

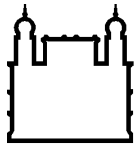
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado Pelo Programa de Pós-Graduação Biologia Computacional e
Sistemas

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DA FAMÍLIA BEIJING DO
TIPO ANCESTRAL E MODERNO

LIA LIMA GOMES

Rio de Janeiro
SETEMBRO de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

Lia Lima Gomes

Título da Dissertação ou Tese:

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DA FAMÍLIA BEIJING DO TIPO ANCESTRAL E MODERNO

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz,
como parte dos requisitos, para obtenção do
título de Doutor em Biologia Computacional
e Sistemas.

Orientador (es): Prof. Dr. Antonio Basílio de Miranda
Prof. Dr. Philip Noel Suffys

RIO DE JANEIRO
SETEMBRO de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

G633 Gomes, Lia Lima

Caracterização fenotípica e genotípica de *Mycobacterium tuberculosis* da família Beijing do tipo ancestral e moderno / Lia Lima Gomes. – Rio de Janeiro, 2016.

xi, 97 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, 2016.

Bibliografia: f. 52-66

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Genotipo. 3. Virulência. I. Título.

CDD 579.374

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e
Sistemas

AUTOR: LIA LIMA GOMES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *MYCOBACTERIUM*
***TUBERCULOSIS* DA FAMÍLIA BEIJING DO TIPO ANCESTRAL E**
MODERNO

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Antonio Basílio de Miranda
Prof. Dr. Philip Noel Suffys

Aprovada em: 26/ 09/ 2016.

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Letícia Miranda Lery Santos
Prof. Dra. Silvana Spindola de Miranda
Prof. Dr. Milton ozório Moraes
Prof. Dr. Marcelo Alves Ferreira
Prof. Dr. Nicolas Carels

Rio de Janeiro, 26 de Setembro de 2016.

À Minha Família: Arléa, João Bosco, Luma (in memoriam), Rafael e Enrico pela contribuição na minha educação e pelo amor que me deram, ao longo da vida.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao Philip Suffys, por todos os ensinamentos e dedicação que tem me fornecido, ao longo dos anos.

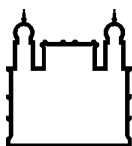
Ao Antonio Basílio, que além dos ensinamentos científicos, sempre oferece palavras que tranquilizam e colocam os nossos pés no chão.

Ao Michel Abanto, que muito me ajudou com todo o conhecimento computacional e nas análises genômicas.

Ao Ricardo Junqueira, pelo apoio tecnológico da plataforma de sequenciamento Genômico –IOC.

E, aos amigos de laboratório: Sidra, Marcelo, Amanda, Harrison, Adalberto, Márcia, Raquel, Luciene, Atiná e Andréa, que muito contribuíram para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, ao longo do doutorado.

Muito grata a todos !



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
DA FAMÍLIA BEIJING DO TIPO ANCESTRAL E MODERNO

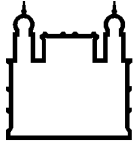
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA COMPUTACIONAL E SISTEMAS

Lia Lima Gomes

A tuberculose ainda é um problema de saúde pública global, principalmente em países em desenvolvimento, onde a doença é negligenciada e associada à pobreza, co-infecção com HIV e resistência aos antibióticos. A infecção é causada principalmente pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), e em especial a linhagem Beijing se destaca entre as outras linhagens do complexo *Mtb*, por geralmente estar relacionada com a presença de mais fatores de virulência e mecanismo de multirresistência à drogas. O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente e fenotipicamente a *Mtb* Beijing, em oito isolados esporádicos circulantes no Brasil e em dezoito isolados de regiões com maior prevalência, como Moçambique e Rússia. Para a genotipagem foram utilizadas inicialmente, ferramentas moleculares tradicionais como o RFLP, *Spoligotyping* e MIRU-VNTR. Com a intenção de aprofundar a classificação da sublinhagem ancestral e moderna, avaliamos inserções de IS6110 inverso na região NTF, regiões de deleção (RDs 105, 142, 150 e 181) e SNPs nos genes *mutT2* e *mutT4*. Ainda, sequenciamos o genoma de 11 isolados visando avaliar a presença e conservação de genes associados à virulência. Do ponto de vista fenotípico, foram realizados experimentos de infecção em macrófagos THP-1 e em camundongo C5BL/6, para avaliar a virulência das linhagens ancestral e moderna. A genotipagem demonstrou que a maioria dos isolados *Mtb* Beijing do Brasil pertenciam a sublinhagem ancestral e que os isolados de Moçambique e da Rússia eram em sua maioria modernos. A avaliação da infecção *in vitro* e *in vivo*, evidenciou que independente da região geográfica, os isolados *Mtb* Beijing modernos são mais virulentos que a sublinhagem ancestral. Coerentemente, o sequenciamento genômico revelou um menor número de genes associados à virulência em isolados ancestrais. Dessa forma, este trabalho demonstrou pela primeira vez fatores que podem estar contribuindo para o sucesso da família Beijing dentro do complexo *Mtb*. Este trabalho abre a perspectiva de futuramente avaliar o posicionamento filogenético desses isolados em relação à coleção mundial da família Beijing.

Palavras Chave: *Mycobacterium tuberculosis* Beijing, Genotipagem, Virulência.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS BEIJING FAMILY, BOTH ANCIENT AND MODERN TYPES

ABSTRACT

PHD THESIS IN COMPUTATIONAL AND SYSTEMS BIOLOGY

Lia Lima Gomes

Tuberculosis remains a global public health problem, especially in developing countries where the disease is neglected and associated with poverty, co-infection with HIV and antibiotic resistance. The infection is mainly caused by the etiologic agent *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), and in particular the Beijing lineage stands out among other strains of Mtb complex, due to generally being related to the presence of more virulence factors and multidrug-resistance mechanisms. The main objective of this study was to characterize genetically and phenotypically Mtb Beijing strains: eight sporadic isolates circulating in Brazil and eighteen isolated from regions with more prevalence, as Mozambique and Russia. For genotyping were initially used traditional molecular tools as RFLP, Spoligotyping and MIRU-VNTR. In order to deepen the classification of ancient and modern sublines, we evaluated reverse IS6110 inserts in NTF region, deletion of regions (RDs 105,142,150 and 181) and SNPs in *mutT2* and *mutT4* genes. Further, we have sequenced the genome of 11 isolates to assess the presence and conservation of genes associated with virulence. From the phenotypic point of view, infection experiments were conducted in THP-1 macrophages and in mice C5BL / 6, to assess the virulence of modern and ancestor strains. Genotyping showed that most Mtb Beijing isolates in Brazil belonged to ancestral subline and isolates from Mozambique and Russia were most from the modern subline. The in vitro and in vivo infection showed that regardless of geographic region, modern Beijing Mtb strains are more virulent than the ancestral subline. Accordingly, genomic sequencing revealed a smaller number of genes associated with virulence in ancestral isolates. Thus, this study demonstrated for the first time, factors that may be contributing to the success of the Beijing family within the Mtb complex. This work opens up the perspective of further assessing the phylogenetic position of these isolates in relation to the worldwide collection of the Beijing family.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* Beijing, Genotyping, Virulence.

ÍNDICE

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	1
1.1.1 COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	3
1.1.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BEIJING.....	11
1.3.1 HISTÓRICO	11
1.3.2 FATORES ASSOCIADOS À EMERGÊNCIA DA FAMÍLIA BEIJING	14
1.3.3 EPIDEMIOLOGIA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BEIJING ..	17
1.3.4 GENÓTIPO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BEIJING	18
1.3.5 MUTAÇÕES EM GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA CONTRA ANTIMICROBIANOS	21
1.3.6 VIRULÊNCIA.....	23
1.4-JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	24
2-OBJETIVOS.....	26
2.1-OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO	26
CAPÍTULO I	27
Diversidade Genética de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> família Beijing no Brasil e Moçambique e sua relação com a infectividade e indução de necrose em célulasTHP-1	
CAPÍTULO II	29
Isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> da sublinhagem moderna pertencente à Família <i>Beijing</i> são mais propensos à exibir aumento de virulência do que em isolados ancestrais.	
CAPÍTULO III	31
Comparação genômica entre um isolado ancestral e um isolado Moderno de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pertencente à linhagem Beijing, de São Paulo, Brasil.	
3-DISCUSSÃO	42
4-CONCLUSÕES.....	51
5-REFERÊNCIAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. - Esquema explicativo sobre a metodologia do Spoligotyping	5
Figura 1.2 - Esquema da via evolutiva proposta dos bacilos da tuberculose que ilustram perda sucessiva de DNA em certas linhagens	8
Figura 1.3 - Análise filogenética apoiada em sequenciamento WGS, aponta que o complexo Mtb possui sete linhagens adaptadas ao hospedeiro humano	10
Figura 1.4 - Distribuição filogeográfica da linhagem Beijing vs linhagem não Beijing, em diferentes sub-regiões ou países	17
Figura 1.5 - Características de resistência de linhagens Beijing vs. não-Beijing M. tuberculosis e evolução da resistência a drogas isolados entre 1998 e 2011	21
Figura 3.1 - Preparação da biblioteca genômica Nextera	32
Figura 3.2 - Representação esquemática do princípio tecnológico da plataforma Illumina.....	34
Figura 3.3 - Representação da avaliação dos Reads pelo software FastQC ..	35
Figura 3.4 - Representação da comparação genômica entre a cepa referência H37Rv e os Isolados Mtb Beijing ancestral e moderno circulante no Brasil.....	37
Figura 3.5 - Gráfico representando o números de SNPs missense de acordo com a sua categoria funcional pré-estabelecida pelo Tuberculist 39	

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Resultados obtidos pela montagem do A5	37
Tabela 3.2 - Exemplificação da avaliação de SNPs encontrados no genoma do isolado Mtb Beijing ZT272 em relação a cepa H37Rv	38
Tabela 3.3. - SNPs relacionados com virulência presentes nas duas sublinhagens	39
Tabela 3.4 - Genes associados com virulência no complexo Mtb que apresentaram variação entre presença e ausência nos genomas de Mtb Beijing ancestral e moderno pelo software LS-BSR	40
Tabela 3.5 – SNPS relacionados com resistência à Kanamicina.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CFU	Unidade Formadora de Colônia
CMtb	Complexo Mtb
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DR	Locus Repetição Direta estabelecido por Spoligotyping
HGDI	Índice Discriminatório Hunter-Gaston.
HGT	Transferência Horizontal de Genes
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IS	Sequência de Inserção
katG	Gene da catalase relacionado à resistência a Isoniazida
LSPs	Large Sequence Polymorphisms- Polimorfismo em grandes Seqüências.
MDR	Multiple drug resistance - Multi-droga resistente
MIRU-VNTR	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeat- Unidades Repetitivas Intercaladas de Micobactéria com Variáveis Números de Repetição em Sequência.
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
MtbB	Mycobacterium tuberculosis Beijing
PCR	Polymerase Chain Reaction -Reação em cadeia da polimerase
PGL	Glicolípido fenólico
RD rio	Região de deleção descrita em isolados de Mycobacterium tuberculosis do Rio de Janeiro
RFLP	Restriction fragment length polymorphism - Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
RJ	Rio de Janeiro
rpoB	Gene ribossomal relacionado à resistência a Rifampicina
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossomal
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism - Polimorfismo em um único nucleotídeo
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose Multi-droga resistente
THP-1	Linhagem celular monocítica humana
WGS	Whole Genome Shotgun - Sequência do Genoma Inteiro

1.1-Contextualização do problema

A tuberculose (TB) é um problema de saúde global, cujo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) infecta mais de um terço da população mundial. No Brasil, o problema da tuberculose reflete o estágio de desenvolvimento social do país, onde a pobreza, e deficiências de gestão no sistema de saúde limitam o controle da doença. No país em 2013, foram registrados 73 mil novos casos, com a taxa de incidência de 36,6/100 mil habitantes para todas as formas de tuberculose e aproximadamente 4,5 mil óbitos (BRASIL, 2015). Este cenário é acelerado por altas taxas de co-infecção com HIV, ineficiência da atual vacina BCG e o surgimento de resistência aos fármacos.

A caracterização por marcadores genéticos tradicionais para *Mtb*, como o RFLP e Spoligotyping, levou ao longo de duas décadas a classificação a nível familiar. As principais famílias são Beijing, Beijing-like, CAS (Ásia Central), EAI (Leste da África e Índia), Haarlem, LAM (América Latina-Mediterrâneo), Manu (indígena), X e T (BRUDEY, 2006). O conhecimento dessas famílias gerou uma melhor compreensão das diferenças regionais na população bacteriana, particularidades de fatores de risco para a transmissão da doença, filogenia, evolução do complexo, mecanismos de resistência aos medicamentos e interação parasito-hospedeiro, incluindo resposta imunológica, suscetibilidade, evolução da doença e migração da população (COSCOLLA, 2014, TRAUNER, 2014).

Atualmente sabe-se que no Brasil a família mais prevalente é a família LAM, responsável por 46% dos casos de tuberculose (GOMES H, 2012). Já a família Beijing é encontrada com menor frequência, entre 0,5%-1%, em isolados clínicos de pacientes pertencentes aos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo (RITACCO, 2008, VASCONCELLOS, 2014). Este genótipo tem sido associado a surtos clonais, infectando rapidamente novos hospedeiros (VAN SOOLINGEN, 1995).

A ocorrência da família Beijing no país possibilitou a este trabalho a comparação de suas características genéticas, de virulência, de resistência aos fármacos e suas taxas de agrupamentos/clusters com *Mtb* Beijing isoladas em

países de outros continentes, como do leste europeu (Rússia), com alta taxa de transmissão, e do sul da África (Moçambique) com menor taxa de transmissão.

Estudos recentes baseados em marcadores moleculares e na observação de fatores fenotípicos associados com virulência *in vitro* e *in vivo* apontaram que *Mtb* Beijing modernas são mais virulentas em comparação com a sublinhagem ancestral. Entretanto, as *Mtb* Beijing modernas do Brasil e de Moçambique apresentaram menores fatores de virulência do que os isolados *Mtb* Beijing da sublinhagem moderna da Rússia, sugerindo que os fatores de virulência também estão associados com áreas de maior prevalência. (LASSUNSKAIA, 2010, RIBEIRO, 2014).

Marcadores moleculares tradicionais como RFLP (do inglês, *restriction fragment length polymorphism* -IS6110), *Spoligotyping* e MIRU-VNTR (do inglês, *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeat*), não foram capazes de elucidar os elementos genéticos e fenotípicos responsáveis por aumentar os fatores de virulência nas cepas *Mtb* Beijing modernas pertencentes a *clusters* de áreas endêmicas. Desta forma, a análise genômica utilizando sequenciamento de nova geração e *softwares* capazes de localizar mutações em genes específicos, é atualmente uma importante ferramenta para explicar essas diferenças de fenótipo entre cepas ancestrais e modernas.

1.2-Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose na maioria das vezes é causada por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), que compreende diversas espécies de bactérias relacionadas, incluindo *M. tuberculosis* *sense stricto* e *M. africanum*. Estas são bem adaptada's ao hospedeiro humano, estando divididas em sete linhagens filogeneticamente distintas associadas com diferentes regiões geográficas. O MTBC inclui ainda espécies adaptadas a animais, tais como. *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. mungi*, *M. suricattae*, chimpanzee *Bacillus*, e dassie *Bacillus*. Em adição a esses membros clássicos, o complexo *Mtb* compreende espécies mais distantemente relacionadas, como *M. canettii* (COUSINS, 1994, PARSONS, 2007, ALEXANDER, 2010, COSCOLLA, 2013, COSCOLLA, 2014).

Os membros desse complexo apresentam sequências de nucleotídios quase idênticas e sequências 16S rRNA totalmente idênticas. Esta semelhança extrema do 16S rRNA prova que todos eles têm um ancestral comum. Apesar disso, *M. canettii* apresenta um genoma bem maior, em torno de 10-115 kb, em comparação com *M. tuberculosis* e *M. africanum*, representando a micobactéria com o maior genoma do complexo, possuindo uma forma clínica de transmissão muito particular e maior diversidade entre os genomas do complexo *Mtb* (BANULS, 2015). Apesar da propagação da *Mtb* parecer clonal, evidências indicam que *M. canettii* e *Mtb* são capazes de realizar transferência genética horizontal (KOECK, 2011; SUPPLY, 2013). A *Mtb* está presente em todos os lugares no mundo, enquanto *M. africanum* é localizada especificamente na África (DE JONG, 2010) e *M. canettii* parece ser confinada ao Chifre da África (MILTGEN, 2002; FABRE, 2010; KOECK, 2011).

As micobactérias do MTBC são ácido resistentes Gram-positivas, com transmissão através de aerossóis gerados por pacientes com TB pulmonar. O resultado da infecção por tuberculose é muito variável, podendo apresentar uma diversidade de formas da doença, desde a TB clássica pulmonar até formas extrapulmonares como a meningite e a miliar. As diferentes formas da doença têm sido atribuídas a fatores genéticos particulares que influenciam a imunidade do hospedeiro e à variáveis ambientais (CASANOVA, 2002, COMAS I, 2009, O'GARRA, 2013).

Estudos experimentais forneceram evidências de que linhagens clínicas do MTBC diferem em virulência, porém a identificação de determinantes genéticos de virulência requer métodos analíticos mais abrangentes do que apenas a mera genotipagem molecular. A evolução do sequenciamento de nova geração tem permitido o melhor entendimento da diversidade filogenética global e do impacto fenotípico de alguns polimorfismos genéticos (COSCOLLA, 2014). Os primeiros estudos utilizando a técnica RFLP exibiram um baixo grau de diversidade genética, porém a resolução do método aumentou quando foram identificadas mais sequências de inserção (IS), as quais atualmente permitem a determinação das relações genéticas entre espécies (JAGIELSKI, 2014).

A região de inserção 6110 encontrada dentro do MTBC em múltiplas cópias, com exceção de *M. bovis* que normalmente apresenta apenas uma, foi descrita em 1990 (THIERRY, 1990). As diferenças no número de cópias desta inserção dentro do genoma, responsáveis pelo elevado grau de polimorfismo de IS6110, têm sido

utilizadas como um marcador molecular específico para a genotipagem de *Mtb*. Este é o primeiro marcador capaz de fazer o reconhecimento e diferenciação entre cepas. Esse método é altamente discriminatório e reprodutível, permitindo assim estudos epidemiológicos. No entanto, existem algumas limitações para o seu uso, pois essa técnica exige grandes quantidades de DNA e apresenta baixo poder discriminatório em isolados cujo número de cópias de IS6110 seja menor ou igual a seis (JAGIELSKI, 2014). Por essas limitações, outras técnicas baseadas em PCR, que exigem menos DNA, têm sido empregadas na análise do MTBC.

A técnica de *spoligotyping* é atualmente uma das abordagens baseadas em PCR mais usadas para estudar a filogeografia do MTBC. O método baseia-se no polimorfismo em uma região genômica particular, chamada repetição direta (do inglês, *direct repeat* - DR). O locus DR compreende uma série de repetições diretas (DRs) bem conservadas com 36 pares de base (pb), intercaladas com sequências espaçadoras não repetitivas de 34 – 41 pb. Uma vez que as DRs são extremamente bem conservadas entre as cepas de *M. tuberculosis*, cada DR é um alvo potencial para que iniciadores amplifiquem esta região por PCR. Os produtos de PCR de tamanhos diferentes são hibridizados a uma membrana com 43 oligonucleotídeos sintéticos ligados covalentemente, sendo cada um destes os espaçadores polimórficos em *M. tuberculosis*. Os sinais de hibridação são detectados por quimioluminescência através da marcação por biotina dos produtos de PCR e um sistema conjugado de estreptavidina-peroxidase, que posteriormente são visualizados por auto-radiografia. Cepas são diferenciadas pelas posições e números dos espaçadores que estão presentes ou ausentes a partir do conjunto completo de 43 espaçadores (Figura 1.1, KAMERBEEK, 1997).

As vantagens da técnica de *spoligotyping* são a alta sensibilidade, o seu baixo custo, os resultados precisos e reprodutíveis, que são obtidos em 2 dias. Estes são transformados em dados binários e confrontados contra os bancos de dados internacionais como o SpolDB4, acessível *online* (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>). Este banco comporta 39.295 isolados pertencentes ao complexo *Mtb*, originados em 122 países, classificados em 62 linhagens. Outro exemplo é o Banco de dados SITVIT, que é acessível (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT ONLINE/>) e comporta 7.105 padrões de espoligotipos.

A técnica de *spoligo*typing permite a identificação de isolados do complexo *Mtb* a níveis de subespécies, sendo capaz de diferenciar *Mtb* pela ausência de espaçadores 33-36 em comparação com *M. bovis*, que apresenta ausência de espaçadores de 39-43 (Figura 1.1).

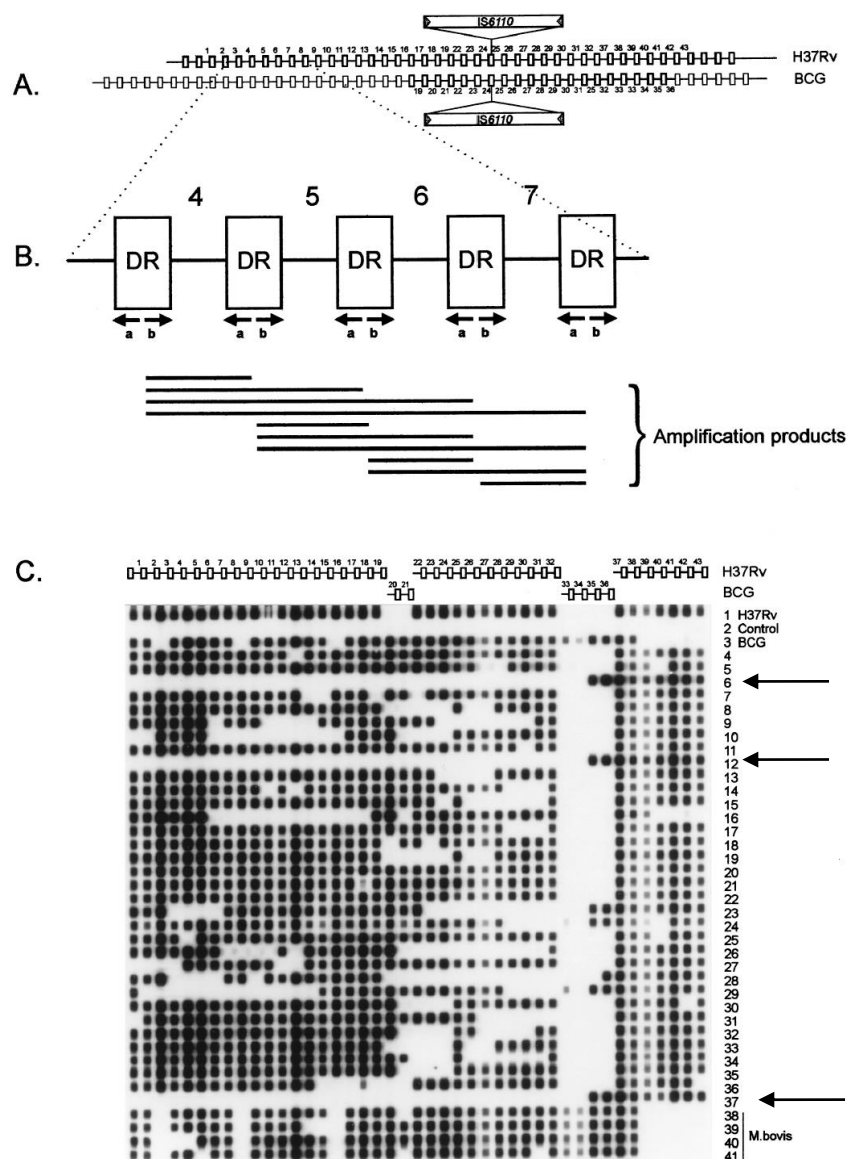


Figura. 1.1. **Esquema explicativo sobre a metodologia do spoligo typing.** Figura modificada de KAMERBEEK,1997.(A) Estrutura do locus DR no genoma micobacteriano, em *Mtb* H37Rv e *M. bovis* BCG, que contêm 48 e 41 DRs, respectivamente (representadas como retângulos), os quais são intercalados com espaçadores exclusivos, variando em comprimento de 35-41 pb (B) Princípio da amplificação região RD por PCR. (C) Hibridação (espilgotipos) de DNAs de micobactérias amplificados, sendo 35 *Mtb* e 5 *M.bovis*. A ordem dos espaçadores no filtro correspondem a sua ordem no genoma. Note que os isolados 6, 12 e 37, indicados pelas setas pretas correspondem ao genótipo Beijing.

Além disso, *spoligotyping* tem contribuído para a identificação de genótipos com significativa relevância epidemiológica e clínica com o genótipo Beijing. Porém, a técnica tem demonstrado baixo poder discriminatório, pois abrange apenas 0,1% do genoma do complexo *Mtb*. Todavia, com a introdução de novas sequências, com a mudança da avaliação de 43 DR para 51, houve uma melhora significativa na discriminação de subespécies de *M. africanum* e do clado Leste da África e Índia (EAI).

A estratégia que tem sido proposta é que o *spoligotyping* poderia ser realizado como método de rastreamento em conjunto com um método de tipagem com maior poder discriminatório como o MIRU-VNTR (JAGIELSKI, 2014). Esta análise tem sido considerada como o padrão-ouro para investigações epidemiológicas dentro do complexo *Mtb*.

A técnica de MIRU-VNTR baseia-se na análise de 41 unidades repetitivas intercaladas no genoma da micobactéria com número de repetições variável em sequência. Originalmente, 12 MIRUs foram definidos para serem avaliados através de PCR padronizados, por possuírem polimorfismos variáveis (SUPPLY, 2000). Em 2006, um novo sistema que emprega 24 MIRU-VNTR *loci* (incluindo os 12 VNTRs investigados anteriormente) foi proposto, com o objetivo de aumentar o poder discriminatório da técnica (SUPPLY, 2006). Desde então, o MIRU-VNTR passou a ser tão discriminatório quanto o RFLP, sendo considerado atualmente o novo padrão ouro em tipagem epidemiológica dentro do complexo *Mtb* (OELEMANN, 2007, ALLIX-B'EGUE, 2008, RODRIGUEZ, 2008).

Essa técnica baseia-se na amplificação por PCR de região específica, sendo posteriormente determinado os tamanhos dos produtos obtidos, seja através de eletroforese em gel de agarose ou de PCR *multiplex*, onde iniciadores marcados com fluorescência são utilizados e o produto da reação é avaliado através de um sistema automatizado. O resultado final é um código numérico, que corresponde ao número de repetições para cada *locus* analisado. Este sistema de codificação permite que os resultados possam ser comparados entre laboratórios em todo o mundo e permite que os dados sejam depositados nas bases de dados globais, como MIRU-Plus (<http://www.miru-vntrplus.org/>) e SITVITWEB). Desta forma, estudos epidemiológicos em larga escala e de população genética podem ser conduzidos por diferentes grupos (JAGIELSKI, 2014).

Todavia, o uso de *spoligo*typing e MIRU é limitado para filogenia e classificação do complexo *Mtb*; isso se deve ao fato de que esses marcadores moleculares mudam rapidamente, podendo gerar padrões semelhantes ao acaso. Para contornar este problema, deleções genômicas, muitas vezes referidas como Regiões de Diferença (RDs) ou longas Sequências de Polimorfismo (LPSs), vêm sendo utilizadas como marcadores para classificar grupos de MTBC nas principais linhagens filogenéticas e sublinhagens (COSCOLLA, 2014).

Análises filogenéticas baseadas na presença e na ausência da deleção cromossômica TbD1, têm sido utilizadas para fazer a separação entre *M. tuberculosis* ancestrais e modernas. Dentre os principais isolados de *M. tuberculosis* modernos incluem-se as famílias W-Beijing, Haarlem, Centro-Asian1 (CAS1) e a cepa referência H37Rv, enquanto a família Leste da África e Índia (EAI) representa a linhagem ancestral (SOLA, 2001, BROSCHE, 2002). Outras espécies como *M. canetti*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. bovis* também demonstraram, até o momento, a região TbD1 intacta, pertencendo assim à classificação ancestral (SENG GOH, 2005).

Todos os isolados de *M. tuberculosis* que possuem a região TbD1 intacta são classificados de forma independente como Grupo 1 (PGG1), a partir da análise katG463-gyrA95 SNP (do inglês, *Single nucleotide polymorphism*), enquanto todas as modernas podem pertencer a classificação PGG1, PGG2, ou PGG3. Uma hipótese para a eliminação da região TbD1 é que esta tenha ocorrido em um isolado *M. tuberculosis* PGG1 e este clone passou a estabelecer a linhagem moderna, dando origem aos grupos PGG1, PGG2 e PGG3. Já as linhagens ancestrais atuais de *M. tuberculosis* PGG1 são descendentes diretas de um isolado de *M. tuberculosis* Pré-TbD1. Atualmente as linhagens modernas são mais prevalentes que as ancestrais (SREEVATSAN, 1997, SENG GOH, 2005, Figura 1.2).

Regiões de diferença (RDs) e mutações específicas também são capazes de diferenciar o complexo *Mtb*, sugerindo que eventos genéticos possam contribuir para o espectro de infecção no hospedeiro ser muitas vezes tão diferente e específico. Os mecanismos exatos que levaram a essas exclusões permanecem obscuros, mas se deve possivelmente a erros da atividade da DNA polimerase, que podem ter contribuído para as regiões de deleção como *RD1*, *RD2*, *RD4*, *RD7*, *RD8*, *RD9*, *RD10*, *RD12*, *RD13*, *RD14* e *TbD1*, que estão presentes no grupo que compreende *M. africanum*, *M. microti* e *M. Bovis*. A avaliação das RDs sugere que isolados de *M.*

canetti estão mais relacionados com o ancestral comum do complexo *Mtb* (Figura 1.2, BROSCH,2002).

Durante muitos anos pensava-se que a tuberculose humana havia evoluído a partir da tuberculose bovina, por adaptação do agente patológico ao hospedeiro humano, já que *M. bovis* tem uma ampla gama de hospedeiros frente ao *M. tuberculosis*. No entanto, foi demonstrado através da avaliação de RDs que o número de regiões de deleções foi muito maior em relação a *M. tuberculosis*. Além disso, em estudo genômico observou-se que o genoma de *M.bovis* é maior que o de *M. tuberculosis*. É provável que *M. bovis* tenha sido oriundo de um ramo representado por *M. africanum* (RD9), *M. microti* (RD7, RD8, RD9, RD10) e *M. bovis* (RD4, RD5, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13), ramificado a partir do progenitor de *M. tuberculosis* (GORDON, 2001, BROSCH, 2002) (Figura1.2).

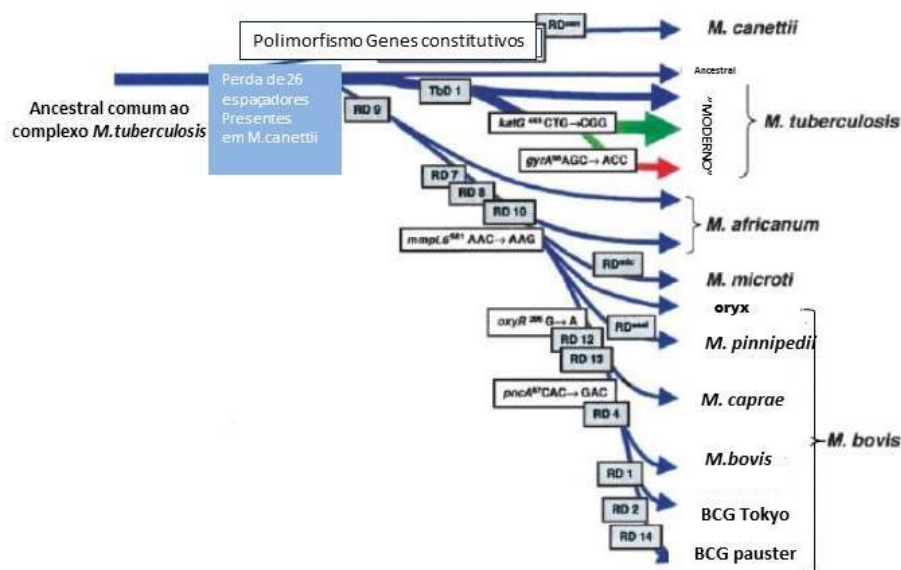


Figura 1.2- Esquema da via evolutiva proposta dos bacilos da tuberculose que ilustram perda sucessiva de DNA em certas linhagens. Figura modificada de BROSCH, 2002. O esquema é com base na presença ou ausência de regiões deletadas e em polimorfismos de sequência em cinco genes selecionados. RDs (caixas azul claro), setas azuis indicam que as cepas são caracterizadas por *katG463*. CTG(Leu), *gyrA95* ACC (THR), típico para o grupo 1 destes organismos. A Seta verde indica as cepas que pertencem ao grupo 2, caracterizado por *katG463* CGG (Arg), *gyrA95* ACC (Tre). A seta vermelha indica as estirpes que pertencem ao grupo 3, caracterizado por *katG463* CGG (Arg), *gyrA95* AGC (Ser), tal como definido por DE Sreevatsan et al. (1997).

O avanço da genômica comparativa estabelecida por dados de WGS (do inglês, *Whole Genomic Sequencing*) e o desenvolvimento de métodos de tipagem de SNPs levaram a uma maior compreensão da diversidade global filogenética do Complexo *Mtb*, o que mudou o cenário baseado na análise apenas por RDs (COSCOLLA, 2014).

Com a grande disponibilidade de dados gerados pela análise por WGS, novos bancos dados vêm sendo desenvolvidos. O Tuberculist por exemplo, é um importante banco de dados que é muito consultado durante as análises de comparação genômica. Este banco contém informações de anotação do genoma da cepa referência H37Rv, disponibilizando características funcionais do genes, proteínas, informações estruturais e polimorfismos associados com resistência à drogas. O Patric é um sistema web que integra dados genômicos, dados relacionados à virulência e ferramentas para análise de dados genômicos em bactérias. Já o TB *Database* é um banco online que fornece acesso integrando a sequência do genoma e dados da literatura (LEW, 2013, GALAGAN, 2010). Essas plataformas oferecem recursos para a análise da diversidade do complexo *Mtb*.

Atualmente, com base na análise por WGS, o complexo *Mtb* possui sete linhagens adaptadas ao hospedeiro humano (Figura 1.3). O clado moderno, ainda classificado pela ausência TbD1, forma um grupo monofilético que inclui as sublinhagens 2, 3, 4. Em contraste, as ancestrais são parafiléticas, ou seja, não possuem apenas um único grupo filogenético (COSCOLLA, 2014).

Algumas destas linhagens são globalmente mais prevalentes que as outras e demonstram uma forte estrutura filogeográfica. As linhagens mais prevalentes são a 2 e a 4. A linhagem 2, conhecida também como linhagem do leste Asiático, inclui a família Beijing, com alta prevalência na Ásia oriental, Ásia central, Rússia e África do Sul e a linhagem 4, conhecida como a linhagem euro-americana, ocorre com frequência em populações da Ásia, Europa, África e América. As linhagens 1 e 3 apresentam uma distribuição geográfica mais restrita, limitada ao leste da África e na parte central, sul e sudeste da Ásia. As linhagens geograficamente mais restritas são as linhagens 5-7, que são associadas a regiões específicas da África (COSCOLLA, 2014), conforme pode ser observado na figura 1.3.

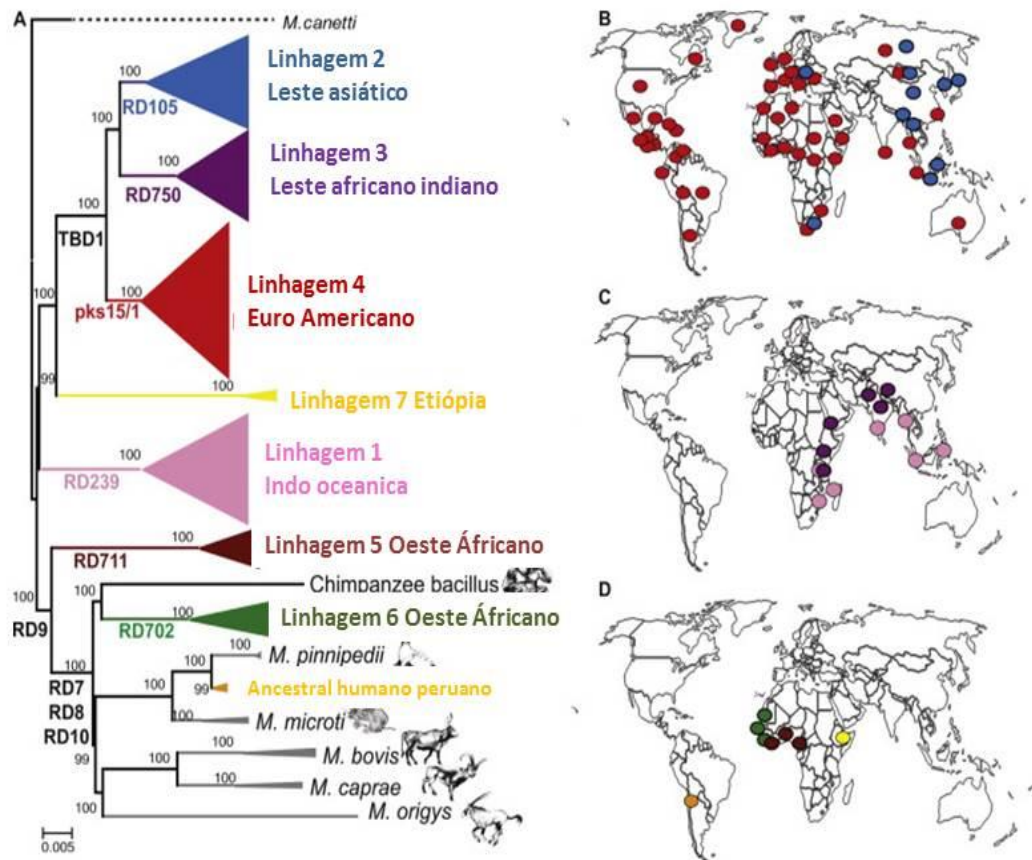


Figura 1.3- **Análise filogenética apoiada em sequenciamento WGS, aponta que o complexo *Mtb* possui sete linhagens adaptadas ao hospedeiro humano.**(A) filogenia probabilidade máxima modificada de Bos et al. 2014, demonstra árvore enraizada pela *M. Canettii*. As (RDs) Regiões de diferenças estão indicados ao longo dos ramos. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos (B-D) demonstra a linhagem MTBC dominante por país.

Além disso, outras duas linhagens foram recentemente estabelecidas dentro do MTBC, uma destas está associada as cepas que infectam animais domésticos, como: *M. bovis* (incluindo a BCG), *M. microti*, *M. caprae*, e *M. Pinnipedii*, *M.orygis*. A outra linhagem estaria relacionada com a adaptação do bacilo aos animais selvagens, como as espécies: bacilo chimpanzé; bacilo dassie, *M. mungii* e *M. suricatae* (COUSINS,1994, PARSONS, 2007, ALEXANDER, 2010, COSCOLLA, 2013).

Recentemente, um novo grupo dentro do complexo foi identificado em restos humanos no Peru, datando de mais de 1000 anos. Estas cepas antigas são completamente diferentes das linhagens adaptadas aos humanos, estando mais relacionadas com *M. pinnipedii*, espécie mais adaptada às focas e aos leões marinhos. Isto sugere que os mamíferos marinhos possam ter desempenhado um papel importante na disseminação da tuberculose na África e nas populações americanas pré- colombianas através do Oceano Atlântico (BOS, 2014).

Por muitos anos o MTBC foi considerado pouco diverso geneticamente, porém através da abordagem genômica este paradigma mudou. Estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado o impacto da diversidade genética nos diferentes padrões fenotípicos dentro do MTBC. Pesquisas relacionadas com virulência demonstraram que as linhagens modernas são geralmente mais virulentas e globalmente melhor sucedidas que as outras linhagens. Muitos estudos têm demonstrado que o aumento e o sucesso da Linhagem 2, que inclui a linhagem Beijing, podem ter sido impulsionados por fatores ambientais, como o tratamento com antibióticos ou pela vacinação (COSCOLLA, 2014). Por isso, há necessidade de estudar a fundo esta linhagem de maior sucesso dentro do complexo *Mtb*.

1.3 *Mycobacterium tuberculosis* Beijing

1.3.1 Histórico

Um particular grupo genético de *Mycobacterium tuberculosis* foi descrito inicialmente na China, em 1995 e denominado de família Beijing. Este genótipo foi originalmente identificado RFLP e *Spoligotyping* (VAN SOOLINGEN, 1995). Nos anos seguintes, o genótipo Beijing foi responsável por surtos associados à alta resistência aos fármacos, causando preocupação em diferentes lugares do mundo, principalmente no oeste da Ásia, sul da África, no norte da Eurásia e em algumas áreas da América Central (MOKROUSOV, 2006, KREMER, 2004).

Simultaneamente, nos Estados Unidos da América (EUA), nos primeiros anos da década de 90, identificou-se por RFLP e *Spoligotyping* um genótipo de *Mtb* denominado cepa "W", com alta similaridade às cepas *Mtb* da família Beijing. Essas

cepas foram responsáveis por surtos de tuberculose multidroga-resistente em grandes centros urbanos como Nova Iorque, Miami, e São Francisco (KREMER, 2004). Logo em seguida, descobriu-se que a família "W" e a família Beijing representavam o mesmo genótipo familiar de *M. tuberculosis*, pois ambas possuíam uma inserção IS6110 no locus *dnaA-dnaN*. A diferença da família Beijing descrita na Ásia da W/ Beijing descrita nos EUA com características MR, é que esta última possui duas cópias de IS6110 na região NTF em seu genoma enquanto a Beijing descrita na Ásia apresenta só uma inserção IS6110 nesta região (PLIKAYTIS, 1994, KREMER, 2004,).

A partir da definição da linhagem Beijing por *Spoligotyping* (presença de espaçadores 35-43), muitos estudos têm se empenhado em explicar a sua história evolutiva e o seu sucesso endêmico em relação as outras linhagens. Dados baseados em marcadores moleculares concordam que essa linhagem se originou na Ásia central e a sua propagação mundial se deu em momentos diferentes, acompanhada por mudanças evolutivas específicas na população do patógeno e através da, migração humana (MOKROUSOV, 2005, MERKER, 2014), Análises moleculares sugerem que a primeira diferenciação no genótipo Beijing ocorreu provavelmente em uma região denominada NTF, o que definiu duas linhagens conhecidas atualmente como ancestral e moderna, em diferentes subpopulações humanas (MOKROUSOV, 2005).

Uma possibilidade levantada por um trabalho que compara rotas de migrações humanas com mudanças evolutivas no genótipo Beijing, seria que isolados de *M. tuberculosis Beijing* ancestral tenham se originado na Ásia Central, em humanos migrando do Oriente Médio, no período do paleolítico superior, aproximadamente entre 17.000 e 20.000 anos atrás, permanecendo em uma subpopulação da Ásia Central que migrou em direção ao continente americano pelo estreito de Bering, antes do último período glacial (MOKROUSOV, 2005). É provável que os nativos americanos tenham vivido dois episódios de contato com as cepas ancestrais em tamanho reduzido na população: um com o povoamento das Américas e o outro com o contato com os Europeus a partir do século XVI (MULLINGAN, 2004). Essa hipótese justificaria o baixo nível endêmico de *Mtb* Beijing ancestral nos países da América do Norte (MOKROUSOV, 2005).

O surgimento do genótipo Beijing moderno pode estar relacionado com a subpopulação da Ásia central que migrou para o norte da China, no período neolítico. Nesta região este novo genótipo se expandiu e foi transferido para outros continentes por diferentes subpopulações humanas (MOKROUSOV, 2005).

O genótipo Beijing é endêmico apenas em alguns países do sul da África como Moçambique, África do Sul e Madagascar. Nesta região, a chegada do genótipo Beijing moderno é recente e deve ter ocorrido há cem anos, com a chegada de chineses para trabalhar nas minas ou há 400 anos por meio do tráfico de escravos da Indonésia e da Índia. Isto sugere que cepas Beijings modernas foram introduzidas nos países do sul da África, a partir de um foco secundário da Indonésia (MOKROUSOV, 2005).

Na Rússia, é provável que tenha ocorrido uma grande dispersão de isolados de *Mtb* pertencentes a linhagem Beijing em pelo menos dois momentos; por refugiados chineses para o império russo no período de 1861 a 1877; e uma dispersão mais recente originada de uma única linhagem com características MDR, há 20 -30 anos atrás, que coincide com a dissolução da antiga União Soviética na década de 90, marcada por crises econômicas, sociais e pela constituição de novos países, justificando a epidemia causada principalmente por cepas clonais W148 MDR com alta prevalência em toda a Rússia (MERKER, 2014).

Na América Latina, a família Beijing apresenta baixa prevalência e baixo número de transmissão. Especula-se que a introdução de isolados de *M. tuberculosis* do genótipo Beijing tenha ocorrido no Peru e eventualmente em outros países da América do Sul, quando houve uma grande imigração de chineses no meio do século XIX (RITACCO, 2008). As migrações humanas podem moldar a estrutura evolutiva e genética de microrganismos, portanto uma relação filogeográfica da família Beijing com a coevolução entre humanos foi estabelecida ao longo do tempo.

Além das migrações humanas, fatos históricos provavelmente influenciaram na dispersão da linhagem Beijing em todo mundo. Informações sobre SNPs genômicos oferece potencial para detectar variações na população bacteriana. Porém, essa análise requer estabelecer o relógio evolutivo do genoma em questão e saber a taxa de frequência de mutação anual. Se a população bacteriana diminui a frequência de mutação também diminui, o mesmo é esperado se a população bacteriana aumenta a frequência de mutação também aumenta.

Sendo assim, análises de SNPs apontam consistentemente para um aumento acentuado da linhagem Beijing concomitantemente à revolução industrial há 200 anos, sendo que a segunda dispersão abrupta teria ocorrido durante a primeira guerra mundial, totalmente alinhada com aumentos da taxa de morte causado por tuberculose, devido a privações e pandemias causadas pela gripe. Mudanças nas taxas de SNPs apontaram o impacto provável do uso de antibióticos em grande escala na década de 60, sendo observada a primeira queda da dispersão dessa linhagem, porém em seguida a pandemia de HIV e o aumento de populações MDR, interromperam essa queda (MERKER, 2014). Propriedades genômicas podem também ter contribuído para a diferente dispersão histórica das sublinhagens Beijing, já que evidências apontam para uma maior virulência dos isolados modernos em comparação aos isolados ancestrais (RIBEIRO, 2014).

1.3.2 Fatores associados à emergência da família Beijing

A Família Beijing é responsável por mais de um quarto dos casos de tuberculose no mundo (LUO, 2015). A explicação do sucesso dessa família pode estar relacionada à ineficiência da vacina BCG, pois a vacinação em massa em todos os países do sudeste da Ásia poderia ter contribuído para a disseminação desta linhagem.

Neste sentido foram feitas algumas observações: comparando a estrutura genética de *Mtb*. Constatou-se que países sem uso da vacinação por BCG apresentam mais polimorfismos de DNA em *Mtb* que países que adotaram a vacinação por BCG, sugerindo que a vacinação possa ter favorecido a seleção de cepas que não são cobertas pela a proteção imunológica conferida pela vacinação por BCG. Um mecanismo similar pode ter operado na Ásia, favorecendo a disseminação da família Beijing (VAN SOOLINGEN, 1995).

Além disso, frequências diferentes foram observadas entre sublinhagens Beijing ancestral e moderna em indivíduos vacinados com BCG na Holanda, Vietnam e Hong Kong, sugerindo que a vacinação por BCG possa ter favorecido a seleção de Beijing modernas, já que são mais frequentes em indivíduos vacinados por BCG (KREMER, 2009). Estes dados foram confirmados por um estudo prévio em modelo animal de ratos, que demonstrou que a vacina BCG não oferece proteção diante de infecção por Beijing moderna (KREMER, 2005a).

Apesar destas evidências não podemos atribuir somente essa justificativa ao surgimento e emergência da família Beijing, que é anterior a vacinação em massa estabelecida em alguns países em 1921. Se essa justificativa fosse correta países da América Latina que adotaram políticas de vacinação em massa como o Brasil teriam alta distribuição da família Beijing, no entanto sua prevalência é baixa ou ausente nos países sul americanos (ABEBE, 2006).

Outras hipóteses são relacionadas ao sucesso desta família como: a presença de mecanismos de resistência à drogas, fatores de virulência e de adaptação ao ambiente hospedeiro. Diferentes padrões de resistência à drogas têm sido encontrados nessa família e estão relacionados com as variações de regimes de tratamento, protocolos e qualidade das drogas aplicadas. Esses fatores juntos podem ter contribuído de forma negativa para o controle da tuberculose, favorecendo a propagação de diferentes sublinhagens muito particulares, como a *Mtb* Beijing. Em países com alta prevalência da família Beijing, mais de 5% dos isolados apresentam multirresistência. Muitos casos da ocorrência da família Beijing estariam relacionados a um grande número de cepas clonais multirresistentes (PARWATI, 2010).

A frequência de mutações em genes associados a resistência a fármacos em membros da família Beijing tem sido pesquisada. Com exceção da mutação 315S em *katG*, que apresentou alta frequência, nenhuma associação entre os genes de resistência foi estabelecida com a família Beijing. Uma hipótese para a presença de resistência nessa família seria a existência de taxas de mutações aumentadas em alguns genes relacionados com reparo de DNA, que teriam sua função alterada e, conseqüentemente, levando ao aumento de variações genéticas (LARI, 2006). Além disso, falhas no tratamento, com exposições prolongadas à drogas antituberculosas, também poderiam contribuir para um aumento da aquisição de resistência aos medicamentos por esta linhagem.

A virulência desta família pode resultar das propriedades bioquímicas específicas e suas interações com o sistema de defesa imunológico do hospedeiro. Estudos proteômicos têm demonstrado maior nível de expressão da proteínas GlgP envolvida com virulência e inibição do recrutamento de macrófagos por *Mtb* Beijing, o que seria mais vantajoso para essas micobactérias em relação a cepa H37Rv (PHEIFFER, 2005, RYOO, 2007). Cepas Beijing também mostram diferenças na estrutura de lipídio associados à parede celular, com a presença do PGL, lipídio

característico dessa família que inibe a liberação de mediadores pró-inflamatórios *in vitro* e estariam associados à infecção letal em animais (REED, 2004).

Estudos sugerem que as cepas Beijings, são capazes de induzir a morte celular preferencialmente por necrose, fator que favorece a disseminação e a multiplicação de micobactérias no hospedeiro. Além disso, modelos animais sugerem que as cepas do genótipo Beijing são mais virulentas e mais eficientes ao resistir ou escapar da resposta imune do hospedeiro. Camundongos BALB/c infectados com cepas de Beijing demonstraram mais alterações histopatológicas, resposta prévia de TNF e expressão iNOS, maior crescimento bacteriano e, mortalidade prematura, em comparação com os animais infectados com H37Rv (PARWATI, 2010).

Dentro de *M. tuberculosis*, os pacientes infectados com a cepa Beijing teriam maior probabilidade de evoluir para a tuberculose ativa e apresentariam um fenótipo clínico mais grave. Porém, estudos relacionados com esse assunto não foram conclusivos e avaliações com um maior número de casos devem ser realizadas. Todavia, foi relatada uma diferença na resposta frente ao tratamento medicamentoso. Pacientes infectados por *Mtb* Beijing logo após começarem o tratamento apresentam febre. Essa resposta febril em pacientes infectados por outro genótipo não Beijing é incomum, o que sugere que esta família induza uma diferente resposta no hospedeiro em comparação aos outros genótipos (VAN CREVEL, 2001). Na análise de imagens do radiograma torácico de pacientes com TB pulmonar, não foi possível demonstrar diferença significativa entre pacientes infectados por *Mtb* Beijing e não-Beijing (HANEKOM, 2007).

Entretanto, há relato de que os isolados de *Mtb* Beijing possam estar associados com uma maior ocorrência de TB extrapulmonar (KONG, 2007). Estudos adicionais são necessários para confirmar ou refutar a hipótese de que a TB de maior gravidade clínica, radiológica e evolutiva ocorre mais frequentemente em pacientes infectados por *Mtb* Beijing.

1.3.3 Epidemiologia de *Mycobacterium tuberculosis* Beijing

A rápida dispersão global dessa linhagem, a de maior sucesso do complexo *Mtb*, tornou-se, a principal causa de preocupação pelos agentes de saúde pública no mundo. Esforços para o seu monitoramento e controle têm sido realizados

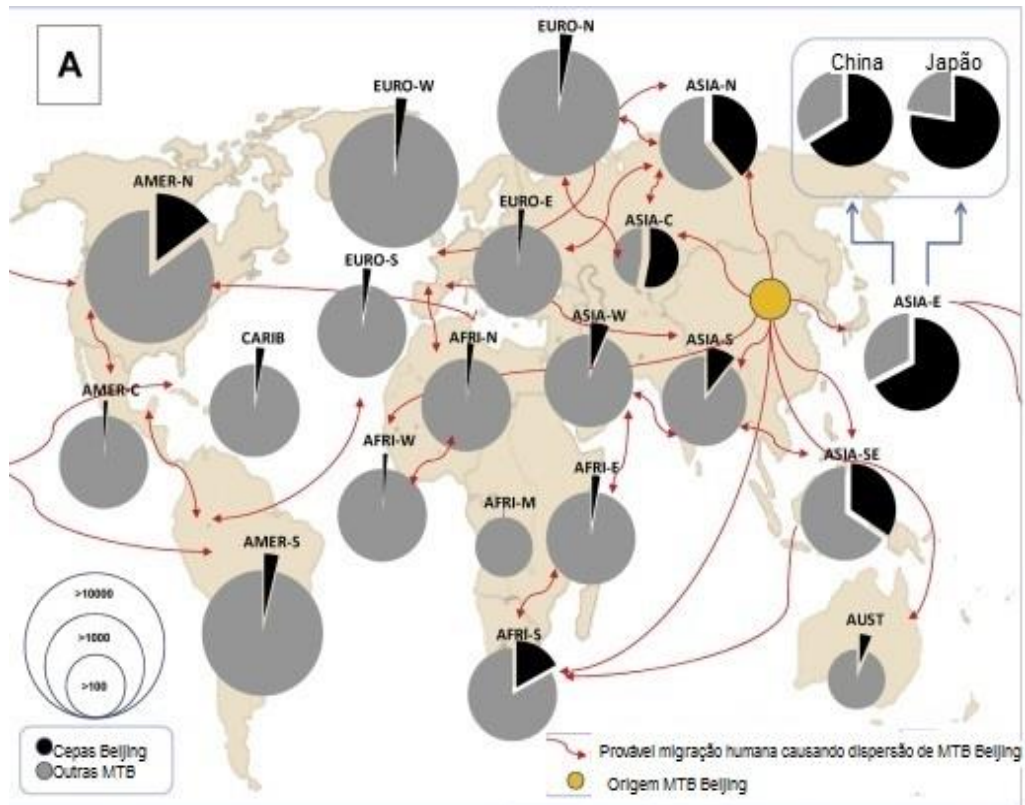
principalmente através de métodos moleculares como; *spoligotyping*, MIRU-VNTR e por depósito de perfis de *Mtb* em bancos de dados. Essas informações têm permitido o mapeamento global da *M. tuberculosis*, através das informações demográficas, epidemiológicas e de resistência aos medicamentos para cada linhagem (COUVIN, 2015).

Esta família representa cerca de 50% das cepas no extremo Oriente da Ásia e 13% dos isolados mundiais (PARWATI, 2010). Com altos índices de prevalência na Ásia Oriental (64,47%), na Ásia Central (53,13%), no norte da Ásia (38,67%), com menor incidência no sul da África (17%) e, América do Norte (14%) (COUVIN, 2015). Na Ásia sua prevalência pode ser comparada com a apresentada pela família LAM na América Latina (BRUDEY, 2006, LAZZARINI, 2007). (Figura 1.4).

Na América do Sul apenas 1,6% dos casos de TB são causados por *Mtb* Beijing. Os países da América Latina que apresentam as maiores incidência são: o Peru, contabilizando 5,9% dos casos de *Mtb* Beijing e, a Argentina com 1,0%. No Brasil, os primeiros relatos de *Mtb* Beijing foram registrados no Rio de Janeiro e em São Paulo, representando 0,8% do número total de casos de TB causados por esse microrganismo (RITACCO, 2008). A partir da sua ocorrência foi possível a comparação dos isolados *Mtb* Beijing do Brasil com isolados de *Mtb* Beijing oriundos de outros países com maior prevalência, como Moçambique e Rússia.

Em Moçambique estima-se que 27 mil mortes são causadas por TB por ano. A prevalência da família Beijing entre isolados de *Mtb* em Moçambique foi avaliada por meio da técnica de *spoligotyping* e esta família foi a terceira mais prevalente, sendo responsável por 7% dos casos de TB em sete províncias do país. A ocorrência de Beijing foi quase sete vezes maior no sul do país, o que sugere que estas cepas foram importadas da África do Sul, país vizinho com elevada prevalência de *Mtb* Beijing e de *Mtb* multirresistente (VIEGAS, 2010).

Na Rússia, por meio de estudos moleculares, foi demonstrado que essa é a segunda região mais afetada pela dispersão da família Beijing depois da Ásia; cerca de 30-50% das *Mtb* circulantes pertencem à linhagem Beijing. Além disso, mais de 80% de *Mtb* circulantes na Rússia são resistentes a pelo menos um ou mais antibióticos para tuberculose, dessas TBMR 65% pertencem à família Beijing (LASUNSKAIA, 2010).



Legenda: AFRI-E= Leste Africano, AFRI-M= África Meridional, AFRI-N=Norte da África, AFRI-W= Oeste Africano, AMER-C= América Central, AMER-S=América do Sul, AMER-N= América do Norte, ASIA-E= Leste da Ásia, ASIA-C= Ásia Central, ASIA-N= Norte da Ásia, ASIA-S= Sul da Ásia, ASIA-SE= Suldeste da Ásia, ASIA-W= Oeste da Ásia, AUST=Áustria .CARIB=Caribe, EURO-E= Leste da Europa, EURO-N= Norte da Europa, EURO-W= Oeste da Europa

Figura 1.4- **Distribuição filogeográfica da linhagem Beijing vs linhagem não-Beijing, em diferentes sub-regiões ou países;** o mapa também mostra prováveis migrações humanas. Figura modificada (COUVIN,2015).

1.3.4 Genótipo *Mycobacterium tuberculosis* Beijing

O reconhecimento do genótipo Beijing foi iniciado na década de 90, através da análise por RFLP. Essa família apresenta um grande número (> 20) de cópias de IS6110, com alta similaridade de bandas em seu perfil, o que causa dificuldade de análise. No entanto, esta mesma característica é utilizada para classificação destes isolados e, apesar da complexidade dos perfis obtidos por RFLP, é observada uma homogeneidade dos mesmos em comparação aos perfis característicos de outras famílias (KAM, 2005).

A principal forma de caracterizar o genótipo Beijing é através da técnica de *spoligo*typing, a qual baseia-se em detectar a presença ou ausência de sequências DR. As *Mtb* Beijing caracterizam-se pela ausência de DR (1-34) e presença de nove DR entre os espaçadores (35-43) (KREMER, 2004). A classificação "Beijing-like" se aplica quando um ou mais marcadores DR entre os espaçadores (35-43) estão ausentes (KREMER, 2004). Todavia, a técnica não possui poder para diferenciar genótipos entre os isolados clínicos da família Beijing (KAM, 2005).

A análise por MIRUs-VNTR tem sido usada entre isolados de *Mtb Beijing* para indicar perfis mais frequentes (*clusters*), com a finalidade de responder perguntas epidemiológicas. Contudo, Kam e colaboradores (2005) ao utilizarem 12 MIRU-VNTR em suas análises demonstraram que a técnica apresentava Índice Discriminatório de Hunter-Gaston (HGDI) menor que 0.5, ou seja, um baixo poder discriminatório para a classificação de perfis dentro da família Beijing. Logo, a análise por 15 ou 24 VNTRs e sua padronização internacional foi sugerida por Supply *et al.* (2006) com o intuito de aumentar o poder discriminatório da técnica e avaliar quais os VNTRs mais adequados para diferenciar a família Beijing.

Além da evolução dos VNTRs para genotipar *Mtb* Beijing, o desenvolvimento e padronização de outros marcadores capazes de determinar e diferenciar as características evolutivas destas famílias vem sendo estabelecidos.

Em 2006, Mokrousov e colaboradores descreveram uma nova técnica baseada em PCR inverso de IS6110, com análise da presença e orientação de inserções de IS6110 em região particular do genoma denominada como NTF, capazes de diferenciar três ramificações de *Mtb* Beijing; sublinhagem Beijing ancestral (atípica), sublinhagem Beijing Moderna (típica) e cepas W Beijing (MOKROUSOV, 2005, MOKROUSOV 2006).

A sublinhagem Beijing ancestral possui a região NTF intacta, ou seja, com ausência da inserção IS6110 nesta região; a sublinhagem Beijing moderna apresenta uma simples inserção IS6110 na região NTF e as W Beijing, que são as variantes derivadas da sublinhagem moderna, possuem duas cópias de IS6110 inversa nesta região (WADA, 2009).

Outros marcadores baseados em SNPs são capazes de diferenciar o genótipo Beijing ancestral do moderno. Os Beijings modernos são conhecidos por apresentarem alterações *missense* em três genes putativos de reparo de mutações (*Rv3908*, *mutT2* e *ogt*) e essas, a princípio, confeririam vantagens com relação a

adaptação ao ambiente do hospedeiro, uma vez que podem aumentar as taxas mutacionais (LAN, 2003, MESTRE, 2011).

Além disso, um recente estudo demonstrou através da análise do gene *lysX* que todos os isolados Beijing avaliados possuíam uma substituição silenciosa no códon 995 (Pro CCG - Pro CCA), já os isolados considerados modernos demonstraram uma mutação no codón 701 (Ile ATT - Thr ACT), este gene estaria envolvido possivelmente com virulência, uma vez que possui um importante papel na sobrevivência do patógeno durante a infecção por *Mtb* (ZHAO, 2016).

Ainda do ponto de vista evolutivo, a Família Beijing pode ser subdividida em várias sublinhagens, por meio da análise “Large Sequence Polymorphisms” (LSPs). A análise de Regiões de Diferença (RDs) em *Mtb* Beijing confirmou que esta família pertence à um grupo monofilético (KONG, 2006, HANEKOM, 2007). A deleção na região RD 105 foi exclusivamente encontrada na família Beijing, e apontada como um novo marcador para a linhagem W/Beijing. As regiões RD142, RD150 e RD181 possuem a capacidade de subdividir a W/ Beijings em quatro subtipos (KONG, 2006).

As distinções entre dois clados, ancestral e moderno, e sublinhagens, definidas por RDs de cepas Beijing, têm sido de extrema relevância, pois fornecem uma nova visão sobre a evolução do genótipo desses isolados, além de sugerir diferentes propriedades biológicas, de transmissão e virulência entre esses (KONG, 2006, KREMER, 2009).

Estudos anteriores demonstraram que todos os isolados de *Mtb* Beijing possuem o gene *pks15/1* intacto. Esse gene está envolvido na síntese de PGL (do inglês, Phenolic glycolipid), responsável por aumentar os fatores de virulência micobacterianos (CHAIPROSERT, 2006). Contudo, observou-se que a produção de PGL ocorre em apenas algumas sublinhagens de *Mtb* Beijing (três, quatro e cinco), o que sugere que esta propriedade biológica dessa família estaria relacionada com fatores evolutivos (REED, 2007).

Marcadores moleculares tradicionais, apesar de serem ótimos para estudos epidemiológicos e filogenéticos, não têm sido capazes de justificar propriedades biológicas específicas encontradas na família Beijing. Estudos genômicos baseado em SNPs têm demonstrado grande eficácia em descrever rotas migratórias entre patógeno e hospedeiro, e a existência de várias mutações importantes relacionados com virulência numa mesma análise (MERKER, 2014). O aumento de dados

genômicos demonstrou que a linhagem Beijing é mais heterogênea do que o estimado inicialmente, sendo o sequenciamento genômico completo a estratégia ideal para estudar a diversidade a origem e evolução dessa família (LUO, 2015).

Recentemente, dois trabalhos baseados em sequenciamento genômico tentaram determinar o conjunto mínimo de SNP que seriam capazes de definir a linhagem Beijing moderna. Schurch e colaboradores (2011) encontraram 51 SNPs analisando um conjunto de 150 cepas, porém Merker e colaboradores (2014), definiram e caracterizaram a linhagem Beijing moderna através de 81 SNPs a partir de 110 genomas oriundos de 99 países. A inconsistência entre os dois estudos provavelmente foi devida a diferentes conjuntos de amostras estudadas, demonstrando a necessidade de investigar melhor essa linhagem e seus efeitos funcionais (LIU, 2016).

1.3.5 Mutações em genes associados à resistência contra antimicrobianos

A família Beijing tem sido associada à resistência aos fármacos principalmente entre os países asiáticos e a Rússia. Estudo recente no qual foram avaliados 2.846 isolados provenientes de diferentes partes do mundo e que constavam no banco de dados SITVIT2, verificou um número maior de cepas Beijing envolvidas com resistência às drogas, conforme ilustrado na figura 1.5 (COUVIN, 2015).

Uma das hipóteses que explicaria a associação da linhagem Beijing com resistência às drogas seria a alta frequência de mutações em seu genoma. Estudos baseados na detecção de mutações pontuais (SNPs) revelam que o acúmulo dessas variações, geralmente nos genes *mutT 2*, *mutT 4*, e *ogt* em *Mtb* Beijing, resulta em maior resistência.

Supostamente essas mutações causam “defeito” no reparo do DNA, resultando na oxidação de nucleotídeos e aumento da frequência de mutações. Dessa forma, haveria uma elevação da capacidade de adaptação da bactéria em condições estressantes. Tal fenômeno é observado no gene *mutT 2*, onde mutações são capazes de induzir a redução do metabolismo em *Mtb* quando existem privações de nutrientes essenciais para o seu funcionamento. Assim, a bactéria se adapta melhor ao hospedeiro em condições extremas e adquire maior resistência aos fármacos, por se adaptar (RAD, 2003, MORELAND, 2009).

Em *Mtb* Beijing provenientes da China, verificou-se que a grande maioria das amostras apresentavam mutações nos genes *rpoB* e *katG* associadas com resistência à rifampicina e à isoniazida (JIAO, 2007). Porém o padrão de resistência aos fármacos pode variar em diferentes países.

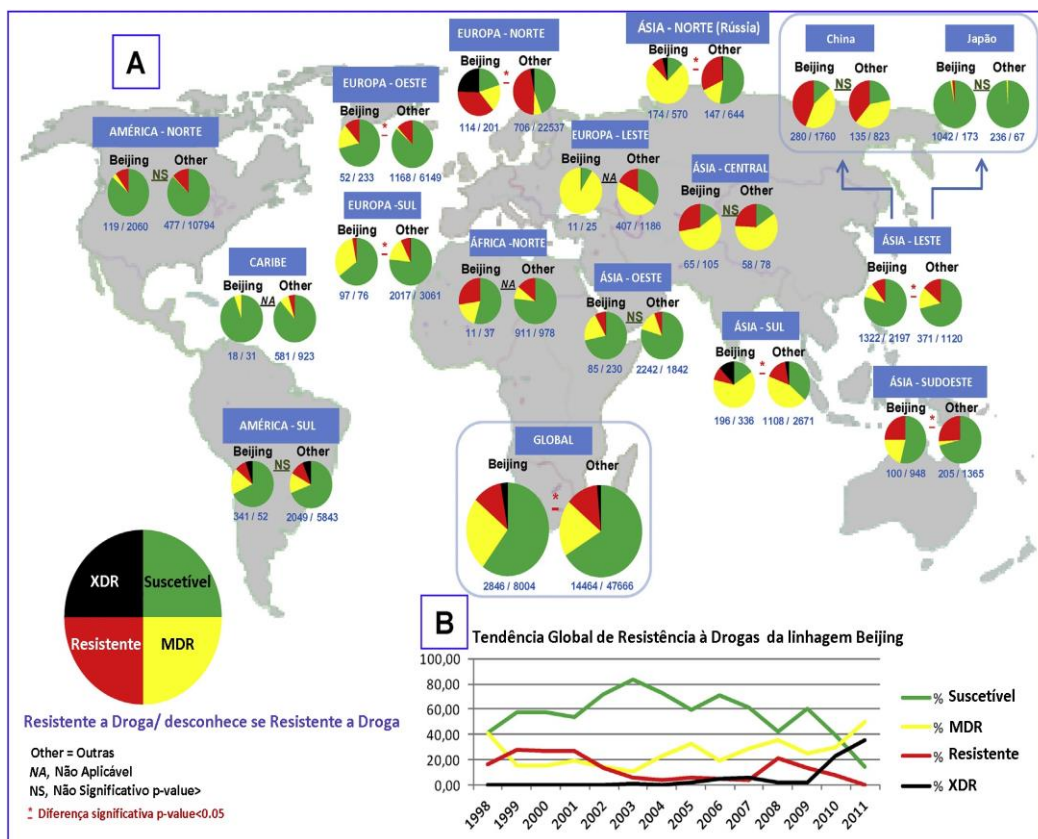


Figura 1.5. Características de resistência de linhagens Beijing vs. não-Beijing *M. tuberculosis* e evolução da resistência à drogas isolados entre 1998 e 2011. Figura modificada (COUVIN, 2015)

Sublinhagens de *Mtb* Beijing podem exibir diferentes susceptibilidades aos fármacos. Avaliando isolados *Mtb* Beijing originados do Vietnã, isolados *Mtb* Beijing pertencentes à sublinhagem ancestral apresentaram proporções elevadas da resistência a isoniazida e estreptomicina em comparação com a sublinhagem moderna ($P < 0,00001$) (MAEDA, 2014). Contudo, avaliando associação com resistência à drogas a partir de quatro sublinhagens de isolados Beijing da China definidas por LSPs (RD105, RD207, RD181, e RD150), nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as sublinhagens em relação a resistência a isoniazida, rifampicina, estreptomicina e etambutol (WANG, 2015).

Na verdade, pouco se sabe sobre a complexa associação entre a linhagem, sublinhagens Beijing e a resistência às drogas, sendo, desta forma, necessário avaliar um maior número de isolados de diferentes regiões. Um estudo recente baseado em sequenciamento genômico identificou 39 genes e algumas regiões intergênicas, onde mutações poderiam ocasionar uma mudança da parede celular das *Mtb* (FARHAT, 2013) e conseqüentemente definir o perfil de resistência às drogas desses isolados.

1.3.6 Virulência

Novas metodologias têm ajudado a entender como algumas espécies de *Mtb* se adaptam melhor às diferentes condições de estresse. A disponibilidade do genoma inteiro a partir do sequenciamento de nova geração, de diferentes cepas de *Mtb*, têm revelado a presença de deleções ou mutações em genes que se correlacionam com virulência. A maioria destes genes de virulência codificam enzimas de várias vias de lipídios, proteínas da superfície celular e reguladoras dos sistemas de transdução de sinal; outros intervêm na sobrevivência da micobactéria dentro do macrófagos do hospedeiro (FORRELLAD, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que a sublinhagem Beijing moderna pode exibir vantagens seletivas diante da sublinhagem Beijing ancestral, que estariam associadas aos fatores de virulência. A linhagem Beijing moderna induziria a produção mais baixa de citosinas pró inflamatórias (IL-1b, IFN-c, IL-22) (VAN LAARHOVEN, 2014), apresentam mais fatores fenotípicos de virulência em camundongos e em macrófagos quando comparada a sublinhagem ancestral (RIBEIRO, 2014).

Sabe-se também que a sublinhagem Beijing moderna apresenta alterações *missense* em três genes relacionados ao reparo de mutações (Rv 3908, *mutT2*, *ogt*), o que poderia conferir uma vantagem com relação à adaptação aos novos ambientes e maior resistência aos fármacos. Porém, ainda não existe uma clara explicação para a diferença de virulência entre essas sublinhagens.

1.4-Justificativa do Estudo

O objetivo central deste estudo foi observar características genéticas dentro da linhagem Beijing, utilizando marcadores moleculares tradicionais e sequenciamento de nova geração, para uma maior compreensão dos fatores de virulência, resistência aos fármacos e filogenia.

No Brasil os primeiros casos de tuberculose por *Mtb* Beijing foram notificados entre 2001 e 2003, no Hospital Adolfo Lutz em São Paulo e no Hospital Clementino Fraga, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, causando preocupação entre a comunidade científica por serem os primeiros casos de tuberculose causados por uma linhagem associada com alta transmissibilidade, multirresistência e hipervirulência em toda a Ásia e Europa. Sua ocorrência permitiu comparar esses isolados esporádicos com isolados *Mtb* Beijing pertencentes a outras regiões com diferente prevalência como Moçambique e Rússia.

Com a intenção de compreender e descrever a linhagem Beijing circulante no Brasil e em Moçambique, características genéticas desses isolados foram estabelecidas por marcadores moleculares capazes de definir perfis, sublinhagens, e mutações relacionadas com resistência à drogas. Inicialmente esses isolados foram caracterizados como pertencente à família Beijing por *Spoligotyping*. Em seguida esses isolados foram avaliados por MIRU-VNTR, IS6110 inverso na Região NTF e mutações no genes (*mutT2, mutT4, rpoB, katG* e *pks15/1*). A avaliação do número de cópias de IS6110 presentes na região NTF e de mutações nos genes *mutT2* e *mutT4*, discriminou a sublinhagem ancestral e moderna entre os isolados.

Análise de propriedades relacionadas com virulência, como a avaliação de crescimento intracelular e quantificação de morte por necrose também foram realizadas *in vitro* por infecção em macrófagos THP-1. Nesta análise foi adicionada uma cepa da Rússia 1471 como referencia de virulência. Este isolado é proveniente de um grande cluster chamado BO que é relacionado com característica MDR e alto índices de virulência em áreas endêmicas da Rússia. Os resultados obtidos pela genotipagem relacionado com a avaliação por infecção em macrófago observou maior virulência entre a sublinhagem moderna.

Para tornar as evidências obtidas *in vitro* mais confiáveis, foi incluída uma análise de infecção pulmonar em camundongos (C57BL/6), no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), em que foram

avaliados os níveis de virulência associados à sobrevivência, carga bacteriana e patologia nos pulmões dos animais infectados.

Contudo, os dados obtidos por marcadores moleculares não foram capazes de elucidar a dinâmica de diferentes níveis de virulência em sublinhagens específicas, por isso evoluímos para a análise por sequenciamento genômico de nova geração, ferramenta que tornou possível a avaliação de SNPs e *indels* em genes envolvidos com virulência.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar isolados clínicos de *M. tuberculosis* pertencente à família “Beijing” relacionando o genótipo à fatores de virulência e resistência.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a diversidade genética de *M.tuberculosis* Beijing circulante no Brasil, Moçambique e Rússia.
- Aprimorar métodos antigos de genotipagem e buscar novos métodos capazes de identificar de maneira rápida, sublinhagens e subgrupos em *M. tuberculosis* Beijing.
- Caracterizar propriedades biológicas associadas à virulência por infecção *in vitro* e *in vivo* em isolados pertencentes a diferentes subgrupos da família Beijing.
- Buscar informações genômicas que expliquem a diferença de fatores de virulência encontrados entre a sublinhagem ancestral e moderna, utilizando o sequenciamento de nova geração.

Diversidade Genética de *Mycobacterium tuberculosis* família Beijing no Brasil e Moçambique e sua rela o com a infectividade e indu o de necrose em células THP-1.

Visando alcançar os objetivos específicos 1 e 2, avaliamos a diversidade genética de *M. tuberculosis* Beijing circulante no Brasil, Moçambique e Rússia. Os dados gerados foram publicados no artigo "Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells.", do qual sou primeira autora, publicado pela revista Tuberculosis, edi o 2015 Jun;95:190-196.

Este artigo trata-se de um estudo descritivo dos genótipos de *Mtb* Beijing, isolados no Brasil (n=8), Moçambique (n=17) e Rússia (n=1) bem como observa es fenotípicas obtidas por infec o em macrófagos THP-1, por esses isolados. Para isso, foram utilizados marcadores moleculares como; Spoligotyping, MIRU-VNTR, análise do número de cópias de IS6110 inverso na região NTF, avalia o de muta es nos genes; *mutT2*, *mutT4*, *rpoB*, *katG* e *pks15/1*. Propriedades associadas com virulência; tais como taxa de crescimento da micobactéria e a viabilidade de células infectadas, também foram verificadas por infec o em macrófagos THP-1.

A genotipagem por 12 *loci* MIRU-VNTR demonstrou baixo poder discriminatório HGDI < 0,5 para a família Beijing. Com a adi o de 12 *loci* na análise, o MIRU-VNTR 24 demonstrou alto poder discriminatório HGDI=0,997, o mesmo obtido em regiões de alta prevalência. As sublinhagens foram estabelecidas pelo número de cópias de IS6110 inverso na região NTF e confirmadas pela a presença ou ausência de muta o em *mutT2* e *mutT4*. A maioria dos isolados brasileiros analisados são ancestrais (75%) e os isolados de Moçambique foram em sua maioria modernos (53%). Todos os isolados avaliados apresentaram a inser o de 7 pb em *pks 15/1* e classificadas como sublinhagem 7 por RDs, sugerindo que a princípio todas seriam capazes de produzir PGL.

Nossos dados demonstraram que as *Mtb* Beijing isoladas no Brasil apresentaram menor fator de virulência que isolados de regiões com alta prevalência como a Rússia. Além disso, de maneira geral os isolados *Mtb* Beijing analisados

pertencentes à sublinhagem moderna, independente da região geográfica de origem, apresentaram maior virulência.

A metodologia empregada foi realizada em parte na Fiocruz no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias, sob orientação do Dr. Philip Suffys, e no Laboratório de Biologia do Reconhecer, no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, em colaboração com a Dr^a. Elena Lasunskaja. Toda a padronização e desenvolvimento das metodologias de marcadores moleculares para genotipagem, bem como tais análises, foram realizados por mim, no contexto desta tese. Ainda, acompanhei todos os ensaios de infecção em macrófagos, realizados pela Dr^a. Elena. Os resultados e suas referidas discussões estão mais detalhados no artigo mencionado, que segue abaixo.



Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells



Lia Lima Gomes^a, Sidra Ezidrio Gonçalves Vasconcellos^a, Harrison Magdinier Gomes^a, Atina Ribeiro Elias^a, Adalgiza da Silva Rocha^a, Simone C.M. Ribeiro^b, Alessandra Costa Panunto^c, Lucilaine Ferrazoli^d, Maria Alice da Silva Telles^d, Araujo Marelo Emanuel Ivens de^a, Afranio Lineu Kritski^e, Igor Mokrousov^f, Olga A. Manicheva^g, Elena Lasunskaja^b, Philip Noel Suffys^{a,*}

^a Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

^c Laboratory of Bacterial Pathogenesis and Molecular Biology, Unicamp, São Paulo, Brazil

^d Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

^e Laboratório de Micobacteriologia Molecular do Centro de Pesquisas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, University Hospital Clementino Fraga Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

^f Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

^g Laboratory of Microbiology, Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia

S U M M A R Y

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis
Beijing
Mozambique and Brazil
Genotypes
Virulence

Introduction: The success of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing (MtbB) lineage in different geographical regions has been attributed to high transmission, increased virulence, drug resistance and rapid adaptation to the host. In some countries of secondary MtbB dispersion like South Africa and Peru, rising prevalence of the Beijing strains is registered. However, in neighboring countries to affected regions such as Mozambique and Brazil, respectively, the prevalence of these strains is still low and this could be due to biological particularities of the circulating MtbB strains and/or differentiated host susceptibility.

Objective: To characterize genetically and phenotypically MtbB strains isolated in Brazil (n = 8) and Mozambique (n = 17).

Methods: This is a descriptive study of genotypes of the MtbB isolates, determined by spoligotyping, MIRU-VNTR typing, analysis of the IS6110 copy number in the NTF region and screening for mutations in *mutT2*, *mutT4*, *rpoB*, *katG* and *pks 15/1* genes. Virulence-associated properties of the studied isolates were verified in the *in vitro* model of infection of human THP-1 cells.

Results: The genotypes defined by the 24VNTRs were distinct for all isolates included in this study and presented an HGDI of 0.997. The VNTR patterns with seven copies of MIRU26 and seven copies of QUB26, representative for the previously described MtbB genotype B0, dominant in Russia, were detected in 38.5% of the studied isolates. In addition, all isolates presented RD105 deletion and a 7 bp insertion in *pks15/1* gene. Almost all tested strains belonged to the RD181 sublineage, with the exception of two strains from Mozambique of RD150 sublineage. Combined analysis of the NTF region integrity and mutations in *mutT* genes showed that 62.5% and 47% of isolates obtained in Brazil and Mozambique, respectively, were of the ancestral genotype. The virulence index of the ancient isolates, evaluated in the THP-1 cells, was significantly lower than that of the modern genotype group.

Conclusions: These data demonstrate genotype particularities of the Beijing strains isolated in Brazil and Mozambique, two countries of low prevalence of the MtbB lineage in local Mtb populations. In

* Corresponding author. Tel.: +55 21 25621564; fax: +55 22 25621533.
E-mail address: psuffys@gmail.com (P.N. Suffys).

contrast to the neighboring countries with high prevalence of the MtbB strains of modern sublineage, significant proportions of the isolates obtained in Brazil and Mozambique were presented by the strains of the ancient sublineage. Our data suggest that lower virulence of the ancient strains, compared with the modern strains, could be involved in the slow spread of the MtbB strains in some regions.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) remains a major global public health problem, more severe in developing countries with insufficient resources for health care. In countries with high burdens of TB, such as Brazil, Mozambique and Russia, the disease cases caused by strains of the East Asian/Beijing *Mycobacterium tuberculosis* lineage (MtbB) are frequently associated with HIV co-infection and/or drug resistance. The MtbB family was first described in 1995 in China [1] but during the following years, strains of this family were isolated in different parts of the world, demonstrating rising prevalence in southeast Asia, southern Africa and northern Eurasia [2]. The emergence of the MtbB family, determined by high level of association of with MDRTB, increased virulence, and more rapid progression of latent infection to active TB, has caused great concern among investigators and public health authorities [3].

Given this scenario, genotyping of Mtb isolates was employed for monitoring of the spread of MtbB strains and definition of epidemiological risk factors predisposing to infection and disease caused by MtbB. Spoligotyping has been the most usual technique in differentiating the MtbB lineage from other Mtb lineages, but it has limited power to differentiate intra-family genotypes. The MIRU-VNTR genotyping procedure has higher discriminatory capacity for the MtbB strains, and it can be further optimized including some additional VNTRs [4–6]. Other procedures for definition of MtbB evolutionary pathways and discrimination of sublineages have been proposed by introducing techniques for the detection of IS6110 insertions in the NTF locus, capable of differentiating between ancestral or modern MtbB sublineages [2]. Discrimination of modern and ancient MtbB strains is relevant as these two clades seem to have different biological properties [7].

From an evolutionary point of view, the Beijing family can also be defined and divided into distinct subfamilies by analyzing the presence of Regions of Difference (RDs) and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), confirming that this family is monophyletic [8,9]. While deletion of RD105 was exclusively observed in the MtbB strains and, therefore, is a specific marker of this genotype family, deletions of other specific large genome sequences, including RD207, RD181, RD142 and RD150, were suggested as markers of MtbB sublineages [8]. Deletion of the RD207 defines the sublineage 2 and with additional deletion of RD181 is the basis of sublineage 3, which further evolved to sublineages 4 and 5 by deletion of RD150 and RD142, respectively. Related studies show that all the MtbB strains, in contrast to many other Mtb genotype lineages, possess intact *pks15/1* gene, involved in the synthesis of phenolglycolipids, PGL, that is one of the mycobacterial virulence factors [10]. However, recent study demonstrated that the Beijing strains of sublineages 3, 4 and 5, but not those of the sublineages 1 and 2, are able to produce these antigens, suggesting that this biological property was acquired by MtbB during evolution [11]. These data promoted a new vision on the evolution of MtbB, suggesting that LSP and SNP in the bacterial genome provide new

biological attributes, which may influence the virulence and transmission of the Beijing strains [8].

Recent studies demonstrated that in many countries of secondary dispersal of the MtbB, like South Africa [9], or Peru [12], the rising prevalence of the strains of Beijing genotype was associated predominantly with the strains of modern, but not ancient, sublineage. The prevalence of MtbB strains in these countries has reached 25% in South Africa [9] and 9% in Peru [12]. In contrast to these countries, the prevalence of Beijing strains in neighboring countries, like Mozambique and Brazil, is still low, representing only 7% [13,14] and 0.8% in local populations of Mtb strains [15], respectively. In this study, we aimed to investigate genotype characteristics and virulence-associated properties of the Beijing strains isolated in Mozambique and Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Samples

We performed genotyping of 26 isolates of MtbB that were collected between 2002 and 2009 and had been characterized by spoligotyping as belonging to the Beijing family. Among the eight isolates obtained from TB cases in Brazil, two had been diagnosed at the University Hospital “Clementino Fraga Filho” (HUCFF) in Rio de Janeiro, while six patients had been diagnosed at the “Instituto Adolfo Lutz” (IAL) in São Paulo. Seventeen isolates were from patients from Mozambique and were provided by the Laboratory of Bacterial Pathogenesis and Molecular Biology, Unicamp, São Paulo. The MtbB clinical isolate from Russia (strain 1471), was used as a reference strain in our experiments and previously characterized as belonging to a large cluster called B0, dominant in an endemic area in Russia and demonstrating MDR profile and high virulence using the THP-1 cell line model [16]. The laboratory Mtb H37Rv strain was used as a control.

2.2. Bacterial culture and DNA extraction

Culturing was performed on Löwenstein–Jensen (LJ) medium and bacterial mass was submitted to thermal lysis in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) for liberation of nucleic acids, followed by centrifuging; the supernatant was stored at -20°C .

2.3. Conventional drug susceptibility assay

Six isolates from Brazil and the Russian isolate 1471 were submitted to the method of proportions at the Adolfo Lutz Institute, while 17 isolates from Mozambique were characterized using the same method at the Laboratory of Bacterial Pathogenesis and Molecular Biology (Unicamp). These isolates were evaluated for resistance to isoniazid, rifampicin, streptomycin and ethambutol.

2.4. Strain typing

Spoligotyping was performed as described by Kamerbeek et al. [17] and 24-MIRU-VNTR typing was done according to Supply et al. [18], by individual PCR for each marker and size definition in agarose gel by comparison with a 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Brazil) and with a reference table [18].

The discriminatory power and allelic diversity of each MIRU-VNTR locus was calculated using the Hunter and Gaston Discrimination (HGDI) Index [19]. The Bionumerics software (version 6.1 Applied Maths, Belgium) was used for cluster identification and construction of phylogenetic trees and/or Minimum Spanning Trees (MST).

2.5. Other genotyping procedures

For differentiation of ancient and modern sublineages, we determined the presence and number of IS6110 copies in the NTF region by PCR using primers MDR-6 and MDR-6r and primers MDR-7 and MDR-7r [20–22,2] and evaluation of fragment size on agarose gel. For the same purpose, the presence of SNPs in the *mutT2* and *mutT4* genes was evaluated by PCR direct sequencing using primer pairs designed to amplify a 398 bp fragment of the *mutT4* gene and a 675 bp fragment of the *mutT2* gene [23,24] and analyzed as described by Faksri et al. [25].

To identify the presence of RDs, PCR of the genomic regions that harbour RD105, RD142, RD150 and RD181 was performed, followed by size definition on agarose gel by comparison with a molecular weight marker and with amplicons of the H37Rv strain that does not carry these deletions [9].

The detection of the 7bp insertion in the gene *pks15/1* was performed by PCR direct sequencing as described by Constant et al. using primers PKS 1L and PKS 15R [26].

In addition, we performed PCR direct sequencing for detection of DR-related SNPs in *katG* and *rpoB*. The sequencing of part of the *katG* gene was performed using primers *katG1* and *katG2*, using the conditions described by Silva et al. [27], while for sequencing of part of *rpoB*, we used primers *rpoBTbF* and *rpoBTbR* [28]. All procedures of purification, sequencing and analysis were performed using PCR Clean-up Kit (Invitrogen, Brazil), ABI PRISM BigDye Terminator v 3.0 sequencing kit (Applied Biosystems), an ABI3730 sequencer and SeqScape version 2.6.

2.6. THP-1 cell infection, bacterial intracellular replication and induction of cell death

The THP-1 cells (ATCC TIB-202) were grown in DMEM-F12 medium and incubated in 96-well cell culture plates (6×10^4 cells/well in 100 μ l) and supplemented with 25 nmol/L phorbolmyristate acetate (PMA; Sigma) to induce macrophage differentiation. After 48 h incubation, the culture medium was changed for the medium without PMA, and the cells were cultured for 24 h until use in experiments.

Mycobacteria suspensions were sonicated, optical density was measured at 600 nm and adjusted to an OD of 0.066. The number of viable bacilli in suspension was measured by colony-forming units, CFU, by plating onto Middlebrook 7H10 agar supplemented with 10% OADC (Difco), and colonies were counted after 3–4 weeks. The THP-1 macrophages were infected at a ratio (MOI) of 1 or 10 bacteria/cell for 3 h at 37 °C in triplicate. After incubation, monolayers were washed, fresh medium was added and the cell cultures were incubated for 6 days. Intracellular bacterial growth was accessed by CFU quantification in the cell lysates of THP-1 cultures on days 0 and 6 after infection at a MOI of 1.

Growth rate was calculated as a difference of log CFU on day 6 and on day 0. The relative growth index of each strain in macrophages was calculated from the ratio of growth of each strain to the growth rate of H37Rv strain.

To analyze MtbB induced cytotoxicity, THP-1 cells were infected at a MOI of 10 and numbers of dead cells were determined by a microscopic analysis of trypan blue-positive cells. The cellular viabilities in the control cultures were similar throughout the experiment (approx. 90%). The relative cytotoxic effect of each strain was calculated as a ratio of the percentage of dead cells in culture infected with the strain to the percentage of dead cells in culture infected with the H37Rv strain. The CFU data and mortality data for each strain were compared with the values of H37Rv strain that was considered as 100%. To assess the virulence index of each strain compared to strain H37Rv, we used the average values: $[(\text{CFU}\%) + (\% \text{ mortality})]/2$. To compare the groups, we performed a statistical analysis of one-way ANOVA and the Tukey post-hoc test.

3. Results

Spoligotyping showed that all isolates had the typical Beijing patterns with absence of the spacers one to 34 and presence of spacers 35–43 (data not shown).

Upon classification of the isolates as being Ancestral or Modern using reverse PCR of the NTF region, 14 (54%) were ancestral and 12 (46%) modern. When evaluating country-wise, six (75%) of the eight isolates from Brazil had ancestral genotype and the other two (25%) were modern. Among the isolates from Mozambique, eight (47%) were ancestral and nine (53%) were modern; the single isolate from Russia was modern. The ancestral/modern nature of the isolates was also determined by combined SNP analysis in genes *mutT2* and *mutT4* but because of limited amount of DNA of some isolates, we could not perform the *mutT2* and *mutT4* typing in respectively nine (35%) and 10 (38%) of the isolates (Table 1). Among the 10 modern isolates (83%) that had *mutT2/4* type established, all were confirmed as modern by presenting an SNP in codon 58 of *mutT2* and codon 48 of *mutT4*; while among the seven ancestral (50%) that were further genotyped, all but one had the WT *mutT2* allele and therefore confirming the NTF results. Exception was an isolate from Brazil (3912/02) that was ancestral by NTF but indicated as modern by presenting the mutant *mutT2* and *mutT4* alleles (Table 1). This could eventually be due to error in interpretation of the NTF assay although both genotyping procedures were repeated. The isolate Beijing from Russia also presented mutations in both genes, confirming the modern nature as indicated by NTF. Interestingly, an MtbB isolate from a patient from Mozambique (strain 442) presented lack of mutation in both *mutT2* and *mutT4*, therefore being more ancestral than the rest.

Upon defining genotypes by 12 MIRUs, we identified 10 isolates (38.5%) carrying the genotype 223325173533, including the Russian isolate, three isolates from Brazil (38%) and five isolates from Mozambique (29%). Because 12-MIRU analysis demonstrates considerable similarity between strains from Brazil and Mozambique, we performed 24-MIRU-VNTR typing. We observed 25 unique profiles (92.3%) with only two strains from Mozambique (440 and 84) having identical genotypes, the latter maybe due to the lack of the copy number of QUB26 in isolate 440. Interestingly, the UPGMA based tree separated genotypes from Brazil and Mozambique, suggesting region-associated similarity (data not shown). Upon construction of a Minimal Spanning Tree based on 24 MIRUs, the precursor status isolates with the B0 signature was confirmed because of their position in the tree. However, there was no centralized location in this tree

when considering Ancient versus Modern genotypes (data not shown).

When evaluating the HGDI of the individual MIRUs in isolates from Brazil and Mozambique, we observed that VNTR QUB 11 had the highest HGDI (>0.5) and best locus to distinguish profiles in MtbB in both countries.

Upon drug susceptibility testing, one strain from Brazil (ZT272) and the Russian strain 1471 were determined as resistant to RMP and INH and both presented the mutation AGC to ACC (exchange of a serine for a threonine) at codon 315 of *katG*; however, different SNPs in codon 531 of *rpoB* were observed, being, respectively, a change from TCG to TTT (change from serine by a phenylalanine) and TCG to TTG (change from serine by a phenylalanine). One strain from Mozambique (strain 16) was resistant to RMP, INH and SM and presented the SNP CAC-GAC at codon 526 of *rpoB*, but no mutation in *katG*.

All isolates, except Mtb H37Rv, presented the 7 bp insertion in *pks 1/15* gene, encoding PGL expression. Upon evaluation of RD105, RD142, RD150 and RD181, we observed that all strains had deleted RD105 and RD181 and intact RD142 and RD150, except for two strains from Mozambique (strains 186 and 198) that had RD150 deleted. This means that all Brazilian strains and 87.5% of the strains from Mozambique presented sublineage type 3; and 12.5% of the Mozambican strains belonged to type 4 sublineage, according to the classification proposed by Reed et al. [10].

Upon investigating the interaction of MtbB strains with THP-1 cells, we evaluated data of infectiousness, growth rate and induction of macrophage death by six MtbB strains from Mozambique (five modern strains and one ancestral strain), seven isolates from Brazil (three modern and four ancestral strains) one (modern) Russian isolate and the non-Beijing strain H37Rv (Figure 1)).

When evaluating growth in THP-1 cells, four modern and one ancient Beijing isolates presented higher intracellular growth than the strain H37Rv. The growth of these strains was similar to the growth of Russian modern strain 1471. In contrast, three of five ancient isolates evaluated, and none of the modern isolates, replicated slower in macrophages than the strain H37Rv. The mean value of growth of the ancestral strains was lower than that of modern group, but the difference was not statistically significant (data not shown).

Examining induction of necrotic death in THP-1 cells, we observed that at least five of modern Beijing strains, including the Russian strain, but none of the ancient strains, were able to induce macrophage death more rapidly than the strain H37Rv. The mean value of cytotoxicity of modern strains was significantly higher than that of the ancestral group ($p < 0.01$) (data not shown).

When considering the virulence index that combines two important biological characteristics of Mtb, associated with virulence, the ability to intracellular multiplication and induction of necrosis of macrophages, a significantly higher index was observed when comparing the group of modern strains with the ancestral one. The virulence index of only one ancestral isolate (strain zt264) was significantly higher than that of the H37Rv strain. In contrast, at least five modern strains isolated in Mozambique and Brazil, as well as the Russian modern strain were more virulent when compared with the strain H37Rv. Two of the studied modern MtbB isolates (strain M467 from Mozambique and strain 2172 from Brazil) presented the virulence index comparable with that of the Russian strain 1471 (Figure 1).

4. Discussion

The occurrence of outbreaks caused by MtbB in various countries of the world and its association with antimicrobial resistance

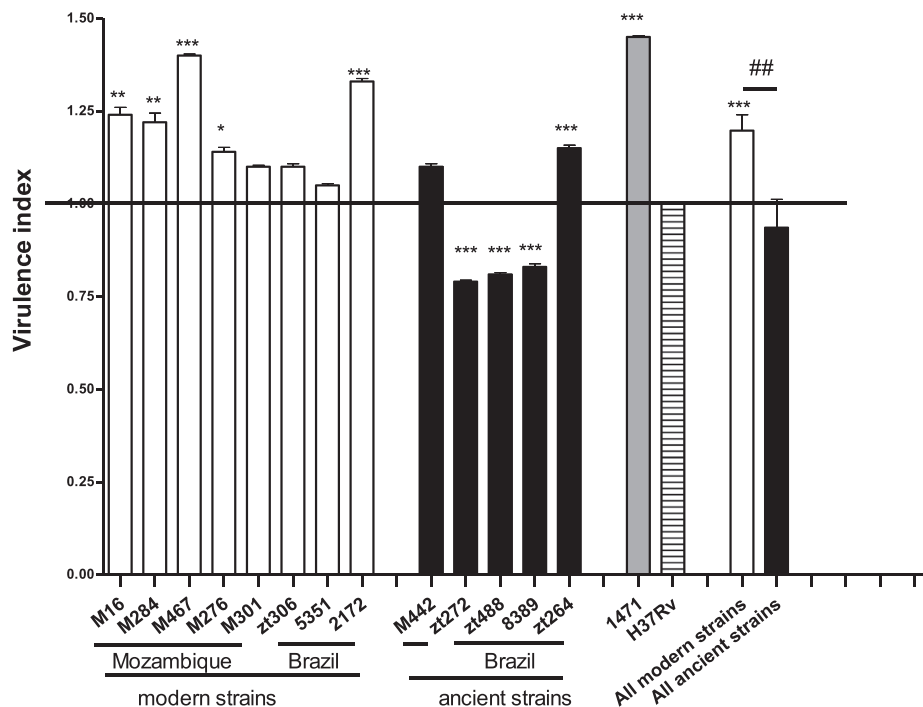


Figure 1. Relative virulence of the Beijing strains. Virulence index of modern and ancient strains, combining intracellular growth rates and induction of necrosis, using the model of *in vitro* infection of human THP-1 macrophage-like cells. The THP-1 cells were infected with ancient and modern MtbB strains isolated in Brazil and Mozambique, with laboratory Mtb H37Rv and with highly virulent MtbB strain 1471 isolated in Russia. The intracellular growth rates were measured within 6 days as a difference in CFU numbers, log CFU day 6 – log CFU day 0. The necrotic death of infected macrophages was measured as a difference in numbers of trypan blue-positive cells quantified in culture on day 6 and day 0 (%). Relative virulence index of each strain was quantified in proportion to the virulence index of the strain H37Rv (evaluated as 1.0). The virulence index of each strain was quantified as a media of the intracellular growth value and the macrophage death value. The strains significantly differing from the strain H37Rv are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The difference between the groups of ancient and modern strains is indicated by ## $p < 0.01$.

has concerned researchers and policymakers to control TB. The consensus is that it is necessary to better understand the fitness of MtbB and the particularities of disease caused by this genotype family. Despite the occurrence of MtbB being sporadic in Brazil [15], no data on genetic characterization of such isolates are available. In addition, it is a challenge to determine why this family is not successful in Brazil, a country with predominance of the Latin American Mediterranean (LAM) lineages [29].

In the majority of African countries, prevalence of Beijing strains is low, in contrast to the South Africa, where Beijing strains represent currently 20–25% of the Mtb strains and their emergence is associated with drug resistance. In South Africa, as well as in many other countries with increasing prevalence of the Beijing strains like Russia [22] or Peru [12], predominantly strains of the modern and not of the ancestral sublineage are observed. In the urban region of Cape Town, South Africa, prevalence of the ancestral strains in the local population of the MtbB strains was 1.5% (5/325), and in rural regions 1.9% (5/270) [9]. Recently, a considerable increase of MtbB prevalence was registered in south African countries such as Malawi, where prevalence of MtbB strains has reached 4.3% in 2005 [30] and in Mozambique, with a prevalence of MtbB strains in the southern region being 9.5%, considerably higher than the 2.5% observed in the north [13]. Most likely, the observed increase in prevalence of MtbB strains in other African countries is caused by spreading of modern Beijing sublineages dominant in South Africa, but this issue needs to be further addressed. We therefore characterized the frequency of modern vs ancestral MtbB and their genotypes in a country showing tendency of increasing prevalence of MtbB (Mozambique) and another with stable and low prevalence of MtbB (Brazil).

Typing 12-MIRU-VNTRs confirmed low discriminatory power (all loci less than 0.5 HGDI, data not shown) as reported by other authors [4–6] and led to cluster formation between isolates from the three countries (data not shown). There was however a difference between most diverge alleles between Brazil and Mozambique, in the former being MIRU23 and MIRU31 (0.375) and in the latter MIRU27 and MIRU39 (0.464 and 0.433, respectively). The cluster assigned by 223325173533 has been detected with high frequency in Russia and was associated with higher prevalence and transmissibility [6,31] and with a greater chance of being MDR in Hong Kong [4]. By 24-MIRU-VNTR typing, we observed an overall HGDI of 0.997, highly discriminative and similar to values obtained in endemic areas of MtbB [32,33]. The 24 MIRU-VNTR typing also distinguished the 10 isolates having the 223325173533 signature as defined by 12-MIRU-VNTR typing and interestingly, these isolates were in the core of the MST based on 24-MIRU-VNTR, highly suggestive for being a precursor for MtbB in Brazil and Mozambique (data not shown).

We observed a low frequency of MDR in strains from Brazil and Mozambique and this could be one of the factors that does not favor the spreading of MtbB when compared to other regions of the world. The two mutated strains were of the modern genotype (from Russia and Mozambique) while the Brazilian one was ancestral.

The majority (75%) of the MtbB isolates in Brazil were defined as ancestral and this supports the hypothesis that the introduction of MtbB in the America's could have occurred twice, initially by European colonization and later by the Chinese that started in the nineteenth century [15]. In addition, Japanese immigration, mainly to Sao Paulo, started a century ago and endemicity of ancestral MtbB is described even nowadays in Japan [34]. The relatively high proportion of ancient strains in our set of the MtbB strains isolated in the southern region of Mozambique, neighboring South Africa, was not expected. This region has strong economic relations with

South Africa with impact on epidemiology of TB in Mozambique. Recent studies demonstrated that South Africa is among the countries with highest TB incidence rates of the modern MtbB sublineage in the world. In particular, isolates of sublineage 7 are dominant in population structure of the MtbB strains circulating in the South Africa [9]. Significant similarity of bacterial genotypes (patterns determined by IS6110 RFLP and 24 loci-MIRU-VNTR genotyping) of the strains isolated in South Africa and Mozambique suggest that importation of the South-African Beijing strains could contribute to the epidemiology of TB in Mozambique [14]. However, the RD150 subgroup, being highly prevalent (57%) in South Africa [9] comprised only 12% among the Beijing strains isolated in Mozambique [14], demonstrating that population structure of the Beijing strains in Mozambique has its proper dynamics. Neither in Brazil nor Mozambique, the genotype of the W/Beijing isolates, described as responsible for outbreak in the US in 1990 [20] and recent transmission of TB in rural China [35] was detected.

All the strains in the present study had the 7 bp insertion in *pks15/1*, a gene that is involved in PGL production. However, some MtbB strains with the insertion in *pks15/1* do not produce PGL of RDs 150, 142, 105 and 181 [11], as was demonstrated for different MtbB subgroups determined by deletions of RDs 150, 142, 105 and 181 [11], so other factors are involved in regulation of the gene expression. Regardless of geographical origin of the isolates, only the limited proportions of strains belonging to sublineages 3, 4 and 5, according to the classification by Reed et al. [11], produce PGL. All strains from Brazil and all but two strains from Mozambique belonged to the (RD181) sublineage 3, the other two were of the (RD150) sublineage 4, but the PGL production was not determined. A previous study, involving MtbB from patients in Arkansas (US), defined sublineages by characterization of RD105, RD181, RD142, RD150 and RD239, reporting more extrapulmonary TB by isolates that carried deletions RD105, RD181 and RD142/or RD150 [8]. Unfortunately, in our study, no information was available on clinical form of the disease.

In an earlier study, we evaluated phenotypic characteristics of MtbB including replication and induction of cell lysis in THP-1 macrophages and cytokine production as a measure of virulence, observing that MtbB from Brazil had lower virulence than isolates from high prevalence areas of this genotype such as Russia [16] and associated virulence with MDR status. However, our data obtained in this study are in favor of a relation between bacterial virulence and being of the modern MtbB genotype, regardless of geographical origin of isolates. This could be the reason why MtbB isolates are less spreading in Brazil, where the prevalence of ancient strains is higher than in Russia. **Note added in proof:** While this manuscript was in review, we verified virulence of the selected MtbB strains obtained in Brazil, Mozambique and Russia in the model of C57BL/6 mice infection and reported higher virulence of the strains of modern sublineage when compared with those of the ancient sublineage [36].

Acknowledgments

I.M. acknowledges support from the Russian Science Foundation (project 14-14-00292) P.N.S. acknowledges support from the CNPq.

Funding: None.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

Appendix

Table 1
Mtb Beijing isolates genotyping from Brazil, Mozambique, Russia.

MIRUS	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	A	B	C	M4	M21	M29	M30	M34	M39	Q11	Q4156	Q26	MDR-6	MutT 2	MutT 4
3912/02 Brazil/rj	2	1	3	3	2	5	1	7	3	4	3	3	4	2	5	4	5	14	4	3	3	6	2	3	ancestral	mutation 58	mutation 48
2172/03 Brazil/rj	2	2	3	3	2	6	1	7	3	4	3	3	4	2	5	4	5	4	4	3	3	6	2	3	modern	mutation 58	mutation 48
ZT 272 Brazil/sp	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	4	4	4	4	3	3	6	3	7	ancestral	WT	mutation 48
ZT 264 Brazil/sp	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	4	4	4	4	3	3	7	3	7	ancestral	WT	mutation 48
ZT 306 Brazil/sp	2	2	3	3	2	6	1	7	3	5	3	3	2	2	4	4	5	4	4	3	3	5	2	3	ancestral	WT	mutation 48
5351 Brazil/sp	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	5	4	5	4	4	3	3	6	2	3	modern	mutation 58	mutation 48
a 8283 Brazil/sp	2	2	3	3	2	5	1	3	3	5	3	3	4	2	4	4	4	4	2	3	3	7	4	7	ancestral	WT	N/A
a 8975 Brazil/sp	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	4	4	4	4	3	3	5	2	7	ancestral	WT	mutation 48
1471/Russia	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	4	5	4	4	4	3	6	2	7	modern	mutation 58	mutation 48
58/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	4	5	3	3	4	2	4	4	5	4	4	4	3	4	2	N/A	ancestral	N/A	N/A
109/Mozambique	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3	4	2	4	4	5	4	2	3	3	7	2	3	ancestral	N/A	N/A
186/Mozambique	2	2	3	2	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	5	4	5	4	4	3	4	5	2	N/A	ancestral	N/A	N/A
199/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	1	5	3	3	4	2	4	4	5	4	4	3	3	4	2	3	ancestral	N/A	N/A
276/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	2	5	2	2	4	2	4	4	5	4	4	3	4	4	2	7	modern	mutation 58	mutation 48
288/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	4	3	4	2	4	4	5	2	4	4	3	2	2	N/A	ancestral	N/A	N/A
16/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	2	5	3	3	3	2	4	4	5	4	4	4	3	5	2	7	modern	mutation 58	mutation 48
198/Mozambique	2	2	2	3	2	5	1	7	2	5	3	3	4	2	5	4	5	4	4	4	4	6	2	6	modern	mutation 58	mutation 48
284/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	3	5	4	4	4	3	4	2	3	modern	mutation 58	mutation 48
136/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	3	2	4	4	5	4	4	2	4	5	2	3	ancestral	N/A	N/A
299/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	3	5	4	4	3	3	4	2	7	modern	N/A	N/A
392/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	3	2	4	4	5	4	4	4	3	5	2	3	ancestral	N/A	N/A
440/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	4	5	4	4	4	3	5	2	N/A	modern	N/A	N/A
301/Mozambique	2	2	4	3	2	5	1	6	3	5	3	3	2	2	4	4	5	4	4	4	3	3	2	3	modern	mutation 58	mutation 48
84/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3	4	2	4	4	5	4	4	4	3	5	2	7	modern	mutation 58	mutation 48
442/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	4	3	4	2	4	3	5	4	4	3	3	4	2	3	ancestral	WT	WT
467/Mozambique	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	4	3	4	2	4	3	5	4	4	3	3	4	2	7	modern	mutation 58	mutation 48
H37Rv	2	3'	3	2	2	6	1	3	3	3	2	1	4	7	4	2	2	4	3	3	5	5	2	5	ancestral	WT	WT

N/A = Samples without DNA results by insufficient DNA, WT = wild type strain.

References

- [1] Van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JD. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995;33:3234–8.
- [2] Mokrousov I, Jiao WW, Valcheva V, Vyazovaya A, Otten T, Ly HM, Lan NN, et al. Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. *J Clin Microbiol* 2006;44:2851–6.
- [3] Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotypes strain. *Lancet Infect Dis* 2011;10:103–11.
- [4] Kam KM, Yip CW, Tse LW, Wong KL, Lam TK, Kremer K, Au BK, van Soolingen D. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the Beijing family. *J Clin Microbiol* 2005;43:306–13.
- [5] Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, van Soolingen D. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2005;43:314–20.
- [6] Nikolayevskyy V, Gopaul K, Balabanova Y, Brown T, Fedorin I, Drobniewski F. Differentiation of tuberculosis strains in a population with mainly Beijing-family strains. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1406–13.
- [7] Kremer K, van-der-Werf MJ, Au BK, Anh DD, Kam KM, van-Doorn HR, Borgdorff MW, van-Soolingen D. Vaccine-induced immunity circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains. *Emerg Infect Dis* 2009;15:335–9.
- [8] Kong Y, Cave MD, Zhang L, Foxman B, Marrs CF, Bates JH, Yang ZH. Population-based study of deletions in five different genomic regions of *Mycobacterium tuberculosis* and possible clinical relevance of the deletions. *J Clin Microbiol* 2006;44:3940–6.
- [9] Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CR, Kidd M, et al. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol* 2007;45:1483–90.
- [10] Chaiprasert A, Yorsangsukkamol J, Prammananan T, Palittapongarnpim P, Leechawengwong M, Dhiraputra C, et al. Intact *PKS15/1* in non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Emerg Infect Dis* 2006;12:772–4.
- [11] Reed MB, Gagneux S, Deriemer K, Small PM, Barry 3rd CE. The w-Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the *dos r* dormancy regulon constitutively upregulated. *J Bacteriol* 2007;189:2583–9.
- [12] Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, et al. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *PLoS One* 2012;11:4965.
- [13] Viegas SO, Machado A, Groenheit R, Ghebremichael S, Pennhag A, et al. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mozambique. *BMC Microbiol* 2010;195:1–8.
- [14] Viegas SO, Machado A, Groenheit R, Ghebremichael S, Pennhag A, Gudo PS, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype is associated with HIV infection in Mozambique. *PLoS One* 2013;8:e71999.
- [15] Ritacco V, López B, Cafrune PI, Ferrazoli L, Suffys PN, Candia N, Vásquez L, Realpe T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:489–92.
- [16] Lasunskaja E, Ribeiro SC, 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. *J Clin Microbiol* 2010;12:467–75.
- [17] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907–14.
- [18] Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006;44:4498–510.
- [19] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988;26:2465–6.
- [20] Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, Shinnick TM. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1542–6.
- [21] Wada T, Iwamoto T, Maeda S. Genetic diversity of the mycobacterium tuberculosis Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. *FEMS Microbiol* 2009;291:35–43.
- [22] Mokrousov I, Ly HM, Otten T, Lan NN, Vyshnevskiy B, Hoffner S, Narvskaya O. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome Res* 2005;15:1357–64.
- [23] Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, Rauzier J, et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis* 2003;9:838–45.
- [24] Lari N, Rindi L, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C. Mutations *mutT* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of Beijing genotype. *J Med Microbiol* 2006;55:599–603.
- [25] Faksri K, Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Brown T, Prammananan T, Palittapongarnpim P, et al. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family based on IS6110, SNP, LSP and VNTR profiles from Thailand. *Infect Genet Evol* 2011;11:1142–9.
- [26] Constant P, Perez E, Malaga W, Lanéelle MA, Saurel O, Daffé M, Guilhot C, et al. Role of the *PKS15/1* gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the *PKS15/1* gene. *J Biol Chem* 2002;277:38148–58.
- [27] Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A, Morlock GP, Cooksey RC, Zaha A, Rossetti ML. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:4471–4.
- [28] Ramasoota P, Pitaksajjakul P, Phatihattakorn W, Pransujarit V, Boonyasopun J. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Thailand and its evolutionary implication. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37:136–47.
- [29] Gomes HM, Elias AR, Oelemann MA, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol* 2012;4:649–56.
- [30] 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;8:843–9.
- [31] Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Vyazovaya A, Otten T, Vyshnevskiy B. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implication and evolutionary considerations. *J Clin Microbiol* 2004;42:2438–44.
- [32] Jiao WW, Mokrousov I, Sun GZ, Guo YJ, Vyazovaya A, Narvskaya O, Shen AD, et al. Evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing genotype isolates from Beijing, China. *J Clin Microbiol* 2008;46:1045–9.
- [33] Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Millet J, Otten T, Vishnevsky B, Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in Search of informative variable-number tandem-repeat loci. *J Clin Microbiol* 2008;46:3576–84.
- [34] Maeda S, Wada T, Iwamoto T, Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S, et al. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* isolated from throughout Japan: phylogeny and genetic features. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:1201–4.
- [35] Wang W, Hu Y, Mathema B, Jiang W, Kreiswirth B, Xu B. Recent transmission of W-Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* in rural eastern China. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:306–11.
- [36] Ribeiro SC, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MR, 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;52:2615–24.

Isolados de *Mycobacterium tuberculosis Beijing* da sublinhagem moderna estão mais propensos à exibir aumento de virulência do que isolados ancestrais.

Diferenças de virulência entre sublinhagens *Mtb* Beijing foram observadas em estudos recentes, porém propriedades associadas à virulência na sublinhagem ancestral em comparação com a moderna estão apenas começando a serem investigadas (MERKER, 2014).

Para preencher esta lacuna de conhecimento, tivemos como objetivo (objetivo específico 3) caracterizar propriedades biológicas associadas à virulência, por infecção *in vitro* e *in vivo*, em isolados pertencentes a diferentes subgrupos da família Beijing. Os resultados gerados culminaram na publicação do artigo "*Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage", publicado pelo Journal of Clinical Microbiology, edição 2014. 7 (52)2615–2624, do qual sou a segunda autora.

Neste artigo avaliamos um grupo homogêneo de isolados *Mtb* Beijing, todos pertencentes a mesma classificação filogenética quando avaliados por 24 MIRU-VNTR e RD181, mas que apresentaram diferentes marcadores genéticos para as sublinhagens ancestral e moderno. Foram analisados três isolados *Mtb* Beijing ancestrais e quatro *Mtb* Beijing modernos, sendo que esses possuíam origens geográficas diferentes com baixa prevalência, e um isolado pertencente ao cluster B0/W148 com alta prevalência na Rússia, por infecção em camundongo C57BL/6 e em macrófago THP-1.

Nesta análise, propriedades associadas à virulência dessas cepas foram avaliadas a partir da observação da sobrevivência, carga bacilar e nível de patologia presente no pulmão de animais infectados. Além disso, a infecção de macrófagos obtidos através da medula desses camundongos também foi avaliada, observando-

se o crescimento intracelular e indução de necrose, por esses mesmos isolados *Mtb* Beijing.

Os dados obtidos confirmaram que os isolados da linhagem Beijing moderna, de origem endêmica ou esporádica, são mais propensos a exibir propriedades biológicas que contribuem para a virulência, do que as estirpes da sublinhagem Beijing ancestral. Porém esses dados não excluem a possibilidade da sublinhagem ancestral apresentar virulência acentuada. Este artigo descreveu de forma pioneira propriedades biológicas relacionadas com virulência em modelo animal que explicam o sucesso competitivo e de dispersão da sublinhagem Beijing moderna em várias regiões do mundo.

Neste trabalho, toda a parte de genotipagem dos isolados foi realizada por mim, como parte desta tese, no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Micobactérias. Esta etapa foi essencial para a seleção das amostras, bem como para a realização dos demais experimentos e discussão dos resultados. Ainda, acompanhei os ensaios de infecção de macrófagos THP-1, realizados no Laboratório de Biologia do Reconhecer, no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Os experimentos de infecção em modelo animal foram realizados no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo –USP pelo Dr. Eduardo Amaral – e embora eu não tenha participado dos experimentos propriamente ditos, participei da discussão dos resultados. Os resultados e suas referidas discussões estão mais detalhados no artigo mencionado, que segue abaixo.

Mycobacterium tuberculosis Strains of the Modern Sublineage of the Beijing Family Are More Likely To Display Increased Virulence than Strains of the Ancient Sublineage

Simone C. M. Ribeiro,^a Lia Lima Gomes,^b Eduardo P. Amaral,^c Marcelle R. M. Andrade,^a Fabricio M. Almeida,^a Andreza L. Rezende,^a Verônica R. Lanes,^a Eulógio C. Q. Carvalho,^a Philip N. Suffys,^b Igor Mokrousov,^d Elena B. Lasunskaja^a

Laboratory of Biology of Recognition and Laboratory of Animal Morphology and Pathology, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos, Rio de Janeiro, Brazil^a; Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil^b; Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^c; Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation^d

Strains of the Beijing genotype family of *Mycobacterium tuberculosis* are a cause of particular concern because of their increasing dissemination in the world and their association with drug resistance. Phylogenetically, this family includes distinct ancient and modern sublineages. The modern strains, contrary to the ancestral counterparts, demonstrated increasing prevalence in many world regions that suggest an enhanced bacterial pathogenicity. We therefore evaluated virulence of modern versus ancient Beijing strains with similar epidemiological and genotype characteristics. For this, we selected six strains that had very similar 24-locus mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) typing profiles and belonged to the region of difference 181 (RD181) subgroup but differed using markers (*mutT2* and *mutT4* genes and NTF locus) that discriminate between modern and ancient Beijing sublineages. The strains were isolated from native patients in Brazil and Mozambique, countries with a low prevalence of Beijing strains. The virulence levels of these strains were determined in models of pulmonary infection in mice and *in vitro* macrophage infection and compared with that of a strain from Russia, part of the epidemic and hypervirulent Beijing clone B0/W148, and of the laboratory strain H37Rv. The results showed that two of the three modern Beijing strains were highly pathogenic, exhibiting levels of virulence comparable with that of the epidemic Russian strain. In contrast, all isolates of the ancient sublineage displayed intermediate or low virulence. The data obtained demonstrate that the strains of the modern Beijing sublineage are more likely to exhibit highly virulent phenotypes than ancient strains and suggest that genetic alterations characteristic of the modern Beijing sublineage favor selection of highly virulent bacteria.

Despite extensive surveillance, tuberculosis (TB) remains a serious public health problem. In different parts of the world, there is concern about TB caused by the East Asian/Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis*, demonstrating increasing prevalence in the global *M. tuberculosis* population (1). Clinical and epidemiological studies demonstrated that emergence of the Beijing strains could be associated with high levels of bacterial resistance to multiple drugs (2, 3) and enhanced pathogenicity of these strains, leading to increased transmissibility (4) and rapid progression from infection to active disease (5). However, the data on evaluation of the virulence of Beijing isolates were inconclusive, demonstrating a wide range of inflammatory and virulence phenotypes, as determined in animal models (6, 7, 8) and *in vitro* models of macrophage infection (9, 10).

Such differences in the virulence of Beijing strains could be associated with genetic heterogeneity of the Beijing *M. tuberculosis* lineage. Indeed, bacterial genotyping and sequencing demonstrated that the Beijing lineage, having in common a characteristic spoligotype signature and lack of the region of difference 105 (RD105) and RD207, has evolved into several subgroups that are defined by deletion of other regions, such as RD181, RD150, and RD142 (11, 12). While the large RD181 deletion occurred early in evolution of the Beijing lineage and is found in most of the Beijing strains, the more recent RD150 and RD142 deletions were described in different unrelated strains, demonstrating their homoplasy and hence limited utility for phylogeny (13). Additional subdivision of the Beijing lineage is currently based on the presence of IS6110 insertions

in the NTF chromosomal region (14, 15) and on detection of alterations in putative mutator genes, *mutT2* and *mutT4* (13, 16). The ancient (atypical) sublineage is characterized by an intact NTF region and includes strains with intact RD181 (“more ancient” strains), as well as strains with deleted RD181 (“classical” ancient strains). The strains of modern (typical) Beijing sublineage differ from the ancient strains by presentation of either a single (most of the modern Beijing sublineage) or two IS6110 insertions (W sublineage) in the NTF region (14, 15). Verification of unique missense alterations in *mut* genes demonstrated that the most ancestral strains possess intact *mut* genes. The downstream ancient strains were discriminated by detection of a single nucleotide polymorphism (SNP) in codon position 48 of the *mutT4* gene, changing CGG (Arg) to GGG (Gly), whereas the modern strains of the RD181 subgroup, and all other descendant branches, were characterized by an additional *mutT2* mutation at codon position 58, changing GGA (Gly) to CGA (Arg), in addition to the modified NTF region

Received 19 February 2014 Returned for modification 27 March 2014

Accepted 9 May 2014

Published ahead of print 14 May 2014

Editor: G. A. Land

Address correspondence to Elena B. Lasunskaja, elena@uenf.br.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00498-14

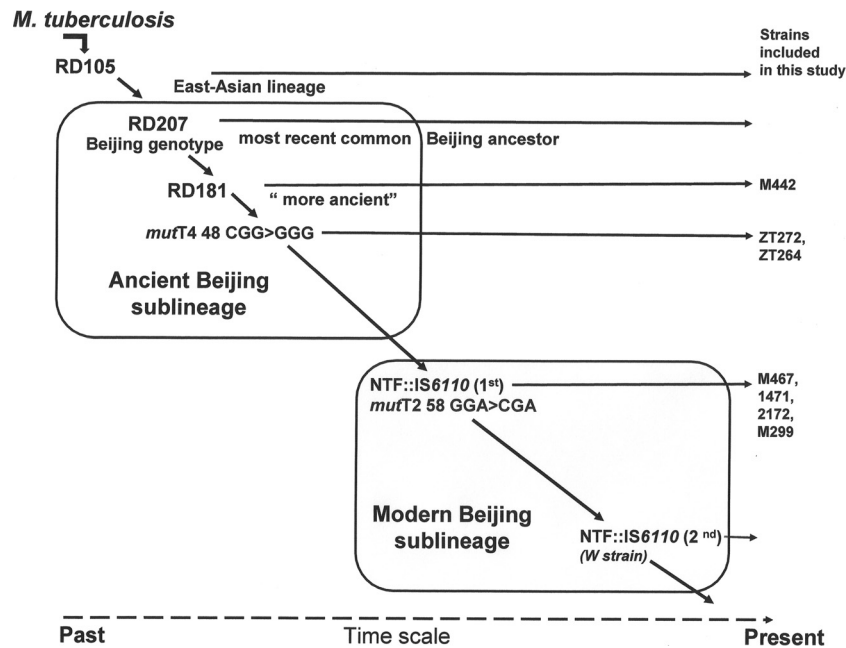


FIG 1 Genetic polymorphisms determining phylogeny of East Asian/Beijing lineage of *M. tuberculosis* respective to isolates included in this study.

(16). The summary of main phylogenetic markers discriminating ancient and modern strains of the Beijing lineage is presented in Fig. 1.

Epidemiological studies evaluating dissemination of different phylogenetic groups of the Beijing *M. tuberculosis* family in different regions of the world demonstrated that the growing prevalence of Beijing TB is driven by strains of the modern sublineage, not ancient Beijing strains (5, 17, 18). These observations lead us to speculate that the supposed enhanced virulence and transmissibility, promoting dissemination of the Beijing strains, could be associated predominantly with strains of the modern sublineage.

Virulence-associated properties of modern and ancient Beijing strains, comparing different phylogenetic subgroups of the Beijing family, are only starting to be investigated. In a previous study, Aguilar and colleagues investigated Beijing strains from distant phylogenetic groups and observed increased virulence of highly transmissible strains of the recently evolved modern sublineage (sublineage 7, RD150 subgroup), compared with orphan strains of the phylogenetically distant ancient sublineage (8). In the present study, we aimed to study a more homogeneous group of Beijing strains that belonged to the same RD181-defined phylogenetic group and presented considerable similarity in 24 MIRU-VNTR-defined genotypes but differed in genetic markers characteristic for ancient and modern sublineages. In an epidemiological sense, the strains were considered sporadic, as being isolated from unique cases of TB in countries with low prevalence of Beijing strains.

Our results demonstrate that two of the three strains of the modern Beijing sublineage studied, in contrast to the ancient strains, displayed increased levels of virulence comparable with that of the epidemic hypervirulent modern Beijing strain from Russia. These data corroborate the hypothesis that evolution of the Beijing *M. tuberculosis* lineage led to accumulation of genetic polymorphisms that enhanced bacterial virulence.

MATERIALS AND METHODS

Mycobacterial isolates and genotype classification. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype were collected over a 6-year period (2001 to 2007) from native TB patients attending primary health care clinics in Rio de Janeiro and Sao Paulo in Brazil (19) and in Maputo and the Maputo province in Mozambique (20) as a part of molecular epidemiology studies in these countries. The Russian *M. tuberculosis* isolate 1471 was isolated from a patient with pulmonary TB in the St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, Russia, and kindly provided by B. Vishnevsky. This isolate was assigned to the Beijing genotype B0/W148 clone by IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing as described in our previous publication (19). The laboratory *M. tuberculosis* strain H37Rv (ATCC) was obtained from the Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. The *M. tuberculosis* isolates were obtained as Lowenstein-Jensen slants of low-passage-number cultures and stored frozen at -80°C as aliquots of 10^8 bacilli/ml in complete 7H9 Middlebrook medium supplemented with 10% albumin-dextrose-catalase (ADC) enrichment (Difco) and 0.05% Tween 80. The number of further culture passages was kept to a minimum.

The Beijing genotype of all isolates was confirmed by spoligotyping, and all presented the Beijing shared international type 1 (SIT 1). Additionally, the strains were tested for regions of difference (RDs), RD105, RD142, RD150, and RD181 by multiplex PCR and analysis of amplicon size on agarose gels (5). The strains were submitted to mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) analysis, using standardized 24-locus MIRU-VNTR typing (21). Verification of the presence of SNPs in the *mutT2* and *mutT4* genes was performed by direct sequencing of PCR product generated as described previously (22). Further characterization of the modern/typical and ancestral/atypical sublineages was done following the NTF locus-based evolutionary framework of the Beijing genotype (15) and using primers MDR6-F (MDR stands for multidrug resistance, and F stands for forward), MDR6-R (R stands for reverse), MDR7-F, and MDR7-R to detect IS6110 insertions in the NTF region (14).

Mouse infections. Specific-pathogen-free C57BL/6 mice (8 to 10 weeks old) were purchased from the Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas at the University of Sao Paulo (USP). The mice were main-

TABLE 1 Genetic characteristics of the *M. tuberculosis* strains included in this study

Strain	Family	Geographic origin	24-locus MIRU-VNTR ^a	Insertion of IS6110 in NTF regions	<i>mutT2</i>	<i>mutT4</i>	Sublineage
H37RV		ATCC					
M442	Beijing	Mozambique	223325173543424354433427	No insertion	Free of mutation	Free of mutation	Ancient
zt272	Beijing	Brazil	223325173533424444433637	No insertion	Free of mutation	Mutation codon 48	Ancient
zt264	Beijing	Brazil	223325173533424444433737	No insertion	Free of mutation	Mutation codon 48	Ancient
M467	Beijing	Mozambique	223325173543424354433427	One insertion	Mutation codon 58	Mutation codon 48	Modern
1471	Beijing	Russia	223325173533424454443627	One insertion	Mutation codon 58	Mutation codon 48	Modern
2172	Beijing	Brazil	223326173433425454433623	One insertion	Mutation codon 58	Mutation codon 48	Modern
M299	Beijing	Mozambique	223325173533424354433427	One insertion	ND ^b	ND	Modern

^a For the MIRU-VNTR data, the loci differed in repeat numbers are underlined.

^b ND, not defined.

tained in microisolators in a biosafety level 3 animal facility at the Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). All experimental protocols were approved and performed according to the guidelines set by the Institutional Animal Care and Use Committee of the UENF.

The *M. tuberculosis* strains were thawed and cultured for 5 days in complete Middlebrook 7H9 broth to optimize viability of the thawed bacteria. Suspensions were sonicated, vortexed, and kept for 10 min for sedimentation of eventual clumps. The culture supernatant was microscopically verified for the absence of clumps larger than five bacteria and adjusted to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.1 using densitometry. Bacteria were inoculated in the mouse intratracheally (i.t.), either at low dose (10² bacilli) or high dose (2.5 × 10³ bacilli) in 60 μl of phosphate-buffered saline (PBS), while the control group was inoculated with sterile PBS. Infection experiments were performed in triplicate. The efficiency of targeting of the inoculum was confirmed by culture of lung homogenates, obtained 18 h postinfection (p.i.) (day 0), on plates with complete Middlebrook 7H10 agar supplemented with oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) enrichment (Becton, Dickinson, USA), and the numbers of CFU were enumerated 21 days later.

Animal survival and lung bacillus loads. For evaluation of animal survival, groups of 10 mice were infected with either low or high doses of bacilli and observed during 350 or 150 days postinfection, respectively. All mice were monitored twice per week until moribund and then sacrificed. For quantification of the bacterial loads in the lungs, three animals from each group infected with the low dose of bacilli were sacrificed at 28 and 120 days after infection. The entire lungs and separated upper lobes of the right lungs, indicative for bacterial burdens, were weighed. The lobes were homogenized, and serial dilutions of the homogenates were plated on Middlebrook 7H10 agar for the CFU test. Results were expressed as log₁₀ CFU per organ.

Lung pathology. The left lungs were fixed in 10% buffered formalin, photographed to evaluate morphological changes, and subsequently embedded in paraffin. For histopathological studies, serial 4- to 5-μm sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to visualize tissue alterations and by the Ziehl-Neelsen method to detect the presence of acid-fast bacteria (BAAR). The samples were examined with an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc.), and the images of lung sections from four mice per group were captured by Coolpix P995 (Nikon)-coupled device camera. For the morphometric analysis, photographs were taken using a magnification of ×10, and the Image J program (NIH, Bethesda, MD) was utilized to objectively assess the area of inflammation. Color images were converted to white/black images, and a contrast cutoff was established to allow software identification of aerated areas (in black) and nonaerated areas, including both inflamed and noninflamed tissue (in white). To quantify the percentage of nonaerated area, we determined the mean percent white area for 10 lung sections of control uninfected mice and each of the different infected groups. To quantify the percentage of inflamed tissue (area of pneumonia), the mean percent tissue area of control mice was subtracted from that of each infected group.

The numbers of lung-infiltrating cells were determined by quantifica-

tion of the cells obtained from enzymatically digested lung tissue. Two lobes of the right lungs were mechanically dissected, resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco, USA) complemented with Liberase (Sigma-Aldrich; 2 μg/ml) and type IV bovine pancreatic DNase (Roche Diagnostic; 1 μg/ml), and incubated at 37°C for 45 min. Cell concentrations were determined by Neubauer chamber cell counting.

Cell culture of bone marrow-derived macrophages and macrophage infection. The bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained through the cultivation of bone marrow cells of C57BL/6 mice in Dulbecco's modified Eagle medium–nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) complemented with 20% L929 cell-conditioned medium (as a source of macrophage colony-stimulating factor [M-CSF] to induce macrophage differentiation), as previously described (23). The cells were infected with the mycobacterial strains at a multiplicity of infection (MOI) of 1:1 bacterium/macrophage. After 3-h incubation, the cultures were washed with PBS and cultured in DMEM-F12 medium containing 2% fetal bovine serum (FBS) for 6 days. The CFU test was employed to quantify intracellular growth of mycobacteria. For this, the infected cultures were lysed on day 0 and day 6 by adding 0.1% saponin for 10 min, and homogenates were cultured in triplicate by plating onto complete Middlebrook 7H10 agar. Induction of necrotic cell death was evaluated in the BMDM cultures infected at an MOI of 10:1 by the lactate dehydrogenase (LDH) test, using LDH cytotoxicity assay kit (Doses, Goiânia, Brazil). Cell lysates obtained via treatment with 1% Triton X-100 were used as a positive control, and the rate of LDH release was calculated using the formula: (supernatant value – blank value)/(lysate value – blank value) × 100%.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Prism4 GraphPad software. Survival Kaplan-Meier curves were compared by log rank test. To compare multiple groups, one-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Bonferroni's multiple-comparison test.

RESULTS

Genetic characteristics of the Beijing strains selected for virulence evaluation. In our previous study, we performed genotyping of 28 Beijing *M. tuberculosis* strains isolated from native TB patients in Brazil (*n* = 10) and Mozambique (*n* = 18) from native patients with TB (L. L. Gomes, S. Vasconcellos, H. M. Gomes, A. Elias, A. Rocha, S. Ribeiro, A. Panunto, L. Ferrazoli, M. Telles, M. Ivens de Araujo, A. Kritski, I. Mokrousov, O. Manicheva, E. Latsunskaja, and P. Suffys, submitted for publication). For this work, we selected three ancient strains and three modern strains, determined by SNP analysis in the *mutT2* and *mutT4* genes and IS6110 insertions in the NTF region, with similar genotype characteristics (Table 1). These strains belonged to the RD181 Beijing subgroup, characterized by deletion of the RD181 region, and presented related genotypes determined by 24-locus MIRU-VNTR genotyping (triple locus variation at most). The laboratory *M. tuberculosis* strain H37Rv was included as a reference strain with a moderate

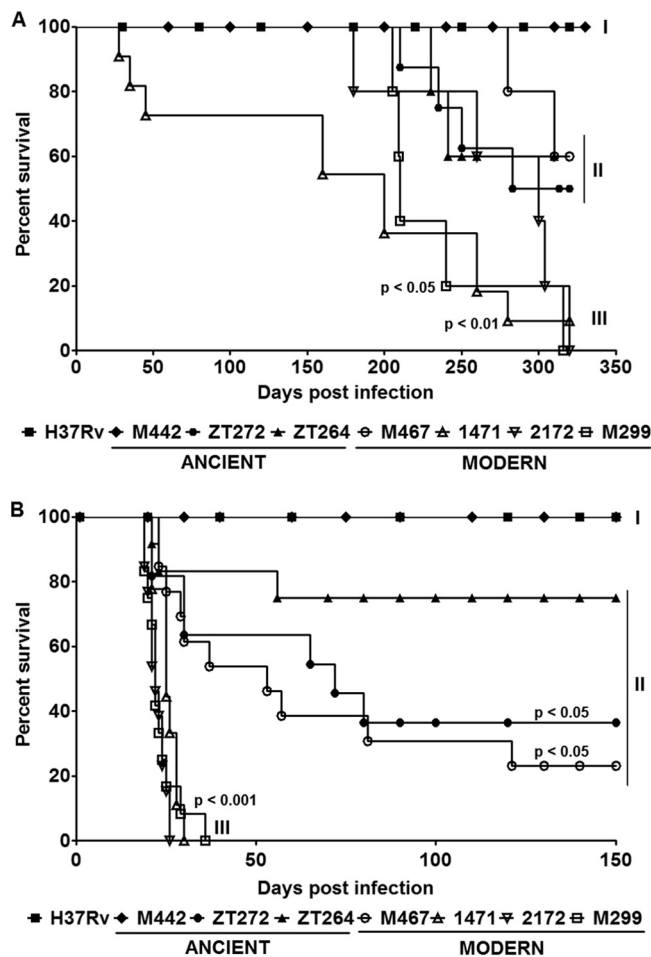


FIG 2 Survival of mice after infection with *M. tuberculosis* Beijing strains of modern and ancient sublineages. C57BL/6 mice were i.t. infected with low doses (10^2 CFU) (A) and high doses (2.5×10^3 CFU) (B) of each strain and observed for 320 days and 150 days, respectively. The data were obtained in three independent experiments with 10 to 15 mice in each group. Kaplan-Meier curves and log rank test were used to evaluate statistical significance. Statistically significant differences between each group infected with the individual clinical isolate and the group infected with strain H37Rv are presented. Three different patterns of animal survival are indicated (pattern I, II, and III).

level of virulence, and the Beijing strain 1471, representing Russian epidemic clone B0/W148 (17), was included as a reference strain with high virulence. Genetic analysis demonstrated that strain 1471 differed in three, four, or five MIRU-VNTR loci from the modern isolates selected for this study (Table 1).

Survival times of mice infected with *M. tuberculosis* strains at low and high doses of bacilli. To determine the relative virulence of the *M. tuberculosis* strains, we employed an established model of pulmonary infection of C57BL/6 mice. In animals inoculated i.t. with 10^2 CFU of each strain, three patterns of animal survival were observed (Fig. 2A). Eighty percent of mice of the groups infected with modern Beijing strains 1471, 2172, and M299 succumbed to death within a 260-day period (pattern III), while mice infected by strain 1471 started to die earlier, at the end of the acute phase of infection, 27 days p.i. In contrast, all mice infected with the H37Rv strain and ancient Beijing strain M442 were alive after 1 year, demonstrating relatively low virulence of

these strains (pattern I). The animals infected with other Beijing strains survived up to the late phase of chronic infection of 200 days p.i., starting to die later on (pattern II). The mice infected with the modern Beijing strains generally succumbed more rapidly than those infected with the strains of ancient Beijing sublineage; however, only two groups of infected animals (strains 1471 and M299) presented significant differences in mortality rate compared with the group of H37Rv-infected mice ($P < 0.05$).

For better discrimination of the virulence of studied Beijing strains, the mice were also infected with a higher dose of 2.5×10^3 bacilli/mouse (Fig. 2B). While three of the modern Beijing strains (strains 1471, M299, and 2172) caused death of all infected animals within 35 days p.i. (pattern III), the animals infected with strains H37Rv and M442 maintained viability during the whole period of observation of 150 days (pattern I) ($P < 0.001$). The mortality rate of mice in other groups was variable. The animals infected with strains M467, zt272, and zt264 started to die at the acute stage of infection, but a considerable numbers (between 30% and 70%) were able to survive within the period of observation (pattern II). Our data (Fig. 2A and B) demonstrate that three of the four strains of the modern Beijing sublineage (strains 1471, M299, and 2172) were highly virulent, whereas one modern strain (M467) and two strains of the ancient sublineage displayed intermediate levels of virulence. The reference strain H37Rv and strain M442 of the ancient sublineage demonstrated relatively low virulence in our experimental model.

Bacterial loads in the lungs of mice infected with low bacterial dose. At the acute stage of infection, all isolates except strain M442 grew faster in the lungs than strain H37Rv (Fig. 3). Bacterial loads of the modern strains measured at 28 days p.i. varied on average between log 7.0 and log 8.0, whereas that of the strain H37Rv and ancient strain M442 was lower than log 6.0 (Fig. 3A). The growth of the modern strains was on average higher than that of the ancient strains; however, the difference was not statistically significant.

Growth curves of the bacteria studied were monitored up to day 120 p.i., with more-detailed analysis of growth kinetics of strains 1471, zt272, and H37Rv. The data presented in Fig. 3B demonstrated that the bacterial loads increased up to day 21 p.i. and was then contained, suggesting inhibitory effect of acquired immunity established 3 to 4 weeks after infection. At the chronic phase of lung infection, the levels of viable bacteria were maintained without significant reduction of the CFU numbers and were similar for all studied strains (Fig. 3B).

Pathological alterations in the lungs of mice infected with low *M. tuberculosis* dose. To further define the virulence of the studied strains, we compared their ability to induce lung pathology, evaluating macropathological (Fig. 4) and histopathological changes (Fig. 5).

The lungs of mice infected with the clinical isolates presented clearly visible large or small white tuberculous nodules, hardly detectable in mice infected with the laboratory H37Rv strain and strain M442, defined as pattern I strains (Fig. 4A). Particularly large and coalescing masses of the inflammatory nodes were observed in the case of modern strains M299, 2172, and 1471 (pattern III strains), and lung weights in these cases were 1.5- to 2.0-fold higher than those of mice infected with the pattern I strains ($P < 0.001$) and 1.3-fold higher ($P < 0.05$) compared with the pattern II strains (Fig. 4B). The increase in lung mass was associ-

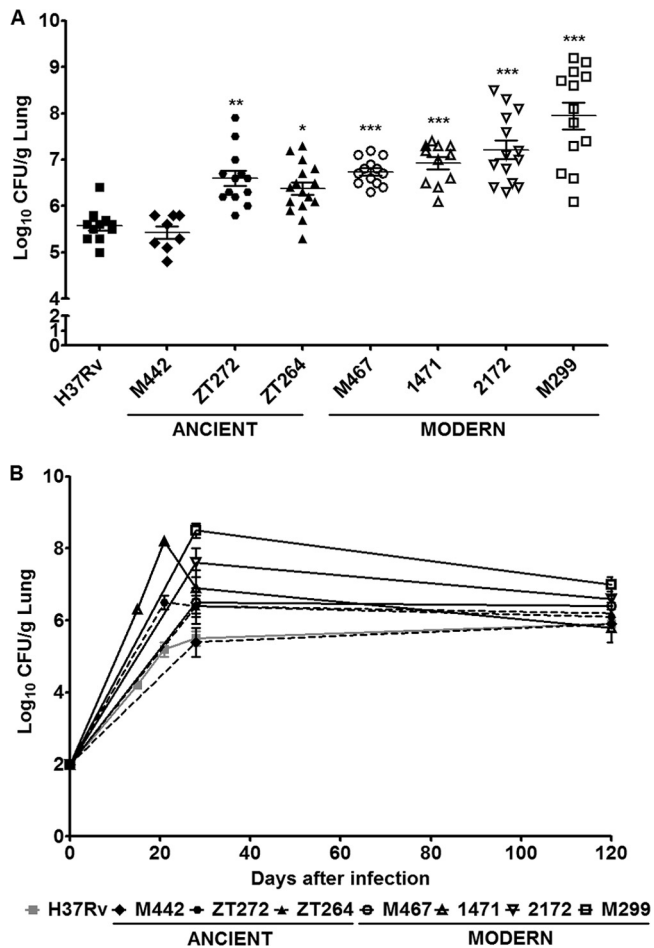


FIG 3 Bacterial growth in the lungs of mice infected with *M. tuberculosis* Beijing strains of modern and ancient sublineages. C57BL/6 mice were i.t. inoculated with 10^2 bacilli of each strain, and lungs were examined for the bacterial growth by CFU test. (A) Bacterial burdens in the lungs determined 28 days p.i. Each symbol represents the value for an individual mouse. (B) Bacterial curves within 120 days p.i. Results of at least three experiments (three mice in each group at each time point) are expressed logarithmically as the mean \log_{10} CFU \pm standard deviation (SD) (error bars). Mean values that were significantly different from the mean value of the group infected by H37Rv strain are indicated by asterisks as follows: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

ated with a rise in the number of cells infiltrating infected lungs (Fig. 4C).

According to the gross pathology data, three distinct histopathological patterns that differed in the severity of lesions were observed 28 days p.i. In the lungs of mice infected with the ancient Beijing strain M442 and strain H37Rv, exhibiting minimal signs of gross pathology (pattern I), the tissue lesions were presented by small numbers of granulomas, formed by recruited macrophages and lymphocytes (Fig. 5A). Ziehl-Neelsen staining revealed few intracellular mycobacteria in macrophages (Fig. 5B). In mice infected with the more virulent pattern II strains (modern strain M467 and ancient strains zt272 and zt264), pulmonary granulomas were larger and coalescing, and the cellular lymphohistiocytic infiltrates occupied significantly larger areas (up to 40%) of the lung on average (Fig. 5C). The most striking differences were observed in mice infected with the modern pattern III strains. These

strains induced rapidly expanding lesions leading to occupation of an average of 70% of the lung by inflammatory cells (Fig. 5C), also presenting extensive areas of alveolitis, with thickened alveolar walls and alveoli filled with histiocytic macrophages, lymphocytes, and neutrophils. Some of the pneumonic lesions progressed to necrosis, presenting acellular areas with disrupted alveoli (Fig. 5A) and numerous intracellular and extracellular bacteria in necrotic areas (Fig. 5B). Intrabronchial cellular exudates with large numbers of bacteria were observed only in the mice infected by highly virulent strains (data not shown).

Evaluation of virulence-associated properties of modern and ancient Beijing strains in the *in vitro* model of macrophage infection. To study bacterial properties determining differential growth of the *M. tuberculosis* strains in lungs at the initial stage of infection, we compared the capacity of the studied strains to replicate in cultured macrophages, as well as their capacity to induce cell necrosis, measured by the LDH test.

Bone marrow-derived macrophages from C57BL/6 mice cultured *in vitro* were infected, and bacterial intracellular growth within a 6-day period, as well as macrophage death, were evaluated. The data presented in Fig. 6 demonstrate that the modern Beijing strains 1471, 2172, and M299 presented faster multiplication in macrophages than other studied strains ($P < 0.01$). At a higher dose of infection (MOI of 10), strains 1471, 2172, and M299 and the ancient strain zt264 induced higher levels of necrotic macrophage death. The release of LDH in cultures infected by these strains was significantly higher than that in cultures infected by strain H37Rv ($P < 0.05$). These data demonstrate that modern Beijing strains (pattern III strains 1471, 2172, and M299) displayed increased virulence in the macrophage model of infection, suggesting that macrophage inhibition could contribute to the pathogenicity of these bacterial strains.

DISCUSSION

In order to understand better the recent worldwide dissemination and increasing prevalence of the modern sublineage of Beijing/East Asian *M. tuberculosis* lineage, we verified the pathogenicity of modern and ancient Beijing strains with related genotypes and similar epidemiological characteristics. For this, we focused our study on the strains of the major RD181 phylogenetic subgroup of the Beijing family, characterized by the deletion of RD181 and without phylogenetically ambiguous deletions RD150 and RD142. Strains of the RD181 subgroup, which includes strains of both the ancient and modern sublineages (13), were isolated more frequently than strains of other Beijing subgroups in non-East Asian regions, such as the United States (24), Peru (18), and Mozambique (25).

Six sporadic Beijing strains of the RD181 group, including three modern strains and three ancient strains with relatively similar 24-locus MIRU-VNTR genotypes, were evaluated in a well-established model of pulmonary infection of C57BL/6 mice. Three distinct virulence patterns were observed, the first of relatively low virulence (pattern I), the second of intermediate virulence (pattern II), and the third defined by highly virulent strains (pattern III). High virulence was exhibited by two of the three strains with the modern genotype that were isolated in Mozambique (strain M299) and Brazil (strain 2172), and their level of virulence was similar to that of the modern strain 1471 representing the successful Russian clone of the Beijing genotype (17). The pattern II strains included isolates of both sublineages (modern strain M467

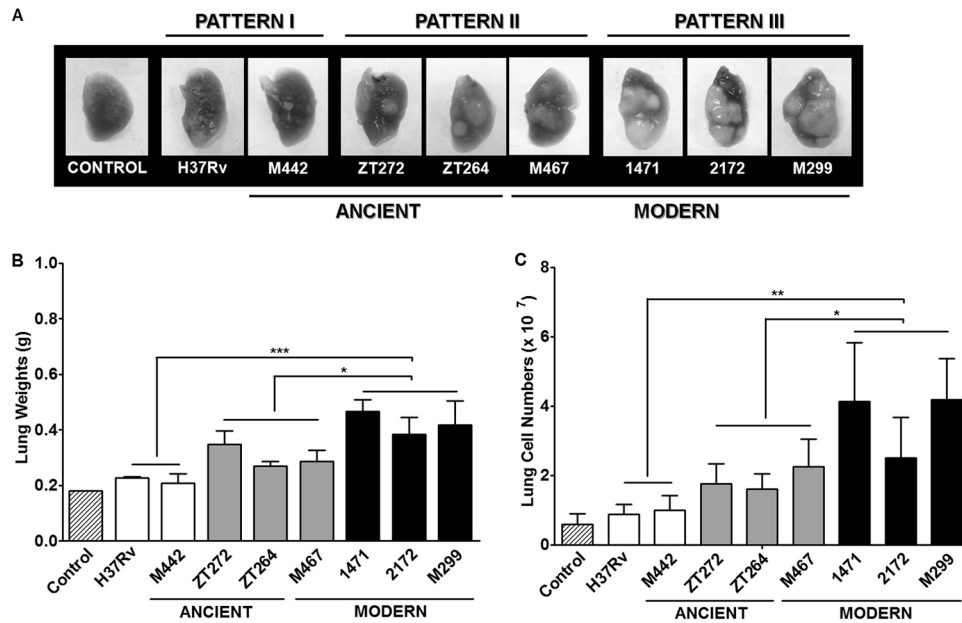


FIG 4 Macropathological changes in the lungs of *M. tuberculosis*-infected mice. C57BL/6 mice were i.t. infected with 10^2 bacilli of each strain, and lungs were examined 28 days p.i. (A) Representative macroscopic lung images demonstrating gross pathology, observed as numerous giant inflammatory lesions (white nodes of different size). (B and C) Lung weights (B) and numbers of cells obtained from lungs after mechanical and enzymatic tissue disruption (C). Results of at least three experiments (three mice in each group in each experiment). Data represent means plus standard deviations (SD) (error bars). Significant differences were determined between the groups of pattern III strains (black columns), pattern II strains (gray columns), and pattern I strains (white columns). Values that are significantly different for the different groups of strains (groups with different patterns) are indicated by asterisks as follows: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

and ancient strains zt272 and zt264), while group I strains were represented by the “more ancient” strain M442 (characterized by wild-type *mutT2* and *mutT4* alleles [Fig. 1]) and the laboratory strain H37Rv. The difference between the highly virulent modern strains (pattern III) and the ancient strains, particularly strain M442, was striking. Survival of mice infected with pattern III bacteria at a high dose of infection was limited to 25 to 35 days p.i., whereas a large proportion of mice infected with moderately virulent strains maintained viability up to 120 days p.i.; no reduction of animal viability was observed in the group infected with pattern I strains, including strain H37Rv. It should be noted, however, that the laboratory strain H37Rv used in our experiments presented a lower level of virulence compared to the virulence of this strain reported in other studies using a similar murine model of infection (26, 27). This could be due to genetic variability of independent sublineages of this strain that evolved in different laboratories and possibly is linked to phenotype variability (28).

The higher virulence of modern Beijing strains observed in this study was based on the ability of these bacteria to induce severe lung pathology, rather than on increased bacterial growth in lungs that was only slightly higher than that of the ancient strains. Extensive pneumonia with areas of necrosis occupying up to 80% of the organ was associated with enhanced inflammatory cell recruitment to the lungs. The results of macrophage infection *in vitro* demonstrated higher ability of these strains to induce necrotic macrophage death known to lead to liberation of mycobacteria and a variety of cellular components called the “danger” signals. Release of these components enhances recruitment of phagocytic leukocytes, including neutrophils, that promote, on one hand, elimination of the bacteria by oxidative burst, but aggravate pa-

thology by collateral tissue damage contributing to lung necrosis (29).

The main limitation of this study, as well as other virulence challenge studies comparing different phylogenetic groups of *M. tuberculosis* strains in animal models of infection (8, 30), is a relatively small number of strains that can be investigated in each experimental setting. Combining analysis of published reports determining virulence of the Beijing strains, that were further discriminated as strains of modern or ancient Beijing sublineages, allows comparison of larger samples of the characterized strains of each sublineage. The strains determined in earlier studies as highly virulent, including strains HN878, W10, 210, and SA161 (31, 32, 33, 34) were further identified as strains of the modern Beijing sublineage (35), whereas the less virulent strains, such as strains NHN5 and N4 (31, 34), belonged to the ancient sublineage (35, 36). In accordance with these observations, some isolates of a recently evolved modern Beijing sublineage (sublineage 7, RD150 group) were more virulent in mice than the ancient strains (8). It should be noted that most of these modern strains came from environments where they caused large numbers of clustered secondary cases of TB in immunocompetent individuals, therefore demonstrating high transmissibility, whereas the ancient strains were isolated from unique TB cases or groups of immunocompromised patients. The data obtained in the present study show that sporadic strains of the modern Beijing sublineage isolated in regions with low prevalence of Beijing strains, but not the ancient strains, could exhibit high levels of virulence comparable with those of the epidemic modern strains in the emerging regions. These data, however, do not exclude the possibility that some strains of the ancient Beijing sublineage display high virulence. A

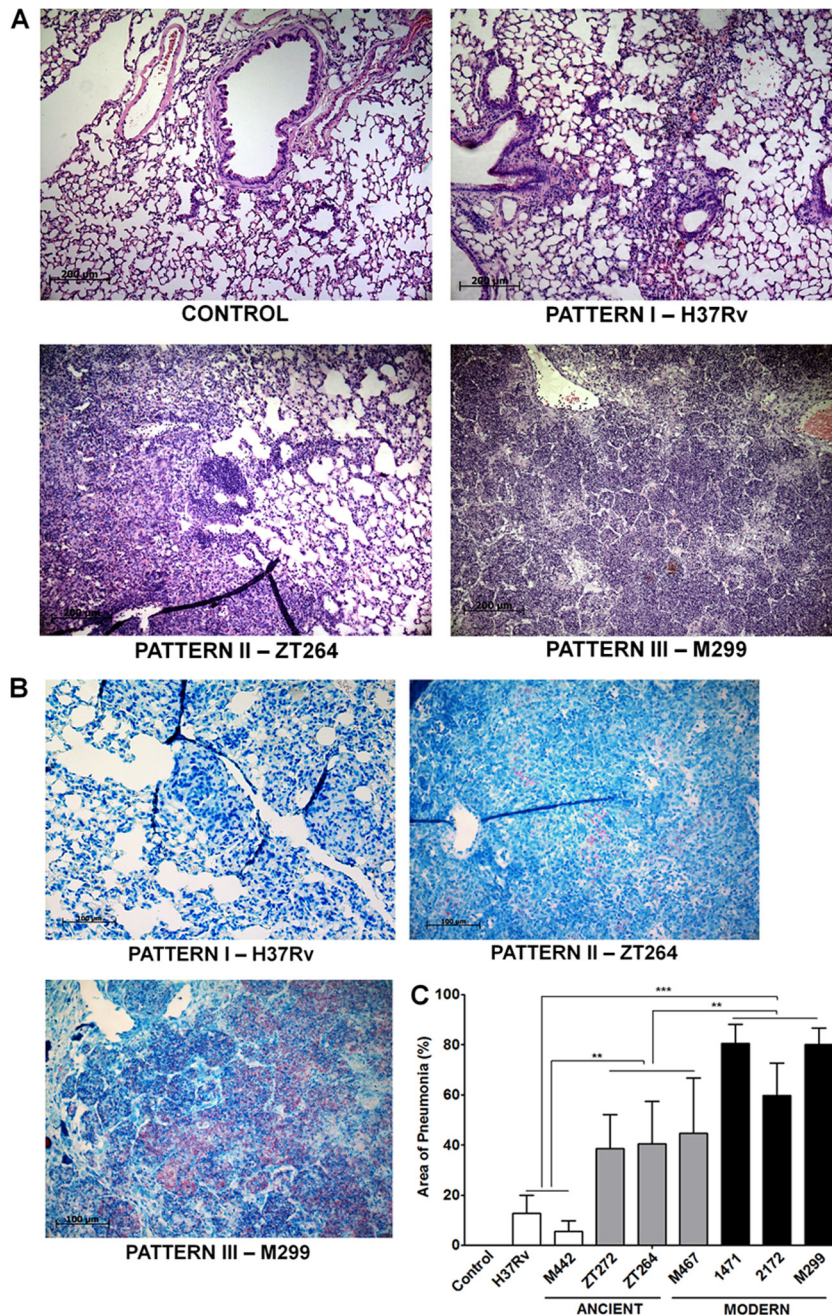


FIG 5 Histopathological changes in the lungs of *M. tuberculosis*-infected mice. The lungs were obtained from infected mice as described in the legend to Fig. 3. (A) Representative hematoxylin-and-eosin-stained lung sections, demonstrating three main pathological patterns. Bars, 200 μ m. (B) Representative lung sections stained by Ziehl-Neelsen method. In pattern I, induced by the strains H37Rv and M442, small and medium-sized peribronchial and perivascular granulomas, consisting of macrophages and lymphocytes, are observed. Small numbers of intracellular bacteria are seen. In pattern II, induced by strains zt264, zt272, and M467, moderate, multifocal granulomatous pneumonia is observed. Increasing numbers of intracellular bacteria are seen. In pattern III, induced by strains M299, 2172, and 1471, extensive diffuse granulomatous pneumonia with areas of necrosis and alveolitis is observed. Large numbers of intracellular and extracellular bacteria are seen. Bars, 200 μ m. (C) Morphometric analysis of the inflammatory lung area. Results of two experiments (three mice in each group in each experiment). Data represent means plus SD. Significant differences were determined between the groups of pattern III strains (black columns), pattern II strains (gray columns), and pattern I strains (white columns) and indicated by asterisks as follows: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

previous study (30) in San Francisco, CA, demonstrated that some of the ancient Beijing strains (the RD207 subgroup) exhibited levels of virulence similar to or even higher than those of the modern Beijing strains isolated in that region and were more transmissible (24). On the other hand, in a region where TB is endemic and

caused by ancient Beijing strains, such as Japan, the recently transmitted TB cases were more frequently caused by modern Beijing strains, whereas isolates of the ancient sublineage were associated with cases of disease reactivation in older patients and not with ongoing transmission (37). All these data together demonstrate

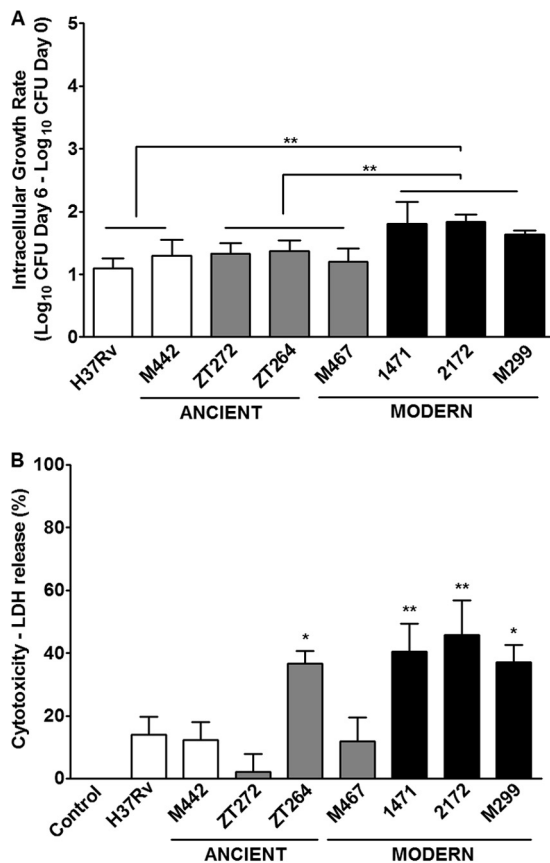


FIG 6 Virulence-associated properties of the ancient and modern Beijing strains evaluated in the macrophage-based model of infection. Bone marrow-derived macrophages obtained from C57BL/6 mice were infected with different mycobacterial strains at an MOI of 1:1 and incubated for 6 days. (A) Intracellular growth of mycobacteria, measured as a fold increase in the numbers of CFU recovered from macrophages on days 0 and 6 after infection. The bacterial growth rate is presented as mean plus SD of log increases in the numbers of intracellular CFU measured in two separate experiments. (B) Induction of necrotic cell death in the macrophage cultures infected at an MOI of 10:1. LDH release from the dead cells was measured in the culture supernatants on day 5 after infection. Asterisks indicate the isolates for which the values of growth or cytotoxicity differed significantly from those of the H37Rv strain or between the indicated groups: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

that strains of the modern Beijing sublineage are more likely to exhibit high virulence than strains of the ancient Beijing sublineage. Although both ancient and modern Beijing strains can exhibit highly virulent phenotypes, the proportion of circulating strains with increased virulence is higher in the modern Beijing subgroup, suggesting a higher propensity of these bacteria to attain more pronounced virulence.

The reasons for higher virulence and general competitiveness of the modern Beijing strains have not been fully determined, but whole-genome sequencing of strains belonging to different Beijing subgroups defined by the presence of RD deletions demonstrated that these strains also displayed distinct mutations in virulence-associated genes (30). Some of these SNPs are shared by the most recent common ancestor and all of its descendants, whereas others could be detected only in the descendant strains. The specific mutations in the *mutT* genes are typical for the descendant modern Beijing strains and lacking in ancestral counter-

parts (16); as a consequence, the resulting weakness of DNA repair functions in the modern strains could promote acquisition of mutations increasing bacterial adaptability to the immunocompetent host. Additionally, the accelerated general mutation rate and its link to bacterial adaptability, leading to multifold increase in acquisition of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) mutants, were also demonstrated in strains of East Asian/Beijing lineage, compared with those of the Euro-American lineage (38; but see opposite opinion in reference 39) or of the East African-Indian lineage (40). This could favor selection of virulence-associated mutants as well, particularly in patients treated with antituberculosis drugs. Highly virulent MDR mutants, expressing compensatory mutations for bacterial fitness and able to enhanced multiplication in treated host organisms, may be selected under such conditions at a higher rate than the low-virulence mutants. Studies in Singapore (41) and Russia (3) demonstrated a higher frequency of MDR isolates and higher transmission rates of drug-resistant TB among Beijing genotype strains than non-Beijing strains, suggesting increased virulence of the MDR Beijing strains circulating in these regions.

In conclusion, highly virulent modern Beijing strains were identified in countries characterized by low prevalence of the East Asian/Beijing *M. tuberculosis* lineage in the local population structures of *M. tuberculosis* strains (Brazil and Mozambique). The data obtained in animal models of infection provide the evidence that modern Beijing strains, epidemic as well as sporadic ones, are more likely to display phenotypes associated with increased virulence than strains of the ancestral Beijing sublineage. These data give new insight on the recent success of this competitive family of strains that appears to contribute to recurrence of TB in particular of multidrug-resistant TB in some parts of the world and demonstrate the importance of continuous monitoring of the populations of Beijing strains in different geographic regions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

We gratefully acknowledge M. A. Telles at the Instituto Adolfo Lutz, Sao Paulo, Brazil, and A. Panunto at the Unicamp, Sao Paulo, Brazil, for providing the strains and epidemiological data. We thank Fernando C. Lopes for excellent technical assistance and Rodrigo S. Oliveira for support in animal experimentation.

We declare that we have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. 2010. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect. Dis.* 10:103–111. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70330-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70330-5).
- European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. 2006. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 12:736–743. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1205.050400>.
- Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Corander J, Bryant J, Parkhill J, Nejentsev S, Horstmann RD, Brown T, Drobniewski F. 2014. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat. Genet.* 46:279–286. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2878>.
- Buu TN, Huyen MMN, Lan NT, Quy HT, Hen NV, Zignol M, Borgdorff MW, Cobelens FG, van Soolingen D. 2009. The Beijing genotype is associated with young age and multidrug-resistant tuberculosis in rural Vietnam. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13:900–906.

5. Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndadambi SL, McEvoy CR, Kidd M, Beyers N, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. 2007. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J. Clin. Microbiol.* 45:1483–1490. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02191-06>.
6. López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K, van Soolingen D. 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.* 133: 30–37. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02171.x>.
7. Abebe F, Bjune G. 2006. The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low level protection by bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccines: is there a link? *Clin. Exp. Immunol.* 145:389–397. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03162.x>.
8. Aguilar D, Hanekom M, Mata D, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, Hernandez-Pando R. 2010. Virulence *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis (Edinb.)* 90:319–325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2010.08.004>.
9. Li Q, Whalen CC, Albert JM, Larkin R, Zukowski L, Cave MD, Silver RF. 2002. Differences in rate and variability of intracellular growth of a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates within a human monocyte model. *Infect. Immun.* 70:6489–6493. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.11.6489-6493.2002>.
10. Theus SA, Cave MD, Eisenach KD. 2005. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J. Infect. Dis.* 191:453–460. <http://dx.doi.org/10.1086/425936>.
11. Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, Goguet de la Salmoniere YO, Kreiswirth BN, Van Soolingen D, Small PM. 2005. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 43:3185–3191. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.7.3185-3191.2005>.
12. Gagneux S, Small PM. 2007. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect. Dis.* 7:328–337. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70108-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70108-1).
13. Faksri K, Drobniowski F, Nikolayevskiy V, Brown T, Prammananan T, Palittapongarnim P, Prayonwivat N, Chairasert A. 2011. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family based on IS6110, SNP, LSP and VNTR profiles from Thailand. *Infect. Genet. Evol.* 11:1142–1149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.007>.
14. Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, Shinnick TM. 1994. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 32:1542–1546.
15. Mokrousov I, Ly HM, Otten T, Lan NN, Vyshnevskiy B, Hoffner S, Narvskaya O. 2005. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome Res.* 15:1357–1364. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.3840605>.
16. Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, Rauzier J, Kreiswirth B, Blazquez J, Jouan M, van Soolingen D, Gicquel B. 2003. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg. Infect. Dis.* 9:838–845. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0907.020803>.
17. Mokrousov I. 2013. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26:342–360. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00087-12>.
18. Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, Sheen P, Wada T, Taype CA, Shaw MA, Moore DA, Gilman RH. 2012. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *PLoS One* 7:e49651. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049651>.
19. Lasunskaja E, Ribeiro SC, Manicheva O, Gomes LL, Suffys PN, Mokrousov I, Ferrazoli L, Andrade MR, Kritski A, Otten T, Kipnis TL, da Silva WD, Vishnevskiy B, Oliveira MM, Gomes HM, Baptista IF, Narvskaya O. 2010. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect.* 12:467–475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2010.02.008>.
20. Nunes EA, De Capitani EM, Coelho E, Joaquim OA, Figueiredo IR, Cossa AM, Panunto AC, Carvalho-Ramos M. 2005. Patterns of anti-tuberculosis drug resistance among HIV-infected patients in Maputo, Mozambique, 2002–2003. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9:494–500.
21. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-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 MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44:4498–4510. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01392-06>.
22. Lari N, Rindi L, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C. 2006. Mutations in *mutT* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of Beijing genotype. *J. Med. Microbiol.* 55:599–603. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46261-0>.
23. Andrade MR, Amaral EP, Ribeiro SC, Almeida FM, Peres TV, Lanes V, D'Império-Lima MR, Lasunskaja EB. 2012. Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. *BMC Microbiol.* 12:166. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-166>.
24. Kato-Maeda M, Kim EY, Flores L, Jarlsberg LG, Osmond D, Hopewell PC. 2010. Differences among sublineages of the East-Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* in genotypic clustering. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 14:538–544.
25. Viegas SO, Machado A, Groenheit R, Ghebremichael S, Pennhag A, Gudo PS, Cuna Z, Langa E, Miotto P, Cirillo DM, Rastogi N, Warren RM, van Helden PD, Koivula T, Källenius G. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype is associated with HIV infection in Mozambique. *PLoS One* 8:e71999. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071999>.
26. Senaratne RH, Sidders B, Sequeira P, Saunders G, Dunphy K, Marjanovic O, Reader JR, Lima P, Chan S, Kendall S, McFadden J, Riley LW. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* strains disrupted in *mce3* and *mce4* operons are attenuated in mice. *J. Med. Microbiol.* 57:164–170. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47454-0>.
27. Kozak RA, Alexander DC, Liao R, Sherman DR, Behr MA. 2011. Region of difference 2 contributes to virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 79:59–66. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00824-10>.
28. Ioerger TR, Feng Y, Ganesula K, Chen X, Dobos KM, Fortune S, Jacobs WR, Jr, Mizrahi V, Parish T, Rubin E, Sasseti C, Sacchettini JC. 2010. Variation among genome sequences of H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* from multiple laboratories. *J. Bacteriol.* 192:3645–3653. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00166-10>.
29. Yang CT, Cambier CJ, Davis JM, Hall CJ, Crosier PS, Ramakrishnan L. 2012. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell Host Microbe* 12:301–312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.07.009>.
30. Kato-Maeda M, Shanley CA, Ackart D, Jarlsberg LG, Shang S, Obregon-Henao A, Harton M, Basaraba RJ, Henao-Tamayo M, Barrozo JC, Rose J, Kawamura LM, Coscolla M, Fofanov VY, Koshinsky H, Gagneux S, Hopewell PC, Ordway DJ, Orme IM. 2012. Beijing sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in pathogenicity in the guinea pig. *Clin. Vaccine Immunol.* 19:1227–1237. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00250-12>.
31. Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE, III, Freedman VH, Kaplan G. 2001. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- α /beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:5752–5757. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.091096998>.
32. Ordway D, Henao-Tamayo M, Harton M, Palanisamy G, Trout D, Shanley C, Basaraba RJ, Orme IM. 2007. The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. *J. Immunol.* 179:522–531. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.522>.
33. Palanisamy GS, Smith EE, Shanley CA, Ordway DJ, Orme IM, Basaraba RJ. 2008. Disseminated disease severity as a measure of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig model. *Tuberculosis (Edinb.)* 88:295–306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2007.12.003>.
34. Jeon BY, Derrick SC, Lim J, Kolibab K, Dheenadhayalan V, Yang AL, Kreiswirth B, Morris SL. 2008. *Mycobacterium bovis* BCG immunization induces protective immunity against nine different *Mycobacterium tuberculosis* strains in mice. *Infect. Immun.* 76:5173–5180. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00019-08>.
35. Mestre O, Luo T, Dos Vultos T, Kremer K, Murray A, Namouchi A, Jackson C, Rauzier J, Bifani P, Warren R, Rasolofo V, Mei J, Gao Q,

- Gicquel B. 2011. Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair. PLoS One 6:e16020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016020>.
36. Alonso H, Samper S, Martín C, Ota I. 2013. Mapping IS6110 in high-copy number *Mycobacterium tuberculosis* strains shows specific insertion points in the Beijing genotype. BMC Genomics 14:422. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-422>.
37. Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, Kawakami Y. 2009. Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. J. Clin. Microbiol. 47:3340–3343. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01061-09>.
38. Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, Johnston JC, Gardy J, Lipsitch M, Fortune SM. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. Nat. Genet. 45:784–790. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2656>.
39. Mokrousov I. 2014. Widely-used laboratory and clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains: to what extent they are representative of their phylogenetic lineages? Tuberculosis (Edinb.) 94:355–356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2014.03.010>.
40. de Steenwinkel JE, ten Kate MT, de Kneegt GJ, Kremer K, Aarnoutse RE, Boeree MJ, Verbrugh HA, van Soolingen D, Bakker-Woudenberg IA. 2012. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and association with MDR TB. Emerg. Infect. Dis. 18:660–663. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1804.110912>.
41. Sun YJ, Lee AS, Wong SY, Heersma H, Kremer K, van Soolingen D, Paton NI. 2007. Genotype and phenotype relationships and transmission analysis of drug-resistant tuberculosis in Singapore. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 11:436–442.

Comparação genômica entre um isolado ancestral e um isolado moderno de *Mycobacterium tuberculosis* pertencentes à linhagem Beijing, de São Paulo, Brasil.

Nos capítulos anteriores, nossos dados de experimentos *in vitro* e *in vivo* apontaram que isolados *Mtb* Beijings modernos apresentam maior grau de virulência em comparação com isolados ancestrais. Contudo tradicionais marcadores moleculares não foram capazes de elucidar as razões genéticas responsáveis por esta característica. Por isso houve a necessidade de evoluir para o sequenciamento de nova geração, incluindo todo o genoma, que permite avaliar a presença ou ausência de mutações e genes associados com virulência.

O sequenciamento de genomas completos é ao mesmo tempo uma ferramenta poderosa, permitindo a análise em larga escala de genes, SNPs, deleções, entre outros; e também uma ferramenta laboriosa, que por gerar uma quantidade enorme de dados e a possibilidade de diversos tipos de análise descritiva ou comparativa de sequências, requer o uso de ferramentas computacionais específicas. Ao longo do meu doutoramento, realizei o sequenciamento do genoma de 11 isolados de *Mtb*. Estes 11 isolados foram escolhidos para sequenciamento por representarem *Mtb* Beijing sublinhagens ancestral e moderna circulantes no Brasil e em Moçambique que apresentaram diferentes fatores de virulência em infecção em macrófagos THP-1 e em camundongos. Participei ativamente na etapa da extração de DNA e análise computacional dos dados gerados pela a plataforma de sequenciamento. Considerando o grande volume de dados gerados, analisei em detalhes 2 destes genomas. Os demais, ainda estão em análise e a finalização de tais comparações é uma das principais perspectivas futuras desta tese.

A comparação entre os dois genomas já analisados foi publicada na *Genome Annoucement*, em 2015, intitulada “Genome Comparison of an Ancestral Isolate and a Modern Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing Lineage from São Paulo, Brazil”, da qual sou a primeira autora. O objetivo foi realizar a comparação genômica entre dois isolados de *Mtb* Beijing provenientes de pacientes atendidos

em São Paulo, no Instituto Adolfo Lutz, sendo um isolado ancestral ZT272 e um isolado moderno 5351, que apresentaram diferente grau de virulência em estudos anteriores *in vitro* por infecção de macrófagos THP-1 (ver capítulo 1 desta tese).

A publicação no Genome Announcement encontra-se em anexo. Considerando seu formato reduzido, segue abaixo uma descrição complementar da metodologia utilizada, bem como de resultados já obtidos.

Metodologia: Sequenciamento e análise dos genomas:

A metodologia foi baseada principalmente em sequenciamento genômico e análise computacional. Este tipo de sequenciamento exige um DNA Integro e puro. Para extração do DNA genômico foi utilizado o Kit Charge Switch gDNA bactéria (Invitrogen), com o processo de eluição livre de EDTA, que pode causar a inibição de enzimas ocasionando baixa fragmentação e fracasso na preparação da biblioteca (Thermo Scientific). O controle de qualidade dos DNAs foi realizado pela quantificação por Nanodrop para ver a possível contaminação por proteínas e para a quantificação precisa de 1ng/μl foi utilizado o Qubit (Thermo Scientific).

Na preparação da biblioteca, o DNA foi simultaneamente fragmentado e ligado a adaptadores por enzimas, gerando fragmentos em torno de 100 pb. Em seguida, adaptadores para fixação na *flowcell* e indicadores para identificação das amostras foram adicionados por PCR (ilustrado na Figura 3.1).

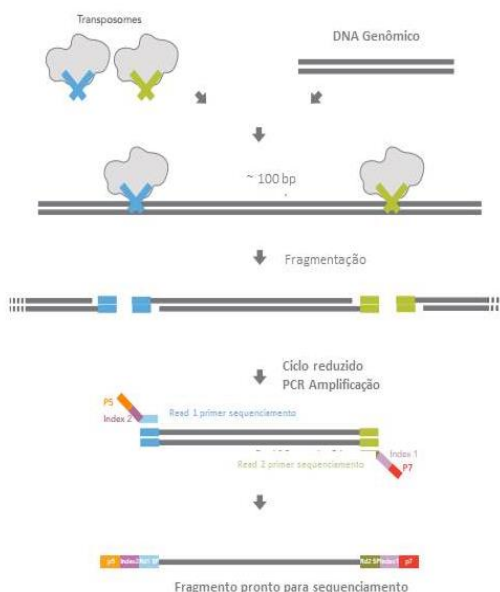


Figura 3.1- **Preparação da biblioteca genômica Nextera.** Fragmentação e adição de adaptadores, na primeira etapa, seguido de uma reação de PCR que adiciona adaptadores e indicadores em cada fragmento.

A biblioteca genômica foi preparada usando o kit Nextera XT *paired-end*, que consiste no emprego de *reads* com pareamento de extremidades, isto é, com identificação de sequência de DNA nas suas duas extremidades, separadas por uma distância conhecida, facilitando o processo de obtenção de *contigs*, sendo importante para resolver problemas de montagem em genomas ricos em sequências repetitivas.

As sequências foram analisadas pelo Illumina HiSeq2500 pertencente à plataforma do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro). O sequenciamento pelo Illumina HiSeq também realiza a síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos com diferentes fluoróforos, a inovação é que a clonagem ocorre em uma superfície sólida chamada *flowcells*. Em cada linha da *flowcell* são fixados adaptadores pela extremidade 5' deixando livre a ponta 3' para a incorporação de nucleotídeos durante a síntese de DNA. Esses adaptadores fixados na *flowcell* são complementares aos adaptadores que foram ligados nas duas extremidades dos fragmentos durante a preparação da biblioteca.

No primeiro ciclo da *clusterização*, dNTPs não marcados são fornecidos para que haja a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado. A alta densidade de adaptadores permite que ocorra a hibridização da ponta livre do fragmento imobilizado com adaptadores próximos que tenha sequência complementar. Assim, após o anelamento e durante a extensão forma-se uma estrutura em "ponte". Na etapa de desnaturação as fitas são separadas e linearizadas. Após 35 ciclos o cluster de um fragmento possui mais de mil cópias.

Nos próximos ciclos são utilizados nucleotídeos marcados com fluoróforos. A alta densidade de cada cluster permite que cada incorporação de nucleotídeo seja detectada e a leitura do sinal é realizada, sendo interpretada com um dos 4 possíveis nucleotídeos. Esse processo é repetido a cada incorporação de nucleotídeo, obtendo-se assim a sequência dos *reads* (CARVALHO & SILVA, 2010, Manual Illumina, Figura 3.2).

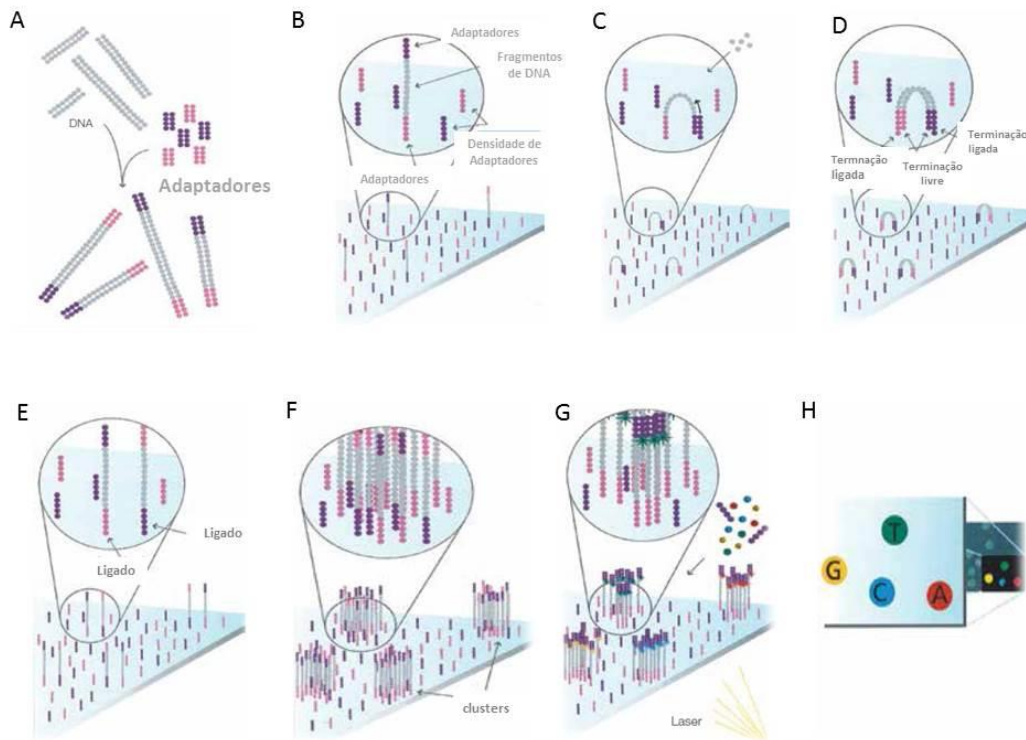


Figura 3.2- **Representação esquemática do princípio tecnológico da plataforma Illumina.** O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades (A). As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B (B). Durante a etapa de anelamento no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como *primer* (C e D). Na etapa de desnaturação, a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura (E). Após uma série desses ciclos de amplificação, serão obtidos *clusters* de moléculas idênticas ligadas ao suporte (F). Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (G), é gerado sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (H).

O controle da qualidade dos *reads* foi realizado utilizando o programa fastQC, que permite de maneira rápida um relatório sobre possível contaminação por adaptadores ou a existência de *reads* de baixa qualidade que devem ser excluídos antes da análise posterior (Figura 3.3). A normalização dos *reads* e a remoção de adaptadores Nextera nesta etapa foi realizada pelo software Trimomatic 0.36.

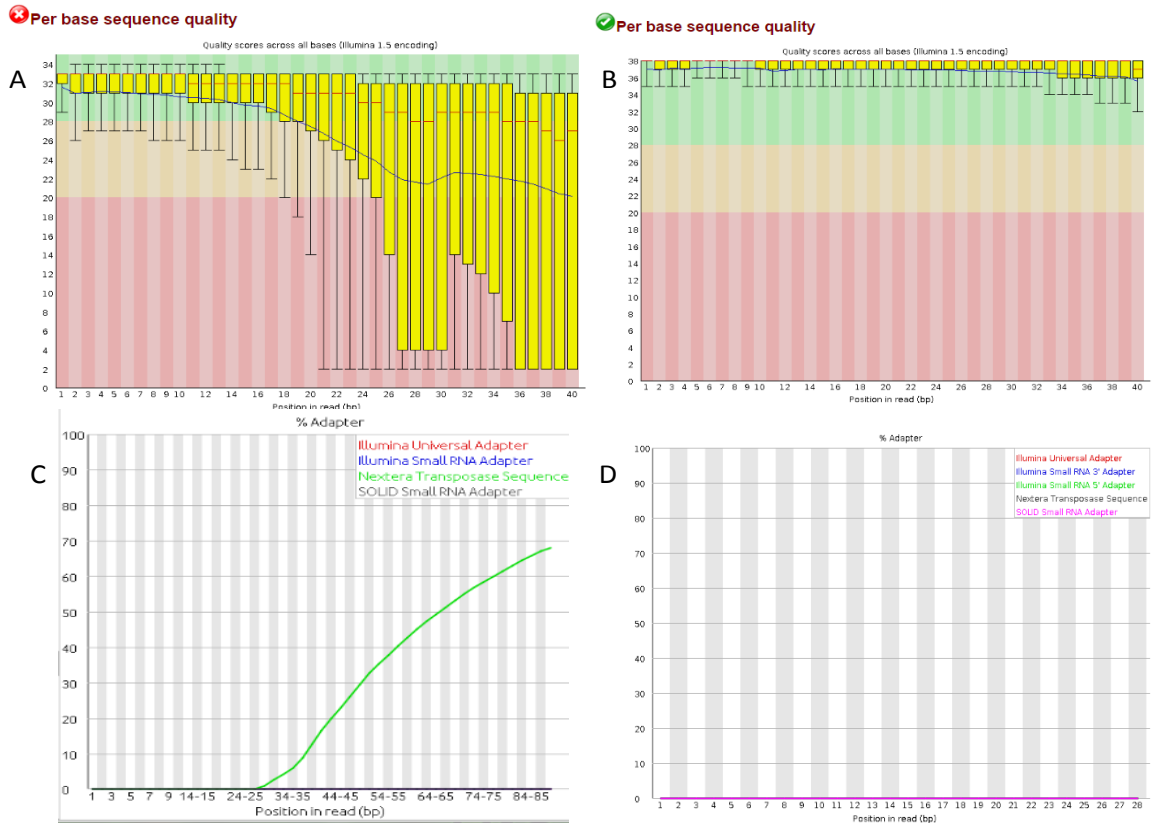


Figura 3.3- Representação da avaliação dos Reads pelo software FastQC. Verificação com qualidade baixa em nas base do read (A) Verificação de boa qualidade das bases do reads após a correção pelo trimmomatic (B). Detecção de presença de adaptadores nas seqüências (C). Correção com a retirada dos adaptadores pelo trimmomatic (D).

A montagem dos *reads* foi realizada utilizando o software A5-Miseq, que possui a interface por linha de comando em Linux, específica para análise de *output* do Illumina. A montagem é realizada em cinco etapas automáticas, por algoritmos específicos, capazes de realizar o *trimming*, remover adaptadores, filtrar a qualidades dos *reads*, fazer a correção de possíveis erros e gerar *contigs* e *scaffolds*. Os resultados obtidos pelo A5-Miseq são apropriados para a submissão no NCBI, que podem ser submetidos como *contigs* ou *scaffolds* no formato fasta.

As ORFs (do inglês, *Open Reading Frames*) foram detectados utilizando o Rast, um servidor que faz a anotação de genoma bacteriano automaticamente. Quando um genoma é submetido ao Rast, faz-se a busca por genes e a anotação é realizada pela comparação com famílias de proteínas anotadas anteriormente, que estão interligadas a milhares de genomas depositados nas *SEEDs*. *SEEDs* é um software que agrupa grandes conjuntos de sequencias de nova geração em uma eficiente e rápida memória, sendo o seu algoritmo capaz de distinguir entre

mismatches e *overhangings*. O servidor é capaz de prever ORFs, função dos genes e caminhos metabólicos (OVERBEEK, 2014).

O alinhamento, anotação e a comparação de SNPs foram realizados pelo software Bionuméric (versão 7.5, Applied), utilizando como referência a sequência genômica da cepa H37Rv. Este programa possui uma interface gráfica amigável e permite alinhar e comparar sequências de cromossomos completos. Nesta ferramenta genômica comparativa os alinhamentos descontínuos são calculados usando SEEDs e mapeamentos ao longo da sequência, revelando inserções, inversões e deleções. As mutações e SNPs podem ser do tipo sinônima (*silent*), não sinônima (*missense*), intergênica ou Indel. O Bionuméric gera uma tabela que pode ser visualizada no Excel, com a posição dos SNPs ou Indel, tipo de mutação e em que gene ocorreu. Com o objetivo de fazer associação entre o fenótipo de virulência e o genótipo dos isolados, os SNPs foram classificados de acordo com sua categoria funcional estabelecida pelo Banco de dados Tuberculist. A representação da comparação entre os dois genomas foi realizada pelo programa Bring versão 0.95. Este programa é capaz de gerar imagens que mostram comparações de múltiplos genomas de procariotos, sem um limite arbitrário do número de genomas comparados. A imagem de saída mostra a semelhança entre uma sequência de referência central e as outras sequências como um conjunto de anéis concêntricos coloridos em uma escala que indicam a identidade percentual entre os genomas analisados (ALIKHAM, 2011). Para avaliar a ausência ou a presença de genes associados com virulência foi utilizado o pipeline LS-BSR (do inglês, Large Scale Blast Score Ratio), foi designado para identificar a distribuição e conservação de genes, comparando o genoma com um grupo de genes em formato multifasta (JASON, 2014). O multifasta dos genes associados com virulência encontra-se disponível no banco de dados *Virulence Factors of Pathogenic Bacteria* acesso: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Mycobacterium>.

Resultados e Discussão:

O sequenciamento gerou 11,163,762 reads para o isolado ZT272 e 5,872,754 reads para o isolado 5351. Após o tratamento das reads pelo Trimmomatic, foram utilizados na montagem 10,922,204 (97.84%) reads de ZT272 e 5,782,962 (98.47%) reads de 5351. Os resultados obtidos na montagem estão na tabela 3.1.

Tabela 3.1- Resultados obtidos pela montagem do A5.

Genoma	Contigs9	Scaffolds	Tamanho do genoma	Maior Scaffold	N50	Cobertura média	bases >= Q40
ZT 272 Brasil	255	164	4347734	205868	87201	207	4340751
5351 Brasil	163	81	4355078	295443	122389	112	4352505

A montagem demonstrou que o isolado moderno possui o genoma maior em comparação com o isolado ancestral. O Rast também detectou um maior número de orfs no isolado moderno com 4,408 ORFs que no isolado ancestral com 4,258 ORFs. A representação genômica dos isolados *Mtb* Beijing e a cepa H37Rv está representada na (Figura 3.4).

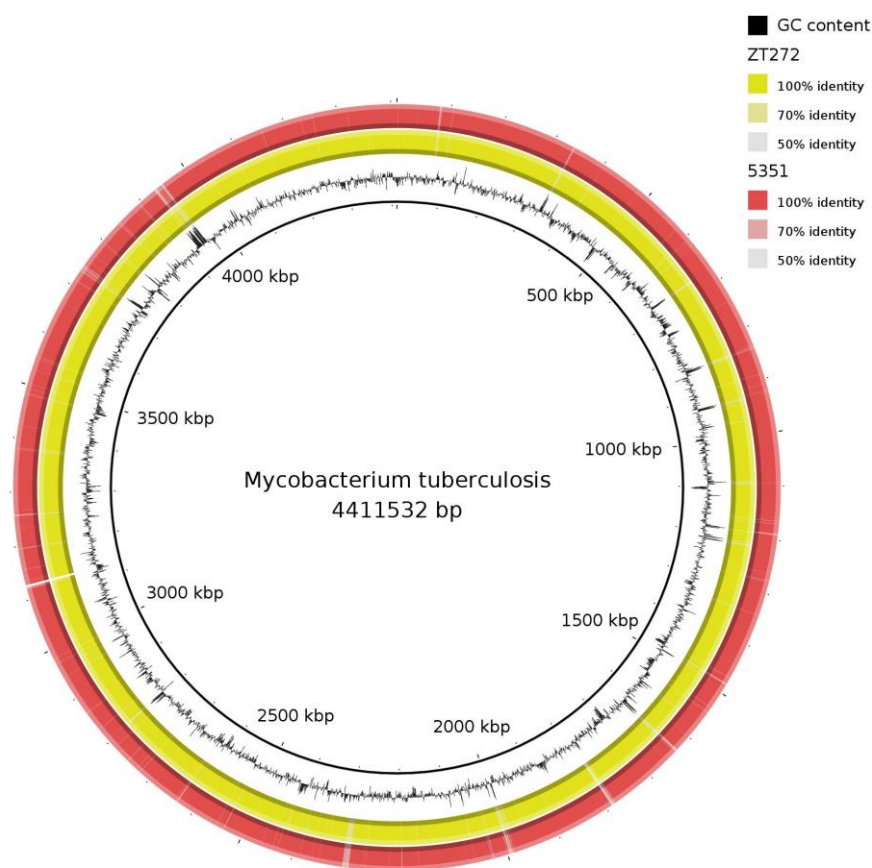


Figura 3.4 - Representação da comparação genômica entre a cepa referência H37Rv e os Isolados *Mtb* Beijing ancestral e moderno circulante no Brasil. Gerada pelo programa Brng. O círculo preto consistente representa a cepa H37Rv, o círculo preto com diferentes níveis representa as regiões ricas em GC, o círculo amarelo consistente representa o isolado ancestral e o círculo vermelho consistente representa o isolado moderno.

O isolado ancestral apresentou maior número de SNPs e Indels em relação a cepa H37Rv em comparação com o isolado moderno. A comparação genômica por Bionuméricos caracterizou 7,332 SNPs e 922 indels presentes no isolado ancestral enquanto o isolado moderno possuía 4.398 SNPs e 675 indels em relação a *Mtb* H37Rv (AL123456.3). A Exemplificação da análise de SNPs do isolado ZT272 por Bionuméricos está representada na tabela 3.2.

Os SNPs que tinham como consequência a mudança de aminoácido (*missense*) também foram contabilizados e agrupados de acordo com sua categoria funcional. Os resultados desta análise estão representados na Figura 3.5. O isolado moderno apresentou maior número de SNPs (41) em comparação com o número de SNPs (32) do isolado ancestral na categoria funcional relacionada com virulência. Os dois isolados apresentaram 17 SNPs em comum em genes de virulência como representados na tabela 3.3.

Além disso, foi observada uma grande variação de SNPs no isolado ancestral em genes relacionados com famílias de proteínas PE/PPE. Existem hipóteses que essas famílias estejam envolvidas com virulência e interação patógeno hospedeiro, por serem proteínas que são reconhecidas pelo sistema imune. As regiões que codificam essas proteínas são conhecidas por sofrerem altas taxas de recombinação, representando uma das regiões mais variáveis em *M.tuberculosis*. Apesar de observamos que o isolado ancestral apresentou bastante diversidade nessa região em relação a cepa H37Rv e o isolado moderno, podendo ter essa região mais conservada em relação as cepas mais virulentas, preferimos não considerar esses dados, por ser uma região complexa e por na maioria das vezes serem retiradas das análises genômicas (PHELAN,2016).

Tabela 3.2- Exemplificação da avaliação de SNPs encontrados no genoma do isolado *Mtb* Beijing ZT272 em relação a cepa H37Rv.

Posição referência	Posição de sequência	Tipo	Mudança de AA	Função
64	53	missense	G->R	Chromosomal replication initiator protein DnaA
4013	3986	missense	I->T	DNA replication and repair protein RecF (single-strand DNA binding protein)
7362	7335	missense	E->Q	DNA gyrase (subunit A) GyrA (DNA topoisomerase (ATP-hydrolysing)) (DNA topoisomerase II) (type II DN
7585	7558	missense	S->T	DNA gyrase (subunit A) GyrA (DNA topoisomerase (ATP-hydrolysing)) (DNA topoisomerase II) (type II DN
9304	9277	missense	G->D	DNA gyrase (subunit A) GyrA (DNA topoisomerase (ATP-hydrolysing)) (DNA topoisomerase II) (type II DN
14785	14758	missense	C->R	Probable conserved membrane protein
14861	14834	missense	G->V	Probable conserved membrane protein
16119	16092	missense	R->L	Transmembrane serine/threonine-protein kinase B PknB (protein kinase B) (STPK B)

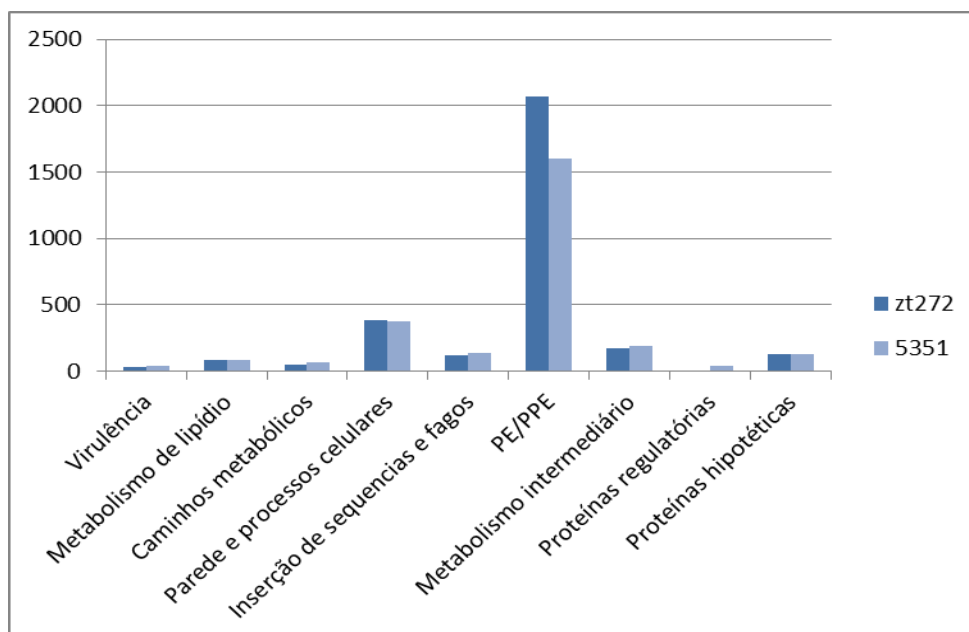


Figura 3.5- Gráfico representando o números de SNPs missense de acordo com a sua categoria funcional pré-estabelecida pelo Tuberculist.

Tabela 3.3- SNPs relacionados com virulência presentes nas duas sublinhagens

Posição da Mutação	Mudança de AA	Gene
154283	S->P	<i>Mak</i>
199470	S->A	<i>mce1A</i>
203038	I->T	<i>mce1D</i>
206339	L->P	<i>mce1F</i>
686972	F->S	<i>mce2A</i>
694531	N->S	<i>mce2F</i>
1230778	T->I	<i>mazF3</i>
2154724	R->L	<i>katG</i>
2155168	S->T	<i>katG</i>
2191498	G->W	<i>ephB</i>
2209465	A->T	<i>mce3A</i>
2216443	A->E	<i>mce3F</i>
2546684	G->V	<i>mazF8</i>
2867575	V->R	<i>vapB18</i>
2867594	L->Y	<i>vapB18</i>
2867756	I->S	<i>vapB18</i>

Além da avaliação de SNPs, foram realizadas buscas para definir a presença e ausência de genes associados à virulência nos dois genomas de *Mtb* Beijing ancestral e moderno. Verificou-se que em 88 genes associados à virulência em H37Rv, três (*plcD-plcD*, *esxM* e *esxN*) estavam ausentes nos dois genomas analisados, além disso o genoma do isolado ancestral possui a ausência de mais dois genes (*espB* e *Rv3879c*).

Conforme mencionado acima, outras 9 cepas Beijing, sendo três ancestrais e seis modernas já foram sequenciados. Ainda não foi possível analisar todos esses dados, mas como perspectiva desta tese, analisaremos a presença de SNPs e genes associados à virulência e resistência em todos estes genomas.

Dessa forma, esperamos em breve ter um número mais representativo de isolados analisados para poder inferir com mais certeza a relação entre esses isolados. Até o momento, foi avaliada a presença ou ausência de 132 genes do complexo *Mtb* associados com virulência, em que os isolados modernos apresentaram em média 4 genes de virulência a mais presentes que nos isolados ancestrais (Tabela 3.4).

Tabela 3.4- Genes associados com virulência no complexo *Mtb* que apresentaram variação entre presença e ausência nos genomas de *Mtb* Beijing ancestral e moderno pelo software LS-BSR

Genes	ANCESTRAIS				MODERNAS						
	272	264	442	3912	16	2172	5351	1471	198	284	299
<i>ppsA</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>ppsB</i>	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1
<i>ppsC</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>ppsD</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
<i>mbtB</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>narG</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>devS</i>	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>eccE1</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>mycP2</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>eccC2</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
<i>eccD3</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>cyp143</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>PPE26</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	4	4	8	7	10	7	11	8	8	9	11

Os isolados modernos também apresentaram maior frequência de SNPs descrito por Farhat e colaboradores (2013), por conferir resistência ao fármaco Kanamicina (Tabela 3.5). Além disso, o isolado ZT264 apresentou ausência do gene *embC* e o isolado 442 apresentou ausência dos genes *nadC* e *glbO*. Esses genes relacionados com resistência estavam presentes entre todos os isolados modernos.

Tabela 3.5 – SNPs relacionados com resistência à Kanamicina.

Gene	RV1313	RV3365	PPE60	RV3798	Sublinhagem
272	1468208AC (L433R)	3775409TC(Q698R)	3894732AG(R103G)	4254290TG (L433R)	Ancestral
264	livre de mutação	livre de mutação	livre de mutação	4254290TG (L433R)	Ancestral
442	livre de mutação	livre de mutação	livre de mutação	livre de mutação	Ancestral
3912	livre de mutação	livre de mutação	livre de mutação	livre de mutação	Ancestral
16	livre de mutação	3775409TC(Q698R)	3894732AG(R103G)	livre de mutação	Moderna
2172	livre de mutação	3775409TC(Q698R)	3894732AG(R103G)	livre de mutação	Moderna
5351	1468208AC (L433R)	3775409TC(Q698R)	3894732AG(R103G)	4254290TG (L433R)	Moderna
1471	1468208AC (L433R)	3775409TC(Q698R)	3894732AG(R103G)	4254290TG (L433R)	Moderna
198	1468208AC (L433R)	3775409TC(Q698R)	3894732AG(R103G)	livre de mutação	Moderna
284	1468208AC (L433R)	livre de mutação	3894732AG(R103G)	livre de mutação	Moderna
299	1468208AC (L433R)	livre de mutação	3894732AG(R103G)	4254290TG (L433R)	Moderna

Aparentemente o que estaria influenciando a maior indução de morte em camundongos e maior crescimento intracelular na *Mtb* Beijing modernas, provavelmente seria o acúmulo do número de genes relacionados com virulência. Além disso, a avaliação de SNPs relacionados com resistência sugere que os isolados modernos seriam mais resistentes a tratamentos com Kanamicina.

A limitação deste estudo foi o número de genomas analisados, para que seja possível estabelecer a significância desses dados. Por isso, esse trabalho terá um desdobramento maior em que toda a metodologia será aplicada também em um grupo de genomas de *Mtb* Beijings que foram publicadas e disponibilizada por Merker e col. (2014). Esse trabalho possui dados de 110 genomas pertencentes a 99 países que representam a coleção mundial da família Beijing. Em que será avaliada além das características genômicas relacionada com a virulência, a posição filogenética dos isolados do Brasil e de Moçambique serão estabelecido em comparação com a coleção *Mtb* Beijing mundial.

Esse dados serão de grande importância para entender e tentar estabelecer os fatores que levam a diferença de grau de virulência entre as duas sublinhagens.

Genome Comparison of an Ancestral Isolate and a Modern Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing Lineage from São Paulo, Brazil

Lia Lima Gomes,^a Michel Abanto Marin,^b Elena Lasunskaja,^c Sidra Ezidio Gonçalves Vasconcellos,^a Marcelo Emanuel Ivens de Araujo,^a Antonio Basílio de Miranda,^d Philip Noel Suffys^a

Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil^a; Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil^b; Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos, Rio de Janeiro, Brazil^c; Pole Computational Biology and Systems, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil^d

***Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing subtype (*MtbB*) is transmitted efficiently in high burden countries for this genotype. A higher virulence was associated with isolates of the “modern” Beijing genotype sub-lineages when compared to “ancient” ones. Here, we report the full genomes of the strain representing these two genotypes from Brazil, a country with a low incidence of *MtbB*.**

Received 17 August 2015 Accepted 19 August 2015 Published 1 October 2015

Citation Gomes LL, Marin MA, Lasunskaja E, Vasconcellos SEG, de Araujo MEI, de Miranda AB, Suffys PN. 2015. Genome comparison of an ancestral isolate and a modern isolate of *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing lineage from São Paulo, Brazil. *Genome Announc* 3(5):e01129-15. doi:10.1128/genomeA.01129-15.

Copyright © 2015 Gomes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Lia Lima Gomes, lialimagomes@hotmail.com.

Tuberculosis (TB), mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), is a serious public health problem in Brazil. One particular set of *Mtb* strains, the strains of Beijing family belonging to lineage 2 (East Asian), is very abundant in some countries and has been responsible for outbreaks in different geographical settings, attributed to high transmission capacity, better adaptation to the host environment, and higher virulence and drug resistance levels. This is not the case in Brazil, where the first isolates of *Mtb* Beijing were detected in 2002 and continue to cause only 0.8% of TB cases (1). Because so-called “modern Beijing strains” were suggested to be more virulent than the ancient ones (2), we evaluated some *MtbB* strains from Brazil of either genotype in virulence models and observed higher virulence in the modern strains (3).

Here, we report the whole-genome sequences of two *Mtb* Beijing isolates obtained from patients in São Paulo, one with the ancient genotype (ZT272) and the other with the modern genotype (5351), the latter presenting a more virulent phenotype (4). The DNA was extracted using a Charge Switch gDNA bacteria DNA mini kit (Invitrogen) and a paired-end library was prepared using the Nextera XT DNA library kit, followed by 2 × 100-bp sequencing on an Illumina HiSeq2500 sequencer at the High Throughput Sequencing Platform of the Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil). Initial quality control of raw reads was performed using fastQC. Quality trimming, adaptor removal and assembly of high-quality reads (between 36 and 83 reads) was realized by the software A5-miseq (<http://sourceforge.net/projects/ngopt/>). *De novo* assembly of the reads from ZT272 and 5351 strains yielded, respectively, 255 and 163 contigs, a genome size of 4,347,734 and 4,355,078 bp and an average coverage of 207 and 112×. Respectively, 4,258 and 4,408 open reading frames were detected using RAST server. Alignment, annotation, and single nucleotide polymorphism (SNP) and indel calling was performed using Bionumerics software (version 7.5; Applied

Maths) and using the genome sequence of *Mtb* H37rv (GenBank accession no. NC_000962.3) as a reference. The SNPs found were grouped by functional category according to the database TubercuList (<http://tubercuList.epfl.ch/>). When compared to *Mtb* H37Rv, ancient sp. ZT272 and modern sp. 5351 presented 7,332 and 4,398 SNPs and 922 and 675 indels, respectively. Among the 88 virulence associated genes defined in *Mtb* H37Rv (5), three (*plcD-plcD*, *esxM*, and *esxN*) were absent in both strains while in addition, the ancient strain had an also deleted *espB* and *Rv3879*. When comparing the number of SNP specifically in the virulence genes only, comparing to *Mtb* H37Rv, a larger number of SNPs was observed in the modern strain (41) than in the ancient one (32), with 22 SNPs in common and an additional 19 and 10 unique SNPs, respectively.

Although the overall genome of the ancestral strain seems more distant from the H37Rv strain than the modern one, the contrary is observed in the virulence associated genes and further investigation as to whether this is related with higher virulence is needed.

Nucleotide sequence accession numbers. These whole-genome shotgun projects have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. [LGTJ000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LGTJ000000000) and [JXXH000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JXXH000000000). The versions described in this paper are versions [LGTJ010000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LGTJ010000000) and [JXXH010000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JXXH010000000).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the CNPq, PAPES, PROEP, and the “Brazil Without Poverty” program of CAPES.

REFERENCES

- Ritacco V, López B, Cafrune PI, Ferrazoli L, Suffys PN, Candia N, Vásquez L, Realpe T, Fernández J, Lima KV, Zurita J, Robledo J, Rossetti ML, Kritski AL, Telles MA, Palomino JC, Heersma H, van Soolinghen D,

- Kremer K, Barrera L. 2008. Mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:489–492.
2. Lasunskaja E, Ribeiro SC, Manicheva O, Gomes LL, Suffys PN, Mokrousov I, Ferrazoli L, Andrade MR, Kritski A, Otten T, Kipnis TL, da Silva WD, Vishnevsky B, Oliveira MM, Gomes HM, Baptista IF, Narvs-kaya O. 2010. Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect* 12:467–475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2010.02.008>.
 3. Ribeiro SC, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MR, Almeida FM, Rezende AL, Lanes VR, Carvalho EC, Suffys PN, Mokrousov I, Lasunskaja EB. 2014. 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* 52:2615–2624. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00498-14>.
 4. Gomes LL, Vasconcelos SE, Gomes HM, Elias AR, da Silva Rocha A, Ribeiro SC, Panunto AC, Ferrazoli L, da Silva Telles MA, Ivens de AM, Kritski AL, Mokrousov I, Manicheva OA, Lasunskaja E, Suffys PN. 2015. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells. *Tuberculosis (Edinb)* 95:S190–S196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.025>.
 5. Chen L, Xiong Z, Sun L, Yang J, Jin Q. 2012. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* 40:641–645. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr989>.

3-Discussão

Desde que linhagem Beijing foi responsável por surtos de tuberculose em várias partes do mundo, que toda a comunidade científica envolvida no controle da tuberculose não tem medido esforços para desvendar a causa do sucesso epidemiológico e patogênico desta família diante do Complexo *Mtb*.

Ao longo do tempo, os marcadores moleculares capazes de caracterizar o genótipo desta família e modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* capazes de avaliar fatores de virulência e patogenicidade foram se aprimorando. Com isso, informações sobre a resistência aos medicamentos, a patogenicidade e o caminho evolutivo, filogenético e epidemiológico trilhado por essa linhagem foram disponibilizadas. Como integrante desse cenário, esta tese de doutorado teve como objetivo buscar novos métodos moleculares e novas tecnologias, para uma maior compreensão dos padrões epidemiológicos, fatores de virulência e conteúdo genômico dessa família.

Inicialmente os marcadores moleculares utilizados para a execução da genotipagem da família Beijing baseavam-se nas técnicas de RFLP e *spoligo*typing, pois estas eram capazes de diferenciar essa família de outras do complexo *Mtb*, porém, não diferenciavam os perfis únicos. Sendo assim, nesta tese propusemos a genotipagem e avaliação de fatores de virulência em isolados *Mtb* Beijing pertencentes a casos esporádicos encontrados em pacientes com tuberculose nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo em comparação com isolados *Mtb* Beijings de áreas com maior prevalência como Moçambique e Rússia.

Anteriormente a este estudo, em colaboração com a Dr^a Elena Lasunskaja, isolados do Brasil e da Rússia foram caracterizados por *spoligo*typing e MIRU-VNTR 12 loci. Utilizando a técnica MIRU-VNTR 12 foi verificado que esses isolados apresentaram o mesmo perfil genético M11 (223325173533), todavia seus padrões de virulência eram diferentes. Estes resultados se justificavam pela avaliação por MIRU-VNTR ser feita apenas por 12 VNTRs, que geravam baixo poder discriminatório (LASUNSKAIA, 2010).

Foi instituída neste trabalho a avaliação por 24 MIRU-VNTRs, com o objetivo de aumentar o poder discriminatório da técnica na família Beijing. Com isso, o isolado *Mtb* Beijing 1471, os isolados *Mtb* Beijing do Brasil e mais isolados oriundos de Moçambique foram submetidos a esta nova abordagem. Com a adição de mais 12 *loci*, observamos um significativo aumento do poder discriminatório, com 92,3% do total dos isolados apresentando perfis únicos; sendo o QUB11 o *loci* com maior poder de discriminação. A abordagem utilizando 24 VNTRs atingiu o poder discriminatório de 0,997 a mesma taxa obtida em áreas endêmicas para isolados de *Mtb* Beijing (JIAO, 2008) (capítulo1).

Além disso, em colaboração com o grupo do Dr. Igor Mokrousov, durante o período do meu doutoramento, participei do desenvolvimento de um PCR *Multiplex* capaz de identificar rapidamente o clone B0/W148, com objetivo de avaliar e eventualmente controlar a sua transmissão de forma rápida em outros países. Este *cluster* tem demonstrado alto grau de virulência em macrófagos, forte associação à MDR e alta transmissibilidade, sendo assim, um clone de grande capacidade de circulação na Rússia (BIFANI, 2002, GHEBREMICHAEL, 2010, LASUNSKAIA, 2010). Entre os 11 isolados *Mtb* Beijing brasileiros avaliados pela técnica de PCR *multiplex*, nenhum pertencia ao clone B0/W148. Sugerindo assim, que esse *cluster* não é o precursor e provavelmente não tem nenhuma relação com os isolados *Mtb* Beijing circulantes no Brasil (MOKROUSOV, 2012).

Em relação a dados evolutivos os isolados de *Mtb* Beijing de Moçambique demonstraram prevalência mais alta da sublinhagem moderna em comparação a sublinhagem ancestral, já os isolados *Mtb* Beijing brasileiros em sua maioria, pertenciam à sublinhagem ancestral (capítulo 1).

Estes resultados corroboram com os dados da literatura, os quais descrevem que a inserção de isolados *Mtb* Beijing no continente Americano e, conseqüentemente, no Brasil, tenha ocorrido em dois momentos históricos. O primeiro momento teria ocorrido com a inserção de cepas Beijing ancestrais através do povoamento das Américas e com o contato com os povos Europeus. Posteriormente, cepas Beijing modernas teriam sido inseridas no país através da grande imigração de chineses, no meio do século XIX. (RITACCO, 2008). Além disso, foi possível demonstrar que os isolados de *Mtb*

Beijing circulantes em Moçambique, em sua maioria pertencentes a sublinhagem moderna, o que pode estar relacionado a importação recente desta sublinhagem da África do Sul, país vizinho com alta prevalência desses tipos de isolados (COWLEY, 2008).

Além de marcadores moleculares capazes de indicar possíveis caminhos evolutivos, nesse estudo também foi avaliado o gene *pks 15-1*, que sabidamente está relacionado com a produção de PGL (Glicolípido Fenólico). Acredita-se que a expressão de PGL iniba as células T e citocinas no hospedeiro (CHAIPRASERT, 2006), sendo, desta forma, associado à maior virulência em micobactérias. A avaliação desse gene demonstrou que todos os isolados Beijings analisados possuíam uma inserção de 7 pb intacta, o que poderia contribuir para a capacidade dessas micobactérias de produzir PGL. Porém, a partir da definição de subgrupos definidos pelas RDs (105, 142, 150 e 181), estudos anteriores demonstraram que apenas os subgrupos 3, 4, e 5 são capazes de produzir PGL (REED, 2007). Observamos que a maioria dos isolados do presente estudo, pertenciam aos subgrupos 3 e 4, sendo capazes a princípio de produzir PGL (capítulo 1).

Com o objetivo de compreender melhor os fatores que regulam a virulência na linhagem Beijing, realizou-se infecção em macrófagos THP-1, neste mesmo grupo de isolados anteriormente diferenciado pela genotipagem como ancestral ou moderno. Para a avaliação dos fatores de virulência em infecção por macrófago THP-1, foi considerada a habilidade de multiplicação intracelular e a indução de necrose em macrófagos, de maneira geral observou-se que a sublinhagem moderna apresentou maior índice que os isolados ancestrais ($P < 0.001$). O isolado ZT264 ancestral foi o único que apresentou índice maior que a H37Rv, demonstrando que apesar dos isolados ancestrais apresentarem baixos níveis de virulência, isso não exclui a possibilidade de que alguns desses apresentem elevados níveis de virulência (capítulo 1). Em estudo recente, isolados ancestrais circulantes em São Francisco, CA, pertencentes ao subgrupo RD207, apresentaram padrões de virulência similares aos encontrados em isolados modernos, por possuir mutações específicas em genes relacionados com virulência e induzir uma resposta imunológica favorável ao patógeno (MAEDA, 2012).

Verificamos também, que existe grande variação entre estas sublinhagens influenciadas de acordo com a origem geográfica, já que a maioria das *Mtb* Beijing modernas circulantes no Brasil e em Moçambique demonstraram indução de necrose menor que o isolado *Mtb* Beijing moderno da Rússia. Desta forma, é possível que nem todos os isolados de *Mtb* Beijing pertencentes à sublinhagem moderna sejam hipervirulentas, assim, processos geográficos e evolutivos poderiam estabelecer as diferenças nos fatores de virulência. Além disso, o caráter de virulência possui certamente outros mecanismos, que possivelmente estão mais relacionados com os *clusters* circulantes em áreas endêmicas como a China e a Rússia, onde estas cepas sofreram intenso processo de coevolução e seleção natural.

Os resultados e conclusões iniciais obtidos corroboram com a etapa posterior deste estudo, que incluiu a análise *in vivo*, com a infecção de camundongos C5BL/6. Nesta etapa, foi possível avaliar a sobrevivência dos animais infectados, a carga bacilar nos pulmões, a patologia pulmonar e a infecção em macrófagos.

Para a avaliação da virulência, foi utilizado um modelo estável de infecção pulmonar em camundongo C5BL/6. Observou-se uma sobrevivência de apenas 25-35 dias após a infecção em camundongos infectados com altas doses de bactérias a maioria pertencente aos isolados modernos. Enquanto os animais infectados com a cepa H37Rv e o isolado 442 “mais ancestral”, mantiveram a viabilidade durante 150 dias. Demonstrando que os isolados modernos apresentaram maior nível de virulência (capítulo2).

Além disso, os pulmões infectados com isolados clínicos modernos apresentaram claramente nódulos maiores do que nos isolados ancestrais. Sendo assim, os isolados modernos demonstraram maior capacidade de induzir grave patologia pulmonar, mesmo com o crescimento bacteriano pulmonar semelhante ao dos isolados antigos. Mais uma vez foi verificada a capacidade de induzir morte celular por necrose por essas sublinhagens em macrófagos THP-1. Porém, desta vez utilizando a quantidade de LDH no meio, como um marcador mais preciso. A infecção *in vitro* demonstrou taxas maiores de LDH em culturas infectadas por sublinhagens modernas que em culturas infectadas por H37Rv, que teve taxas próximas das obtidas pelos isolados ancestrais ($P < 0.05$) (capítulo 3). A necrose induz a liberação de micobactérias

e aumento de sinais favoráveis à fagocitose, que certamente agravam a patologia (YANG, 2012).

Estudos genéticos e imunológicos tentam explicar a razão dos isolados modernos serem mais virulentos do que os ancestrais. Uma das explicações seria apoiada na avaliação de genes do MTBC através desta, sugere-se que os isolados ancestrais tiveram a sua inicial dispersão apenas pelos continentes, marcada por um período de latência para possível sobrevivência em pequenas populações e adaptação ao hospedeiro. Com a possibilidade das migrações pelos mares e aumento desproporcional da população humana à infecção clonal, teriam se originado as linhagens modernas, emergindo fatores de virulência mais acentuados. Sendo assim, momentos evolutivos diferentes podem ter sido fundamentais na origem da virulência ideal para a adaptação ao hospedeiro (HERSHBERG, 2008). Além disso, ensaios imunológicos em macrófagos apontam que isolados modernos induzem menor resposta pró-inflamatória do que as ancestrais. Esta baixa resposta inflamatória induzida pelos isolados modernos foi associada à uma maior capacidade de causar doença na fase inicial progressiva. Essa estratégia pode ser uma vantagem no atual contexto de elevada densidade populacional humana, em que o número de hospedeiro é grande e a letalidade não ameaçam esgotar o número de hospedeiros não infectados (GAGNEUX, 2011).

As razões para a maior virulência e competitividade dos isolados de *Mtb* Beijing modernos não foram totalmente explicadas por marcadores genéticos tradicionais, por isso evoluímos para análise por sequenciamento genômico. Inicialmente, escolhemos dois isolados que representavam *Mtb* Beijing circulantes em São Paulo, por apresentarem diferentes padrões de virulência em avaliação em macrófagos THP-1. Foram selecionados os isolados ZT272 e 5351 que representavam as sublinhagens ancestral e moderna, respectivamente. Com relação aos dados obtidos, foi observado um maior tamanho genômico e um maior número de orfs no isolado moderno. Este resultado é contraditório com o esperado, já que o processo de redução do genoma é um tema recorrente na evolução das espécies de micobactérias (STINEAR, 2008). Partindo desse conhecimento prévio um maior genoma era esperado no isolado ancestral. Com isso, maiores estudos observando essa diferença de tamanho genômico entre as sublinhagens devem ser realizados.

Além disso, avaliamos também a presença e a ausência de 88 genes associados com virulência no isolado H37Rv, informações disponíveis no banco de dados “Virulence Factors of pathogenic Bacteria” <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm> (CHEN, 2015). Observamos que entre os dois isolados avaliados, o pertencente a sublinhagem ancestral apresentou ausência de cinco genes associados com virulência (*plcD*, *esxM*, *esxN*, *espB* and *Rv3879*) (capítulo 3). Esses genes estão envolvidos com sistemas importantes que conferem virulência em *Mtb*. O gene *plcD* está envolvido com a síntese de fosfolipase C que desempenha um papel importante na infecção do hospedeiro. Em *Mtb* a interrupção desse gene prejudica a capacidade da micobactéria se multiplicar nos pulmões e no baço. Este fenótipo foi mais evidente após a fase aguda da infecção, o que sugere que fosfolipases C são importantes durante a infecção persistente (RAYNAUD, 2002). Os genes *esxM* e *esxN* fazem parte de um sistema de secreção chamado ESX-5, que está envolvido em manter a integridade da parede celular, porém a inativação desses genes não demonstrou atenuação em *Mtb*, em crescimento *in vivo*, sendo indiferente a ausência destes genes em ancestrais (BOTTAI, 2012). O gene *espB* e *Rv3879* estão envolvidos na síntese de substratos necessário para a síntese da proteína EspB. Esta enzima está envolvida com o crescimento dentro do macrófago, a interrupção desses genes causou atenuação da virulência *in vivo*. Verificou-se também que substratos fazem contribuições distintas, e potencialmente aditivas, a virulência. (MCLAUGHLIN, 2007).

Com o objetivo de verificar se estas diferenças entre a presença e ausência de genes e de SNPs observados nas duas cepas podem ser generalizadas, analisamos o genoma de outras 9 cepas, incluindo os isolado *Mtb* Beijing circulante no Brasil, em Moçambique e o isolado 1471 *Mtb* Beijing da Rússia pertencentes ao cluster B0/W148. Sendo assim, ao todo avaliamos quatro isolados ancestrais e sete isolados modernos, que tiveram anteriormente seu grau de virulência estabelecida em macrófagos THP-1 ou em camundongo C5BL/6. Algumas observações feitas no estudo anterior foram reforçadas nesta análise preliminar, um maior tamanho genômico entre os isolados modernos também foi verificado por sequenciamento total. Através de uma comparação genômica com a cepa H37Rv, os isolados pertencentes as

duas sublinhagens não demonstraram diferença significativa entre SNPs, não tendo sido observada uma mudança de aminoácidos em genes associados à virulência, como no estudo anterior (Gomes e colaboradores dados em preparação).

Devido à possibilidade de existir uma maior variabilidade de genes por todo o complexo *Mtb* em comparação com a H37Rv, estendemos a avaliação entre a presença e ausência de 132 genes associados com virulência dentro do complexo *Mtb*, disponibilizado pelo banco de dados “virulence factors of pathogenic bacteria” (CHEN, 2015). Resultados demonstraram a variação de 12 genes envolvidos com virulência entre as duas sublinhagens, em que a sublinhagem moderna apresentou maior número destes genes presentes em relação à linhagem ancestral (Capítulo 3). As diferenças genômicas encontradas com a ausência de genes relacionados com virulência seriam uma possível explicação às características fenotípicas atenuadas observadas *in vivo* e *in vitro* associadas com fatores de virulência.

A maior presença de genes envolvidos com virulência em isolados *Mtb* Beijing moderno é algo inesperado. Estudo a partir de dados genômicos descreveram eventos de transferência horizontal de genes (HGT), que evidenciaram aumento de genes relacionados com melhor adaptação em condições anaeróbicas e maior crescimento em macrófagos e em infecção em modelo animal (VEYRIER, 2009), esses eventos poderiam estar associados em alguns casos aos nossos dados. Outra possibilidade seriam gargalos evolutivos que a linhagem Beijing poderia ter sofrido ao longo do tempo, sofrendo assim variações de genes na sua composição genômica.

Devido a associação da família Beijing com resistência à drogas, avaliamos também a presença e ausência de 76 genes associados com resistência, indicados pelo o banco de dados Patric “Drug bank”(WATTAN, 2014). Observamos que três genes estavam menos frequentes em isolados de sublinhagem ancestral, demonstrando possível susceptibilidade por esses isolados. Além disso, isolados da sublinhagem moderna apresentaram maior número de SNPs descritos por conferir resistência drogas de segunda linha como a Kanamicina (FARHAT, 2013), sugerindo provável resistência em caso

de falha do tratamento de primeira linha ou diante de tratamentos inadequados (Capítulo 3).

Estudos anteriores sugeriram que a correlação com resistência a antibióticos na família *M. tuberculosis* Beijing estaria associada com alterações em mecanismos de reparação do DNA, causados por mutações presentes na linhagem moderna em três genes mutantes putativos, sendo *mutT2*, *mutT4* e *ogt* (RAD, 2003). Esta observação foi recentemente confirmada por Ford et al. (2013), que apontou que a correlação entre o genótipo Beijing e resistência poderia realmente ser explicada por uma frequência de mutação superior. Entretanto, nenhuma diferença quantitativa para nos genes *mutT2*, *mutT4* e *ogt* foi demonstrada em recente estudo proteômico, sugerindo que mudanças pós-traducionais e não a quantidade de proteínas são importantes para o mecanismo de reparo de DNA *Mtb* Beijing (KEIJZER, 2014).

Muito tem se falado nos papéis das bombas de efluxo, que são capazes de transportar antibióticos entre a parede celular, causando também resistência antimicrobiana. Poucos trabalhos avaliaram esse fator de resistência no genótipo Beijing, porém a avaliação em três genes (*Rv1634*, *Rv1747*, e *whiB7*) envolvidos com bombas de efluxo, apresentaram expressão gênica aumentada após exposição à Rifampicina durante 24 horas (LOUW,2011). Contudo, somente a presença de bombas de efluxos não foram capazes de conferir sozinhas resistências aos antibióticos (KEIJZER, 2014). Sendo assim, estudos mais esclarecedores associados com resistência a antibióticos, dentro desse genótipo devem ser desenvolvidos, em que se deve levar em consideração não apenas SNPs, mutações e inserções, análise proteômica, bombas de efluxos e transportadores, mas todos os fatores do contexto em conjunto.

Neste trabalho, através de desenvolvimento tecnológico e computacional, foi possível apontar que fatores de virulência aumentados provavelmente estariam contribuindo para o maior sucesso da linhagem Beijing moderna dentro do complexo *Mtb* ao longo do tempo, descrevendo de forma precursora o comportamento de isolados *Mtb Beijing* clínicos circulantes no Brasil e em Moçambique. Após esse estudo, sabemos que no Brasil a maior prevalência é pertencente a sublinhagem ancestral que demonstraram ser menos virulentas *in vitro* e *in vivo*, contudo não podemos negligenciar a

sublinhagem moderna circulante no país que apresentaram níveis de virulência comparáveis ao isolado russo *Mtb* Beijing pertencente ao cluster B0/W148, portanto o controle da transmissão dessa família deve ser mantida.

A principal limitação desse estudo é o fato de não existir estudo retrospectivo associado com severidade clínica em pacientes possibilitando assim a extensão das informações obtidas por experimento *in vitro* e *in vivo* para os humanos. Além disso, estudos proteômicos e experimentos relacionados com recombinantes devem ser futuramente avaliados principalmente em genes que apresentaram ausência ou mutações que possivelmente causariam uma mudança na virulência da micobactéria. Dados obtidos nesse trabalho associado com resistência e virulência a partir do sequenciamento genômico, provavelmente contribuirão com novas conclusões relacionadas com evolução da micobactéria, melhor dispersão, patogenicidade, e no desenvolvimento e administração de novos fármacos na família Beijing e outras micobactérias do complexo.

4-Conclusões

- A avaliação de 26 isolados *Mtb* Beijing pelos marcadores moleculares capazes de diferenciar a sublinhagem ancestral e moderna demonstrou que 62,5% dos isolados circulantes no Brasil pertenciam a sublinhagem ancestral, entretanto 53% dos isolados provenientes de Moçambique e o isolado 1471 russo pertenciam a sublinhagem moderna.
- A Caracterização de perfis pela técnica MIRU-VNTR 12 *loci* foi insuficiente para diferenciar *Mtb* Beijing, havendo a necessidade de analisar essa família por 24 *loci*. O MIRU-VNTR 24 *loci* apresentou alto poder discriminatório HGDI=0,997, demonstrando ser um eficiente método epidemiológico e filogenético para esta família.
- A análise dos fatores de virulência *in vitro* e *in vivo*, demonstraram de maneira geral que a sublinhagem moderna apresentou mais fatores associados com virulência que a sublinhagem ancestral. A sublinhagem moderna apresentou maior crescimento intracelular e maior indução de necrose em macrófagos THP-1 (P <0.01). Em experimentos em camundongos C5BL/6, 75% dos isolados dessa mesma sublinhagem levou a menor viabilidade com diferença significativa máxima de P <0,05 e a uma patologia pulmonar mais severa, apresentando pulmões com nódulos inflamatórios de 1.3 a 2.0 mais pesados que os pulmões infectados por isolados ancestrais (P <0.05).
- O sequenciamento genômico de dois isolados *Mtb* Beijing ancestral/ moderno revelou que entre 88 genes associados com virulência em H37Rv, três genes estavam ausentes em ambos isolados, porém o isolado ancestral possuía outros dois genes deletados. Além disso, avaliação de SNPs demonstrou que o genoma moderno está mais distante da H37Rv que o ancestral em relação aos genes de virulência. Esses dois fatores possivelmente são responsáveis pela diferença de virulência demonstrada *in vivo* e *in vitro* nas sublinhagens ancestral e moderna.

5- Referências

1. Abebe F, Bjune G. The Mycobacterium tuberculosis and low-level protection emergence of Beijing family genotypes of by bacilli Calmette-Guérin (BCG) vaccines: is there a link? *Clinical and Experimental Immunology* 2006 Jun; 145: 389-397.
2. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis.* 2010:1296–1299.
3. Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S : Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46, 2692– 2699.
4. Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M., Herranz M, et al. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiology* 2008; 8: 34.
5. Banuls A, Sanou A, Anh2 N, Godreuil S. Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology* 2015; 64: 1261–1269.
6. Beguec A, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46:692–2699.

7. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 2002; 10:45–52.
8. Bos KI, Harkins KM, Herbig A, Coscolla M, Weber N, Comas I, et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* 2014.
9. Bottai D, Di Luca M, Majlessi L, Frigui W, Simeone R, Sayes F, et al. Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and Strong attenuation. *Mol Microbiol* 2012; 83:1195-209.
10. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24:449–467.
11. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Tuberculose nos Estados Partes e Associados do Mercosul 2009 a 2013. Secretaria de vigilância em Saúde. 2015.
12. Brosch, R., Gordon S, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2002; 99:3684–3689.
13. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, AL-Hajoj SA, 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.
14. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: The human model. *Annu Rev Immunol* 2002 ;20:581–620.
15. Chaiprasert A, Yorsangsukkamol J, Prammananan T, Palittapongarnpim P, Leechawengwong M, Dhiraputra C, Intact PKS15/1 in non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Emerg Infect Dis* 2006 May; 12(5): 772-774.

16. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on Nucleic Acids Res. 2016 Jan 4; 44(Database issue): D694–D697.
17. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998;.393:537–544.
18. Comas I, Gagneux S. The Past and Future of Tuberculosis Research. PLoS Pathog 2009;5.
19. Coscolla M, Gagneux S. Coscolla M, Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Semin Immunol 2014 Dec;26(6):431–444.
20. Coscolla M, Lewin A, Metzger S, Maetz-Renning K, Calvignac-Spencer S, Nitsche A, et al. Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Isolate from a Wild Chimpanzee. Emerg Infect Dis 2013 ;19:969–976.
21. Cousins DV, Peet RL, Gaynor WT, Williams SN, Gow BL. Tuberculosis in imported hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the Mycobacterium tuberculosis complex. Vet Microbiol 1994; 42:135–145.
22. Couvin D, Rastogi N, Tuberculosis - A global emergency: Tools and methods to monitor, understand, and control the epidemic with specific example of the Beijing lineage. Tuberculosis (Edinb) 2015 Jun; 95 Suppl 1:S177-89.
23. Cowley D, Govender D, February B, Wolfe M, Steyn L, Evans J, et al. Recent and rapid emergence of W-Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis in Cape Town, South Africa. Clin Infect Dis 2008; 47(10):.1252-1259.
24. de Jong C, Antonio, M, Gagneux, S. Mycobacterium africanum—review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. PLoS Negl Trop Dis 2010;4: e744.

25. De Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:36–52.
26. De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, Silva PA, Martin C, Ainsa JA, Guglierame P, Riccardi G. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med* 2002;8:714–724.
27. de Steenwinkel J E, ten Kate M T, de Knecht G. J, Kremer , Aarnoutse R E, Boeree M J, et al. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and association with MDR TB. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:660–663.
28. Fabre M, Hauck Y, Soler C, Koeck J L, van Ingen J, van Soolingen D, et al. Molecular characteristics of *Mycobacterium canettii* the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 1165–1173.
29. Farhat M, Shapiro B, Kieser K, Sultana R, Jacobson K, Victor T. Genomic Analysis Identifies Targets of Convergent Positive Selection in Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Published in final edited form as: *Nat Genet*. 2013 October ; 45(10): 1183–1189.
30. Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet* 2013; 45: 784–790.
31. Forrellad M, Klepp L, Gioffré A, García J, Morbidoni H, Santangelo M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 2013;4:1, 3–66.
32. GAGNEUX, S. Comas I, Young D .Human Macrophage Responses to Clinical Isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* Complex Discriminate between Ancient and Modern Lineages. *PLoS Pathogens* 2011.
33. Galagan JE, Sisk P, Stolte C, Weiner B, Koehrsen M, Wymore F, et al. TB database 2010: overview and update. *Tuberculosis*. Edinb. 2010; Jul;90(4):225-35.

34. Gal-Mor O, Finlay BB. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular microbiology* 2006; 8 (11): 1707-1719.
35. Ghebremichael S, Groenheit R, Pennhag A, Koivula T, Andersson E, Bruchfeld J, Hoffner S, Romanus V, Källenius G, et al. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing genotype does not spread in Sweden. *PLoS One* 2010.
36. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. *Emerging Infectious Diseases* 2002 Aug; 8, (8):843-849.
37. Gomes H, Elias A, Oelemann M, Pereira M, Montes F, Marsico A, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol.* 2012 Jun;12(4):649-56.
38. Gomes L, Vasconcellos S, Gomes H, Elias A, da Silva A, Ribeiro S, et al. Genome Comparison of an Ancestral Isolate and a Modern Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing Lineage from São Paulo, Brazil. *Genome Announc.* 2015b Oct; (5)1;3.
39. Gomes L, Vasconcellos S, Gomes H, Elias A, da Silva A, Ribeiro S et al. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells. *Tuberculosis* 2015a; 95:190-196.
40. Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Brosch R, Parkhill J, Barrell, et. *Tuberculosis* 2001;81, 157–163.
41. Hanekom M., van der Spuy G.D, Streicher E, Ndabambi S., McEvoy C, Kidd M, et al. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol* 2007;45 (5):1483-1490.
42. Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, Roach JC, Kremer K, Petrov DA, Feldman MW, Gagneux S. et al. High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography. *Plos Biol* 2008;6 (12): 2658-2671.

43. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. Current Methods in the Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. Biomed Research International 2014.
44. Jhingan G, Kumari S, Jamwal S, Kalam H, Arora, Jain N, et al. Comparative proteomic analyses of avirulent, virulent and clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* identifies strain-specific patterns .JBC Papers 2016.
45. Jiao W, Mokrousov I, Sun G, Guo Y, Vyazovaya A, Narvskaya O et al. Evaluation of New Variable-Number Tandem-Repeat Systems for Typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing Genotypelolates from Beijing, China. J Clin Microbiol 2008;46 (3):1045-1049.
46. Jiao WW, Mokrousov I, Sun GZ, Li M, Liu JW, Narvskaya O, et al. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. Chin Med J. China 2007;120(9):814-819.
47. Kam K, Yip C, Tse L, Wong K, Lam T, Kremer K. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multidrugresistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the Beijing family. J Clin Microbiol 2005;43: 306–313.
48. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35 (4) :907–914, 1997.
49. Keijzer J, de Haas PE, de Ru AH, van Veelen PA, van Soolingen D. Disclosure of selective advantages in the "modern" sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype family by quantitative proteomics. Mol Cell Proteomics 2014 Oct;13(10):2632-45.
50. Koeck J L, Fabre M, Simon F, Daffe M, Garnotel E, Matan A B, et al. Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli '*Mycobacterium canettii*' infection suggest the existence of an environmental reservoir. Clin Microbiol Infect 2011; 17:1013–1019.

51. Kong Y, Cave M, Zhang L, Foxman B, Marrs C, Bates J, et al. Association between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: Insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2007;45, (2): 409-414.
52. Kong Y, Cave MD, Zhang L, Foxman B, Marrs CF, Bates JH, Yang ZH, et al. Population-based study of deletions in five different genomic regions of *Mycobacterium tuberculosis* and possible clinical relevance of the deletions. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (11):3940-3946.
53. Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, Niemann S, Kurepina NE, Kreiswirth BN, Bifani PJ, van Soolingen D, et al. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4040-4049.
54. Kremer K, van-der-Werf MJ, Au BK, Anh DD, Kam KM, van-Doorn HR, et al. Vaccine-induced immunity circumvented by Typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains. *Emerging Infectious Diseases* 2009;15(02): 335-339.
55. Kremer, K. Typical and Atypical strain of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype have different levels of association with BCG vaccination and drug resistance In: Genetic markers for *Mycobacterium tuberculosis*; characterization and spread of the Beijing genotype. Amsterdam, p.235-247, 2005a.
56. Laarhoven A, Mandemakers J, Kleinnijenhuis B, Enaimi A, Lachmandas C, Joosten A, et al. Low Induction of Proinflammatory Cytokines Parallels Evolutionary Success of Modern Strains within the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype. *Infection and Immunity* 2013;10 (81): 3750 – 3756.
57. Lan NT, Lien HT, Tung le B, Borgdorff MW, Kremer K, *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1633–1635.

58. Lari N, Rindi L, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C. Mutations in *mutT* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of Beijing genotype. *J Med Microbiol* 2006; 55: 599–603.
59. Lasunskaja E, Ribeiro SC, 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. *J Clin Microbiol*. 2010 Jun; (6):467-75.
60. Lazzarini L, Huard R, Boechat N, Gomes H, Oelemann M, Kurepina N, et al. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage That Is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (12):3891–3902.
61. Lew J, Shukla M, Warren A, Will R, Kuznetsov D, Xenarios I, et al. 2013 Database resources for the Tuberculosis Community. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013; Jan 93(1):12-7.
62. Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2415–2423.
63. Liu Q, Luo T, Dong X, Sun G, Liu Z, Gan M et al. Genetic features of *Mycobacterium tuberculosis* modern Beijing sublineage. *Emerg Microbes Infect*. 2016 Feb 24;5:e14.
64. Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius N. C., Leon R., Jimenez A., Hernandez-Pando R., McEvoy C. R., Grobbelaar M., Murray M., van Helden P. D., Victor T. C. (Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* through efflux. *Am. J. Respir Crit. Care Med* 2011;184: 269–276
65. Luo T, Comas I, Luo D, Lu B, Wu J, Wei L, et al. Southern East Asian origin and coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese. *Proc Natl Acad Sci* 2015 30;112(26):8136-41.

66. Maeda M, Shanley CA, Ackart D, Jarlsberg LG, Shang S, Obregon-Henao A, et al. Beijing sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in pathogenicity in the guinea pig. *Clin. Vaccine Immunol* 2012; **19**:1227–1237.
67. Maeda S, Wada T, Iwamoto T, Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S, et al. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* isolated from throughout Japan: phylogeny and genetic features. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; **14**:1201-4.
68. Maeda S, Hang N, Lien L, Thuong P, Hung N, Hoang N, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains spreading in Hanoi, Vietnam: Beijing sublineages, genotypes, drug susceptibility patterns, and host factors, *Tuberculosis (Edinb)*. 2014 Dec; **94**(6):649-56.
69. McLaughlin B, Chon JS, MacGurn JA, Carlsson F, Cheng TL, Cox JS, et al. A mycobacterium ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. *PLoS Pathog* 2007.
70. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebouge N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nature Genetics* 2014; **47**:242–249.
71. Mestre O, Luo T, Dos Vultos T, Kremer K, Murray A, Namouchi A et al. Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair. *PLoS One* 2011; **6**: e16020.
72. Miltgen J, Morillon M, Koeck J L, Varnerot A, Briant J F, Nguyen G, et al. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**: 1350–1352.
73. Mokrousov I, Jiao WW, Valcheva V, Vyazovaya A, Otten T, Ly HM, et al. Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. *J Clin Microbiol* 2006; **44**,(33):2851-2856.
74. Mokrousov I, Ly HM, Otten T, Lan NN, Vyshnevskiy B, Hoffner S, et al. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing

genotype: Clues from human phylogeography. *Genome Research* 2005;15: 1357-1364.

75. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Otten T, Jiao WW, Gomes LL, et al. Russian "Successful" Clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype: a Multiplex PCR Assay for Rapid Detection and Global Screening. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50 (11) 3757–3759.
76. Moreland NJ, Charlier C, Dingley AJ, Baker EN, Lott JS. Making sense of a missense mutation: characterization of MUT2, a nudix hidrolases from *Mycobacterium tuberculosis*, and the G58R mutant encoded in w-Beijing strain of *M.tuberculosis*. *Biochemistry* 2009;48:699-708.
77. Morris RP, Nguyen L, Gatfield J, Visconti K, Nguyen K, Schnappinger D, et al. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:12200–12205.
78. Mulligan CJ, Hunley K, Cole S, Long JC. Population genetis, history, and health patterns in Native Americans. *Annu. Rev. Genomics Hum.Genet* 2004.;5:.295-315.
79. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The Immune Response in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2013;31:475–527.
80. Oelemann M, Diel R, Vatin V, Haas W, Rüsç-Gerdes S, Locht C et al., Assessment of na optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variablenumber tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis," *Journal of ClinicalMicrobiology* 2007; 45(3):691–697.
81. Parsons SDC, Drewe JA, van Pittius NCG, Warren RM, van Heiden PD. Novel Cause of Tuberculosis in Meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19:2004–2007.
82. Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotypes strain. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:103-111.

83. Pheiffer C, Betts JC, Flynn HR, Lukey PT, van Helden P. Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 2005; 151: 1139–50.
84. Phelan J, Coll F, Bergval I, Anthony R, Warren R, Sampson S, et al. Recombination in *pe/ppe* genes contributes to genetic variation in *Mycobacterium tuberculosis* lineages. *BMC Genomics*. 2016 Feb 29;17:151.
85. Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, Shinnick TM. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol* 1994; 32:1542-1546.
86. Portevin D, Gagneux S, Comas I, Young D. Human Macrophage Responses to Clinical Isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* Complex Discriminate between Ancient and Modern Lineages. *PLoS Pathogens* 2011;7.
87. Rad M, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jul; 9(7): 838–845.
88. Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, et al. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*; 2002; 45:203-17 .
89. Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE 3rd. et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 2004; 431: 84–8
90. Reed MB, Gagneux S, Deriemer K, Small PM, Barry CE 3rd. The W-Beijing Lineage of *Mycobacterium tuberculosis* Overproduces Triglycerides and Has the Dos R Dormancy Regulon Constitutively Upregulated. *J. Bacteriol* 2007;189, (7):2583-2589.
91. Ribeiro SC, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MR, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52 (7): 2615–2624.

92. Ritacco V, López B, Cafrune PI, Ferrazoli L, Suffys PN, Candia N, et al. Mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103 (5), :489-492.
93. Ryoo SW, Park YK, Park SN, Shim YS, Liew H, Kang S, et al. Comparative proteomic analysis of virulent Korean Mycobacterium tuberculosis K-strain with other mycobacteria strain following infection of U-937 macrophage. *J Microbiol* 2007; 45: 268–71.
94. Sahl J, Caporaso J, Rasko D, Keim P The large-scale blast score ratio (LS-BSR) pipeline: a method to rapidly compare genetic content between bacterial genomes. 2014;. *PeerJ PrePrints* 2:e220v1.
95. Schürch AC, Kremer K, Warren RM, Hung NV, Zhao Y, Wan K, et al. Mutations in the regulatory network underlie the recent clonal expansion of a dominant subclone of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype *Infect Genet Evol.* 2011 Apr;11(3):587-97.
96. Seng Goh K, Rastogi N, Berchel M, Huard R, Sola C. Molecular Evolutionary History of Tubercle Bacilli Assessed by Study of the Polymorphic Nucleotide within the Nitrate Reductase (*narGHJI*) Operon Promoter 2005.
97. Siddiqi N, Das R, Pathak N, Banerjee S, Ahmed N, Katoch VM, Hasnain SE. *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. *Infection* 2004; 32:109–111.
98. Sola C, Filliol I, Legrand E, Mokrousov I, Rastogi N. Mycobacterium tuberculosis phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. *J. Mol* 2001;53: 680–689.
99. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer K, Connell N, Kreiswirth B, Whittam T, et al.. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium

tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc. Natl. Acad. Sci 1997;94:9869–9874.

100. Steinar TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PD, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Genome Res. 2008 May; 18(5): 729–741.
101. Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, et al. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis* Nat Gene(2013); 45 172–179 .
102. Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, et al. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Genet 2013; 45: 172–179.
103. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol 2000;36 (3): p.762-771.
104. Supply P, Allix C, Lesjean S, Oelemann M, Rüsç-Gerdes S, Willery E,. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of mycobacterium tuberculosis. J clin Microbiol 2006;44:4498-4510.
105. Tauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S. Evolution of drug resistance in tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy. Drugs 2014 Jul;74(10):1063-72.
106. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Research. 1990;18.
107. Toth IK, Pritchard L, Birch PR: Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen. Annual review of phytopathology 2006, 44: 305-336.

108. van Crevel R, Nelwan R, Lenne W, Veeraragu Y, Zanden A, Amin Z. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(5):880-883.
109. Van Laarhoven A, Mandemakers JJ, Kleinnijenhuis J, Enaimi M, Lachmandas E, Joosten LA, et al. Low induction of proinflammatory cytokines parallels evolutionary success of modern strains within the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype. *Infect Immun* 2013; 81: 3750–3756.
110. Van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995 Dec; 33, (12): 3234-8.
111. Vasconcellos S, Acosta C, Gomes L, Conceição E, Lima K, Araujo M, et al. Strain Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Brazil Based on Genotypes Obtained by Spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing and the Presence of Large Sequence and Single Nucleotide Polymorphism. *PLoS One*. 2014; 9(10): e107747.
112. Veyrier F, Pletzer D, Turenne C, Behr M. Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Evolutionary Biology* 2009.
113. Viegas S, Machado A, Groenheit R, Ghebremichael I, Pennhag A, Gudo P, et al. Diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mozambique. *BMC Microbiology* 2010; 195 (10): 1-8.
114. Wada T, Iwamoto T, Maeda S. Genetic diversity of the mycobacterium tuberculosis Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. *FEMS Microbiol* 2009;291:35-43.
115. Wang XH, Ma AG, Han XX, Gu XM, Fu LP, Li PG, et al. Correlations between drug resistance of Beijing/W lineage clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and sublineages: a 2009-2013 prospective study in Xinjiang province, China. *Med Sci Monit* 2015 May; 7;21:1313-8.

116. Wattam AR, Abraham D, Dalay O, Disz T.L, Driscoll T, Gabbard J.L., J et al. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucl Acids Res* 2014;42 (D1): D581-D591.
117. Yang CT, Cambier CJ, Davis JM, Hall CJ, Crosier PS, Ramakrishnan L. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell Host Microbe* 2012;12:301–312.
118. Zhao LL, Xiao TY, Sun Q, Liu HC, Zhao XQ, Jiang Y, et al. Mutations in *lysX* as the new and reliable markers for tuberculosis Beijing and modern Beijing strains. *Tuberculosis (Edinb)* 2016; 97:33-7.