и T. Это можно объяснить тем, что при выборе маркерных мутаций использовали два штамма, относящиеся к SCG-4 и SCG-6. Штаммы, принадлежащие к группе SCG-5, находятся на одной филогенетической линии

со штаммами, принадлежащими к SCG-6. Штаммы, принадлежащие к SCG-3с, находятся на одной ветви со штаммами, принадлежащими к SCG-4. В то же время группа SCG-3 дистанцирована от филогенетических линий SCG-4 и SCG-6. Поэтому штаммы группы SCG-3 не могут быть дифференцированы на основании анализе точечных мутаций.

Также не обнаружено ни одного изолята, относящегося к кластеру SCG-4, который включает изоляты, принадлежащие к сполигосемейству X. Единственный изолят, отнесенный к сполигосемейству X, имел сполиготип, отсутствующий в международной базе данных, а его принадлежность к данному сполигосемейству была определена на основании эвристических алгоритмов [15]. Вероятно, что в изученной коллекции изолятов действительно отсутствовали изоляты, принадлежащие к SCG-4.

В 2007 году возникло предположение, что штаммы *M. tuberculosis*, относящиеся к Европейско-Американскому семейству, искусственно разбиты на две филогенетические линии при анализе точечных мутаций [9]. Однако, среди изученных в данной работе изолятов *M. tuberculosis*, отсутствие изолятов, принадлежащих к SCG-4, позволяет предположить, что эти филогенетические линии являются независимыми.

В 2009 году, на основании анализа последовательностей 89 генов в геноме возбудителя туберкулеза, была составлена филогенетическая схема, хорошо согласующая с данными, полученными при сполиготипировании и анализе геномных делеций [4]. На основании анализа сполиготипов и точечных мутаций авторы данной работы дополнили эту схему, указав на ней принадлежность филогенетической линии к SCG (рис. 2).

В настоящее время для штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к сполигосемействам Uganda и Cameroon, а также штаммов *M. africanum* не существует классификации, основанной на анализе точечных мутаций. Однако другие филогенетические линии могут быть идентифицированы данным методом.

Вероятно, изначально в группу SCG-3 оказались объединены несколько филогенетических линий *M. tuberculosis*, в результате того, что геномы штаммов, принадлежащие к данной группе, не анализировали при поиске маркерных мутаций. В данную группу входят штаммы, принадлежащие к сполигосемействам Haarlem и T, однако эти сполигосемейства не состоят из эволюционно независимых штаммов. В 2008 году было показано, что в сполигосемейство T оказались объединены штаммы *M. tuberculosis*, принадлежащие к SCG-5 и SCG-6 [5]. Однако согласно данным, полученным в настоящей работе, в сполигосемейство T включены также штаммы, принадлежащие к SCG-3.

Заключение

При изучении структуры популяции *M. tuberculosis* с использованием трех молекулярно-биологических методов

(MIRU-VNTR, сполиготипирование, анализ точечных мутаций), установлено, что каждую группу MIRU-VNTR сформировали изоляты, относящиеся к одной SNP-группе, однако четыре из пяти SNP-групп содержали изоляты, относящиеся к разным сполигосемействам. Это позволяет сделать вывод, что определение филогенетического родства изолятов *M. tuberculosis*,

основываемое только на результатах сполиготипирования, может быть ошибочным. Возможно, в ближайшем будущем полногеномный анализ позволит построить филогенетическую схему, отражающую реальную эволюцию штаммов *M. tuberculosis*.

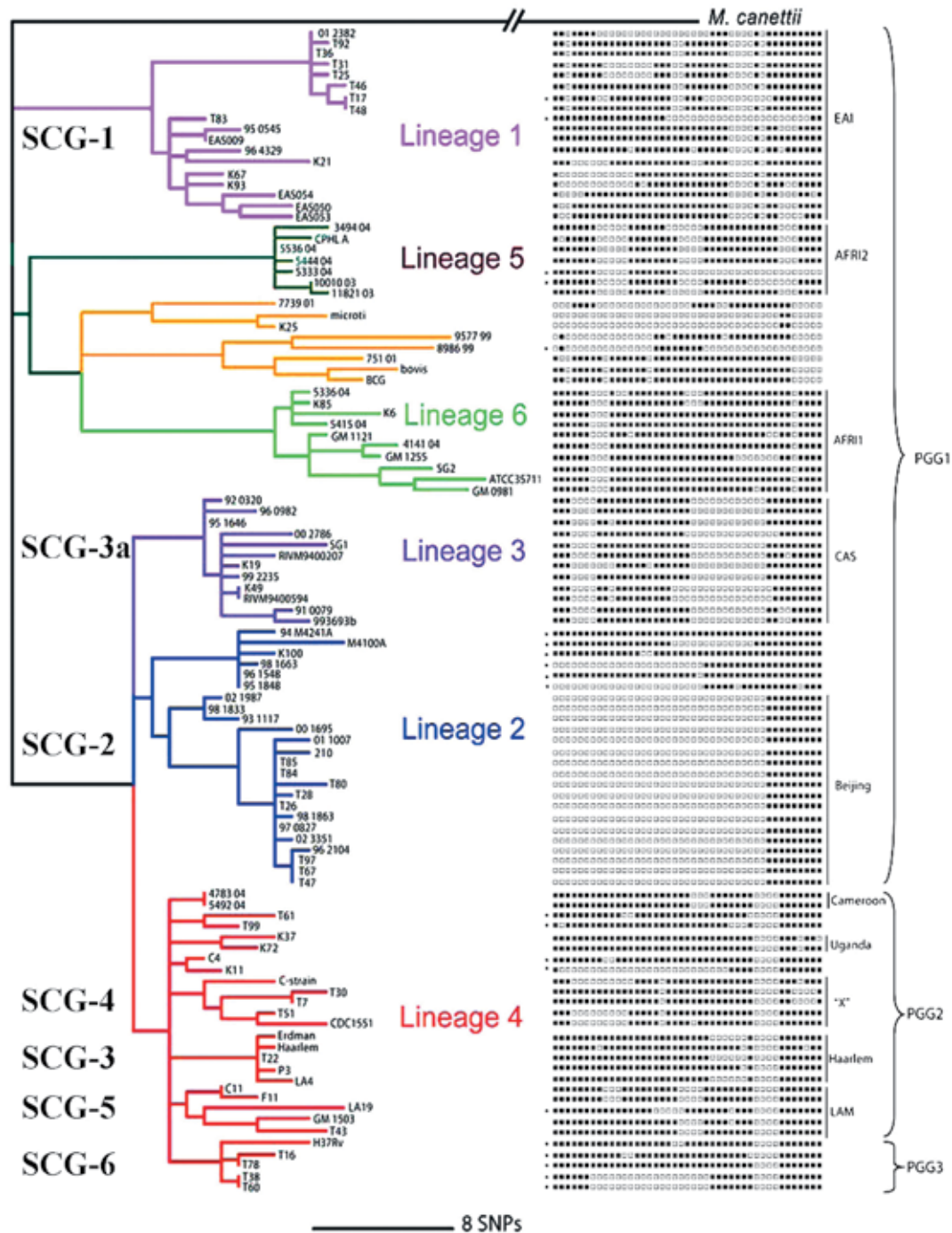


Рис. 2. Дендрограмма молекулярно-генетического родства клинических изолятов *M. tuberculosis*, построенная на основании анализа 89 генов [4].

Литература

1. Ибраева А.Р., Ахметова А.Ж., Кожамкулов У.А. и др. Генотипирование и определение лекарственной устойчивости клинических изолятов *M. tuberculosis* из различных областей Казахстана на основе ДНК-секвенирования и MIRU-VNTR анализа // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 2. – С.71-77.
2. Alonso-Rodriguez N., Martinez-Lirola M., Sanchez M.L. et al. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47. – No. 7. – P. 2026-2032.
3. Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology // *BMC Microbiol.* – 2006. – 6. – 23.
4. Comas I., Homolka S., Niemann S., Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4. – e7815.
5. Dos Vultos T., Mestre O., Rauzier J. et al. Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis* // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3. – e1538.
6. Dubiley S., Kirillov E., Ignatova A., Sepanshina V., Shemyakin I. Molecular characteristics of *M. tuberculosis* LAM-RUS family prevalent in Central Russia // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – No. 12. – P. 4036-4038.
7. Filliol I., Motiwala A.S., Cavatore M. et al. 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.
8. Fitzgibbon M.M., Gibbons N., Roycroft E. et al. A snapshot of genetic lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in Ireland over a two-year period, 2010 and 2011 // *Eurosurveillance.* – 2013. – Vol. 18. – No. 3. – P. 1-7.
9. 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.
10. Global tuberculosis report 2012. – WHO/HTM/TB/2012.6. – Geneva. – 2012.
11. Hanekom M., van der Spuy G.D., Gey van Pittius N.C. et al. Discordance between mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing and IS6110 restriction fragment length polymorphism genotyping for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in a setting of high incidence of tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – Vol. 46. – No. 10. – P. 3338-3345.
12. 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.* – 1988. – Vol. 26. – No. 11. – P. 2465-2466.
13. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – No. 4. – P. 907-914.
14. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem-repeat loci // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – Vol. 46. – No. 11. – P. 3576-3584.
15. Sebban M., Mokrousov I., Rastogi N., Sola C. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis* // *Bioinformatics.* – 2002. – Vol. 18. – No. 2. – P. 235-243.
16. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized Mycobacterial Interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – No. 12. – P. 4498-4510.
17. Velji P., Nikolayevskyy V., Brown T., Drobniowski F. Discriminatory ability of hypervariable variable number tandem repeat loci in population-based analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains // *Emerg. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 15. – No. 10. – P. 1609-1616.

Сведения об авторах

Богун Александр Геннадьевич – заведующий отделом ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

Телефон (496) 736-00-00

e-mail: bogun62@mail.ru

Благодатских Станислав Александрович – младший научный сотрудник отдела ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

Телефон (496) 736-00-00

e-mail: merry-st@mail.ru

Мухина Татьяна Николаевна – научный сотрудник отдела ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

Телефон (496) 736-00-00

e-mail: Cecile98@rambler.ru

Майская Надежда Васильевна – научный сотрудник отдела ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

Телефон (496) 736-00-00

e-mail: myskaya_NN@mail.ru