

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ *MYCOBACTERIUM AVIUM* subsp. *HOMINISSUIS* — ВОЗБУДИТЕЛЯ МИКОБАКТЕРИОЗА ЧЕЛОВЕКА

Д.А. Старкова, О.В. Нарвская

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Среди представителей большой группы нетуберкулезных микобактерий (более 180 видов), *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (*МАН*) обладает наибольшей вирулентностью и является одним из основных возбудителей микобактериоза легких у иммунокомпетентных лиц и диссеминированной формы инфекции у ВИЧ-инфицированных. В связи с ростом заболеваемости микобактериозом, особенно в условиях распространения ВИЧ-инфекции, приобретают актуальность исследования генетического контроля и механизмов вирулентности *M. avium*. Благодаря полной расшифровке нуклеотидной последовательности генома *M. avium* 104 стало возможным его использование в качестве референсного штамма при сравнении с другими геномами. Так, сравнительный анализ штаммов *МАН*, выделенных от больных легочной и диссеминированной формами микобактериоза, продемонстрировал различия в структуре генома, затрагивающие ключевые гены вирулентности. В обзоре представлены современные данные о генетических детерминантах вирулентности *МАН*, ассоциированных с начальной фазой инфицирования. Подробно рассмотрены семейства генов *mce* (mammalian cell entry), *mmp* (mycobacterial membrane proteins), *pe/ppr* и *esx*, обеспечивающих выживание *МАН* в клетках организма-хозяина с момента адгезии и проникновения в макрофаги. Приведены механизмы генетического контроля выживаемости *M. avium* в культуре макрофагов человека *in vitro* и в организме мышей *in vivo* в условиях токсического влияния активных форм кислорода, оксида азота, бактерицидных белков. Сохраняясь в латентном состоянии, *МАН* способны вызывать бактериемию и вторичное поражение органов и тканей. Бактерии *МАН*, связываясь с эпителиальными клетками, образуют микроагрегаты, что способствует инвазии в слизистую оболочку дыхательных путей или желудочно-кишечного тракта, обеспечивая персистенцию в организме хозяина. Рассмотрены известные на данный момент генетические детерминанты, ответственные за формирование микроагрегатов и биопленок. Отмечены генетические и фенотипические особенности *МАН* (отсутствие корд-фактора, наличие плазмид, способность к «переключению» морфологических типов колоний) по сравнению с *M. tuberculosis*. Подчеркнута роль природной резистентности *M. avium* к большинству противотуберкулезных и других антибактериальных препаратов, обычно не применяющихся для лечения туберкулеза. Известно, что кларитромицин, азитромицин, рифабутин, этамбутол, амикацин и фторхинолоны малоэффективны при раздельном применении, поэтому лечение микобактериоза требует

Адрес для переписки:

Старкова Дарья Андреевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-21-49 (служебн.); 8 921 424-63-37 (моб.).
E-mail: dariastarkova13@gmail.com

Contacts:

Daria A. Starkova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 233-21-49 (office); +7 921 424-63-37 (mobile).
E-mail: dariastarkova13@gmail.com

Библиографическое описание:

Старкова Д.А., Нарвская О.В. Генетические детерминанты вирулентности и лекарственной устойчивости *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* — возбудителя микобактериоза человека // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 26–34. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1220

Citation:

Starkova D.A., Narvskaya O.V. Genetic determinants of virulence and drug resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* — a causative agent of mycobacteriosis in humans // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 26–34. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1220

© Старкова Д.А., Нарвская О.В., 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-GDO-1220>

использования комбинации из нескольких препаратов, хирургического вмешательства или сочетания обоих методов. Обсуждаются генетический контроль и механизмы формирования устойчивости штаммов *MAH* к вышеперечисленным антибиотикам.

Ключевые слова: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, микобактериоз, нетуберкулезные микобактерии, вирулентность, гены вирулентности, макрофаги, генетический контроль вирулентности, лекарственная устойчивость, патогенность, гены *mce*, гены *esx*, гены *mmp*, гены *pe/ppa*.

GENETIC DETERMINANTS OF VIRULENCE AND DRUG RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* subsp. *HOMINISSUIS* — A CAUSATIVE AGENT OF MYCOBACTERIOSIS IN HUMANS

Starkova D.A., Narvskaya O.V.

St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Among the members of the large group of non-tuberculous mycobacteria (comprising more than 180 species), *M. avium* subsp. *hominissuis* (*MAH*) is the most significant causative agent of pulmonary infection in immunocompetent individuals as well as disseminated infection in immunocompromised hosts, e.g. human immunodeficiency virus (HIV)-positive patients. Due to increased incidence rate of mycobacteriosis, especially in HIV infection, much still need to be learnt about the *MAH* genetic control and virulence mechanisms. Deciphering the genome contents of the *M. avium* strain 104 (isolated from an AIDS patient with disseminated *MAH* disease) allowed to compare genome sequences of *M. avium* strains to gain insights into genomic diversity associated with variable hosts and environments. Comparative genome analysis of *MAH* strains isolated from patients with pulmonary and disseminated forms of mycobacteriosis revealed differences in the structure of the genome, affecting the key virulence genes. This review provides current data on the genetic determinants of *MAH* virulence associated with the initial phase of infection. Several mycobacterial virulence-associated gene families, such as *mce* (mammalian cell entry), *mmp* (mycobacterial membrane proteins), *pe/ppa* and *esx* expressed by *MAH* during human infection are thought to be crucial for adhesion, entry, survival, and reproduction inside host macrophages. The genetic mechanisms of *MAH* survival in human macrophage cell culture as well as mice exposed to toxic effects of reactive oxygen, nitric oxide, bactericidal proteins (cathelicidin) are discussed. The *MAH* survival in the latency-like state is important for pathogen dissemination. Some genetic and phenotypic features of *MAH* (absence of a cord factor, presence of plasmids, potential to “switch” morphological types of colonies) are compared with *M. tuberculosis*. In addition, we summarized current state of *MAH* drug discovery, a role of *MAH* intrinsic multidrug resistance, genetic control, as well as mechanisms underlying formation of resistance to various groups of antibiotics in *MAH* strains.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, mycobacteriosis, non-tuberculous mycobacteria, virulence, virulence genes, macrophages, genetic control of virulence, drug resistance, pathogenicity, *mce*, *esx*, *mmp*, *pe/ppa*.

Введение

Микобактериоз (лат. mycobacteriosis) — инфекционное заболевание животных и человека, возбудителями которого являются представители большой группы нетуберкулезных микобактерий (НТМБ). Из всех потенциально патогенных видов НТМБ (более 180), наибольшее клиническое значение имеет *M. avium* subsp. *hominissuis* (*MAH*) — возбудитель микобактериоза человека и животных [34].

Среди основных клинико-рентгенологических проявлений микобактериоза, вызванного *MAH*, чаще всего встречаются поражения периферических и внутригрудных лимфатических узлов и легких, сходные с туберкулезными [1, 2].

У иммунокомпетентных лиц входными воротами для *MAH* служат дыхательные пути. При аэрогенном заражении микобактерии колонизируют слизистую бронхов, вызывая поражение легких. Наличие предрасполагающих факторов зачастую способствует развитию инфекции. Так, к группам соматического риска

относят больных кистозным фиброзом, бронхоэктатической болезнью и пациентов, длительно получающих иммуносупрессивные препараты [1, 2, 44]. Повышен риск заболевания у лиц, имеющих профессиональные болезни легких (пневмокониоз и силикоз) и работающих в тесном контакте с сельскохозяйственными животными [2, 14].

При иммуносупрессии (в особенности у ВИЧ-инфицированных) входными воротами для *MAH* служит не только респираторный, но и желудочно-кишечный тракт. Бактерии *MAH*, попадая с пищей или водой в полость рта, способны сохраняться в кислой среде желудка и поражать слизистую кишечника. Находясь в латентном состоянии в лимфоузлах брюшной полости, *MAH* в дальнейшем могут вызывать бактериемию и вторичное поражение костного мозга, печени и селезенки (персистируют в макрофагах и купферовских клетках) [5, 35]. Диссеминированная форма инфекции является одним из самых частых осложнений у ВИЧ-инфицированных на поздних стадиях [2, 14].

Попав в макрофаги, *M. avium* противостоят токсическому влиянию активных форм кислорода, оксида азота, бактерицидных белков (кателицидин) и препятствуют слиянию фагосомы с лизосомой, активно размножаясь в макрофагах. Захват микобактерий макрофагами опосредован рецепторами комплемента CR3b, CR1, CR3, CR4, маннозо-фукозным и/или avb3 интегриновым рецепторами и рецептором фибронектина [9, 16, 18, 23]. Через несколько суток инфицированный *МАН* макрофаг подвергается апоптозу, что, однако, не приводит к полной элиминации возбудителя. Бактерии *МАН* покидают апоптотные клетки макрофагов и инфицируют соседние, способствуя дальнейшей диссеминации возбудителя [5, 12]. Показано, что мутации в генах MAV_2235, MAV_2120, MAV_2410 и MAV_4563 нарушают способность бактерий *МАН* выходить из макрофагов при апоптозе [5].

Вирулентность *M. avium*

Степень патогенности (потенциальной способности микроорганизма вызывать инфекционное заболевание) каждого штамма определяется набором факторов вирулентности. Экспериментально установлено, что большие дозы возбудителя способствуют развитию инфекционного процесса у лабораторных животных. При этом из всех видов НТМБ *M. avium* обладает наибольшей вирулентностью [2].

Существует зависимость между вирулентностью *M. avium*, лекарственной устойчивостью и морфологическими типами колоний (гладкие/шероховатые, прозрачные/непрозрачные) [44]. Показано, что гладкие прозрачные колонии, доминирующие при первичном посеве на питательные среды, содержат бактерии, резистентные к большинству антибиотиков и вирулентные для лабораторных животных [13]. Шероховатые непрозрачные колонии *M. avium*, преобладающие при последующих пассажах культуры *in vitro*, содержат менее вирулентные бактерии [2, 7].

Фенотипической особенностью *МАН* является способность к переключению морфотипов колоний [44]. Основой морфологического изменения гладкого типа на шероховатый является утрата антигенной поверхностной структуры — гликопептидолипида (GPL) в результате делеции протяженного кластера генов *ser2*. Так, шероховатые морфотипы штаммов *МАН*, лишенные GPL, были выделены от больных СПИД с диссеминированной формой микобактериоза [13, 14, 25, 28].

Клинические изоляты *M. avium* подвергаются обратимому переключению между красным и белым морфотипами колоний на среде

с Конго красным (за это ответственна двухкомпонентная регуляторная система генов *mtrAB*) [7]. Белый морфотип отличается большей вирулентностью и резистентностью к антибиотикам по сравнению с красным типом [7, 13, 25].

В зависимости от профиля нуклеотидной последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) *16S-23S rRNA*, штаммы *M. avium* подразделяют на таксономические единицы — секвоары (Mav-A — Mav-H) [37]. Сообщается об ассоциации некоторых секвоаров *M. avium* с вирулентностью. Подавляющее большинство случаев микобактериоза у человека обусловлено штаммами *МАН* секвоаров Mav-A и Mav-B. Секвоар Mav-A вызывает в основном легочные инфекции у пожилых пациентов и шейный лимфаденит у детей, в то время как Mav-B связан с тяжелыми диссеминированными формами инфекции у больных СПИД. Оба секвоара являются продуцентами большего количества гемолизина — важного фактора вирулентности — по сравнению с секвоарами остальных типов [14, 37].

Исследование антигенных свойств штаммов *M. avium*, выделенных от больных СПИД, выявило преобладание серотипов 4, 6, 8 и 11, которые характеризовались большей вирулентностью, чем другие серотипы в опытах *in vitro* и *in vivo* при заражении мышей [38, 45, 46].

Генетические детерминанты вирулентности *M. avium*

В связи с ростом заболеваемости микобактериозом, особенно в условиях распространения ВИЧ-инфекции, приобретают актуальность исследования генетического контроля и механизмов вирулентности *M. avium*.

Многие механизмы, используемые *МАН* для выживания в клетках организма-хозяина, аналогичны таковым у *M. tuberculosis*, однако существуют и различия. Так, у *M. avium* и других НТМБ отсутствует корд-фактор — важнейший среди многочисленных факторов вирулентности *M. tuberculosis* [1, 2]. В отличие от бактерий *M. tuberculosis*, которые способны покинуть вакуоль инфицированного макрофага, *МАН* остаются в клетках хозяина до начала апоптоза [5].

Геном *M. avium*, помимо хромосомной ДНК, включает внехромосомные генетические элементы — плазмиды (отсутствуют у *M. tuberculosis*), которые обеспечивают селективные преимущества при воздействии жестких условий окружающей среды. Так, у *МАН* выявлена уникальная плаزمиды pMAN135, которая содержит гены, ассоциированные с вирулентностью *МАН* и устойчивостью к противомикробным препаратам. Наибольшая частота носительства pMAN135

была отмечена у клинических изолятов *МАН* (практически не определялась у изолятов, полученных от свиней) [32, 41, 43].

Благодаря полной расшифровке нуклеотидной последовательности генома *M. avium* 104 стало возможным его использование в качестве референсного штамма при сравнении с другими геномами. Так, сравнительный анализ штаммов *МАН*, выделенных от больных легочной (*M. avium* ТН135) и диссеминированной (*M. avium* 104) формами микобактериоза, продемонстрировал различия в структуре генома, затрагивающие ключевые гены вирулентности [42].

К основным генам вирулентности патогенных микобактерий относят семейства генов *mce* (mammalian cell entry), *mmp* (mycobacterial membrane proteins), *pe/ppa* и *esx* (рис.) [22].

Отличительной особенностью микобактерий является высокое содержание липидов и восков в клеточной стенке, что играет ключевую роль во внутриклеточном выживании патогена. Известно, что белки MmpL и MmpS опосредуют транспорт липидных метаболитов для биосинтеза липидов клеточной стенки.

Геном штамма *МАН* ТН135 содержит все гены *mmpL* и *mmpS*, обнаруженные в геноме штамма *МАН*104, а также ТН135-специфичные гены *mmpL5* (*МАН*_0778), *mmpL5_5* (*МАН*_4506), *mmpL6* (*МАН*_3375), ген семейства *mmpL* (*МАН*_0016) и *mmpS4_1* (*МАН*_4505) [40]. Хотя роль генов *mmpL* у *M. avium* полностью не изучена, установлено, что инфицирование макрофагов *M. avium* связано с экспрессией транспортных белков MmpL, вероятно по аналогичному *M. tuberculosis* механизму [28].

Семейство микобактериальных генов *esx*, кодирующих белки системы секреции метаболитов VII типа, включает пять ESX-геномных локусов (ESX-1 — ESX-5). В частности, белки ESAT-6 и CFP-10, кодируемые ESX-1, участвуют в лизисе мембран фагосом, межклеточном распространении и являются ключевыми факторами вирулентности *M. tuberculosis* [11]. Характерной особенностью генома *МАН* является отсутствие локуса ESX-1 и наличие интактных локусов ESX-2 — ESX-5 с неполной гомологией в отношении генома *M. tuberculosis* [22, 42]. Инактивация ESX-5 приводит к потере

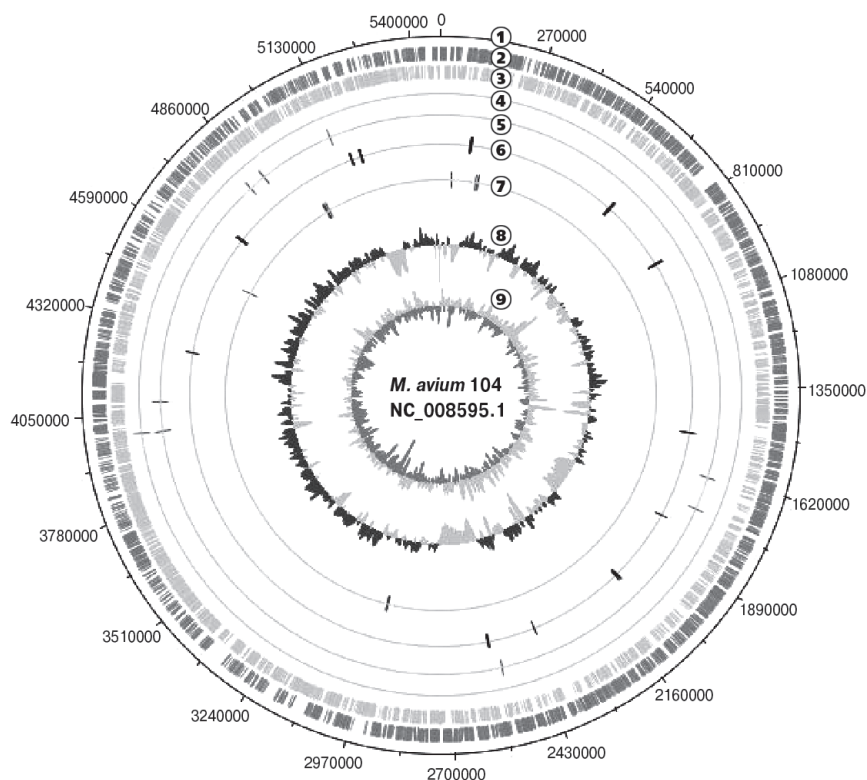


Рисунок. Локализация основных детерминант вирулентности на хромосоме *M. avium* 104

Figure. Localization of the main determinants of virulence on the chromosome *M. avium* 104

1 — шкала в п.н.; 2 — кодирующие участки на плюс-цепи; 3 — кодирующие участки на минус-цепи; 4 — локализация гена *mmpS*; 5 — локализация генов *mmpL*; 6 — локализация семейства генов *mce*; 7 — локализация семейства генов *esx*; 8 — GC состав (доля GC по отношению к длине ДНК, %); 9 — GC skew (отклонение по отношению суммы всех гуанинов к сумме всех цитозинов, (G-C)/(G+C)).

1 — scale, base pairs; 2 — coding DNA sequences (CDS) on the plus chain; 3 — CDS on the minus chain; 4 — localization of the *mmpS* gene; 5 — localization of *mmpL* genes; 6 — localization of the *mce* gene family; 7 — localization of the *esx* gene family; 8 — GC content scale; 9 — GC skew scale.

способности *M. avium* модулировать реакцию иммунного ответа с участием макрофагов [30].

Ряд белков, обнаруженных в инфицированных *МАН* макрофагах, кодировались генами, гомологичными *mce1* и *mce4* у *M. tuberculosis*. Эти гены входят в состав двух из четырех *mce*-оперонов, ассоциированных с вирулентностью микобактерий. Белок Mce1A способствует проникновению микобактерий в макрофаг, а продукты оперона *mce4* обеспечивают усвоение холестерина — важного источника энергии у микобактерий [22, 42].

Известно, что микобактерии имеют два родственных семейства генов *pe/ppr*. Наименования этих генов отражают присутствие ProGlu (PE) и ProProGlu (PPE) мотивов в консервативных доменах N-терминальной области соответствующих глицин-богатых белковых антигенов. Показано, что белки PE и PPE, экспрессируемые на поверхности бактериальных клеток, ассоциированы с вирулентностью микобактерий и формированием клеточного и гуморального иммунного ответа [22]. У трех подвидов *M. avium* — *МАН*, *ММА* и *МАР* — были выявлены 12 PE и 49 PPE ортологов [29]. Среди ортологов PPE особый интерес представляют гены MASPPE4 (MAV_0790) и MASPPE12 (MAV_2006), поскольку являются уникальными для штамма *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 [21, 26, 29]. Функциональная область ESX-5 генома *M. avium* обеспечивает экспорт ряда белков PE/PPE и является одной из основных детерминант вирулентности *M. avium*. Так, белок MAV_2928 (продукт гена PPE25-MAV области ESX-5) экспрессируется в ответ на низкое содержание питательных веществ в фагосоме и транслоцируется на поверхность бактериальной клетки. Инактивация гена PPE25-MAV приводит к нарушению способности микроорганизма реплицироваться внутри макрофагов и значительно ослаблению вирулентности как *in vitro*, так и *in vivo* [27, 30].

Как и многие патогенные бактерии, *МАН* способны связываться с эпителиальными клетками, что приводит к образованию микроагрегатов и инвазии в слизистую оболочку дыхательных путей или желудочно-кишечного тракта, обеспечивая персистенцию в организме хозяина. Образование микроагрегатов предшествует образованию биопленок, что частично объясняет устойчивость *M. avium* к антибиотикам и рецидивирующий характер респираторных инфекций [3, 39].

Важную роль в формировании биопленок играют такие генетические детерминанты, как MAV_4604 и MAV_1406 [22], а также продукты генов кластера GPL (отвечает за синтез гликопептидолипида — одного из основных компонентов клеточной стенки микобактерий). Отмечено,

что у штаммов *M. avium* с мутациями в генах *sucA* (кодирует 6-оксидегидрогеназу), *pstB* (кодирует протеин-синтетазу) нарушается способность к формированию биопленок [20, 47].

Продукт гена MAV_3013 (MBP-1, англ. Microaggregate Binding Protein-1) участвует в адгезии микроагрегата к клеткам эпителия посредством взаимодействия с белком хозяина — виментином. L. Vabrak с соавт. (2015) выявили высокий уровень экспрессии гипотетического гена MAV_0831 (MIP-1, англ. Microaggregate Invasion Protein-1) в ходе формирования микроагрегатов. MIP-1 способствует эффективному проникновению сформировавшегося агрегата в эпителиальные клетки хозяина посредством взаимодействия с филамином А — актинсвязывающим структурным белком цитоскелета [3, 39, 47]. Продукты генов MAV_5138 и MAV_3679, регулируемые геном *fadD2* (кодирует ацил-КоА-синтетазу), ответственны за инвазию *МАН* в эпителиальные клетки [15].

Изучение генетического контроля вирулентности *M. avium* в культуре макрофагов человека *in vitro* и в организме мышей *in vivo* выявило некоторые детерминанты вирулентности, ассоциированные с начальной фазой инфицирования. Были идентифицированы гены, кодирующие белки, аналогичные белкам других микроорганизмов и участвующие в синтезе пиримидина (*carB*), полисахаридов (*udgA*) и микобактина (*mbtE* и *mbtF*), цикле трикарбоновых кислот (*icd* и *sucA*), глиоксалатном цикле (*icl*), нитрат-нитритном дыхании (*nirB* и *narK3*), переработке нуклеотидов и нуклеозидов (*add*), связывании/транспорте белков (*dppD*, *glnQ*), ДНК-репликации (*dnaZX*), синтезе нуклеотидов (*guaB3*), регуляции трансляции (*infB*, *greA*), деградации макромолекул (*lipL*) [9, 18].

Показано, что ген *mig* активно экспрессируется только в процессе размножения *M. avium* в макрофагах [9, 18, 33, 48].

Регуляторный белок OхuR индуцирует экспрессию генов, ассоциированных с ответной реакцией на действие оксидативного стресса, связанного с действием производных перекиси водорода в фагосомах [9, 40].

Выявлена высокая экспрессия гена *oppA* (MAV_0464) *M. avium* в печени, легких и селезенке мышей на ранних этапах инфицирования. Белки Opp отвечают за активный транспорт в бактериальную клетку олигопептидов, которые используются в качестве источников аминокислот и углерода. С этими белками взаимодействует гипотетический белок MAV_2941, который секретируется бактериальной клеткой в цитоплазму макрофагов *in vitro*. Мутации в генах *oppA* и MAV_2941 приводят к значительному подавлению роста бактерий в культуре макрофагов [10].

Также обнаружены гены (*mbtE* и *mbtF*) ферментов, участвующих в биосинтезе сидерофора микобактерии. Повышенная экспрессия данных генов наблюдается *in vivo* у микобактерий, находящихся внутри макрофагов, что связано с дефицитом ионов железа [18].

Экспрессия гомолога гена *icl* (изоцитрат-лиаза) *M. tuberculosis* была обнаружена при персистенции *M. avium* в макрофагах [17, 18].

Лекарственная устойчивость *M. avium*

M. avium обладает природной резистентностью к большинству противотуберкулезных и других антибактериальных препаратов, обычно не применяющихся для лечения туберкулеза. Установлено, что у *M. avium* полисахариды внешнего слоя клеточной стенки препятствуют диффузии химиотерапевтических препаратов внутрь клетки, поэтому условия, способствующие нарушению ее целостности, приводят к повышению лекарственной чувствительности микроба [2, 7, 44].

Такие препараты, как кларитромицин, азитромицин, рифабутин, этамбутол, амикацин и фторхинолоны малоэффективны при раздельном применении, поэтому лечение микобактериоза требует использования комбинации из нескольких препаратов, хирургического вмешательства или сочетания обоих методов [2].

Макролиды (кларитромицин и азитромицин) являются ключевыми лекарственными средствами для лечения микобактериоза, вызванного *МАН*. Механизм действия макролидов заключается в связывании с рибосомным туннелем большой субъединицы рибосомы бактериальной клетки, что нарушает освобождение растущей пептидной цепи от пептидилтрансферазного центра. Приобретенная антибиотикорезистентность почти всегда связана с мутацией в генах 23S рРНК, ответственных за связывание макролидов с рибосомами. Точечные мутации в положениях 2058 и 2059 в гене *rml* 23S рРНК в большинстве случаев (80–100%) ассоциированы с устойчивостью к макролидам клинических изолятов *M. avium* [8, 19, 31, 44].

Аминогликозиды (канамицин, амикацин, гентамицин) связываются с 30S-субъединицей бактериальной рибосомы, нарушая процесс трансляции, что приводит к гибели клеток. У некоторых клинических изолятов *M. avium*, устойчивых к амикацину, встречается мутация A1408G в гене *rrs* 16S rRNA [6, 19].

Рифампицин (противотуберкулезный препарат первого ряда) связывается с β -субъединицей РНК-полимеразы, кодируемой геном *rpoB*, блокируя удлинение цепи РНК. Устойчивость к рифампицину у *M. tuberculosis* связана с мутациями в области RRDR (rifampin

resistance-determining region) гена *rpoB*. В настоящее время у рифампицин-резистентных клинических изолятов *M. avium* не выявлено мутаций в области RRDR *rpoB*, что обуславливает необходимость поиска замен в геноме *МАН* за пределами данной области [19].

Этамбутол является одним из ключевых препаратов для лечения *МАН*-ассоциированных заболеваний. Этамбутол ингибирует биосинтез арабиногалактана — важнейшего компонента клеточной стенки, а устойчивость к этамбутолу ассоциирована с приобретенными мутациями в опероне *embCAB* (кодирует микобактериальную арабинозилтрансферазу) [19]. Устойчивость к этамбутолу *M. avium* связана со сверхэкспрессией генов *embAB* [4, 19].

Антибиотики группы фторхинолонов представляют особый интерес для лечения микобактериальной инфекции, так как активно действуют на возбудитель внутри клеток фагоцитов [2]. У *M. tuberculosis* большинство (~90%) устойчивых к фторхинолонам штаммов имеют мутации в области QRDR (quinolone resistance-determining region) генов *gyrA* и *gyrB* (кодируют ДНК-гиразу). Сообщается о некоторых мутациях в генах *gyrA* и *gyrB* у клинических изолятов *M. avium*, однако корреляции между однонуклеотидными заменами и резистентностью штаммов к фторхинолонам не выявлено [19, 24].

Обнаружено, что два гена — *pks12* (Maa1979) и Maa2520 — принимают участие в формировании лекарственной устойчивости у штаммов *M. avium*. В результате инсерционной мутации в локусе Maa2520 получены штаммы, чувствительные к ципрофлоксацину, кларитромицину, пенициллину и рифампицину. Они не образовывали лекарственно-устойчивых колоний по сравнению с диким предшественником и были чувствительны к минимальной ингибирующей концентрации препаратов. Ген Maa2520 кодирует гипотетические белки клеточной стенки, которые имеют высокую степень гомологии с белками *M. tuberculosis*, и, возможно, выполняют роль ее стабилизаторов [36]. Мутации в гене *pks12* (Maa1979) *M. avium* приводят не только к повышению лекарственной чувствительности ко всем вышеперечисленным препаратам, но также к изменению морфологии колоний (шероховатый тип). Продукт гена *pks12* штамма *M. avium* 104 на 87% гомологичен таковому микобактерий туберкулеза, участвует в синтезе фтиоцеролдимикоцерозата (DIM) — одного из основных компонентов клеточной стенки, обеспечивающих проницаемость [20, 36].

Таким образом, в связи с неуклонным ростом заболеваемости микобактериозом (особенно в условиях распространения ВИЧ-инфекции), резко возрастает необходимость исследования генетического контроля и механизмов виру-

лентности *M. avium*. При этом до сих пор остается открытым вопрос об источнике инфицирования и путях передачи инфекции. Полностью не изучены генетические механизмы и роль отдельных генов возбудителя в формировании иммунного ответа организма. Сведения о генах и мутациях в них, оказывающих влияние на возникновение лекарственной устойчивости штаммов *МАН*, малочисленны, поэтому попыт-

ки лечения больных с диссеминированными процессами, вызванными *M. avium*, в большинстве случаев оказываются безуспешными. Все это диктует необходимость дальнейшего изучения молекулярно-генетической структуры популяций *M. avium* различных подвидов с целью выявления молекулярных маркеров возбудителя, ассоциированных с клиническими проявлениями инфекции у человека.

Список литературы/References

1. Вишневский Б.И., Маничева О.А., Шеголева Р.А., Оттен Т.Ф. Вирулентность потенциально патогенных нетуберкулезных микобактерий. Обзор // Медицинский альянс. 2015. № 4. С. 5–14. [Vishnevskii B.I., Manicheva O.A., Shchegoleva R.A., Otten T.F. Virulence of potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria. Review. *Meditsinskii al'yans* = *Medical Alliance (Russia)*, 2015, no. 4, pp. 5–14. (In Russ.)]
2. Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз. СПб.: Медицинская пресса, 2005. 224 с. [Otten T.F., Vasil'ev A.V. *Mycobacteriosis*. St. Petersburg: *Meditsinskaya Pressa*, 2005. 224 p. (In Russ.)]
3. Babrak L., Danelishvili L., Rose S.J., Bermudez L.E. Microaggregate-associated protein involved in invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Virulence*, 2015, vol. 6, no. 7, pp. 694–703. doi: 10.1080/21505594.2015.1072676
4. Belanger A.E., Besra G.S., Ford M.E., Mikusová K., Belisle J.T., Brennan P.J., Inamine J.M. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, no. 21, pp. 11919–11924. doi: 10.1073/pnas.93.21.11919
5. Bermudez L.E., Danelishvili L., Babrack L., Pham T. Evidence for genes associated with the ability of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* to escape apoptotic macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2015, vol. 5, no. 63. doi: 10.3389/fcimb.2015.00063
6. Brown-Elliott B.A., Iakhiaeva E., Griffith D.E., Woods G.L., Stout J.E., Wolfe C.R., Turenne C.Y., Wallace R.J.Jr. In vitro activity of amikacin against isolates of *Mycobacterium avium* complex with proposed MIC breakpoints and finding of a 16S rRNA gene mutation in treated isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no. 10, pp. 3389–3394. doi: 10.1128/JCM.01612-13
7. Cangelosi G.A., Do J.S., Freeman R., Bennett J.G., Semret M., Behr M.A. The two-component regulatory system *mtrAB* is required for morphotypic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, no. 2, pp. 461–468. doi: 10.1128/AAC.50.2.461-468.2006
8. Christianson S., Grierson W., Wolfe J., Sharma M.K. Rapid molecular detection of macrolide resistance in the *Mycobacterium avium* complex: are we there yet? *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no. 7, pp. 2425–2426. doi: 10.1128/JCM.00555-13
9. Danelishvili L., Poort M.J., Bermudez L.E. Identification of *Mycobacterium avium* genes up-regulated in cultured macrophages and in mice. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, vol. 239, no. 1, pp. 41–49. doi: 10.1016/j.femsle.2004.08.014
10. Danelishvili L., Stang B., Bermudez L.E. Identification of *Mycobacterium avium* genes expressed during in vivo infection and the role of the oligopeptide transporter *OppA* in virulence. *Microb. Pathog.*, 2014, vol. 76, pp. 67–76. doi: 10.1016/j.micpath.2014.09.010
11. Dumas E., Christina Boritsch E., Vandebogaert M., Rodríguez de la Vega R.C., Thiberge J.M., Caro V., Gaillard J.L., Heym B., Girard-Misguich F., Brosch R., Sapriel G. Mycobacterial pan-genome analysis suggests important role of plasmids in the radiation of type VII secretion systems. *Gen. Biol. Evol.*, 2016, vol. 8, no. 2, pp. 387–402. doi: 10.1093/gbe/evw001
12. Early J., Fischer K., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* uses apoptotic macrophages as tools for spreading. *Microb Pathog.*, 2011, vol. 50, no. 2, pp. 132–139. doi: 10.1016/j.micpath.2010.12.004
13. Eckstein T.M., Inamine J.M., Lambert M.L., Belisle J.T. A genetic mechanism for deletion of the *ser2* gene cluster and formation of rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, no. 21, pp. 6177–6182. doi: 10.1128/jb.182.21.6177-6182.2000
14. Falkinham 3rd J.O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1996, vol. 9, no. 2, pp. 177–215.
15. Harriff M.J., Danelishvili L., Wu M., Wilder C., McNamara M., Kent M.L., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* genes MAV_5138 and MAV_3679 are transcriptional regulators that play a role in invasion of epithelial cells, in part by their regulation of *CipA*, a putative surface protein interacting with host cell signaling pathways. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 4, pp. 1132–1142. doi: 10.1128/JB.01359-07
16. Hayashi T., Rao S.P., Catanzaro A. Binding of the 68-kilodalton protein of *Mycobacterium avium* to alpha(v)beta3 on human monocyte-derived macrophages enhances complement receptor type 3 expression. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, no. 4, pp. 1211–1216.
17. Höner zu Bentrup K., Swenson D.L., Miczak A., Russell D.G. Characterization of isocitrate lyase activity and expression in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, no. 23, pp. 7161–7167.
18. Hou J.Y., Graham J.E., Clark-Curtiss J.E. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Infect Immun.*, 2002, vol. 70, no. 7, pp. 3714–3726. doi: 10.1128/iai.70.7.3714-3726.2002
19. Huh H.J., Kim S.Y., Jhun B.W., Shin S.J., Koh W.J. Recent advances in molecular diagnostics and understanding mechanisms of drug resistance in nontuberculous mycobacterial diseases. *Infect. Genet. Evol.*, 2018, pii. S1567–1348(18)30784–6. doi: 10.1016/j.meegid.2018.10.003
20. Ignatov D., Kondratieva E., Azhikina T., Apt A. *Mycobacterium avium*-triggered diseases: pathogenomics. *Cell Microbiol.*, 2012, vol. 14, no. 6, pp. 808–818. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01776.x

21. Iwamoto T., Arikawa K., Nakajima C., Nakanishi N., Nishiuchi Y., Yoshida S., Tamaru A., Tamura Y., Hoshino Y., Yoo H., Park Y.K., Saito H., Suzuki Y. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Infect. Genet. Evol.*, 2014, vol. 21, pp. 479–483. doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.010
22. Jeffrey B., Rose S.J., Gilbert K., Lewis M., Bermudez L.E. Comparative analysis of the genomes of clinical isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* regarding virulence related genes. *J. Med. Microbiol.*, 2017, vol. 66, no. 7, pp. 1063–1075. doi: 10.1099/jmm.0.000507
23. Khattak F.A., Kumar A., Kamal E., Kunisch R., Lewin A. Illegitimate recombination: an efficient method for random mutagenesis in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *BMC Microbiol.*, 2012, vol. 12, no. 204. doi: 10.1186/1471-2180-12-204
24. Kim S.Y., Jhun B.W., Moon S.M., Shin S.H., Jeon K., Kwon O.J., Yoo I.Y., Huh H.J., Ki C.S., Lee N.Y., Shin S.J., Daley C.L., Suh G.Y., Koh W.J. Mutations in *gyrA* and *gyrB* in moxifloxacin-resistant *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium abscessus* complex clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2018, vol. 62, no. 9: e00527–18. doi: 10.1128/AAC.00527-18
25. Krzywinska E., Bhatnagar S., Sweet L., Chatterjee D., Schorey J.S. *Mycobacterium avium* 104 deleted of the methyltransferase D gene by allelic replacement lacks serotype-specific glycopeptidolipids and shows attenuated virulence in mice. *Mol. Microbiol.*, 2005, vol. 56, no. 5, pp. 1262–1273. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04608.x
26. Lahiri A., Sanchini A., Semmler T., Schäfer H., Lewin A. Identification and comparative analysis of a genomic island in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *FEBS Lett.*, 2014, vol. 588, no. 21, pp. 3906–3911. doi: 10.1016/j.febslet.2014.08.037
27. Li Y., Miltner E., Wu M., Petrofsky M., Bermudez L.E. A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. *Cell Microbiol.*, 2005, vol. 7, no. 4, pp. 539–548. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00484.x
28. Li Y.J., Danelishvili L., Wagner D., Petrofsky M., Bermudez L.E. Identification of virulence determinants of *Mycobacterium avium* that impact on the ability to resist host killing mechanisms. *J. Med. Microbiol.*, 2010, vol. 59, pp 8–16. doi: 10.1099/jmm.0.012864-0
29. Mackenzie N., Alexander D.C., Turenne C.Y., Behr M.A., de Buck J.M. Genomic comparison of PE and PPE genes in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 4, pp. 1002–1011. doi: 10.1128/JCM.01313-08
30. McNamara M., Danelishvili L., Bermudez L.E. The *Mycobacterium avium* ESX-5 PPE protein, PPE25-MAV, interacts with an ESAT-6 family Protein, MAV_2921, and localizes to the bacterial surface. *Microb Pathog.*, 2012, vol. 52, no. 4, pp. 227–238. doi: 10.1016/j.micpath.2012.01.004
31. Moon S.M., Park H.Y., Kim S.Y., Jhun B.W., Lee H., Jeon K., Kim D.H., Huh H.J., Ki C.S., Lee N.Y., Kim H.K., Choi Y.S., Kim J., Lee S.H., Kim C.K., Shin S.J., Daley C.L., Koh W.J. Clinical characteristics, treatment outcomes, and resistance mutations associated with macrolide-resistant *Mycobacterium avium* Complex lung disease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, vol. 60, no. 11, pp. 6758–6765. doi: 10.1128/AAC.01240-16
32. Moriyama M., Ogawa K., Nakagawa T., Nikai T., Uchiya K. Association between a pMAH135 and the progression of pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium*. *Kekkaku*, 2016, vol. 91, no. 1, pp. 9–15.
33. Morszczek C., Berger S., Plum G. The macrophage-induced gene (*mig*) of *Mycobacterium avium* encodes a medium chain acyl-coenzyme A synthetase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2001, vol. 1521, no. 1–3, pp. 59–65.
34. Parte A.C. LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.*, 2018, vol. 68, pp. 1825–1829. doi: 10.1099/ijsem.0.002786
35. Petrofsky M., Bermudez L.E. CD4+ T cells but Not CD8+ or gammadelta+ lymphocytes are required for host protection against *Mycobacterium avium* infection and dissemination through the intestinal route. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 5, pp. 2621–2627. doi: 10.1128/IAI.73.5.2621-2627.2005
36. Philalay J.S. Palermo C.O., Hauge A.K., Rustad T.R., Cangelosi G.A. Genes required for intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, vol. 48, no. 9, pp. 3412–3418. doi: 10.1128/AAC.48.9.3412-3418.2004
37. Rindi L., Lari N., Garzelli C. Virulence of *Mycobacterium avium* Subsp. *hominissuis* Human Isolates in an in vitro Macrophage Infection Model. *Int. J. Mycobacteriol.*, 2018, vol. 7, no. 1, pp. 48–52. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_11_18
38. Ritacco V., Kremer K., Laan T., Pijnenburg J.E., Haas P.E., Van Soolingen D. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 1998, vol. 2, no. 3, pp. 242–251.
39. Rose S.J., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* biofilm attenuates mononuclear phagocyte function by triggering hyperstimulation and apoptosis during early infection. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 1, pp. 405–412. doi: 10.1128/IAI.00820-13
40. Sherman D.R., Sabo P.J., Hickey M.J., Arain T.M., Mahairas G.G., Yuan Y., Barry C.E. 3rd, Stover C.K. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, no. 14, pp. 6625–6629. doi: 10.1073/pnas.92.14.6625
41. Uchiya K., Takahashi H., Nakagawa T., Yagi T., Moriyama M., Inagaki T., Ichikawa K., Nikai T., Ogawa K. Characterization of a Novel Plasmid, pMAH135, from *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *PLoS One*, 2015, vol.10, no. 2: e0117797. doi: 10.1371/journal.pone.0117797
42. Uchiya K., Takahashi H., Yagi T., Moriyama M., Inagaki T., Ichikawa K., Nakagawa T., Nikai T., Ogawa K. Comparative genome analysis of *Mycobacterium avium* revealed genetic diversity in strains that cause pulmonary and disseminated disease. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 8: e71831. doi: 10.1371/journal.pone.0071831
43. Uchiya K., Tomida S., Nakagawa T., Asahi S., Nikai T., Ogawa K. Comparative genome analyses of *Mycobacterium avium* reveal genomic features of its subspecies and strains that cause progression of pulmonary disease. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7: 39750. doi: 10.1038/srep39750
44. Wu M.L., Aziz D.B., Dartois V., Dick T. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. *Drug Discov. Today*, 2018, vol. 23, no. 8, pp. 1502–1519. doi: 10.1016/j.drudis.2018.04.001
45. Yakrus M.A., Good R.C. Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 5, pp. 926–929.

46. Yakrus M.A., Reeves M.W., Hunter S.B. Characterization of isolates of *Mycobacterium avium* serotypes 4 and 8 from patients with AIDS by multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, vol. 30, no. 6, pp. 1474–1478.
47. Yamazaki Y., Danelishvili L., Wu M., MacNab M., Bermudez L.E. *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 1, pp. 819–825. doi: 10.1128/AEM.72.1.819-825.2006
48. Yoon J.H., Kim E.C., Kim J.S., Song E.Y., Yi J., Shin S. Possession of the macrophage-induced gene by isolates of the *Mycobacterium avium* complex is not associated with significant clinical disease. *J. Med. Microbiol.*, 2009, vol. 58, no. 2, pp. 256–260. doi: 10.1099/jmm.0.001958-0

Авторы:

Старкова Д.А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Нарвская О.В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; научный консультант ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Starkova D.A., PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Narvskaya O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Scientific Advisor, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.06.2019
Отправлена на доработку 21.02.2020
Принята к печати 11.03.2020

Received 10.06.2019
Revision received 21.02.2020
Accepted 11.03.2020