

The Present and Future of Molecular Epidemiology in Tuberculosis

Young Kil Park*

Korean Institute of Tuberculosis, Chungbuk, Korea

Molecular epidemiology has been initiated for the confirmation of transmission link among tuberculosis patients. IS6110 restriction fragment length polymorphisms (RFLP) technique has been used as an excellent tool to discriminate *Mycobacterium tuberculosis* isolates, especially in tuberculosis (TB) outbreak in the population. IS6110 RFLP has the most discriminatory power for the *M. tuberculosis* isolates with high copy number of IS6110 like Korean isolates. Spoligotyping using spacers of direct repeat is useful to distinguish Beijing strains which are found widely in Eastern Asia, from non-Beijing strains. It is known that Beijing strains are more virulent, apt to be drug resistant than non-Beijing strains. Strain typing techniques of *Mycobacterium tuberculosis* has lead to the development of phylogenetic classification. Variable number tandem repeat (VNTR) of *M. tuberculosis* is another good target for strain typing. The technique using VNTR is rising as an alternative tool to overcome disadvantages of IS6110 RFLP which is time consuming in the sense that it takes longer time to process from the culture positive bacilli, and has the intrinsic difficulties in objectification of the results. The combination of many VNTR loci enhances discriminatory power to become equal to that of IS6110 RFLP. On the other hand, the optimal VNTR combination differs from one country to another due to different dominant clade. Large sequence polymorphisms (LSP) and single nucleotide polymorphisms (SNP) are important tools for the classification of the phylogeny of *M. tuberculosis* complex. Many previous reports indicate that the depending upon the type of strains, the ways of transmission of disease, the way to get infected with disease and the development of drug resistance conditions are variable. Therefore, the molecular epidemiology of *M. tuberculosis* has become more important for tuberculosis control in the world. It will be possible to set up tuberculosis-tailored policy after the characterization of *M. tuberculosis* by molecular epidemiologically.

Key Words: Tuberculosis, Molecular Epidemiology, Phylogeny

서 론

인류에게 가장 많은 고통을 준 결핵은 아직도 세계 주요 공중 보건 문제 중 하나로 남아 있고, 원인균은 1882년 Robert Koch에 의해 발표된 그람 양성인 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)이다. 세계보건기구 보고에 따르면 2007년도에 약 927만 명의 새로운

결핵환자가 발생하였고, 결핵환자는 1천3백70만 명으로 추산하였다 (1).

아직도 결핵관리는 1백 년 전에 사용된 객담 도말 방법, 80년 전에 생산된 BCG 백신, 수십 년 전에 개발된 항결핵약제(streptomycin, rifampicin, isoniazid, ethambutol, pyrazinamide)에 의존하고 있으며, 더구나 결핵이 만연하고 있는 대부분의 국가에서 이 방법을 사용할 수 밖에 없는 실정이거나, 이들마저도 온전하게 사용하지 못하고 있는 나라들도 많다는 것이 안타까운 현실이다.

선진국에서도 결핵이 20세기 후반까지 꾸준히 감소하고 있었지만 1990년대 초에 에이즈 영향으로 결핵이 다시 나타나기 시작했다 (2). 선진국에서 결핵이 일시적으로 다시 증가한 사실은 결핵분야 연구에 있어 다시 관심

Received: April 11, 2011/ Revised: May 9, 2011

Accepted: May 19, 2011

*Corresponding author: Young Kil Park. Department of Research and Development, Korean Institute of Tuberculosis, 482, Mansu-ri, Kangwoi-myun, Cheongwon-gun, Chungbuk 363-954, Korea.
Phone: +82-43-249-4960, Fax: +82-43-249-4965
e-mail: ypark7@empal.com

을 갖게 되는 기회가 되었다. 20세기 분자생물학적 기술이 발전함에 따라 결핵의 전염경로를 파악하는데 이용할 수 있는 결핵분자역학이라는 분야가 생기게 되었다. 단순히 균주의 구별로 전염경로의 규명에 주로 이용되었던 이 분야는 점점 더 영향력이 넓어지고 있고, 이제는 미래에 결핵퇴치에 있어서 매우 중요한 역할을 하게 될 것으로 많은 연구자들이 예측하고 있다.

1. IS6110 RFLP

1990년도에 발표된 결핵균 계놈의 IS6110 유전자는 (3) 결핵 진단의 마커로 사용될 뿐만 아니라 결핵분자역학 연구에서 획기적인 발전에 기여하였다. IS6110 유전자는 결핵균 계놈에서 그 copy 숫자가 많아 결핵 진단에서 유용한 PCR의 target으로 이용되고 있다. IS는 특성상 결핵균 계놈의 여러 부위에 무작위로 여러 copy가 존재할 수 있다. 이러한 특징을 잘 이용하여 결핵균을 균주(strain) 단위로 분류 가능한 IS6110 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 기술을 정립하게 되었고 (4), 이 방법은 곧바로 세계로 널리 퍼져 나갔다. 우리나라에서도 1995년도 이 기술을 도입하여 처음으로 시도하였다 (5). 이어서 우리나라 균주 뿐만 아니라 주변 외국 균주에 대한 IS6110 RFLP pattern을 파악한 결과, 우리나라 결핵균주는 대부분이 IS6110 copy 수가 계놈 내에 10개 이상이었으며, 균주 변별력이 매우 우수하였다 (6). 이러한 IS6110 RFLP 기술은 지역 내 또는 국가 내에서 결핵의 전염경로를 파악하고자 하는 것이 주된 목적이다 (7, 8). 결핵환자가 적은 선진국에서는 모든 결핵환자에서 분리된 결핵균의 IS6110 RFLP를 데이터베이스화 하여 전염경로를 파악하는데 이용하고 있다. 우리나라에서도 처음으로 지역 내 결핵환자를 대상으로 전염경로 파악을 시도하였다 (9). 그러나 현재로서는 결핵환자가 너무 많아, 모든 균을 수집하여 IS6110 RFLP 실험을 할 수가 없는 실정으로 지역 내의 전체 전염경로를 파악하기란 쉽지 않다.

이 기술의 또 다른 응용은 집단발병에서 동일한 균주에 의한 전염 여부를 파악하는데 있다 (10, 11). 우리나라에서도 거의 해마다 고등학교에서 결핵 소집단 발병이 발생하고 있으며, 분리된 결핵 균주에 대한 IS6110 RFLP pattern을 데이터베이스에 저장하고 있다. 그리고 이 기술은 또한 재발환자가 치료 실패에 의한 것인지 다른 균의 재감염에 의한 것인지를 구별해 줄 수 있게 되었다 (12).

IS6110 RFLP 기술이 균주 변별력은 탁월하지만, 다량

의 염색체 DNA가 사용되므로 반드시 배양균이 필요하여 배양음성 도말 양성 균에 대한 정보는 얻을 수 없다. 또한 결과의 객관성과 호환성이 결여되어 다른 실험실 결과를 비교하기에는 신뢰도가 떨어진다는 약점이 있다.

2. VNTR

1998년에 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 균주의 전체 게놈이 해독되었고 (13), 이후 여러 결핵 균주의 전체 게놈 정보가 발표되었다. 결핵균 전체 게놈 정보가 해독됨에 따라 Variable Number Tandem Repeat (VNTR)가 발견되었고, 이는 곧 결핵균 분자역학에 새로운 방법에 이용되었다. VNTR에 의한 균주 typing은 신속성과 재현성이 높아 IS6110의 대안으로 급부상하게 되었고, 오늘날 여러 나라에서 결핵균 분자역학을 위해 우선적으로 사용되는 기법이 되었다. VNTR typing은 계놈 상에 존재하는 수십 bp의 염기서열이 하나의 unit로서 copy 수를 조사하여 여러 loci의 VNTR의 copy 수를 가지고 균주를 구별하는 것이다. 이 기법의 장점은 PCR을 이용하므로 소량의 추출 DNA로도 결과를 얻을 수 있다. 해석결과를 디지털 표시가 가능하므로 광역 database 구축에 유리하며, 결과의 호환성으로 다른 실험실간의 비교하는데 있어 문제가 없다. 그러나 균주 변별능력은 IS6110 RFLP 보다 떨어지며, 다수의 VNTR loci 조합이 필요하고, 조합에 따라 균주 변별능력이 다르다 (14). 균주의 변별력이 IS6110 RFLP 정도 되려면 약 15개 이상의 loci를 적절하게 조합을 해야 한다. 일본에서는 VNTR 기법을 매우 활발하게 이용하고 있는데, h value를 사용하여 변별력이 높은 상위 12개 loci로 분석하는 JATA (Japan Anti-Tuberculosis Association) 12를 구축하였다 (15, 16). 그러나 균주의 변별력을 IS6110 RFLP 만큼 높이기 위해서 ETR-A (Exact Tandem Repeat-A), QUB (Queen's University Belfast)18 (VNTR-1982, VNTR 뒤의 숫자는 *M. tuberculosis* H37Rv chromosome 약 4.4 Mb 중의 위치를 의미하며 단위는 Kb임), QUB-11a (VNTR-2163a) 3개를 추가하게 되었다. JATA 15에 VNTR 4120을 추가하였더니 cluster 형성률이 RFLP의 0.9배로 나타나 더 좋은 것으로 나타났다. 유럽에서 주로 사용되고 있는 supply 15- VNTR (17)가 있으나, 일본 균주를 구별하는데 있어서는 JATA 12보다 균주 변별력이 좋지 않았다. 이는 각 나라의 결핵균의 계놈 특성이 다르므로 각 나라에 알맞은 VNTR loci의 조합을 각 나라의 균주로 실험하여 선택하여야 한다는 것을 의미한다. 우리나라에서도 여

러 개의 VNTR loci의 군주 변별력을 조사하였으나, 각 loci 별 변별력에서 조사 별로 차이를 보여 (18~20), 아직도 우리나라 결핵 군주에 가장 적합한 VNTR loci 조합 선정을 위한 추가적 실험이 필요한 실정이라고 볼 수 있다.

3. 결핵의 계통발생학적 측면에서의 분자역학

결핵균 분자역학 과정에서 파생적으로 생긴 결과 중 하나가 결핵균의 계통분화를 정립하는데 이용된 것을 볼 수 있다. 결핵 군주의 전체 게놈 분석이 1998년도에 완성되고, 이후 여러 결핵균의 게놈 염기서열 분석 비교로 결핵균 게놈에서 큰 부위의 차이(Large sequence polymorphisms, LSPs 또는 Regions of Difference, RD)가 발견되었다. 이러한 차이는 결핵균의 계통분화를 연구하는데 있어 중요한 자료로 사용되었다 (21).

1) 특정영역에 IS6110 유전자 존재

1991년도 미국 뉴욕에서 여러 결핵환자에서 분리된 W strain의 특징을 보니, IS6110 유전자가 NTF region에 삽입이 되어 있었음을 알게 되었다 (22). 이후에 결핵균 베이징 군주 중에서 NTF 영역에 IS6110 유전자의 삽입 여부에 따라, 삽입되어 있지 않은 균을 ancient type으로, 삽입되어 있는 균주를 modern type으로 분류하였다.

2) RD

Region of difference (RD)는 계통발생학적 정보를 제시하는 마커로 결핵균에 사용되고 있다 (23). 여러 가지 RD의 유무에 따라 세계의 결핵균 계통을 6개로 나누기도 하였다 (24). 우리나라 군주는 일본, 중국 등과 함께 TbD1을 포함하는 동아시아 계통으로(East-Asian lineage) 분류된다. 최근의 연구에서는 우리나라에서 분리된 균이 세 분류에서 일본과 중국의 군주와 차이가 있는 부분을 발견하였다. 중국의 군주는 modern type이 많으며, 일본과 우리나라는 ancient type이 많다. 또 일본 군주는 RD181이 소실된 균이 많은 ancient type이 많은 반면에 (25). 우리나라 군주는 RD181이 존재하는 ancient type이 많았다 (26).

3) Single nucleotide polymorphism (SNP)

각 유전계통의 분기 시 무작위로 발생한 결핵균 유전자의 SNP에 따라 유전계통을 결정한다. 결핵균에는 이러한 현상이 많이 발생하여 여러 가지 유전자 SNP에 의한 계통분류가 발표되고 있다 (27). SNP 검출기법은 real-time PCR이나 sequencer를 이용하는 방법이 보고되고 있

다 (28, 29). 계통분화 연구는 세계결핵의 현재를 파악하는데 중요 자료가 되며, 향후 어떤 결핵 군주가 세계적으로 유행할 것인지 등, 결핵의 방향을 예측할 수 있도록 해 준다.

4) Spoligotyping

결핵균 게놈에는 Direct repeat (DR)이 있으며, DR 사이에 43개의 spacer가 있다. 이 spacer를 probe로 하여 각 결핵 군주의 DR 부분 PCR 산물로 교잡반응을 한 결과 나타난 spacer 배열의 유무에 의해 군주를 typing하는 방법이다. 이 방법은 원래 감염경로(transmission link) 파악을 위해 개발되었지만 IS6110 RFLP보다 변별력이 떨어져 그 용도로는 부족한 부분이 있다. 그러나 이 방법으로 아시아에 많이 분포하는 베이징 type (spacer 35~43만 존재하는 결핵 군주)을 구별하는 계기가 되었다 (30).

이후 베이징 군주에 대한 연구가 이어졌는데, 대체로 내용은 1) 감염전파력이 우세하다 2) 약제내성과 연관성이 높다 3) 발병, 재발을 유도하기 쉽다 4) BCG 접종에 대한 면역이 되지 않는다 등의 연구 보고서가 있어 베이징 군주는 고병원성균으로 간주되고 있다 (31). 우리나라 군주 조사에서 베이징 군주는 70%가 넘고 다제내성 군주에서 베이징 군주의 분포는 높게 나타났다 (32).

Modern type의 베이징 군주의 전파 및 발병은 ancient type의 베이징 군주보다 우세하다는 연구 보고가 있다 (33).

4. 결핵분자역학의 영향

결핵의 전염경로를 파악하는 용도로 시작되었던 결핵 분자역학의 연구결과는 여러 분야에 영향을 미치게 되었다. 오랫동안 약제내성 균은 균 염색체내 돌연변이에 의해 발생하고 이는 균의 생활에 있어 결함으로 작용하기 때문에 전염력은 없다고 알려져 왔었다 (34). 그러나 소 집단 발병 중에는 약제내성 균도 존재하였고 이들이 같은 군주 type이라는 것이 분자역학기술로 밝혀짐에 따라서 내성 균도 전염시킬 수 있다는 인식이 자리잡게 되었다 (35). 이러한 사실의 발견은, 약제내성 균을 가진 환자를 치료하기가 매우 어렵다는 현실을 감안할 때, 약제내성 균을 가진 환자에 대한 관리를 더욱 철저하게 해야 한다는 필요성을 강조하는 계기가 된다.

다른 측면에서는 재발환자의 경우 기존의 인식은 잠복 결핵균에 의해 재발되는 것으로 간주되어 왔으나 재감염에 의한 결핵환자로 이환될 수 있다는 것이 분자역학으

로 증명되었다. 특히 HIV 양성인 결핵환자에서 재감염 비율이 높았다 (36). 재감염에 의한 재발의 의미는 결핵균 자체에 의한 결핵 백신의 효과가 없다는 것을 의미하며, 따라서 결핵균도 아닌 비시지 백신의 효과를 의심하게 하는 것이다. 그러므로 비시지 효과에 대한 재평가와 더불어 차세대 백신연구의 방향을 잘 설정해야 한다는 메시지를 주고 있다.

잠비아의 최근 연구에 따르면 결핵균의 주요 항원 중의 하나인 ESAT-6 대한 IFN- γ 에 대한 반응이 결핵균 계통에 따라 다르게 나타난다는 것을 보여주었다 (37). 이 결과의 의미는 분포하고 있는 결핵균 계통에 따라 진단 항원도 다르게 해야 할 필요성이 있음을 시사한다.

우리나라에서 경기도의 한 고등학교에서 2005년~2007년까지 약 90명의 환자가 발생하였는데, 그 중에서 배양된 균의 DNA 지문 type을 조사하였더니 모두 동일하였다. 이 사건은 학교에서 결핵환자 발생 시 잠복감염 검사를 확대 실시하게 된 계기가 되었으며, 잠복감염 양성자에게 예방 화학치료를 실시하게 된 동기가 되었다. 이와 같이 분자역학의 연구결과, 과거에는 생각할 수 없었던 결핵 균주가 미치는 여러 가지 영향을 고려할 수 있게 되었다. 과거에는 결핵은 단지 숙주의 면역과 주위 환경요건만 고려 대상이었지만, 결핵 균주 type에 따라 결핵감염 및 발병 여부도 달라질 수 있음을 보여주고 있다. 따라서 분자역학은 결핵관리에 전반적인 영향을 주어 근본적인 방향설정에 기여하고 있다.

5. 결핵분자역학의 미래

분자생물학과 전자공학기술의 눈부신 발전에 힘입어 차세대 염기서열 분석기기(Next Generation Sequencer, NGS)가 등장하여 결핵균 염기서열 분석을 더욱 저렴한 비용으로 더욱 빠르게 실현할 수 있게 되었다. 이러한 기기의 덕택으로 결핵균 염색체의 많은 부분의 염기서열을 쉽게 분석함으로써 균주를 구별할 수 있는 새로운 구별법이 나타나게 될 것이다. 또한 NGS를 통해 여러 계통의 결핵균의 전체 게놈이 밝혀질 것이고, 결핵균 계통에 따라 전염력, 발병력 등의 차이가 있는지, 차이가 있다면 그에 따른 영향은 어느 정도인지를 알 수 있게 될 것이다. 따라서 분포되어 있는 균주의 계통에 알맞은 결핵관리 대책을 마련할 수 있을 것으로 판단하고 있다.

결 론

분자역학의 시초는 결핵 균주를 분류하여 transmission link를 확인하는데 있었다. 분자역학적 기술은 결핵집단 발생에 있어 가장 먼저 해야 할 필수적인 하나의 과정이 되었다. 이와 더불어 결핵균의 계통분화에 대한 연구도 분자역학에서 빠질 수 없는 중요한 위치를 차지하고 있다. 더구나 결핵균의 종류에 따라 전염력 및 발병의 상황, 항결핵약제 내성의 확대 등에 영향을 줄 수 있다는 보고서들이 발표되면서, 분자역학 연구는 결핵관리에 있어서 더욱 중요하게 되었다. 결핵균의 분자역학적 특징을 파악하게 되면 현재의 결핵 대책에 획기적인 방안, 즉 결핵 균주에 맞는 맞춤형 결핵 대책이 가능하게 될 것이다. 현재로서는 우리나라에 결핵환자가 너무 많아서 개별적인 대응에는 한계가 있다. 그러므로 우선 우리나라 결핵균의 전반적인 특징을 먼저 파악하는 것이 필요하다. 우리나라에 널리 퍼져 있는 K 균과 K family의 독성, 전염력, 발병력, 약제내성 유도 능력, 재발이 되는 빈도 등 특징을 파악하게 되면, K family에 대한 효과적인 진단방법 개발, 효과적인 전염방지 대책, 효과적인 치료 대책, 효과적인 항결핵제 개발 등으로 이어지게 될 것이다.

참 고 문 헌

- 1) World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing. WHO Report No. WHO/HTM/TB/2009.411. Geneva, World Health Organization, 2009.
- 2) Frieden TR, Fujiwara PI, Washko RM, Hamburg MA. Tuberculosis in New York City-turning the tide. N Engl J Med 1995;333:229-33.
- 3) Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Res 1990;18:188.
- 4) van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;31:406-9.
- 5) Huh YJ, Ahn DI, Kim SJ. Limited variation of DNA fingerprints (IS6110 and IS1081) in Korean strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis 1995;76:324-9.

- 6) Park YK, Bai GH, Kim SJ. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region. *J Clin Microbiol* 2000;38:191-7.
- 7) Pena MJ, Caminero JA, Campos-Herrero MI, Rodríguez-Gallego JC, García-Laorden MI, Cabrera P, *et al.* Epidemiology of tuberculosis on Gran Canaria: a 4 year population study using traditional and molecular approaches. *Thorax* 2003;58: 618-22.
- 8) Yeo IK, Tannenbaum T, Scott AN, Kozak R, Behr MA, Thibert L, *et al.* Contact investigation and genotyping to identify tuberculosis transmission to children. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:1037-43.
- 9) Park YK, Kang HY, Lim JG, Ha JS, Cho JO, Choi HS, *et al.* Analysis of DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients registered at Health Center in Gyeonggi Province in 2004. *Tuberc Respir Dis* 2006;60:290-6.
- 10) Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, *et al.* The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994;330:1703-9.
- 11) Filia A, Ciarrocchi G, Belfiglio R, Caferri M, Bella A, Piersimoni C, *et al.* Tuberculosis in kindergarten and primary school, Italy, 2008-2009. *Emerg Infect Dis* 2011;17:514-6.
- 12) Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, Singh SP, Murphy MJ, Desmond E, *et al.* Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993;328:1137-44.
- 13) 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;393:537-44.
- 14) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, Tomita M, Fujiyama R, Tanaka N, *et al.* Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett* 2007;270:67-74.
- 15) Okada M, Kobayashi K. Recent progress in mycobacteriology. *Kekkaku* 2007;82:783-99.
- 16) Maeda S, Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S. Rapid, simple genotyping method by the variable numbers of tandem repeats (VNTR) for *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Japan-analytical procedure of JATA (12)-VNTR. *Kekkaku* 2008;83:673-8.
- 17) 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.
- 18) Kang HY, Ryoo SW, Park YK. Evaluation of the selected 12-locus MIRU for genotyping Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *Tuberc Respir Dis* 2009;67:499-505.
- 19) Yun KW, Song EJ, Choi GE, Hwang IK, Lee EY, Chang CL. Strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea by mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats. *Korean J Lab Med* 2009;29:314-9.
- 20) Shamputa IC, Lee J, Allix-Béguec C, Cho EJ, Lee JI, Rajan V, *et al.* Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a tertiary care tuberculosis hospital in South Korea. *J Clin Microbiol* 2010;48:387-94.
- 21) Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, *et al.* Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4865-70.
- 22) 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.
- 23) Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, Goguet de la Salmoniere YO, Kreiswirth BN, Van Soolingen D, *et al.* Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3185-91.
- 24) Gagneux S, Deriemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, *et al.* Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:2869-73.
- 25) 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 Lett* 2009;291:35-43.
- 26) Kang HY, Wada T, Iwamoto T, Maeda S, Murase Y, Kato S, *et al.* Phylogeographical particularity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in South Korea based on international comparison with surrounding countries. *J Med Microbiol* 2010;59:1191-7.
- 27) Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, Qi W, Hazbón MH,

- Bobadilla del Valle M, *et al.* Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* 2006;188:759-72.
- 28) Abadia E, Zhang J, dos Vultos T, Ritacco V, Kremer K, Aktas E, *et al.* Resolving lineage assignation on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method. *Infect Genet Evol* 2010;10:1066-74.
- 29) Alonso M, Navarro Y, Barletta F, Martínez Lirola M, Gotuzzo E, Bouza E, *et al.* A novel method for the rapid and prospective identification of Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains by high-resolution melting analysis. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:349-57.
- 30) 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;33:3234-8.
- 31) Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 2002;10:45-52.
- 32) Park YK, Shin S, Ryu S, Cho SN, Koh WJ, Kwon OJ, *et al.* Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non-Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Microbiol Methods* 2005;63:165-72.
- 33) 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.
- 34) Dye C, Williams BG, Espinal MA, Raviglion MC. Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. *Science* 2002;295:2042-6.
- 35) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Two simultaneous outbreaks of multidrug-resistant tuberculosis--Federated States of Micronesia, 2007-2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:253-6.
- 36) Crampin AC, Mwaungulu JN, Mwaungulu FD, Mwafulirwa DT, Munthali K, Floyd S, *et al.* Recurrent TB: relapse or reinfection? The effect of HIV in a general population cohort in Malawi. *AIDS* 2010;24:417-26.
- 37) de Jong BC, Hill PC, Brookes RH, Gagneux S, Jeffries DJ, Otu JK, *et al.* *Mycobacterium africanum* elicits an attenuated T Cell response to early secreted antigenic target, 6 kDa, in patients with tuberculosis and their household contacts. *J Infect Dis* 2006;193:1279-86.