

ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА СУБТИПА B0/W148 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ОСОБЕННОСТИ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

Синьков В.В.,
Огарков О.Б.

ФГБНУ «Научный центр проблем
здоровья семьи и репродукции
человека» (664003, г. Иркутск,
ул. Тимирязева, 16, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Синьков Вячеслав Владимирович,
e-mail: vsinkov@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Субтип B0/W148 принадлежит к филогенетической линии L2 *Mycobacterium tuberculosis* и наиболее часто встречается в странах бывшего Советского Союза. Для эффективного эпидемиологического контроля необходимы тест-системы, способные выявлять генетические варианты возбудителя. Изучение генетического разнообразия штаммов B0/W148 и поиск молекулярных маркеров, пригодных для их генотипирования, являются ключевыми этапами в разработке таких диагностических инструментов.

Цель исследования. Изучение филогенетического разнообразия субтипа B0/W148, циркулирующего на территории Российской Федерации и сопредельных стран, для выявления уникальных клад и поиска специфических молекулярных маркеров, пригодных для их точной идентификации.

Материалы и методы. В исследовании были использованы образцы ДНК штаммов B0/W148 ($n = 34$), изолированных в различных регионах РФ, а также геномные данные, полученные из SRA NCBI (Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information) ($n = 419$). Для анализа генетического разнообразия и выявления молекулярных маркеров использовались методы филогенетического анализа и анализа главных компонент (PCA, principal component analysis) полногеномных данных (WGS, whole genome sequencing). Была проведена эволюционная реконструкция возраста выявленных клад.

Результаты. Анализ геномов B0/W148 ($n = 453$) обнаружил, что они подразделяются на три филогенетические клады: В – базальную (Basal), М – малую (Minor) и Р – основную (Principal). Было установлено, что специфические мутации в кладах М и Р позволяют выполнять их дифференциальную диагностику. Для клады М уникальной является мутация 4137219T>G, а для клады Р – мутация 2241091C>T. Среди штаммов, относящихся к кладе В, характерных мутаций обнаружено не было. Кроме этого, для клады В были выявлены уникальные профили мутаций в генах, отвечающих за лекарственную устойчивость.

Заключение. Исследование показало, что штаммы B0/W148 представляют собой генетически гетерогенную популяцию, разделённую на клады В, М и Р. Клады М и Р имеют уникальные мутации, позволяющие проводить их идентификацию. Также было установлено, что все клады характеризуются наличием специфических профилей мутаций в генах лекарственной устойчивости.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, генотип Beijing, B0/W148, WGS, лекарственная устойчивость

Статья поступила: 11.07.2024
Статья принята: 22.08.2024
Статья опубликована: 25.09.2024

Для цитирования: Синьков В.В., Огарков О.Б. Популяционная структура субтипа B0/W148 *Mycobacterium tuberculosis*: филогенетический анализ и особенности генотипической лекарственной устойчивости. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(4): 248-259. doi: 10.29413/ABS.2024-9.4.27

POPULATION STRUCTURE OF THE B0/W148 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUBTYPE: PHYLOGENETIC ANALYSIS AND CHARACTERISTICS OF GENOTYPIC DRUG RESISTANCE

Sinkov V.V.,
Ogarkov O.B.

Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems
(Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003,
Russian Federation)

Corresponding author:
Viacheslav V. Sinkov,
e-mail: vsinkov@yandex.ru

ABSTRACT

Background. The B0/W148 subtype belongs to the L2 phylogenetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis* and is most common in the former Soviet Union. Test systems capable of detecting genetic variants of the pathogen are needed for effective epidemiological surveillance. Studying the genetic diversity of B0/W148 strains and finding molecular markers suitable for their genotyping are key steps in the development of such diagnostic tools.

The aim of the work. To study the phylogenetic diversity of the B0/W148 subtype circulating in the territory of the Russian Federation and neighboring countries in order to identify unique clades and search for specific molecular markers suitable for their precise identification.

Materials and methods. The study used DNA samples of B0/W148 strains ($n = 34$) isolated in different regions of the Russian Federation, as well as genomic data obtained from the SRA NCBI (Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information) ($n = 419$). Phylogenetic analysis and principal component analysis (PCA) of whole genome sequencing (WGS) data were used to analyze genetic diversity and to identify molecular markers. An evolutionary reconstruction of the age of the identified clades was carried out.

Results. The analysis of the B0/W148 genomes ($n = 453$) revealed that they are divided into three phylogenetic clades: B – basal, M – minor and P – principal. It was found that specific mutations in the M and P clades allow for their differential diagnosis. The 4137219T>G mutation is unique for the M clade, and the 2241091C>T mutation is unique for the P clade. No characteristic mutations were found among the strains of B clade. In addition, unique mutation profiles in the genes responsible for drug resistance were identified for the clades.

Conclusion. The study showed that B0/W148 strains represent a genetically heterogeneous population divided into B, M and P clades. M and P Clades have unique mutations that allow for their identification. It was also found that all clades are characterized by the presence of specific mutation profiles in drug resistance genes.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing genotype, B0/W148, WGS, drug resistance

Received: 11.07.2024
Accepted: 22.08.2024
Published: 25.09.2024

For citation: Sinkov V.V., Ogarkov O.B. Population structure of the B0/W148 *Mycobacterium tuberculosis* subtype: Phylogenetic analysis and characteristics of genotypic drug resistance. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(4): 248-259. doi: 10.29413/ABS.2024-9.4.27

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулёз (ТБ) по-прежнему остаётся одной из ключевых проблем общественного здравоохранения. В 2022 г. он занял второе место в списке причин смерти от инфекционных болезней в мире после COVID-19. Он также является ведущей причиной смертности среди людей, живущих с ВИЧ, и одной из основных причин смертности, связанной с антимикробной резистентностью. В 2022 г. туберкулёз стал причиной 1,3 млн смертей в мире, включая 167 000 человек с ВИЧ. Показатель заболеваемости туберкулёзом в мире (число новых случаев на 100 000 населения в год) вырос на 3,9 % с 2020 по 2022 г., что замедлило снижение этого показателя, который стабильно снижался на протяжении почти двух десятилетий примерно на 2 % в год [1].

В Российской Федерации, согласно официальной статистике, в 2022 г. заболеваемость туберкулёзом составила 31,1 случая на 100 тысяч населения [1]. Снижение смертности на 10 % и числа новых случаев на 6 % в последние годы позволило России покинуть список стран с высоким бременем туберкулёза. Однако наша страна по-прежнему остаётся в лидерах по распространению лекарственно-устойчивых (ЛУ) штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), где их доля достигает 70 %. Кроме этого, последние опубликованные статистические данные указывают на рост показателей смертности от туберкулёза на 5,6 % в мире, что связывают с пандемией SARS-CoV-2, на борьбу с которой были брошены существенные ресурсы системы здравоохранения [1].

Анализ показателей заболеваемости туберкулёзом в Сибирском федеральном округе и в Иркутской области за период с 2005 по 2019 г. демонстрирует существенное снижение показателей интенсивности эпидемического процесса [2], однако, несмотря на положительную динамику, ситуация по-прежнему остаётся сложной [3].

Туберкулёз в человеческой популяции формирует локальные эпидемические очаги, в которых возбудитель накапливается и с когортой восприимчивых к инфекции групп населения распространяется дальше. Анализ спектра генетического разнообразия штаммов МБТ, выделяемых от больных на исследуемых территориях, демонстрирует относительно схожий профиль возбудителей. Это в первую очередь связано с внутренней миграцией населения, обусловленной такими факторами, как политика, здравоохранение и культурные особенности территории. Однако набор генетических семейств возбудителя может существенно различаться между географически близкими, но разделёнными границами территориями [4].

Глобализация и развитие пассажирских транспортных сетей увеличивают риски экспансии «агрессивных» вариантов МБТ как внутри отдельных стран, так и в общемировом масштабе. Миграционные потоки являются основным фактором распространения новых вариантов МБТ между странами [5], их увеличение неизбежно ускоряет процесс экспансии генетических семейств из одного региона в другой. Следовательно, анализ генетического разнообразия представителей МБТ на от-

дельно взятых территориях является важным критерием оценки с точки зрения эпидемиологического мониторинга. Изменения генетического ландшафта популяции возбудителя могут служить маркером накопления более агрессивных генотипов, что, безусловно, является плохим прогностическим признаком.

На территории стран бывшего Советского Союза доминирующим генетическим семейством МБТ является генотип Beijing. Предполагается, что он был завезён в Советский Союз в 1920–1930-х гг. с миграцией людей из Маньчжурии и затем распространился в пенитенциарной системе. Эпидемические свойства этого штамма в сочетании с неблагоприятными условиями содержания заключённых способствовали его быстрому распространению сначала в тюрьмах и исправительных учреждениях, а затем и по всей территории Советского Союза [6–8].

Российский «успешный» клон B0/W148, относящийся к филогенетической линии L2 [9], также известный как Восточно-Европейский кластер 2 или CC2, является важным элементом распространения лекарственно-устойчивого туберкулёза в Российской Федерации и странах бывшего СССР [10–13]. Известно, что данное семейство способно формировать более вирулентные фенотипы и приобретать мутации, повышающие его патогенные свойства [14, 15]. Эти штаммы также обладают высокой способностью к выживанию в макрофагах, повышенной трансмиссивностью и склонны чаще вызывать заболевание после первичного инфицирования [16–19]. Его геном характеризуется масштабными структурными перестройками, а синтез ферментов, ответственных за биосинтез длинноцепочечных жирных кислот, усиливает способность к выживанию в макрофагах [20, 21].

По данным исследователей, вероятный общий предок B0/W148 возник в период с 1950 по 1963 г. [12, 19]. Эти данные согласуются с ранее выдвинутой гипотезой [8], согласно которой массовое освобождение сотен тысяч заключённых из пенитенциарной системы в период «оттепели» конца 1950-х гг. могло послужить началом широкого распространения генотипа Beijing, в том числе и его эндемичного для Советского Союза варианта B0/W148, среди гражданского населения. Следует отметить, что субтип B0/W148 до сих пор остаётся недостаточно изученным с точки зрения филогенетического разнообразия. Более того, его часто рассматривают не как самостоятельный вариант, а как часть более широкой эпидемической вспышки генотипа Beijing [19].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение филогенетического разнообразия субтипа B0/W148, циркулирующего на территории Российской Федерации и сопредельных стран, для выявления уникальных клад и поиска специфических молекулярных маркеров, пригодных для их точной идентификации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы культуры субтипа B0/W148 *Mycobacterium tuberculosis* ($n = 34$), полученные от больных туберкулёзом лёгких с территорий Иркутской области ($n = 5$), Республики Саха (Якутия) ($n = 6$), Республики Бурятия ($n = 3$), Забайкальского края ($n = 5$), Дальнего Востока ($n = 13$), Республики Тыва ($n = 2$). Геномная ДНК была выделена из замороженных бактериальных культур методом фенол-хлороформной экстракции.

Геномные библиотеки были приготовлены при помощи набора DNA Flex (Illumina, США). Полногеномное секвенирование образцов осуществлялось на секвенаторе NextSeq 550 (Illumina, США) с использованием набора реагентов v 2.5 и проточной ячейкой (high output) 300 циклов.

Кроме этого, были использованы 762 полных генома B0/W148 из онлайн-сервиса Short Read Archive (National Center for Biotechnology Information, США), являющиеся частью следующих биопроектов:

PRJEB2138, PRJEB24099, PRJEB6273, PRJEB7281, PRJEB9680, PRJNA229223, PRJNA229570, PRJNA229571, PRJNA229573, PRJNA229575, PRJNA229578, PRJNA229584, PRJNA229585, PRJNA229596, PRJNA229598, PRJNA229599, PRJNA229600, PRJNA229603, PRJNA229605, PRJNA229607, PRJNA229608, PRJNA229609, PRJNA229615, PRJNA229618, PRJNA229619, PRJNA229622, PRJNA229624, PRJNA229626, PRJNA229627, PRJNA229629, PRJNA229630, PRJNA229631, PRJNA229632, PRJNA229634, PRJNA229635, PRJNA229636, PRJNA229641, PRJNA229646, PRJNA229649, PRJNA229651, PRJNA229652, PRJNA229654, PRJNA229655, PRJNA229656, PRJNA229668, PRJNA229669, PRJNA229671, PRJNA229674, PRJNA229677, PRJNA229679, PRJNA229691, PRJNA229692, PRJNA229693, PRJNA229697, PRJNA229698, PRJNA229700, PRJNA229701, PRJNA229704, PRJNA229706, PRJNA229709, PRJNA229710, PRJNA229712, PRJNA229716, PRJNA229717, PRJNA229718, PRJNA229721, PRJNA229727, PRJNA237405, PRJNA240163.

В качестве аутгруппы при определении направления эволюционных изменений в исследуемой группе B0/W148 был использован геном семейства Beijing, относящийся к древнему варианту (Asian Ancestral 1), который был выделен от больного туберкулёзом в городе Омске (биопроект PRJNA489691).

Первичная обработка данных включала удаление коротких прочтений плохого качества ($Q < 20$) с удалением технических последовательностей с помощью программы CutAdapt [22]. Далее короткие прочтения были картированы на референсный геном NC_000962 при помощи Burrows – Wheeler Aligner [23]. Индексирование и сортировка последовательностей осуществлялись при помощи программ SAMtools [24].

Поскольку в работе использовались микобактериальные геномы, полученные из различных источников – для обеспечения сходимости результатов были осуществлены несколько этапов фильтрации и нормализации данных. В первую очередь была построена матрица позиций нуклеотидов со значениями минимального порога глубины прочтения (5 прочтений в обеих ориентациях), Phred-значения > 20 . Далее был расчи-

тан межквартильный интервал для значений глубины покрытия каждой позиции из матрицы с определением границ распределения. Геномы с глубиной прочтения, выходящей за допустимые пределы, были обозначены как выбросы и исключены из исследования.

Для исключения из анализа микст-вариантов с другими представителями семейства Beijing было выполнено определение специфичных для субтипа B0/W148 молекулярных маркеров: 497491G>A RD105, 4280708G>A RD207, 2825581T>G RD181, 1892017T>C mutT4, 146C>T mutT2, 1286766G>C Ogt12, 4086G>T B0/W148 [21], – наличие которых являлось обязательным критерием для включения образца в группу исследования.

Изучение лекарственной устойчивости проводилось в формате *in silico* на основе анализа мутаций в генах, ассоциированных с ЛУ [25]. Для обеспечения сходимости данных при сравнении профилей ЛУ геномы с плохим покрытием в генах и их промоторах были исключены из последующего анализа.

В классификации лекарственной устойчивости к противотуберкулёзным препаратам (ЛУ) использовались обновлённые критерии, предложенные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) [1]:

- монорезистентная форма (Mono-DR) – ЛУ к одному противотуберкулёзному препарату;
- полирезистентная форма (Poly-DR) – ЛУ как минимум к двум противотуберкулёзным препаратам, но не к изониазиду и рифампицину;
- множественная ЛУ (МЛУ или MDR, multidrug resistance) – ЛУ к изониазиду и рифампицину, основным противотуберкулёзным препаратам первой линии;
- пре-широкая лекарственная устойчивость (пре-ШЛУ или PreXDR, pre-extensive drug resistance) – ЛУ к рифампицину и фторхинолонам;
- широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ или XDR, extensive drug resistance) – ЛУ к рифампицину, фторхинолону и бедаквилину или линезолиду.

Филогенетический анализ проводился на основе конкатенированной последовательности нуклеотидов из массива геномных данных B0/W148 ($n = 453$), отфильтрованных с помощью программы BedTools [26]. Из последовательности были исключены гены резистентности к противотуберкулёзным препаратам, их промоторы, а также гены с высокой изменчивостью (PP, PE, PPE).

Филогенетическое дерево было построено при помощи метода максимального правдоподобия. Надёжность топологии дерева была оценена на основе бутстрап-анализа с 1000 итераций. В качестве модели замены нуклеотидов была выбрана TVM (transversion substitution model), поскольку она имела наилучшие Akaike-значения, вычисленные при помощи IQ-TREE Model Finder. Скорость эволюции и топология деревьев были проанализированы с помощью модели замены общего времени восстановления (GTR, generalised time reversible) с гамма-распределённой скоростью замены на каждом сайте и четырьмя категориями скорости (G4) с использованием программы BEAST v. 2.7.4 [27].

Измерение вариации скорости и оценки времени расхождения осуществлялось с моделью строгих часов

(strict clock) и мутационной скоростью 0,5 SNP/геном/год. Для анализа филогенетического разнообразия штаммов B0/W148 была применена линейная skyline-модель с запусками в 200 млн шагов. Выборки отбирались каждые 1000 поколений, а образцы цепей Маркова – Монте-Карло (MCMC, Markov chain Monte Carlo) проверялись на сходимость и адекватную смешиваемость при помощи Tracer 1.7.1. Первые 10 % каждой цепи были отброшены как «разогрев». Для получения максимальной достоверности топологии филогенетических клад использовался Tree Annotator 2.6.7, а дерево визуализировалось с помощью пакета R-ggtree.

При помощи программы TempEst [28] осуществлялись анализ временного сигнала и оценка молекулярных часов, в результате которого были определены скорость накопления мутаций и время до вероятного общего предка (TMRCA, time to most recent common ancestor) в исследуемой популяции штаммов.

Анализ топологии распределения филогенетических ветвей на древе для обнаружения специфических молекулярных маркеров проводился с учётом мутаций, сходство которых не обусловлено наследованием от общего предка (гомоплазий). Для исключения таких мутаций использовалась программа Homoplasy Finder [29]. Наличие специфических SNP в геномах B0/W148 подтверждалось методом амплификации таргетных регионов ДНК случайно отобранных штаммов ($n = 8$) с использованием полимеразной цепной реакции. Для амплификации клады М использовалась пара праймеров – прямой праймер 5'-CTCCGCTCAGTGAATGGC и обратный праймер 5'-CCGAGGATGTAGCCGATGAA. Для амплификации клады Р использовалась пара праймеров – прямой праймер 5'-GGCGTGGTTTCAGCAAGTTTC и обратный праймер 5'-CGTCATCTGATTCTCGGTCA.

Смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР), используемая для исследования, включала стандартный буфер ПЦР, смесь дезокситрифосфатов (200 мкМ), Taq-полимеразу (0,5 ед/реакцию) и 3 мМ $MgCl_2$. Общий объём смеси составлял 25 мкл: 20 мкл ПЦР-смеси и 5 мкл ДНК. Реакция ПЦР проводилась при стандартных условиях с использованием ПЦР-термоциклера CFX96 (BioRad, США).

Программа ПЦР для амплификации фрагментов была следующей: один цикл при 95 °C в течение 5 мин; 30 циклов – денатурация при 95 °C в течение 10 с, отжиг при 60 °C в течение 30 с, элонгация при 72 °C в течение 30 с. Очистка продуктов реакции проводилась в 1%-м агарозном геле с использованием электрофореза в 1 × трис-ацетатном буфере. После очистки ампликон вырезали из геля и извлекали из агарозы замораживанием. Очищенный продукт ПЦР (1 нг/мкл), праймер (20 пмоль/мкл) и Big Dye Terminator v. 3.1 (4 мкл) были разведены в 12 мкл воды и секвенированы при помощи протокола: 1 мин при 90 °C (10 с при 96 °C, 5 с при 50 °C и 4 мин при 60 °C) в течение 25 циклов. Продукты реакции секвенирования были очищены путём переосаждения в спиртовом растворе ацетата натрия и растворены в 10 мкл HiDi формамида. Реакции секвенирования были проанализированы на Нанофор-05 (Синтол, Россия).

Статистический анализ выполняли при помощи программного обеспечения R (версия 4.2.1; Фонд статистических вычислений R, Австрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе были использованы 453 генома штаммов B0/W148, собранные в 9 странах и 2 географических регионах (когда точная принадлежность выделенных образцов к той или иной стране не была определена) (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОМОВ ПО СТРАНАМ И РЕГИОНАМ В КЛАДАХ В, М И Р
TABLE 1
DISTRIBUTION OF GENOMES BY COUNTRIES AND REGIONS IN B, M, AND P CLADES

Регион	Абсолютное количество		
	В ($n = 30$)	М ($n = 134$)	Р ($n = 289$)
Африка	1	0	1
Беларусь	0	30	11
Грузия	1	13	11
Западная Европа	6	14	25
Иран	0	0	2
Казахстан	2	6	3
Литва	4	2	7
Россия	11	64	89
Узбекистан	1	2	2
Украина	2	2	3
Эстония	2	1	135

Характер филогенетических отношений между штаммами изучался с помощью байесовского коалесцентного анализа и метода максимального правдоподобия. Было установлено, что все геномы B0/W148 подразделяются на три филогенетически различные группы, которые мы обозначили в соответствии с их положением на древе и размером как базальную (клада В), малую (клада М) и основную (клада Р) (рис. 1а). Следует заметить, что клада В представляет собой группу базальных узлов филогенетического древа и не является кладой, однако для удобства описания и проведения статистических расчётов данная группа геномов была объединена в условную кладу В.

Методы биоинформационного анализа показали, что штаммы B0/W148, относящиеся к кладам М и Р, имеют специфические мутации, позволяющие выполнять их дифференциальную диагностику: клада М ха-

рактеризуется мутацией 4137219T>G, а клада Р – мутацией 2241091С>Т. В то же время у штаммов, принадлежащих к кладе В, уникальные мутации не были выявлены. Для подтверждения наличия выявленных мутаций часть исследуемых штаммов ($n = 8$), выделенных на территории Российской Федерации, была изучена методом амплификации участков ДНК с фланкирующими регионами праймерами и последующим их секвенированием по методу Сэнгера. Было установлено, что выявленные мутации действительно присутствуют в геномах B0/W148 (рис. 16) и могут служить инструментом для идентификации клад.

Динамика возникновения клад во времени рассчитывалась на значениях среднего возраста узла филогенетического дерева, который определялся как сред-

нее арифметическое значение между 95%-м интервалом наивысшей и наименьшей апостериорной плотности (HPD, highest posterior density), соотносённое с возрастом самого молодого генома. Вычисленные значения были проверены на нормальность распределения с помощью теста Шапиро – Уилка, который показал, что p -значение ($p < 0,01$) меньше выбранного уровня статистической значимости ($p = 0,05$), и нулевая гипотеза должна быть отвергнута, поскольку данные не распределены нормально. В связи с этим для изучения распределения среднего возраста узлов между кладами был выбран метод Краскела – Уоллиса, который обнаружил статистически значимые различия ($p < 0,01$) в распределении среднего возраста между всеми кладами (рис. 26). Полученные данные позволяют сделать вы-

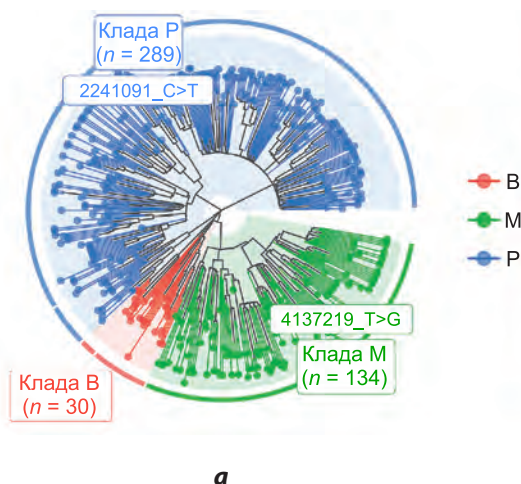


РИС. 1.
а – филогенетическое древо B0/W148 с указанием основных клад и специфических мутаций; **б** – выравнивание фрагментов ДНК с клада-специфическими мутациями

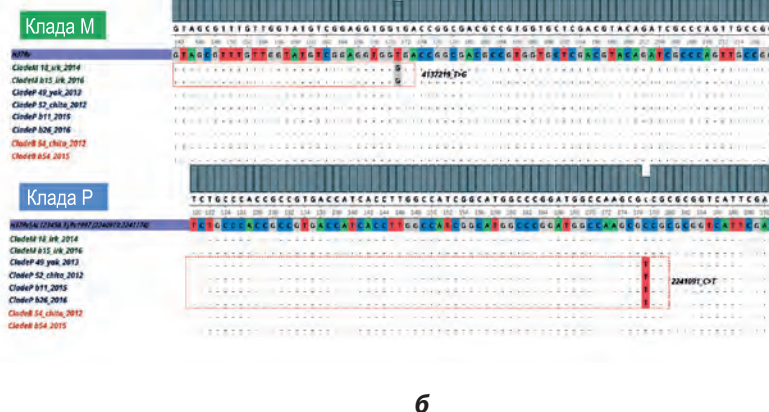


FIG. 1.
а – phylogenetic tree of B0/W148 indicating major clades and specific mutations; **б** – alignment of DNA fragments with clade-specific mutations

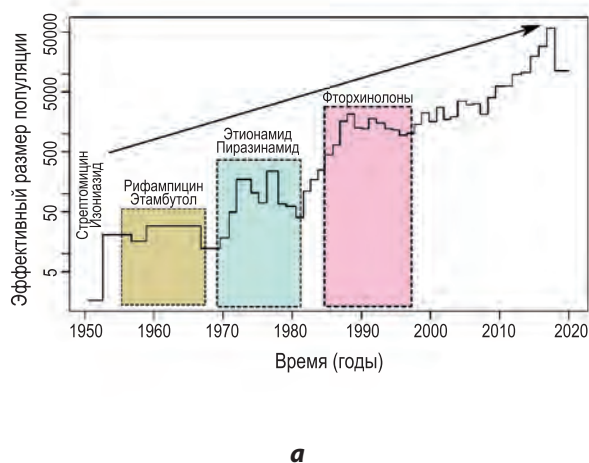


РИС. 2.
а – динамика изменения популяции возбудителя во времени; **б** – распределение среднего возраста возникновения узла, рассчитанное на основе 95%-го интервала наивысшей апостериорной плотности

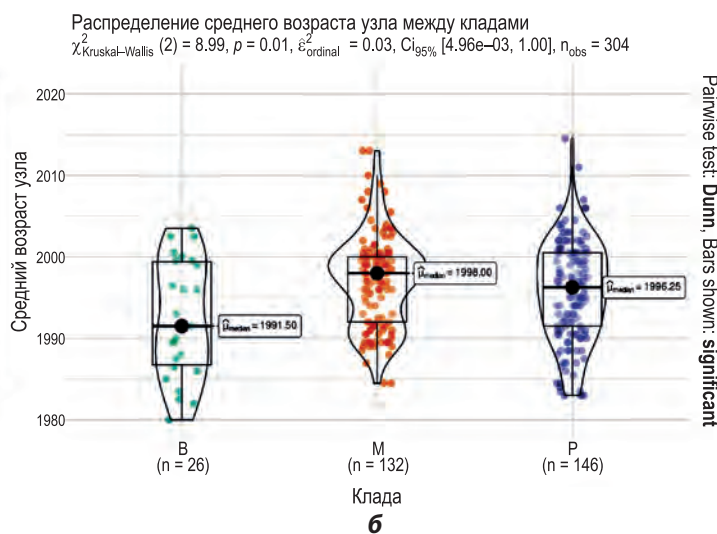


FIG. 2.
а – dynamics of the pathogen population change over time; **б** – distribution of the mean age of node emergence, calculated based on the 95 % highest posterior density interval

вод о том, что формирование клад происходило в разные промежутки времени.

Анализ временного сигнала с использованием метода молекулярных часов продемонстрировал высокую степень соответствия генетических данных выбранной модели эволюции. Временной диапазон охватывал 25 лет, при этом скорость накопления мутаций была стабильной (наклон графика составил 1 мутацию на единицу времени). Расчёт TMRCA всех исследуемых штаммов показал, что он возник в середине 1970-х гг. (с 1964 по 1982 г. в пределах 95% HPD). Полученные данные согласуются с предыдущими расчётами других исследователей, указавших на возраст возникновения вероятного общего предка B0/W148 в 1950–1963 гг. [12, 19].

Метод линейной регрессии подтвердил, что средний возраст узлов на филогенетическом дереве статистически значимо различается при уровне значимости $p \leq 0,05$: для клад М он составил 4,013 года ($p = 0,00196$), для клад Р – 2,846 года ($p = 0,02628$). Поскольку клад В находится в основании филогенетического дерева, и её можно считать наиболее «древней», то наблюдаемое двукратное увеличение значений среднего возраста междукладами М и Р свидетельствует о том, что клад М возникла значительно позже, чем клад Р.

Изучение динамики изменения эффективного размера популяции возбудителя во времени позволило выявить пики, приходящиеся на 1960-е, 1970–1980-е и 1990-е годы (рис. 2а), что соответствует этапам внедрения противотуберкулёзных препаратов в медицинскую практику: началу применения рифампицина и изониазида – в 1960-е гг., введению в клиническую практику этионамида и пипразинамида – в 1970-е гг., использованию фторхинолонов – в 1990-е гг. [30].

Фокус исследования был сделан на клинически значимых мутациях с установленной или вероятной связью с лекарственной устойчивостью в соответствии с рекомендациями ВОЗ [25]. Для последующего анализа были отобраны ЛУ мутации, относящиеся к следующим группам:

- группа 1: Assoc w R (R) – резистентность подтверждена (R);

- группа 2: Assoc w R – Interim (r) – резистентность полностью не доказана (r);

- группа 3: Uncertain significance (U) – взаимосвязь с резистентностью неизвестна (U).

Мы исключили из исследования мутации, относящиеся к группе 4 (Not assoc w R – Interim) и группе 5 (Not assoc w R), поскольку их включение могло бы привести к искажению результатов. Удаление этих мутаций также позволило сократить объём данных и упростить интерпретацию, сосредоточив внимание на клинически значимых мутациях.

Было обнаружено 2886 мутаций в генах, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, среди 453 генотипов B0/W148, соответствующих указанным критериям. Из них 190 (6,58 %) мутаций принадлежали к кладу В, 853 (29,6 %) – к кладу М, 1843 (63,9 %) – к кладу Р.

Ввиду того, что в текущем исследовании были использованы данные, для которых отсутствовала достоверная информация о профилях фенотипической лекарственной устойчивости – предсказание профилей ЛУ осуществлялось методом *in silico*, основанном на определении специфических мутаций в генах ЛУ. Было установлено, что распределение профилей ЛУ среди клад В, М и Р имеет статистически значимые различия (табл. 2). В кладу В наблюдается значительное увеличение доли изониазид-устойчивого ТБ (Ну-ТБ) до 16,67 % и снижение доли МЛУ до 83,33 % по сравнению с другимикладами. Тем не менее, высокие значения доли МЛУ (от 83 до 96 %) во всехкладах указывают на их высокий эпидемический потенциал в распространения ЛУ ТБ.

PCA обнаружил, что распределение частот мутаций в генах ЛУ (рис. 3а) характеризуется образованием отдельных кластеров (эллипсы) соответствующихкладам В, М и Р. Поскольку границы компонент не пересекаются, то можно говорить о существовании уникальных вариантов профилей мутаций для каждойклады. Наблюдаемое непересекающееся расположение векторов главных компонент дляклад В, М и Р (рис. 3б), определяемое распределением мутаций, указывает на взаимосвязь изменений в генах лекарственной устойчивости и процессов формированияклад.

ТАБЛИЦА 2
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
СРЕДИ КЛАД В, М, Р

Клада	Число штаммов по группе ЛУ, абс. (%); [95% ДИ]				Хи-квадрат
	Ну-ТБ	Ру-ТБ	МЛУ	пре-ШЛУ	
В	5 (16,67 %) [7,34–33,56]	0	25 (83,33 %) [66,44–92,66]	0	$\chi^2 = 24,589$ ($p < 0,01$)
М	2 (1,49 %) [0,41–5,28]	0	129 (96,27 %) [91,56–98,40]	3 (2,24 %) [0,76–6,38]	
Р	9 (3,11 %) [1,65–5,81]	1 (0,35 %) [0,06–1,93]	279 (96,54 %) [93,75–98,11]	0	

Примечание. Ру-ТБ – рифампицин-устойчивый ТБ.

TABLE 2
DISTRIBUTION OF DRUG RESISTANCE AMONG В, М, Р
CLADES

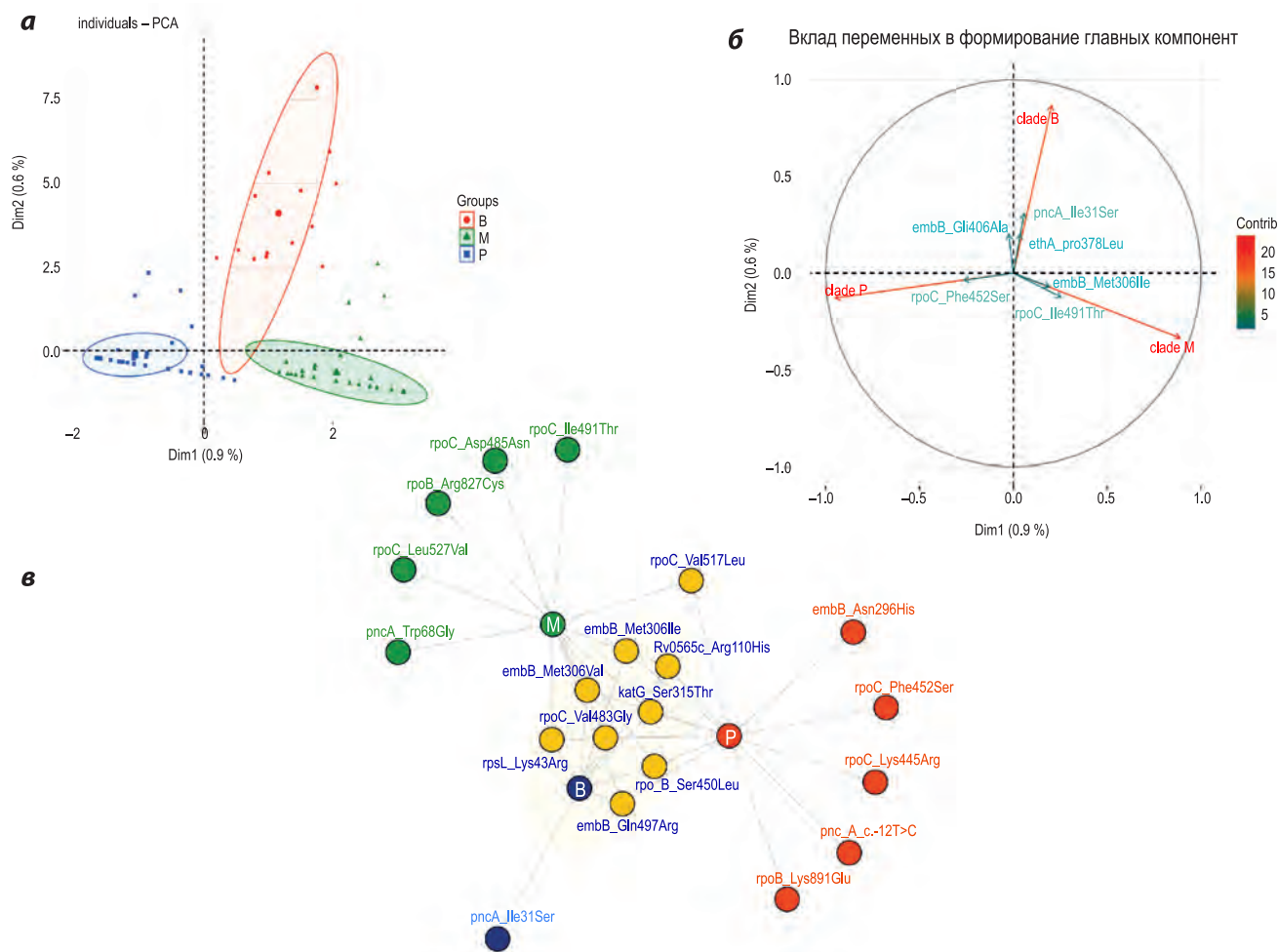


РИС. 3.

а – анализ главных компонент (PCA), распределение мутаций с группировкой по кладам В, М, Р; **б** – вклад переменных в формирование главных компонент с использованием PCA; **в** – граф взаимосвязей мутаций между кладами В, М, Р на основе частоты встречаемости мутаций

FIG. 3.

а – PCA, distribution of mutations grouped by B, M and P clades; **б** – contribution of variables to the formation of principal components using PCA; **в** – mutation network graph between B, M and P clades based on mutation frequency

Выявление мутаций, ассоциированных с кладами, осуществлялось с использованием теста Данна с поправкой Холма ($p_{adj} < 0,05$), являющегося методом выявления статистически значимых различий между группами, в результате чего были отобраны мутации, статистически значимо различающиеся между кладами.

Для подтверждения полученных результатов был проведён анализ распределения мутаций между кладами В, М и Р с использованием точного теста Фишера с симуляцией p -значения на 2000 репликациях, который показал наличие статистически значимых различий в наблюдаемой частоте мутаций ($p = 0,0004998$). Полученные данные обнаружили неравномерное распределение мутаций среди кладов, указывая на существование специфических мутационных профилей для каждой из них (табл. 3).

Далее был построен невзвешенный граф (рис. 3в) значений частоты мутаций, где вершины соответствуют мутациям, а рёбра указывают на наличие связи между

ними в различных кладах. Метки вершин были приняты равными их названиям, и размер установлен пропорционально важности или частоте обнаружения мутации. Для визуального представления использовался алгоритм раскладки Фрюхтермана, который позволяет укладывать вершины графа таким образом, чтобы минимизировать пересечения рёбер для улучшения восприятия структуры сети. Полученное изображение графа дало возможность обнаружить уровни распределения мутаций между кладами, которые мы условно разделили на общие, промежуточные и индивидуальные. Общий уровень объединяет те мутации, которые являются «ядром» популяции B0/W148 – на графе он обозначен жёлтым цветом. Мутации, относящиеся к «ядру», скорее всего, являются «древними», эволюционно эффективными изменениями и существуют во всех штаммах безотносительно кладовой принадлежности. К таким мутациям относятся: *embB* Met306Ile, *embB* Met306Val, *embB* Gln497Arg, *Rv0565c* Arg110His, *katG* Ser315Thr,

ТАБЛИЦА 3
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ СРЕДИ КЛАД В, М, Р

TABLE 3
DISTRIBUTION OF MUTATIONS AMONG
B, M AND P CLADES

Мутация	Число штаммов с мутацией в составе клады, абс (%); [95% ДИ]			ПТП	Группа ЛУ*
	В (n = 30)	М (n = 134)	Р (n = 289)		
<i>embB</i> Asn296His	0	0	23 (1,46 %) [0,97–2,18]	этамбутол	U
<i>embB</i> Gln497Arg	2 (1,44 %) [0,40–5,09]	3 (0,41 %) [0,14–1,21]	28 (1,78 %) [1,23–2,56]	этамбутол	R
<i>embB</i> Met306Ile	3 (2,16 %) [0,74–6,15]	46 (6,35 %) [4,8–8,37]	16 (1,02 %) [0,63–1,64]	этамбутол	R
<i>embB</i> Met306Val	8 (5,76 %) [2,94–10,95]	56 (7,73 %) [6–9,91]	172 (10,93 %) [9,48–12,57]	этамбутол	R
<i>katG</i> Ser315Thr	30 (21,58 %) [15,56–29,14]	134 (18,51 %) [15,85–21,50]	288 (18,30 %) [16,47–20,28]	изониазид	R
<i>pncA</i> с.-12T>C	0	0	7 (0,44 %) [0,22–0,92]	пиразинамид	R
<i>pncA</i> Ile31Ser	7 (5,04 %) [2,46–10,03]	0	0	пиразинамид	R
<i>pncA</i> Trp68Gly	0	16 (2,21 %) [1,36–3,56]	0	пиразинамид	R
<i>rpoB</i> Arg827Cys	0	10 (1,38 %) [0,75–2,52]	1 (0,06 %) [0,01–0,36]	рифампицин	U
<i>rpoB</i> Lys891Glu	0	0	8 (0,51 %) [0,26–1]	рифампицин	U
<i>rpoB</i> Ser450Leu	22 (15,83 %) [10,69–22,8]	122 (16,85 %) [14,3–19,75]	262 (16,65 %) [14,89–18,57]	рифампицин	R
<i>rpoC</i> Asp485Asn	0	10 (1,38 %) [0,75–2,52]	0	рифампицин	U
<i>rpoC</i> Ile491Thr	0	44 (6,08 %) [4,56–8,06]	1 (0,06 %) [0,01–0,36]	рифампицин	U
<i>rpoC</i> Leu527Val	0	8 (1,1 %) [0,56–2,17]	0	рифампицин	U
<i>rpoC</i> Lys445Arg	0	1 (0,14 %) [0,02–0,78]	12 (0,76 %) [0,44–1,33]	рифампицин	U
<i>rpoC</i> Phe452Ser	1 (0,72 %) [0,13–3,96]	0	154 (9,78 %) [8,41–11,35]	рифампицин	U
<i>rpoC</i> Val483Gly	6 (4,32 %) [1,99–9,1]	4 (0,55 %) [0,22–1,41]	4 (0,25 %) [0,1–0,65]	рифампицин	U
<i>rpoC</i> Val517Leu	0	4 (0,55 %) [0,22–1,41]	24 (1,52 %) [1,03–2,26]	рифампицин	U
<i>rpsL</i> Lys43Arg	30 (21,58 %) [15,56–29,14]	134 (18,51 %) [15,85–21,5]	289 (18,36 %) [16,53–20,35]	стрептомицин	R
<i>Rv0565c</i> Arg110His	30 (21,58 %) [15,56–29,14]	132 (18,23 %) [15,59–21,21]	285 (18,11 %) [16,28–20,09]	этионамид	U

Примечание. R – резистентность подтверждена; U – взаимосвязь с резистентностью неизвестна в соответствии с каталогом мутаций B03 [25].

rpoB Ser450Leu, *rpoC* Val483Gly, *rpsL* Lys43Arg. Промежуточные мутации характеризуют общность между отдельными кладами. Например, мутация *rpoC* Val517Leu является общей между М и Р, но не встречается в штаммах из клады В. Индивидуальный уровень демонстрирует наличие уникальных для каждой клады профилей мутаций. Так, мутации *embB* Asn296His, *pncA* с.-12T>C, *rpoB* Lys891Glu встречаются исключительно в штаммах клады Р, а *pncA* Trp68Gly, *rpoC* Asp485Asn, *rpoC* Leu527Val характерны для клады М.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании был детально изучен геномный полиморфизм штаммов B0/W148 из различных географических регионов. Основные результаты показали, что штаммы B0/W148 подразделяются на три филогенетические клады (В, М и Р), каждая из которых имеет специфические мутационные профили, что указывает на различия в их эволюционном развитии и эпидемическом потенциале. Байесовский коалесцентный анализ и метод максимального правдоподобия позволили установить, что клады М и Р содержат характерные мутации, которые могут быть использованы для их дифференциальной диагностики: 4137219T>G – для клады М, 2241091C>T – для клады Р. Анализ возраста узлов филогенетического дерева показал, что клада М возникла позже клады Р. Динамика изменения эффективного размера популяции выявила пики, приходящиеся на 1960-е, 1970–1980-е и 1990-е годы, что совпадает с этапами внедрения в лечение противотуберкулёзных препаратов. Применение метода главных компонент в совокупности с методом сетевого анализа позволило выявить уровни распределения мутаций между кладами. Общие мутации являются «ядром» популяции B0/W148 и представляют собой наиболее «древние» и эволюционно-эффективные изменения, которые наблюдаются во всех штаммах независимо от кладовой принадлежности. К таким мутациям относятся: *embB* Met306Ile, *embB* Met306Val, *embB* Gln497Arg, *Rv0565c* Arg110His, *katG* Ser315Thr, *rpoB* Ser450Leu, *rpoC* Val483Gly и *rpsL* Lys43Arg. Промежуточные мутации характеризуют общность между отдельными кладами. Например, мутация *rpoC* Val517Leu является общей для М и Р, но не встречается в штаммах из клады В. Индивидуальный уровень демонстрирует наличие уникальных для каждой клады профилей мутаций. Так, мутации *embB* Asn296His, *pncA* с.-12T>C, *rpoB* Lys891Glu встречаются исключительно в штаммах клады Р, а *pncA* Trp68Gly, *rpoC* Asp485Asn, *rpoC* Leu527Val характерны для клады М.

Для объяснения факта обнаружения филогенетических клад, обладающих своими специфическими молекулярными маркерами, была сформулирована эпидемическая модель, предполагающая, что клады являются двумя последовательными независимыми эпидемическими волнами. Следует отметить, что полученные данные соответствуют результатам работы международной исследовательской группы, которая предпо-

жила, что распространение штамма B0/W148 происходило в две эпидемических волны – в конце 1980-х и в конце 1990-х годов [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование показало, что штаммы B0/W148 представляют собой генетически гетерогенную популяцию, разделённую на клады В, М и Р. Клады М и Р имеют уникальные мутации, позволяющие проводить их идентификацию. Кроме этого, были выявлены значительные различия в распределении мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью, между указанными кладами B0/W148.

Результаты настоящего исследования подчёркивают важность комплексного подхода к изучению генетического разнообразия и эволюции патогенных микроорганизмов и являются важным шагом в понимании эволюционных механизмов и распространения штаммов B0/W148. Выявленные мутационные профили могут служить основой для разработки новых диагностических методов и стратегий борьбы с туберкулёзом, учитывающих генетическое разнообразие и специфические характеристики различных клад. Кроме этого, результаты подчёркивают необходимость дальнейшего изучения геномных изменений в патогенных микроорганизмах для эффективного контроля инфекционных заболеваний.

Финансирование

Работа выполнена в рамках выполнения темы государственного задания № 121022500179-0 «Молекулярные, организменные и популяционные закономерности формирования эпидемического процесса антропонозных и трансмиссивных инфекций на территории Северной Азии и сопредельных территориях» с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Global tuberculosis report*. Geneva: World Health Organization; 2023.
2. Савилов Е.Д., Хромова П.А., Шугаева С.Н., Орышчак С.Е., Синьков В.В., Огарков О.Б. Анализ многолетней динамики заболеваемости методом комплексной оценки на разных территориальных уровнях. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2023; 28(6): 353–362. [Savilov ED, Khromova PA, Shugaeva SN, Oryshchak SE, Sinkov VV, Ogarkov OB. Analysis of long-term dynamics of morbidity by the method of complex assessment at different

territorial levels. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2023; 28(6): 353-362. (In Russ.). doi: 10.17816/EID569175

3. Хромова П.А., Синьков В.В., Савилов Е.Д., Огарков О.Б. Использование комплексного анализа эпидемиологической ситуации по туберкулезу как дополнительного инструмента определения «территорий риска» на примере Сибирского федерального округа. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021; 20(3): 37-44. [Khromova PA, Sinkov VV, Savilov ED, Ogarkov OB. Complex analysis of the epidemiological situation of tuberculosis used as an additional tool for determining the «Risk Areas» on the Siberian Federal District. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021; 20(3): 37-44. (In Russ.). doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-3-37-44

4. Zhdanova S, Mokrousov I, Orlova E, Sinkov V, Ogarkov O. Transborder molecular analysis of drug-resistant tuberculosis in Mongolia and Eastern Siberia, Russia. *Transbound Emerg Dis*. 2022; 69(5): e1800-e1814. doi: 10.1111/tbed.14515

5. Meaza A, Tola HH, Eshetu K, Mindaye T, Medhin G, Gumi B. Tuberculosis among refugees and migrant populations: Systematic review. *PLoS One*. 2022; 17(6): e0268696. doi: 10.1371/journal.pone.0268696

6. Савилов Е.Д., Синьков В.В., Огарков О.Б. Пекинский генотип *M. tuberculosis*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2010; (4): 50-53. [Savilov ED, Sinkov VV, Ogarkov OB. Beijing genotype of *M. tuberculosis*. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2010; (4): 50-53. (In Russ.). doi: 10.17816/EID40504

7. Савилов Е.Д., Синьков В.В., Огарков О.Б. *Эпидемиология туберкулеза на Евро-Азиатском континенте: оценка глобального движения штаммов генотипа "Пекин"*. Иркутск: Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования; 2013. [Savilov ED, Sinkov VV, Ogarkov OB. *Epidemiology of tuberculosis on the Eurasian continent: Assessment of the global movement of strains of the Beijing genotype*. Irkutsk: Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education; 2013. (In Russ.).

8. Синьков В.В., Савилов Е.Д., Огарков О.Б. Эпидемиология туберкулеза в России: эпидемиологические и исторические доказательства в пользу сценария распространения «пекинского» генотипа *M. tuberculosis* в XX веке. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (6): 23-28. [Sinkov VV, Savilov ED, Ogarkov OB. Epidemiology of tuberculosis in Russia: Epidemiological and historical evidences in favor of the scenario distribution of Beijing genotype of *M. tuberculosis* in the XX century. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2010; (6): 23-28. (In Russ.).

9. Shitikov E, Bespyatykh D. A revised SNP-based barcoding scheme for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *mSphere*. 2023; 8(4): e00169-23. doi: 10.1128/msphere.00169-23

10. Narvskaja O, Mokrousov I, Otten T, Vishnevski B. Genetic marking of polyresistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in the north-west of Russia. *Problems of Tuberculosis*. 1999; (3): 39-41.

11. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet*. 2015; 47(3): 242-249. doi: 10.1038/ng.3195

12. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26(2): 342-360. doi: 10.1128/CMR.00087-12

13. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46(3): 279-286. doi: 10.1038/ng.2878

14. Cohen KA, Abeel T, Manson McGuire A, Desjardins CA, Munsamy V, Shea TP, et al. Evolution of extensively drug-resistant tuberculosis over four decades: Whole genome sequencing and dating analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu-Natal. *PLoS Med*. 2015; 12(9): e1001880. doi: 10.1371/journal.pmed.1001880

15. Ribeiro SCM, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MRM, Almeida FM, Rezende AL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(7): 2615-2624. doi: 10.1128/JCM.00498-14

16. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(8): 843-849. doi: 10.3201/eid0805.020002

17. Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A template for success. *Tuberc Edinb Scotl*. 2011; 91(6): 510-523. doi: 10.1016/j.tube.2011.07.005

18. Lasunskaja E, Ribeiro SCM, Manicheva O, Gomes LL, Suffys PN, Mokrousov I, 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*. 2010; 12(6): 467-475. doi: 10.1016/j.micinf.2010.02.008

19. Merker M, Rasigade JP, Barbier M, Cox H, Feuerriegel S, Kohl TA, et al. Transcontinental spread and evolution of *Mycobacterium tuberculosis* W148 European/Russian clade toward extensively drug resistant tuberculosis. *Nat Commun*. 2022; 13(1): 5105. doi: 10.1038/s41467-022-32455-1

20. Bespyatykh J, Shitikov E, Butenko I, Altukhov I, Alexeev D, Mokrousov I, et al. Proteome analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 cluster. *Sci Rep*. 2016; 6(1): 28985. doi: 10.1038/srep28985

21. Shitikov E, Kolchenko S, Mokrousov I, Bespyatykh J, Ischenko D, Ilina E, et al. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 9227. doi: 10.1038/s41598-017-10018-5

22. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J*. 2011; 17(1): 10-12.

23. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows – Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010; 26(5): 589-595. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698

24. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 2021; 10(2): giab008. doi: 10.1093/gigascience/giab008

25. Walker TM, Miotto P, Köser CU, Fowler PW, Knaggs J, Iqbal Z, et al. The 2021 WHO catalogue of complex mutations associated with drug resistance: A genotypic analysis. *Lancet Microbe*. 2022; 3(4): e265-e273. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00301-3

26. Quinlan AR. BEDTools: The Swiss-army tool for genome feature analysis. *Curr Protoc Bioinforma*. 2014; 47: 11.12.1-11.1234. doi: 10.1002/0471250953.bi1112s47

27. Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol*. 2019; 15(4): e1006650. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006650
28. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol*. 2016; 2(1): vew007. doi: 10.1093/ve/vew007
29. Crispell J, Balaz D, Gordon SV. HomoplasmyFinder: A simple tool to identify homoplasies on a phylogeny. *Microb Genomics*. 2019; 5(1): e000245. doi: 10.1099/mgen.0.000245
30. Сысоев П.Г., Люкина А.Н., Мадатова М.К. Эволюция противотуберкулезных препаратов. *Modern Science*. 2020; (5-1): 263-267. [Sysoev PG, Lyukina AN, Madatova MK. Evolution of anti-tuberculosis drugs. *Modern Science*. 2020; (5-1): 263-267. (In Russ.)].

Сведения об авторах

Синьков Вячеслав Владимирович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: vsinkov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>

Огарков Олег Борисович – доктор медицинских наук, директор Института эпидемиологии и микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: obogarkov@sbamsr.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Information about the authors

Viacheslav V. Sinkov – Cand. Sc. (Med.), Senior Research Officer at the Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: vsinkov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>

Oleg B. Ogarkov – Dr. Sc. (Med.), Director of the Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: obogarkov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>