

## ПОЛИМОРФИЗМ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ГЕНАХ *hsp65* И *MACPPE12* *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

© 2019 г. Д. А. Старкова<sup>1</sup>, \*, Т. Iwamoto<sup>2</sup>, А. А. Вязовая<sup>1</sup>, В. М. Молчанов<sup>3</sup>,  
В. Ю. Журавлев<sup>4</sup>, Б. И. Вишневский<sup>4</sup>, О. В. Нарвская<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии  
им. Пастера, Санкт-Петербург, 197101 Россия

<sup>2</sup>Институт здравоохранения, кафедра инфекций, Кобе, 6500046 Япония

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, 197376 Россия

<sup>4</sup>Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии,  
Санкт-Петербург, 193063 Россия

\*e-mail: dariastarkova13@gmail.com

Поступила в редакцию 17.07.2018 г.

После доработки 15.08.2018 г.

Принята к публикации 24.08.2018 г.

*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (МАН) — обитатели окружающей среды, которые являются оппортунистическими патогенами животных и человека. Целью исследования являлся анализ профилей однонуклеотидных замен (SNPs) в генах *hsp65* и *MACPPE12* для характеристики российской популяции МАН в контексте изучения филогенетических связей и эволюции географически удаленных популяций *M. avium* subsp. *hominissuis*. Нами проведено секвенирование продуктов амплификации *hsp65* и *MACPPE12* 40 штаммов МАН, выделенных от больных микобактериозом. Нуклеотидные последовательности выравнивали на референсный геном *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 (accession no. NC\_008595.1). Сравнивали мутационные профили российских и зарубежных штаммов МАН. Профили однонуклеотидных замен в гене *hsp65* соответствовали секвоарам трех типов: code 1, code 2 и code 3. Большинство штаммов МАН (72.5%) принадлежали к секвоару code 1, характерному для референс-штамма. В гене *MACPPE12* выявлены SNPs в 20 позициях. Профили SNPs *MACPPE12* были сгруппированы в девять “нуклеотидных” секвоаров: NA01, NA02, NA03, NA06, NA10, NA13, NA14, NA19 и NA\_Rus01. Из 20 SNPs восемь являлись несинонимичными, что обусловило формирование семи “аминокислотных” секвоаров: AA01, AA02, AA04, AA07, AA08, AA13 и AA\_Rus01. При этом в состав секвоара AA02 входили три варианта профиля синонимичных нуклеотидных замен: NA02, NA03 и NA06. Половина штаммов МАН принадлежали к секвоару AA02 (тип NA02). Таким образом, нами установлена относительная консервативность нуклеотидной последовательности гена *hsp65* и полиморфизм гена *MACPPE12*, а также выявлен доминирующий кластер AA02 (тип NA02)/code 1 и уникальный вариант AA\_Rus01 (NA\_Rus01) среди штаммов российской популяции МАН. Сравнительный анализ профилей SNP генов *hsp65* и *MACPPE12* позволил выявить различия и сходство между штаммами географически удаленных популяций МАН, что вносит вклад в характеристику глобальной популяции вида *M. avium*.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, микобактериоз, однонуклеотидные замены, SNPs, *hsp65*, *MACPPE12*, MATR-VNTR типирование.

**DOI:** 10.1134/S0016675819050126

Бактерии рода *Mycobacterium* семейства Мусобактериасеae — неподвижные, аэробные, грамположительные палочки, которые характеризуются кислото- и щелочестойкостью при окраске карболовым фуксином, высоким содержанием липидов в клеточной стенке. Содержание Г + Ц в

молекуле ДНК составляет 62–70%. В настоящее время род включает более 130 видов, подвидов и комплексов [1–3].

К представителям рода *Mycobacterium* относят возбудителей туберкулеза человека и животных (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* и др.), а так-

же сапрофитные и условно-патогенные виды нетуберкулезных микобактерий, в частности *Mycobacterium avium* [1–3].

*M. avium* – медленно растущие кислотоустойчивые микобактерии, типичные обитатели окружающей среды, которые, однако, являются оппортунистическими патогенами диких и домашних животных, птиц и человека [1, 4].

Согласно современным представлениям, вид *M. avium* включает несколько подвидов, ассоциированных с определенным кругом хозяев, экологическими и географическими характеристиками штаммов, которые имеют специфические геномные паттерны. Так, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (*МАН*) может вызывать заболевания у людей (в том числе у ВИЧ-инфицированных) и животных (крупного рогатого скота, свиней); *M. avium* subsp. *avium*, *silvaticum* и *paratuberculosis* поражают птиц и животных [1, 5, 6].

Генетическое разнообразие *МАН* обусловлено полиморфизмом кодирующих (*rpoB*, *gyrB*, *hsp65*, область ITS гена *16S-23S rRNA*) и некодирующих (*MATR-VNTR*, *IS901*, *IS900*, *IS1245*, *IS1311*) последовательностей генома. Показано, что геном штаммов *МАН* характеризуется наибольшим числом единичных однонуклеотидных замен (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) по сравнению с *M. avium* других подвидов [7].

Анализ полиморфизма участка конститутивно-го гена *hsp65*, кодирующего белок теплового шока (*heat shock protein*) с молекулярной массой 65 кДа, используют для геноидентификации *МАН* [8–10].

Известно, что микобактерии имеют два родственных семейства генов – PE и PPE. 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 [11]. Среди ортологов PPE особый интерес представляет ген *MACPPE12*, поскольку он является уникальным для подвида *hominissuis* [12, 13].

Для дифференциации штаммов (генотипирования) *МАН* используют присутствие однонуклеотидных замен в генах *hsp65* и *MACPPE12* [4, 7, 8].

Ранее на основе 13-локусного *MATR-VNTR*-типирования и *IS1245-RFLP*-типирования нами выявлена генетическая неоднородность 90 штаммов *МАН*, выделенных от больных микобактериозом из числа иммунокомпетентных (микобактериоз легких) и ВИЧ-инфицированных (диссеминированная форма микобактериоза) [14, 15].

Целью настоящего исследования является анализ профилей однонуклеотидных замен в генах *hsp65* и *MACPPE12* для характеристики рос-

сийской популяции *МАН* в контексте изучения филогенетических связей и эволюции географически удаленных популяций *M. avium* subsp. *hominissuis*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены 90 штаммов *M. avium*, полученных от двух групп пациентов (72 штамма от иммунокомпетентных больных микобактериозом легких и 19 штаммов от ВИЧ-инфицированных с диссеминированной формой инфекции) в 2008–2011 гг. в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте фтизиопульмонологии (СПбНИИФ). Культивирование микобактерий осуществляли в лаборатории СПбНИИФ общепринятым методом на среде Левенштейна–Йенсена при 37°C. Видимый рост культур медленно растущих микобактерий наблюдали в течение 21 дня.

Процедуру выделения хромосомной ДНК из чистых культур *M. avium* проводили с использованием стандартного протокола [16].

Все штаммы *M. avium* были отнесены к подвиду *hominissuis* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) для детекции инсерционных элементов (*IS901*, *IS900*) [17]. Аллельный полиморфизм 90 штаммов *МАН* оценивали методом *MATR-VNTR*-типирования по 13 вариабельным локусам: *TR292*, *TRX3*, *TR25*, *TR47*, *MATR-1*, *MATR-4*, *MATR-5*, *MATR-6*, *MATR-8*, *MATR-11*, *MATR14*, *MATR-15*, *MATR-16* [15, 18, 19].

Для дальнейшей оценки генетической вариабельности штаммов *МАН* методом секвенирования продуктов амплификации генов *hsp65* и *MACPPE12* из 90 штаммов были отобраны 40 (в том числе 19 – от ВИЧ-позитивных пациентов), из которых 24 имели индивидуальный *MATR-VNTR*-профиль IP (Individual Profile), остальные 16 входили в состав кластеров Ma1–Ma8 [15].

Секвенирование продукта амплификации 3'-концевого участка гена *hsp65* 1059 пн (начиная с позиции 574) проводили с использованием прямого *MACbspF\_574* (CGGTTTCGACAAGGGTTACAT) и обратного *MACbsp65R* (ACGGACTCAGAAGTCCATGC) праймеров [4, 20].

Секвенирование продукта амплификации размером 1337 пн гена *MACPPE12* (расположен в локусе *MAV\_2006* референс-штамма *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 (accession no. in GenBank, NC\_008595.1)) проводили с использованием прямого *MAV\_2006F* (TGCGTGGTAACAAAAGCAAC) и обратного *MAV\_2006R* (CTTGCTGCGTAATGCGATAA) праймеров [13].

Обработка хроматограмм секвенирования и выравнивание сиквенсов на референсный геном *M. avium* subsp. *hominissuis* 104, трансляция генов и идентификация нуклеотидных и аминокислотных замен были выполнены с использованием

**Таблица 1.** Профили SNPs в гене *hsp65* клинических изолятов *МАН* по сравнению со штаммом *M. avium* subsp. *hominissuis* 104

<i>hsp65</i> секвоары	Позиции нуклеотидных замен в штамме <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> 104					Число штаммов <i>МАН</i>
	1128	1218	1269	1272	1536	
Code 1	C	A	G	C	A	29
Code 2	·	G	·	·	G	3
Code 3	G	G	C	G	G	8

пакета программ SnapGene® (версия 4.1), Unipro UGENE 1.12 (Россия) и Highest stringency. Обработанные последовательности были выровнены на референсный геном методом локального парного выравнивания (алгоритм Смита–Ватермана) с автоматической идентификацией нуклеотидных замен. Поиск аминокислотных замен осуществлялся путем сравнения аминокислотных последовательностей продуктов трансляции референсного генома и анализируемых сиквенсов.

Степень родства между штаммами *МАН* оценивали с использованием алгоритма Neighbor Joining (NJ) и графически отображали в виде дендрограммы, построенной на сайте URL: <http://www.miru-vntrplus.org>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Видимый рост нефотохромогенных микобактерий на среде Левенштейна–Йенсена, положительные результаты биохимических тестов (каталазная активность, способность восстанавливать теллурид калия, наличие никотинамидазы и пирозинамидазы) позволили судить о принадлежности 40 чистых культур медленно растущих нетуберкулезных микобактерий к группе *Mycobacterium avium* complex. Все штаммы были идентифицированы до вида *M. avium* с использованием тест-системы GenoType® *Mycobacterium* CM/AS (Hain Lifescience, Германия) и отнесены к подвиду *hominissuis*, поскольку не содержали мобильных элементов IS901 и IS900 [14, 15].

Результаты секвенирования ПЦР-продукта 3'-участка гена *hsp65* (1090 пн), с одной стороны, подтвердили принадлежность исследуемых штаммов *M. avium* к подвиду *hominissuis*, с другой – продемонстрировали их относительный геномный полиморфизм. Так, профили однонуклеотидных замен в гене *hsp65* (табл. 1) соответствовали секвоарам трех типов: code 1, code 2 и code 3 [4, 20]. Большинство штаммов *МАН* ( $n = 29$ ; 72.5%) были отнесены к секвоару code 1, характерному для референс-штамма *M. avium* subsp. *hominissuis* 104. Секвоары code 2 и code 3 включали 3 (7.5%) и 8 (20%) штаммов соответственно.

Следует отметить, что к секвоару code 1 принадлежали 15 из 19 штаммов *МАН*, выделенных от ВИЧ-позитивных больных микобактериозом с диссеминированной формой инфекции; к секвоару code 3 – остальные штаммы.

Секвенирование нуклеотидной последовательности гена *MACPPE12* 40 штаммов *МАН* выявило однонуклеотидные замены в 20 позициях (табл. 2) по сравнению с референс-штаммом *M. avium* subsp. *hominissuis* 104. Как видно из табл. 2, профили SNPs были сгруппированы в девять “нуклеотидных” секвоаров: NA01, NA02, NA03, NA06, NA10, NA13, NA14, NA19 и NA\_Rus01 (Nucleic Acid, нуклеиновая кислота). Из 20 SNPs восемь являлись несинонимичными (nsSNPs), что обусловило наличие семи “аминокислотных” секвоаров: AA01, AA02, AA04, AA07, AA08, AA13 и AA\_Rus01 (Amino Acid, аминокислота). При этом в состав секвоара AA02 входили три варианта профиля синонимичных нуклеотидных замен (sSNPs): NA02, NA03 и NA06. Следует отметить, что обозначения выявленных нами секвоаров по аминокислотному и нуклеотидному типам приведены согласно Iwamoto et al. [13]. Однако секвоар, обозначенный AA\_Rus01 (NA\_Rus01), являлся уникальными для российской выборки штаммов *МАН*.

Половина из 40 штаммов *МАН* были отнесены к доминирующему секвоару AA02 типа NA02. К этому же секвоару принадлежали девять (47.4%) из 19 штаммов, выделенных от ВИЧ-позитивных больных микобактериозом; к типам NA03 и NA06 секвоара AA02 – по одному штамму *МАН*.

Секвоары AA07 и AA13 включали по пять штаммов соответственно; остальные секвоары – AA01, AA04, AA08, AA\_Rus01 содержали от одного до трех штаммов *МАН*.

Характеристика полиморфизма клинических изолятов *МАН* по генам *MACPPE12* и *hsp65* представлена в табл. 3. Данные табл. 3 демонстрируют, что в российской популяции *МАН* доминирующим является кластер AA02 (тип NA02)/code 1.

Таблица 2. Профили SNPs в гене *MASRP12* клинических изолятов *M. avium* subsp. *hominissuis* 104

Аминоислотный SNP (AA) тип профиля	Нуклеотидный SNP (NA) тип профиля	Позиции нуклеотидных замен в штамме <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> 104																Число штаммов МАН					
		66	272	468	558	605	733	744	765	822	829	831	866	867	868	870	877		924	978	1150	1330	
AA01	NA01	A	A	T	T	C	C	G	G	G	A	C	T	G	G	G	G	C	G	G	A	N (Arg-Gly)	4
AA02	NA02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	20
	NA03	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	1
	NA06	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	1
AA04	NA10	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	1
AA07	NA13	G	.	C	C	.	.	.	.	G	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	5	
AA08	NA14	.	G	C	C	.	.	.	.	G	T	.	.	.	.	.	.	T	A	.	G	2	
AA13	NA19	.	.	C	C	.	.	A	A	G	T	A	A	A	.	.	.	.	.	A	.	5	
AA_Rus01	NA_Rus01	.	.	C	C	.	.	.	.	G	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	1	

**Таблица 3.** Характеристика полиморфизма клинических изолятов *МАН* по генам *МАСРРЕ12* и *hsp65*

Секвоары <i>МАСРРЕ12</i>		Секвоары <i>hsp65</i>		
АА-тип	NA-тип	code 1	code 2	code 3
AA01	NA01	2	1	1
AA02	NA02	15	2	3
	NA03	1	–	–
	NA06	1	–	–
AA13	NA19	3	–	2
AA04	NA10	1	–	–
AA07	NA13	3	–	2
AA08	NA14	2	–	–
AA_Rus01	NA_Rus01	1	–	–

### ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полиморфизма участка конститутивного гена *hsp65* успешно используют для геноидентификации *M. avium* уже более 10 лет. Однако присутствие и распределение однонуклеотидных мутаций в различных участках *hsp65* позволило использовать последовательность данного гена не только для внутривидовой идентификации, но и дифференциации штаммов (генотипирования) возбудителя [7–10]. Различные варианты рекомбинационных событий между аллелями в геноме *МАН* привели к формированию гетерогенности популяции в целом [7].

Так, сравнительный анализ мутационных профилей *hsp65* российских и зарубежных штаммов, выделенных от человека, выявил различия популяций *МАН*. Установлено, что в Японии и Корее явно доминировали секвоары code 15, code 16 и code 2, тогда как наиболее распространенный секвоар code 1, выявленный более чем у половины российских штаммов (72.5%), встречался лишь у 4.7% штаммов из Японии и отсутствовал в корейской выборке [4, 21]. Вместе с тем секвоары code 1 и code 2 преобладали среди штаммов *МАН* в США и Канаде [20].

Обращает на себя внимание, что code 1 в Японии доминирует у штаммов *МАН*, выделенных от свиней (76%) [4]. Секвоары code 1 (23.1%) и code 2 (65.4%) преобладают у штаммов *МАН* крупного рогатого скота в Швейцарии [22].

Принимая во внимание генетическое родство штаммов *M. avium hominissuis* – оппортунистических патогенов домашних животных и человека, ряд авторов указывают на общность источников инфекции и возможность передачи возбудителя от животных к человеку [1, 5, 13, 23]. Однако до

сих пор остается открытым вопрос о передаче возбудителя от человека к человеку.

Полагают, что вирулентность микобактерий связана с семейством генов, контролирующих экспрессию белков PE (Pro-Glu) и PPE (Pro-Pro-Glu), функции которых у штаммов *M. avium* изучены недостаточно [12, 13].

В зарубежной литературе имеется ограниченное число публикаций, посвященных генетическому разнообразию *M. avium hominissuis*, что затрудняет сравнительный анализ полученных данных. Так, Iwamoto et al. [13] приводят результаты секвенирования гена *МАСРРЕ12* штаммов *МАН*, выделенных от разных источников окружающей среды, в Японии и Корее. Сравнение выборок продемонстрировало доминирование секвоара AA02 у штаммов *МАН*, выделенных от человека в России, Японии и Корее. Примечательно, что секвоар AA03, который является вторым по частоте встречаемости в Японии, не обнаружен в изученной нами выборке, в то время как характерный лишь для корейской выборки секвоар AA13 выявлен у штаммов *МАН* российской популяции.

Сопоставление результатов MATR-VNTR типирования штаммов *МАН* по 13 локусам (*TR292*, *TRX3*, *TR25*, *TR47*, *MATR-1*, *MATR-4*, *MATR-5*, *MATR-6*, *MATR-8*, *MATR-11*, *MATR-14*, *MATR-15*, *MATR-16*) [15] с результатами секвенирования генов *МАСРРЕ12* и *hsp65* отражено на дендрограмме (рис. 1). Как видно из дендрограммы, наиболее крупный кластер А включает семь штаммов доминирующего в российской популяции *МАН* кластера Ма6 (с числовым профилем 222223145443') секвоаров AA02(NA02)/code1. Кластеры В и С включают по два штамма кластера Ма5 (242223142443') секвоаров AA07(NA13)/code3 и кластера Ма2 (2422213145443') секвоаров

NJ-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical



**Рис. 1.** Дендрограмма профилей SNPs генов *MACPPE12*, *hsp65* и профилей MATR-VNTR 40 штаммов *M. avium* subsp. *hominissuis*. В прямоугольниках слева направо указаны: номер штамма *MAN*, секвоары AA и NA гена *MACPPE12*, секвоар гена *hsp65*, MATR-VNTR-профиль (IP – индивидуальный числовой профиль). Кластеры A, B, C объединяют штаммы *MAN* с идентичными профилями SNPs генов *MACPPE12*, *hsp65* и MATR-VNTR. Кластеры a, b, c, d, e, f объединяют штаммы *MAN* с идентичными профилями SNPs генов *MACPPE12* и *hsp65*, но индивидуальными числовыми профилями (IP) MATR-VNTR.

AA13(NA19)/code 3 соответственно. Штаммы кластеров a, b, c, d, e, f группировались по принципу идентичности нуклеотидных последовательностей генов *MACPPE12* (AA- и NA-типы) и *hsp65* (code 1–3), но имели при этом индивидуальные числовые профили (IP), различавшиеся по числу копий более чем в двух локусах MATR-VNTR. Учитывая различную скорость эволюции кодирующих и не кодирующих областей генома,

данное обстоятельство свидетельствует о гетерогенности группы штаммов, входящих в состав кластеров a–f, но не исключает филогенетического родства между ними.

Таким образом, нами установлена относительная консервативность нуклеотидной последовательности конститутивного гена теплового шока *hsp65* и полиморфизм гена *MACPPE12*, а также

выявлен доминирующий кластер штаммов, представляющих российскую популяцию *МАН*.

Вместе с тем сравнительный анализ профилей однонуклеотидных замен генов *hsp65* и *MACPPE12* позволил выявить различия и сходство между штаммами географически удаленных популяций *МАН*, что вносит вклад в характеристику глобальной популяции вида *M. avium*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз. СПб: Мед. пресса, 2005. 224 с.
2. Levy-Frebault V.V., Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species // Int. J. Syst. Bacteriol. 1992. V. 42. P. 315–323.
3. Shinnick T.M., Good R.C. Mycobacterial taxonomy // Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994. V. 13. № 11. P. 884–901.
4. Iwamoto T., Nakajima C., Nishiuchi Y. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment // Infect. Genet. Evol. 2012. V. 12. № 4. P. 846–852.
5. Falkinham III J.O. Nontuberculous mycobacteria in the environment // Clin. Chest Med. 2002. V. 23. № 3. P. 529–551.
6. Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era // Clin. Microb. Rev. 2007. V. 20. № 2. P. 205–229.
7. Rindi L., Garzelli C. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium* // Infect. Genet. Evol. 2014. V. 21. № 4. P. 375–383.
8. Chimara E., Ferrazoli L., Ueky S.Y.M. et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns // BMC Microbiol. 2008. V. 8. № 48. doi 10.1186/1471-2180-8-48
9. McNabb A., Eisler D., Adie K. et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. № 7. P. 3000–3011.
10. Telenti A., Marchesi F., Balz M. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis // J. Clin. Microbiol. 1993. V. 31. № 2. P. 175–178.
11. Sampson S.L. Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface // Clin. Dev. Immunol. 2011. doi 10.1155/2011/497203
12. Mackenzie N., Alexander D.C., Turenne C.Y. et al. Genomic comparison of PE and PPE genes in the *Mycobacterium avium* complex // J. Clin. Microbiol. 2009. V. 47. P. 1002–1011.
13. Iwamoto T., Arikawa K., Nakajima C. et al. Intra-subspecies sequence variability of the *MACPPE12* gene in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* // Genet. Evol. 2014. V. 21. P. 479–483.
14. Старкова Д.А., Оттен Т.Ф., Мокроусов И.В. и др. Генотипическая характеристика штаммов *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* // Генетика. 2013. Т. 49. № 9. С. 1048–1054.
15. Старкова Д.А., Мокроусов И.В., Вязовая А.А. и др. Генотипический полиморфизм штаммов *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* // Мол. генет., микробиол., вирусол. 2014. Т. 29. № 4. С. 14–19.
16. Van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T. et al. Strain identification on *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology // J. Clin. Microbiol. 1993. V. 31. № 2. P. 406–409.
17. Bartos M., Hložek P., Svastova P. et al. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards // J. Microbiol. Methods. 2006. V. 64. № 3. P. 333–345.
18. Inagaki T., Nishimori K., Yagi T. et al. Comparison of a Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing // J. Clin. Microbiol. 2009. V. 47. № 7. P. 2156–2164.
19. Thibault V.C., Grayon M., Boschirolì M. et al. New Variable-Number Tandem-Repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: Comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. № 8. P. 2404–2410.
20. Turenne C.Y., Semret M., Cousins D.V. et al. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex // J. Clin. Microbiol. 2006. V. 44. № 2. P. 433–440. doi 10.1128/JCM.44.2.433-440.2006
21. Kim S.-Y., Jeong B.-H., Park H.Y. et al. Association of ISMav6 with the pattern of antibiotic resistance in Korean *Mycobacterium avium* clinical isolates but no relevance between their genotypes and clinical features // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. doi 10.1371/journal.pone.0148917
22. Scherrer S., Landolt P., Carroli N., Stephan R. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* of two groups of lymph nodes, being intradermal tuberculin or interferon-gamma test positive and negative, isolated from swiss cattle at slaughter // Front. Vet. Sci. 2018. V. 5. № 32. doi 10.3389/fvets.2018.00032
23. Vluggen C., Soetaert K., Duytschaever L. et al. Genotyping and strain distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from humans and pigs in Belgium, 2011–2013 // Euro Surveill. 2016. V. 21. № 3. http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.3.30111

## Single Nucleotide Polymorphisms in *hsp65* and *MACPPE12* Genes of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

D. A. Starkova<sup>a,\*</sup>, T. Iwamoto<sup>b</sup>, A. A. Vyazovaya<sup>a</sup>, V. M. Molchanov<sup>c</sup>,  
V. Yu. Zhuravlev<sup>d</sup>, B. I. Vishnevsky<sup>d</sup>, and O. V. Narvskaya<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, 197101 Russia

<sup>b</sup>Department of Infectious Diseases, Kobe Institute of Health, Kobe, 6500046 Japan

<sup>c</sup>St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, 197376 Russia

<sup>d</sup>St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, 193063 Russia

\*e-mail: dariastarkova13@gmail.com

*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) is the typical inhabitants of the environment, which are known as opportunistic pathogens of animals and humans. The aim of our study was to analyze single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *hsp65* and *MACPPE12* genes to characterize the Russian population of MAH in the context of studying phylogenetic relationships and the evolution of geographically distant populations of *M. avium* subsp. *hominissuis*. The sequence analysis of the *hsp65* and *MACPPE12* genes was applied for 40 MAH strains isolated from humans (patients with mycobacteriosis). The nucleotide sequences were aligned to the reference genome of *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 (accession no. NC\_008595.1). The mutational profiles of Russian strains were compared with those isolated in other countries. In total, the 40 MAH strains were classified into three different *hsp65* sequevars: code 1, code 2 and code 3. The majority of MAH strains (72.5%) belonged to code 1, the same sequevar as for MAH strain 104. The sequence analysis of the *MACPPE12* gene revealed 20 SNPs grouped into nine sequevars at the nucleic acid level: NA01, NA02, NA03, NA06, NA10, NA13, NA14, NA19, and NA\_Rus01. Among 20 SNPs eight were nonsynonymous resulting in seven sequevars at the amino acid level: AA01, AA02, AA04, AA07, AA08, AA13, and AA\_Rus01. The sequevar AA02 consisted of three different NA variants with synonymous SNPs profiles: NA02, NA03, and NA06. Half of the MAH strains belonged to the sequevar AA02 (type NA02). Presently, the predominant cluster AA02 (type NA02)/code 1 and the unique variant AA\_Rus01 (NA\_Rus01) were identified among MAH strains from Russia. Thus, we confirmed the relative conservativeness of the nucleotide sequence of the *hsp65* gene but the polymorphism of the *MACPPE12* gene. At the same time, a comparative analysis of the SNPs profiles of the *hsp65* and *MACPPE12* genes allowed to identify differences and similarities between geographically distant populations of MAH, which highlighted the variability of the global population of *M. avium* species.

**Keywords:** *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, mycobacteriosis, single-nucleotide polymorphisms, SNPs, *hsp65*, *MACPPE12*, MATR-VNTR typing, sequencing.