

УДК 577.21:616-022

^{1,2}У.А. Кожамкулов*, ^{1,2}А.Ж. Ахметова,
³В.Л. Бисмилда, ³Л.Т. Чингисова, ²Е.В. Жолдыбаева,
¹А.Р. Акильжанова

¹Центр Наук о жизни, Назарбаев Университет, Республика Казахстан, г. Астана

²Национальный Центр Биотехнологии Республики Казахстан, г. Астана

³Национальный Центр Проблем Туберкулеза, Республика Казахстан, г. Алматы

*E-mail: ulan.kozhamkulov@nu.edu.kz

Оценка различных схем генотипирования казахстанских штаммов *M.tuberculosis* по 24MIRU-VNTR локусам на основе анализа числа тандемных повторов

Молекулярно-генетический метод MIRU-VNTR типирования является простым и быстрым в выполнении, представляется достаточно интересным и перспективным для изучения генетического разнообразия *M.tuberculosis*, а так же для решения актуальных задач современной клинической микробиологии и эпидемиологии туберкулеза. В статье представлены результаты генотипирования на основе MIRU-VNTR анализа числа тандемных повторов по 12, 15 и 24 локусам для 81 клинического изолята *M.tuberculosis*, собранного из 7 различных областей Казахстана. В результате проведения генотипирования и анализа 24 локусов определены наиболее полиморфные и информативные локусы, проведена оценка различных схем генотипирования, что позволяет выбрать оптимальную схему генотипирования на основе MIRU-VNTR анализа. Наибольшей дискриминирующей способностью обладает схема из полного набора 24 локусов *M.tuberculosis* (HGDI=0,88), наименьшей дискриминирующей способностью обладает схема из комбинации 12MIRU локусов (HGDI=0,73), примерно одинаковые показатели дискриминирующей способности у схем из 15 локусов (HGDI=0,84 и 0,81).

Ключевые слова: туберкулез, генотипирование, MIRU-VNTR анализ, схемы типирования, микобактерии туберкулеза.

U. Kozhamkulov, A. Akhmetova, V. Bismilda, L. Chingissova,
E. Zholdybayeva, A. Akilzhanova

Evaluation of different genotyping schemes *M.tuberculosis* isolates from Kazakhstan by 24 MIRU-VNTR loci based on number of tandem repeats analysis

Molecular genetic MIRU-VNTR typing is simple and fast method seems to be interesting and promising for the study of the genetic diversity of *M.tuberculosis*, also using as instrument of studying modern clinical TB microbiology and epidemiology. The results of genotyping of 81 clinical isolates of *M. tuberculosis* collected from 7 different regions of Kazakhstan by 12, 15 and 24 loci based on MIRU-VNTR analysis are represented in this article. Polymorphic and informative loci were determined, different genotyping schemes were evaluated that allowed to choose optimal scheme of genotyping based on MIRU-VNTR analysis. Most discriminatory power of the genotyping scheme has the full set of 24 *M.tuberculosis* loci (HGDI = 0,88), the smallest discriminatory power of the combination scheme has 12MIRU loci (HGDI = 0,73), roughly the same discriminatory power showed schemes of 15 loci (HGDI = 0.84 and 0.81).

Key words: Tuberculosis, genotyping, MIRU-VNTR analysis, genotyping schemes, mycobacterium tuberculosis.

Ұ.А. Қожамқұлов, А.Ж. Ахметова, В.Л. Бісмілда, Л.Т. Шыңғысова,
Е.В. Жолдыбаева, А.Р. Ақылжанова

Тандемді қайталанулар санының анализі негізінде 24 MIRU-VNTR локустары бойынша қазақстандық *M.tuberculosis* штамдарын генотиптеудің әртүрлі сызбанұсқаларын бағалау

MIRU-VNTR типтеу әдісі орындауда қарапайым және жылдам әдіс болып табылады. Бұл әдістің *M.tuberculosis* генетикалық түрлілігін анықтауда, сонымен қатар заманауи клиникалық микробиология және туберкулез эпидемиологиясының өзекті мәселелерін шешуде келешегі зор. Мақалада Қазақстанның 7 облысынан жиналған 81 *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарын 12, 15 және 24 локустар бойынша MIRU-VNTR анализі негізінде генотиптеудің нәтижелері көрсетілген. 24 локус бойынша генотиптеу нәтижесінде ең полиморфты және ақпаратты локустар анықталды, генотиптеудің әртүрлі сызбанұсқалары бағаланды, бұл MIRU-VNTR анализі негізінде генотиптеудің оңтайлы сызбанұсқасын таңдауға мүмкіндік береді. Ең жоғарғы дискриминациялық қабілетке толық 24 *M.tuberculosis* локустарынан тұратын сызбанұсқа ие (HGDI=0,88), ең төмен дискриминациялық қасиетті 12 MIRU локустарынан тұратын сызбанұсқа ие (HGDI=0,73), 15 локустан тұратын сызбанұсқалар шамамен бірдей дискриминациялық қасиет көрсеткіштеріне ие (HGDI=0,84 и 0,81).

Түйін сөздер: туберкулез, генотиптеу, MIRU-VNTR анализі, типтеу сызбанұсқалары, туберкулез микобактериялары.

Введение

Туберкулез (ТБ) остается одной из основных проблем человечества, ежегодно в мире регистрируется около 9 миллионов новых случаев заболевания туберкулезом, 1,5 миллиона человек умирает [1]. В нашей стране отмечается напряженная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу, показатели заболеваемости и смертности остаются высокими. Так, заболеваемость в Республике Казахстан в 2013 г. составляла 73,4 на 100 тысяч населения, а смертность составляла 5,6 на 100 тысяч населения [2].

Данные молекулярно-генетических методов генотипирования являются очень важными в изучении эпидемиологии этого заболевания, так как позволяют получить результаты, которые невозможно получить другими методами. Своевременная идентификация и определение свойств штамма позволит решать такие вопросы, как его происхождение, установление источника инфекции, наиболее вероятных путей и факторов передачи, а так же прогнозировать и выявлять случаи возникновения и распространения устойчивости к химиотерапевтическим препаратам.

Существует около десятка различных молекулярно-генетических методов типирования микобактерий, однако наибольшее распространение получили три: анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов IS6110 (от англ. Restriction Fragment Length Polymorphisms IS6110, IS6110 RFLP), сполиготипирование (spoligotyping) и анализ числа тандемных пов-

торов в различных локусах генома (от англ. Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) [3-6]. При помощи этих методов успешно решаются разнообразные прикладные задачи молекулярной эпидемиологии (установление путей передачи, выявление возможных случаев кросс-контаминации при лабораторных исследованиях, суперинфекции или реактивации очагов при возобновлении туберкулезного процесса), а так же изучаются фундаментальные вопросы происхождения и эволюции микобактерий [7, 8, 9]. Метод амплификации варьирующих по числу тандемных повторов (VNTR) является быстрым методом типирования микобактерий. Важной особенностью MIRU-VNTR локусов является их наследование. У микроорганизмов каждая хромосома представлена в единственном экземпляре, поэтому при размножении каждый дочерний микроорганизм будет иметь ту же кратность VNTR локусов, что и «родительский микроб» (будут иметь одинаковый генотип).

На сегодняшний день идентифицировано несколько десятков локусов в геноме *M.tuberculosis*, состоящих из различного числа тандемных повторов (VNTR-локусов) – структур, представляющих собой гомологичные последовательности ДНК длиной от 40 до 100 п.о., лежащих в межгенных регионах генома *M.tuberculosis* [6]. Комбинация из пяти локусов – ETR-A, B, C, D и F, первоначально предложенных для VNTR-типирования, имела малую, по сравнению с IS6110 RFLP-типированием и сполиготипированием, дискриминирующую способность. Позднее для анализа была пред-

ложена комбинация из 12 локусов (включая ранее использованные локусы ETR-D и F) – так называемых микобактериальных рассеянных повторяющихся единиц (от англ. Mycobacterial Interspersed Repetitive Units, MIRU). Данная методика MIRU-VNTR-типирования при анализе глобальной коллекции штаммов по разрешающей способности превосходила сполиготипирование и лишь незначительно уступала по этому параметру методу анализа IS6110 RFLP [10]. На сегодняшний день комбинация из 12 MIRU-локусов, обозначаемых как MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 и 40, получила для VNTR-типирования *M.tuberculosis* наибольшее распространение [11, 12]. К несомненным преимуществам данного метода типирования может быть отнесена простота и доступность, поскольку осуществление простой ПЦР-реакции и анализ ее результатов методом агарозного гель-электрофореза в настоящее время является рутинной процедурой для любой молекулярно-генетической лаборатории. Цифровой формат данных (количество tandemных повторов в исследуемых локусах) позволяет легко сравнивать генотипические данные, полученные в разных лабораториях, а так же осуществлять их кластерный анализ. Использование автоматических систем капиллярного электрофоретического анализа и праймеров, меченных флюоресцентными красителями, дает возможность одновременной амплификации нескольких локусов в мультиплексной ПЦР-реакции и оценки результатов без последующего этапа агарозного гель-электрофореза. Это позволяет проводить быстрый и высокопроизводительный анализ большого количества клинических образцов [13].

На современном этапе для повышения разрешающей способности метода исследуется возможность использования дополнительных VNTR-локусов [14]. Дополнительные локусы, в комбинации с ранее предложенной MIRU-VNTR системой, повышают разрешающую способность метода до уровня IS6110 RFLP-типирования, что дает возможность использовать VNTR-типирование даже на территориях с высоким уровнем распространения эндемичных штаммов *M.tuberculosis* [15]. Однако при выборе дополнительных локусов и составлении различных комбинаций с целью увеличения разрешающей способности необходимо обязательно учитывать тот факт, что полиморфизм тех или иных локусов значительно отличается в раз-

ных выборках и зависит от многих факторов, таких, как, например, принцип формирования коллекции штаммов, их географическое происхождение и др. Таким образом, молекулярно-генетический метод VNTR-типирования, будучи простым и быстрым в выполнении, представляется достаточно интересным и перспективным для изучения генетического разнообразия *M.tuberculosis*, а так же для решения актуальных задач современной клинической микробиологии и эпидемиологии, в частности, изучение вспышек туберкулезной инфекции, поиск закономерностей появления и распространения инфекции в регионе и т.д. Однако метод требует дальнейшей разработки и совершенствования для определения оптимального минимального набора локусов, обеспечивающих максимальную разрешающую способность, в том числе и на территориях с высокой частотой встречаемости эндемичных штаммов.

Материалы и методы

Подготовку клеточного лизата ДНК M.tuberculosis проводили в стекл. пробирки с 0,5-1 мл ТЕ-буфера (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7.0) и добавляем в пробирки несколько лопаток культуры максимально размазывая культуру по стенке до гомогенности. Затем в водяной бане кипятили при 85-90°C 60 мин. Полученную бактериальную убитую взвесь разливаем в две пробирки по 0,25-0,5 мл подписываем пробирки, центрифугируем, используем супернатант для генетических исследований, храним при минус 19-20°C в морозильнике.

Анализ числа tandemных повторов проводили в 24 локусах генома клинических штаммов *M.tuberculosis*. В работе были использованы условия ПЦР и известные последовательности праймеров 24MIRU-VNTR локусов из базы данных <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/>. Продукты амплификации анализировались методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в 1×TAE-буфере, с последующей окраской бромистым этидием. Число tandemных повторов в соответствующем локусе вычислялось исходя из размера ПЦР-продукта, определяемого путем сравнения размера полученного фрагмента с 100 п.о. маркером молекулярного веса ДНК – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladders (Fermentas), с использованием программного пакета Quantity One v.4.4.0 BioRad.

Таким образом, для каждого штамма был получен 24,15,12-символьный цифровой паттерн,

в котором каждая цифра соответствовала числу tandemных повторов в том или ином локусе.

Для оценки численной вариабельности генетических локусов использовался индекс аллельного полиморфизма (h), формула:

$$h = 1 - \sum x_i^2 [n/(n_i-1)],$$

где x_i – частота встречаемости аллеля i в локусе, и n_i – число штаммов, имеющих аллельный вариант i .

Для численной оценки дискриминирующей способности схем MIRU-VNTR-типирования использовали индекс Хантера-Гастона (HGDI):

$$HGDI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1),$$

где S – число групп, на которое данный метод разделяет всю выборку штаммов, n_j – число штаммов в j -й группе и N – общее число штаммов в исследованной выборке, что означает определение вероятности того, что два разных штамма из тестируемой выборки, будут отнесены с использованием данной методики к разным типам.

Результаты и их обсуждение

VNTR типирование основано на ПЦР-амплификации с использованием специфических праймеров для перекрывающихся регионов VNTR последовательностей и на определении размеров ампликонов после гель-электрофореза. Так как длина повторяющихся единиц известна, полученные размеры влияют на количество амплифицированных VNTR копий. В конечном результате, получается цифровой профиль, где каждая цифра соответствует количеству tandemных повторов в определенном локусе. К тому же, цифровой формат данных позволяет легко сравнивать генотипические данные, полученные в разных лабораториях на сайте www.miru-vntrplus.org.

В ходе выполнения работ был проведен VNTR-MIRU анализ числа tandemных повторов в 24 локусах для 81 мультирезистентного штамма *M.tuberculosis*, выделенных от больных из Павлодарской, Кызылординской, Алматинской, Западно-Казахстанской, Восточно-Казахстанской, Южно-Казахстанской и Северо-Казахстанской областей.

Цифровой формат данных (количество tandemных повторов в исследуемых локусах) поз-

воляет легко сравнивать генотипические данные, полученные в разных лабораториях, а так же осуществлять их кластерный анализ.

Для каждого штамма получен аллельный профиль, представленный набором аллельных вариантов по 24 MIRU локусам, где номер аллельного варианта соответствовал числу tandemных повторов в данном локусе.

Проведенный анализ аллельного полиморфизма каждого из 24 локусов клинических изолятов *M.tuberculosis* в отдельности выявил различную вариабельность числа повторов в том или ином локусе (таблица 1).

По результатам генотипирования и анализу индекса полиморфизма (h) локусы MIRU-04, MIRU-24, MIRU-27, VNTR 48, VNTR 49 *M.tuberculosis* были инвариабельны – все изоляты, попавшие в нашу выборку, имели один и тот же аллельный вариант этого локуса ($h = 0$).

Самый большой полиморфизм наблюдался в локусе VNTR 21 ($h=0.52$), высокий по сравнению с другими локусами индекс полиморфизма отмечен в локусах Qub26 ($h=0.37$), MIRU-26 ($h=0.36$), MIRU-31 ($h=0.35$) и Qub11b ($h=0.32$). Изменчивость остальных локусов варьировала в диапазоне от 0.13 до 0.28 (локусы MIRU 02, 10, 16, 20, 39, 40, *etrA*, VNTR 53, 43, 42,47,52). Мономорфным оказался локус MIRU-23 ($h = 0.06$) и VNTR 46 ($h= 0.01$) с двумя вариантами повторов.

Проведена оценка различных схем генотипирования штаммов *M.tuberculosis* по 24MIRU-VNTR локусам. Использовались четыре различных схемы генотипирования с использованием 24 локусов *M.tuberculosis* (таблица 2):

12 (MIRU02,04,10,16,20,23,24,26,27,31,39,40);

15 (MIRU04,10,16,26,31,40;VNTR43,42,47,52,53;ETRA,Mtub21,Qub11b,Qub26);

15 (MIRU02,04,10,16,20,23,24,26,27,31,39,40 +ETRA,ETRB, ETRC).

Для каждой схемы генотипирования для численной оценки дискриминирующей способности VNTR-типирования подсчитан индекс Хантера-Гастона (HGDI).

Как видно из таблицы 2, наибольшей дискриминирующей способностью обладает схема из полного набора 24 локусов *M.tuberculosis* (HGDI=0,88), наименьшей дискриминирующей способностью обладает схема из комбинации 12MIRU локусов (HGDI=0,73), примерно одинаковые показатели дискриминирующей способности у схем из 15 локусов (HGDI=0,84 и 0,81).

Таблица 1 – Полиморфизм 24 MIRU-VNTR локусов у 81 клинических изолятов *M.tuberculosis*. Серым цветом выделены локусы, обладающие наибольшим полиморфизмом.

Локус	Число повторов											h
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	13	14	
MIRU 2	-	7	73	1	-	-	-	-	-	-	-	0.19
MIRU 4	-	-	81	-	-	-	-	-	-	-	-	0
MIRU 10	-	-	6	70	3	-	2	-	-	-	-	0.24
MIRU 16	-	1	5	75	-	-	-	-	-	-	-	0.13
MIRU 20	-	8	69	-	3	-	1	-	-	-	-	0.25
MIRU 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78	3	0.06
MIRU 24	-	81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
MIRU 26	-	-	2	1	8	67	-	3	-	-	-	0.36
MIRU 27	-	-	-	81	-	-	-	-	-	-	-	0
MIRU 31	-	-	8	7	65	-	1	-	-	-	-	0.35
MIRU 39	-	-	8	72	1	-	-	-	-	-	-	0.19
MIRU 40	1	1	-	71	3	4	-	-	1	-	-	0.22
ETR A	-	-	10	2	69	-	-	-	-	-	-	0.25
VNTR 48 (ETR B)	-	-	81	-	-	-	-	-	-	-	-	0
VNTR43 (ETR C)	-	-	8	-	68	5	-	-	-	-	-	0.27
VNTR 42 (Mtub04)	-	1	2	9	69	-	-	-	-	-	-	0.25
VNTR 21 (Mtub21)	-	-	3	14	3	54	7	-	-	-	-	0.52
VNTR 46 (Mtub29)	-	1	-	-	80	-	-	-	-	-	-	0.01
VNTR 47 (Mtub30)	1	8	2	-	70	-	-	-	-	-	-	0.23
VNTR 49 (Mtub34)	-	-	-	81	-	-	-	-	-	-	-	0
VNTR 52 (Mtub39)	-	-	12	68	-	1	-	-	-	-	-	0.28
QUB 11b	-	4	6	4	-	-	66	1	-	-	-	0.32
QUB 26	-	-	-	-	3	14	2	62	-	-	-	0.37
VNTR 53 (QUB4156)	-	5	76	-	-	-	-	-	-	-	-	0.13

Примечание: h – индекс аллельного полиморфизма

Таблица 2 – Результаты использования четырех схем MIRU-VNTR-типирования у 81 клинической изоляты *M. tuberculosis*

Метод	Общее число генотипов	Число уникальных генотипов	Число кластеров	Размеры кластеризованных групп	Значение HGDI
24MIRU-VNTR	43	35	8	2-27	0,88
15MIRU-VNTR	37	29	8	2-32	0,84
12MIRU+3ETR	32	25	7	2-39	0,81
12MIRU	28	22	6	2-42	0,73

В результате проведения генотипирования и анализа 24 локусов определены наиболее полиморфные и информативные локусы, что способствует выбору оптимальной схемы типирования изолятов *M.tuberculosis* на основе MIRU-VNTR анализа. Проведена оценка раз-

личных схем генотипирования, что позволяет выбрать наиболее выполнимую оптимальную схему типирования, состоящую из 15 локусов.

По результатам оценки схем типирования определены две оптимальные схемы метода генотипирования *M.tuberculosis* на основе анализа

числа tandemных повторов в различных локусах генома (MIRU-VNTR). Данные схемы позволяют проводить генотипирование по 15 оптимальным локусам генома *M.tuberculosis*, не применяя для анализа распространенные 24 локуса. Комбинация 15 MIRU-VNTR локусов и 12 MIRU+3ETR,

в сравнении с другой комбинацией 24 MIRU-VNTR локусов, обеспечивает высокую разрешающую способность (HGDI=0,81 и 0,84), приближающуюся к значениям разрешающей способности всей совокупности 24 локусов и является менее трудоемкой.

Литература

- 1 Global tuberculosis report 2014. – Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2014.8). – 2014. – 171 p.
- 2 Абильдаев Т.Ш. Статический обзор по туберкулезу в Республике Казахстан. – Алматы, 2014. – 68с.
- 3 Groenen P. M., Bunschoten A. E., van Soolingen D., and van Embden J. D. 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. – P. 1057–1065.
- 4 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. – Vol. 6. – P. 23.
- 5 Kremer K., Glynn J. R., Lillebaek T., Niemann S., Kurepina N. E., Kreiswirth B. N., Bifani P. J., and van Soolingen D.. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 4040–4049.
- 6 Suresh N., Arora J., Pant H., Rana T. and Singh U. B. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* sDNA from Archival Ziehl–Neelsen -stained sputum smears // *J. Microbiol. Meth.* -2007. – Vol. 68(2). – P. 291-295.
- 7 Hawkey P.M., Smith E.G., Evans J.T., Monk P., Bryan G., Mohamed H.H., Bardhan M. and Pugh R.N.. *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing of Mycobacterium tuberculosis Compared to IS6110-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Investigation of Apparently Clustered Cases of Tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41. – P. 3514-3520.
- 8 Poynten M., Andresen D. N., Gottlieb T. Laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis*: an investigation and analysis of causes and consequences // *Intern. Med. J.* – 2002. – Vol. 32. – P. 511-512.
- 9 Allix-Béguec C., Supply P., and Fauville-Dufaux M. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 39. – P. 783–789.
- 10 Frothingham R., Meeker-O’Connell W.A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats // *Microbiol.* – 1998. – Vol. 144. – P. 1189-1196.
- 11 Mazars E., Lesjean S., Banuls A.L., Gilbert M., Vincent V., Gicquel B., Tibayrenc M., Locht C., and Supply P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98(4). – P. 1901–1906.
- 12 Supply P., Mazars E., Lesjean S., Vincent V., Gicquel B. and Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome // *Molecular Microbiology.* – 2000. – 36(3). – P. 762-771.
- 13 Allix-Béguec C., Supply P., and Fauville-Dufaux M. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 39. – P. 783–789.
- 14 Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rusch-Gerdes, S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M. C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C., D. van Soolingen. 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.
- 15 Jiao W., Mokrousov I., Sun G., Guo Y., Vyazovaya A., Narvskaya O. and Shen A. Evaluation of New Variable-Number Tandem-Repeat Systems for Typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing Genotype Isolates from Beijing, China // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – Vol. 46(3). – P. 1045–1049.