

На правах рукописи

Цветкова Ирина Анатольевна

**Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*,  
принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям**

1.5.11 – микробиология

Автореферат на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор Сидоренко Сергей Владимирович

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в научно-исследовательском отделе медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

**Научный руководитель:**

**Сидоренко Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук (1.5.11 – микробиология), профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней федерального медико-биологического агентства», научно-исследовательский отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, заведующий отделом

**Официальные оппоненты:**

**Гончаров Артемий Евгеньевич**, доктор медицинских наук (3.2.2 – эпидемиология и 1.5.11 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, отдел молекулярной микробиологии, лаборатория функциональной геномики и протеомики микроорганизмов, заведующий лабораторией, г. Санкт-Петербург

**Мавзютов Айрат Радикович**, доктор медицинских наук (1.5.11 – микробиология), профессор, заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, заведующий кафедрой, Республика Башкортостан, г. Уфа

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», дом 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Несмотря на применение антипневмококковых полисахаридных конъюгированных вакцин (ПКВ) и антибиотиков, пневмококковая инфекция (ПИ) остается частой причиной заболеваемости и смертности во всем мире (ECDC, 2017; CDC 2018). В настоящее время много известно о циркулирующих в мире эпидемически значимых клонах, молекулярных маркерах резистентности к антибиотикам и инвазивности, а также об истории эволюции некоторых генетических линий. Однако много остается неясного в механизмах, с помощью которых пневмококковая популяция отвечает на селективное давление вакцин и антибиотиков. В частности, прогноз реакции пневмококковой популяции на применение ПКВ до сих пор не ясен, поскольку появляются данные о росте случаев инвазивных ПИ, вызванных невакцинными серотипами. Для решения проблемы инвазивных ПИ необходимо не только иметь полное представление об эпидемиологической ситуации в России и мире, но также понимать генетические процессы в популяции *S. pneumoniae*, которые происходили как до, так и на фоне вакцинации, а также механизмы, способствующие увеличению вирулентности пневмококка.

### Степень разработанности темы

Введение вакцинации ПКВ7 и ПКВ13 во многих странах привело к снижению распространенности инвазивных ПИ после 2010 г. Однако в последние годы показатели регистрируемой в мире заболеваемости инвазивными ПИ увеличиваются (ECDC, 2017; CDC 2018).

Наиболее частые серотипы пневмококка, вызывающие ПИ, соответствуют спектру распространенных циркулирующих серотипов в регионах (Сидоренко С.В., 2011; Королева И.С., 2012; Калиногорская О.С., 2015). Согласно опыту иммунизации детей против *S. pneumoniae* в других странах, вакцинация приводит к изменению спектра циркулирующих серотипов, а также к повышению резистентности к антибиотикам невакцинных серотипов пневмококка (Griffin M.R., 2013; Ubukata K., 2015). Так, согласно данным ECDC, в 2017 г. в странах Евросоюза, было зарегистрировано 23886 случаев инвазивных заболеваний и 68% этих случаев ассоциировались с 10 наиболее распространенными серотипами (почти все не покрываются ПКВ): 8, 3, 22F, 19A, 12F, 9N, 15A, 10A, 11A и 23B (в порядке убывания частоты) (ECDC, 2017). По сравнению с 2013 г., частоты распространения серотипов 8, 12F и 9N увеличились на 120%, 87% и 85%, соответственно (по данным ежегодных отчетов, предоставленных странами Австрии, Кипра, Чешской Республики, Дании, Эстонии, Финляндии, Франции, Греции, Венгрии, Исландии, Ирландии, Италии, Латвии, Литвы, Нидерландов, Норвегии, Португалии, Словакии, Словении, Испании, Швеции и Великобритании). По данным 2017 г., случаи инвазивных ПИ у детей в возрасте до 5 лет были вызваны: 8% - пневмококками серотипов ПКВ7 (4, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F); 1% - серотипами ПКВ10 / не покрываемыми ПКВ7 (1, 5 и 7F); 15% - серотипами ПКВ13 / не покрываемыми ПКВ10 (3 и 19A); 76% - серотипами, не покрываемыми какой-либо ПКВ вакциной (ECDC, 2017). В настоящее время в России, даже в ранний период после начала вакцинации, сохраняется доминирование вакцинных серотипов 19F, 6A/B, 3, 23F, но наблюдается распространение невакцинных 11A/D, 15A/F и 23A (Маянский Н.А., 2017; Муравьев А.А., 2019; Sidorenko S., 2020).

Большинство резистентных к антибиотикам и инвазивных пневмококков до применения конъюгированных вакцин принадлежало ограниченному числу распространенных эпидемических клонов (Pletz M.W.R., 2004; Sandgren A., 2004; Reinert R.R., 2005; Баранов А.А., 2013). С началом использования ПКВ-вакцин переключение серотипа сыграло роль в распространении ряда других успешных клонов, ассоциированных с невакцинными серотипами (Klugman K.P., 2002; Beall B.W., 2011; Brown, J. Hammerschmidt S. and Orihuela C., 2015). Однако полагают, что в большинстве случаев подобные клоны циркулировали до введения вакцин и получили преимущество для распространения на фоне вакцинации (Croucher N. J., 2014; Watkins E. R., 2015). Тем не менее, не любая комбинация генотип-серотип становится распространенным клоном (Brueggemann A.B., 2003; Brueggemann A., Spratt B.G., 2003; Beall B.W., 2011; Brown, J. Hammerschmidt S. and Orihuela C., 2015). Решающее значение для способности штамма к колонизации и вирулентности имеет не только серотип, но и его общий

генетический фон (Brueggemann A.B., Spratt B.G., 2003; Brueggemann A., Spratt B.G., 2003; Beall B.W., 2011; Brown, J. Hammerschmidt S. and Orihuela C., 2015). Таким образом, идентификация и характеристика распространенных клонов необходима для понимания динамики популяции пневмококка.

В Российской Федерации ПКВ13 была внедрена в 2015 г. Тем не менее, уже на ранних сроках после начала вакцинации отмечается изменение серотипового состава популяции в России: рост распространенности невакцинных серогрупп 11AD и 15BC среди здоровых детей до 5 лет (Sidorenko S., 2020), а также увеличение частоты невакцинных серотипов, ассоциированных с инвазивными ПИ у взрослых (Муравьев А.А., 2019). По данным 2019 г., наблюдалась низкая перекрываемость клинических изолятов *S. pneumoniae*, полученных от взрослых: ППВ-23 выше 60%, а ПКВ-13 – не более 50% (острый средний отит – 50,0%; внебольничная пневмония – 45,6%; другие инвазивные ПИ – 46,7%) (Муравьев А.А., 2019). В связи с этим, для оценки эффективности вакцинации и мониторинга степени роста распространенности инвазивных ПИ, вызванных невакцинными серотипами, необходимо проведение эпидемиологических исследований в РФ во всех возрастных группах пациентов, а также среди носителей.

### **Цель исследования**

Дать генотипическую характеристику изолятов *S. pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям, циркулирующим в Российской Федерации.

### **Задачи исследования**

1. Оценить популяционную структуру и провести сравнительный биоинформатический анализ данных полногеномного секвенирования изолятов *S. pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям.
2. Проанализировать детерминанты резистентности к антибиотикам изолятов *S. pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям.
3. Охарактеризовать геномные локусы изолятов *S. pneumoniae* эпидемических генетических линий, детерминирующих серотиповую принадлежность и устойчивость к бета-лактамам антибиотикам.
4. Провести сравнительный биоинформатический анализ генов пенициллин-связывающих белков у изолятов *S. pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям.
5. Провести сравнительный анализ генов вирулентности, выявить потенциальные мишени для создания белковой антипневмококковой вакцины.

### **Научная новизна**

В результате филогенетического анализа выявлено, что мировая популяция *S. pneumoniae* представлена тремя глобальными группами А, В1 и В2. Наибольший вклад в деление на данные группы вносят гены, кодирующие: сигнальную пептидазу 1, участвующую в процессинге секретрируемых белков; гены глюкокиназы и глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназы, регулирующие поток глюкозы в клетку. В группе А доминируют серотипы 23F, 19F, 14, 23A, в группе В1 – серотипы 11A, 19F, 19A, 1, 9N, а в группе В2 – серотипы 6A/B/E, 3, 19A, 7F, 5. Группа В2 ассоциируется преимущественно с серотипами, не входящими в состав вакцины ПКВ7.

Установлено, что происходившие в 2000 – 2010 гг. изменения в структуре популяции пневмококков, циркулирующих в Российской Федерации, были обусловлены изменениями в структуре глобальной популяции в ответ на массовую вакцинацию ПКВ7 в различных регионах мира. Происходивший в этот период рост устойчивости к бета-лактамам и макролидным антибиотикам связан с преимущественным глобальным распространением серотипа 19A, не входящего в состав ПКВ7.

Выявлена глобальная тенденция к распространению после 2000 г. генетических линий, ассоциированных с инвазивностью (группа В2).

Установлено, что особенности метаболизма углеводов и ароматических аминокислот (пневмококки способны синтезировать фенилаланин, тирозин и триптофан) детерминируют регуляцию клеточных процессов пневмококка и фенотипические особенности, в том числе вирулентный потенциал пневмококка. Серотип-специфичная вакцинация, приводящая к исключению из циркуляции распространенных генетических линий пневмококка, обладающих

большей способностью к адаптации за счет энерго-обеспечивающих систем (АТФ, НАДФН, фосфотрансферазные системы), может приводить к распространению генетических линий, характеризующихся большей вирулентностью.

Показана ассоциация вариабельности гена *strH*, кодирующего экспрессируемую на поверхности клеточной стенки экзо- $\beta$ -D-N-ацетилглюкозаминидазу, с инвазивностью. Установлено, что белок StrH – потенциальный кандидат в мишени для белковой антипневмококковой вакцины.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В целом полученные в ходе проведенного исследования новые научные данные значительно дополняют и уточняют существующие представления об эволюции *S. pneumoniae*, его метаболических особенностях и возможностях адаптации.

Получена так называемая «точка отсчета», отражающая состояние структуры популяции *S. pneumoniae* на момент начала антипневмококковой вакцинации в России. Полученные результаты позволят в дальнейшем получить информацию об изменениях, касающихся как эпидемиологической ситуации в России, так и генетических процессов, детерминирующих ответ популяции пневмококка на методы профилактики и лечения.

Используемые в исследовании биоинформатические методы филогенетического анализа клинических штаммов бактерий были внедрены в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России.

Результаты использования предложенной методики исследования используются при чтении лекций и проведении практических занятий в ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

Депонирование последовательностей сиквенированных геномов *S. pneumoniae* в GenBank.

#### **Перспективы дальнейшего изучения**

Изучение и характеристика популяции пневмококка на фоне вакцинации в России позволит прогнозировать распространение эпидемически значимых клонов, несущих детерминанты резистентности к антибиотикам и вирулентности.

Понимание механизмов вирулентности и резистентности будет способствовать разработке эффективных белковых вакцин и новых антибиотиков.

#### **Методология и методы работы**

Методология диссертационной работы состояла в организации и выполнении фундаментального исследования по характеристике популяции *S. pneumoniae*, принадлежащих эпидемическим генетическим линиям. Анализ научной литературы проведен формально-логическими методами. В работе использованы молекулярно-биологические, эпидемиологические, биоинформатические, статистические методы исследований.

**Характеристика изолятов в ДНКЦИБ:** ПЦР-серотипирование (по рекомендациям CDC), MLST-типирование 126 изолятов выполнено по стандартной схеме ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)). Полногеномное секвенирование 45 изолятов выполнено на платформе MiSeq, Illumina, данные загружены в Генбанк (BioProject PRJNA422133 и BioProject PRJNA738184).

**Сборка геномов *de novo*, аннотация и анализ качества:** программы FastQC, Trimmomatic, SPAdes, Quast, MLST. Геномы аннотированы с помощью RAST сервера (Rapid Annotations using Subsystems Technology).

**Идентификация ядерной части геномов:** вариант 1 – локусы, присутствующие у 95% изолятов (с помощью модуля GenomeComparator в программе BIGSdb, Bacterial Isolate Genome Sequence Database). Минимальный процент идентичности – 70%; вариант 2 – выравнивание геномов и экстракция однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) ядерного генома с помощью Parsnp.

**Филогенетический анализ:** программы SplitsTree и RAxML (с использованием стандартной модели эволюции GTR), удаление сайтов рекомбинаций выполнено с помощью Gubbins. Визуализация и аннотация филогенетического дерева выполнены с помощью программ Phandango и iTOL.

**Идентификация аллелей генов:** сравнение геномов в GenomeComparator против референсного штамма ATCC 700669.

**Множественный анализ соответствий (Multiple correspondens analisys, MCA):** предварительная оценка структуры первичной матрицы (R-пакет FactoMineR).

**Классификация с помощью метода «Случайного леса» (Random Forest):** R-пакет bigrf. В качестве входных данных использовались первичная матрица изолятов и вариантов генов, полученная с помощью модуля GenomeComparator и дополненная метаданными, а также вторичная матрица с ограничением входных данных на основании результатов MCA.

**Предсказание генов, формирующих анализируемые группы:** алгоритм XGBoost на основе приложения Hermes2 (H2O).

**Идентификации и аннотация значимых полиморфизмов в геномах резистентных к пенициллину изолятов:** пакеты bowtie, samtools и snpEff.

**Анализ наличия систем рестрикции-модификации, профагов, транспозонов и генов резистентности к макролидным антибиотикам:** программа blastall с порогом E-value <0.01. Поиск эндонуклеаз рестрикции, метилтрансфераз и субъединиц специфичности выполнен с помощью базы данных REBASE (The Restriction Enzyme Database). Анализ наличия профагов в геномах выполнен с помощью он-лайн сервиса Phaster. Для поиска транспозонов использовались известные последовательности (Croucher N.J. et al., 2009).

**Анализ рекомбинаций в генах пенициллин-связывающих белков:** выравнивание последовательностей, в Geneious, построение филогенетического дерева в RAxML с использованием стандартной модели эволюции GTR, анализ рекомбинаций в программе BratNextGen.

### Основные положения, выносимые на защиту

1. Мировая популяция *S. pneumoniae* представлена тремя глобальными группами A, B1 и B2. В настоящее время в популяции пневмококка эволюционирует генетически гетерогенная группа B, представители которой ассоциируются преимущественно с разными серотипами, но тем не менее, имеют характерные общие метаболические особенности. Наибольший вклад в деление на глобальные группы вносят гены, кодирующие: сигнальную пептидазу I, участвующую в процессинге секретлируемых белков; гены глюкокиназы и глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназы, регулирующие поток глюкозы в клетку. В группе A доминируют серотипы 23F, 19F, 14, 23A; в группе B1 – серотипы 11A, 19F, 19A, 1, 9N; в группе B2 – серотипы 6A/B/E, 3, 19A, 7F, 5. Группа B2 ассоциируется преимущественно с серотипами, не входящими в состав вакцины ПКВ7.

2. Происходившие в 2000 – 2010 гг. изменения в структуре популяции пневмококков, циркулировавших в Российской Федерации, были обусловлены изменениями в структуре глобальной популяции в ответ на массовую вакцинацию ПКВ7 в различных регионах мира. Происходивший в этот период рост устойчивости к бета-лактамам и макролидным антибиотикам связан с преимущественным глобальным распространением серотипа 19A, не входящего в состав ПКВ7.

3. Принадлежность к генетическим линиям определяется структурой базовых систем метаболизма: типа системы рестрикции-модификации ДНК; CiaH сенсорной гистидин-киназы (компонент двухкомпонентной сигнальной системы CiaHR, регулятор компетентности / вирулентности); АссС - ацетил-СоА-карбоксилазы (участвует в первых реакциях синтеза жирных кислот). Возможно, АТФ-синтазный комплекс и компоненты фосфотрансферазной системы детерминируют формирование типов капсулы и метаболический тип *agaD-1* и *atpG-1* является оптимальным для роста и адаптации большинства пневмококков. Серотип-специфичная вакцинация, приводящая к исключению из циркуляции распространенных генетических линий пневмококка, обладающих большей способностью к адаптации за счет энерго-обеспечивающих систем (АТФ, НАДФН, фосфотрансферазные системы), может приводить к распространению генетических линий, характеризующихся большей вирулентностью.

4. Особенности метаболизма углеводов и ароматических аминокислот детерминируют регуляцию клеточных процессов пневмококка и фенотипические особенности, в том числе устойчивость к антибиотикам и вирулентность. Расщепление популяции по вариантам гена *strH* коррелирует с кластеризацией по компонентам углеводного метаболизма (*gnd*, *dexB*), путям

синтеза ароматических аминокислот (*aroE*), регуляторному гену *relA* (ГТФ-пиррофосфокиназа), генам синтеза пептидогликана и клеточного деления (*murD*, *pbp1A*), регуляторным генам экспрессии полисахаридной капсулы (*wzg-wzh-wze*).

5. Белок StrH (экзо- $\beta$ -D-N-ацетилглюкозаминидаза) оказывается на стыке метаболических путей и вариабельность гена *strH*, кодирующего экспрессируемую на поверхности клеточной стенки экзо- $\beta$ -D-N-ацетилглюкозаминидазу, ассоциируется с инвазивностью и источником выделения (кровь, ликвор, жидкость среднего уха, носоглотка). С источником выделения «кровь» ассоциируется ограниченное число вариантов гена *strH* и генетических линий. Белок StrH может быть кандидатом в мишени для белковой антипневмококковой вакцины. Возможно, это позволит модулировать вирулентный потенциал пневмококка.

#### **Личное участие автора в получении результатов**

Все этапы экспериментальной и аналитической работы, а также литературный обзор, выполнены самостоятельно. Отдельные этапы работы выполнены вместе с коллегами отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом выборки изолятов *S. pneumoniae*. Выводы и рекомендации, сформулированные в работе, основаны на полученных результатах исследования.

Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на 11 конференциях и научных форумах, в том числе международных; опубликовано 4 статьи в рецензируемых ВАК журналах.

Используемые в исследовании биоинформатические методы филогенетического анализа клинических штаммов бактерий были внедрены в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России.

Результаты использования предложенной методики исследования используются при чтении лекций и проведении практических занятий в ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа Цветковой И.А. «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae* эпидемически значимых генетических линий» представлена к защите по специальности 1.5.11 (микробиология) и соответствует формуле специальности, охватывающей проблемы теоретических основ жизнедеятельности микроорганизмов (наследственности, изменчивости, метаболизма, закономерности взаимоотношения с окружающей средой и живыми организмами, распространения в природе, взаимодействия с факторами внешней среды и живыми организмами) в областях: «Эволюция микроорганизмов, установление их филогенетического положения», «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне».

#### **Объем и структура диссертационной работы**

Диссертация изложена в двух томах (Том 2 – Приложения). Первый том содержит 175 страниц машинописного текста и состоит из общей характеристики работы, 3 глав, заключения и выводов, списка публикаций по теме диссертации, списка сокращений и списка использованной литературы. Список литературы включает 347 источников. Том 2 содержит 254 страницы машинописного текста и состоит из 9 приложений. Диссертация иллюстрирована 28 таблицами и 119 рисунками (первый том включает 20 таблиц и 43 рисунка, Том 2 включает 8 таблиц и 76 рисунков).

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

#### **Формирование выборки**

В исследование включены все штаммы пневмококка из России, доступные в базе данных PubMLST: 515 штаммов, выделенных в период с 1980 по 2017 гг. в различных городах (126 из 515 штаммов были типированы в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России в период с 2011 по 2017 гг.). Выборка дополнена референтными штаммами (n=543), принадлежащими распространенным эпидемически значимым клонам, либо аналогичным российским редким сиквенс-типам. При отборе штаммов соответствующего сиквенс-типа в выборку включались изоляты из различных регионов мира с интервалом 1-2 года. Для каждого сиквенс-типа отобрано эквивалентное число

инвазивных изолятов и изолятов от носителей, а также эквивалентное число резистентных и чувствительных к антибиотикам штаммов, если это было возможно. Выборку можно считать стратифицированной по генотипу. Метаданные, доступные для 932 изолятов (год выделения, источник выделения, географический регион, серотип, сиквенс-тип, данные антибиотикочувствительности) вместе с данными MLST-типирования были загружены из базы PubMLST (за исключением 126 изолятов, идентифицированных и типированных в ДНКЦИБ). Выборка для анализа взаимосвязей между циркулирующими в России изолятами и распространенными в других регионах мира эпидемически-значимых клонов, включала 1058 изолятов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Структура популяции *S. pneumoniae*.

eBURST-анализ показал, что в России, в период с 1980 по 2017 гг., циркулировали генетические линии, принадлежащие клональным комплексам (в порядке убывания распространенности): CC81<sup>23F,19F</sup>, CC505<sup>3</sup>, CC236<sup>19F</sup>, CC2296<sup>1,19F</sup>, CC315<sup>6B</sup>, CC663<sup>19A</sup>, CC239<sup>19F,9A/V</sup>, CC180<sup>3</sup>, CC230<sup>19A</sup>, CC1025<sup>3,19F</sup>, CC143<sup>19A,14</sup>. Большая часть популяции в России была представлена редкими сиквенс-типами. Для выяснения филогенетических связей и выделения субпопуляций в популяции пневмококка были применены методы кластеризации, использующие данные множественного выравнивания последовательностей. Кластеризация изолятов по конкатенатам последовательностей шести генов схемы MLST (кроме *ddl*) разделила популяцию пневмококков на три крупных филогенетических клада A/B1/B2 на основании ветвей дерева (по программе SplitsTree), а также на 11 «сиквенс-кластеров» начального уровня – SC\_MLST (hierBAPS). Разные сиквенс-кластеры включали изоляты, эволюционировавшие отдельно (между ними не происходило обмена генами). Сиквенс-кластеры, включающие неблизкородственные генетические линии, могут отражать последствия конвергентной эволюции (события горизонтального переноса генов, рекомбинации и др.).

Региональные российские генетические линии относились к SC9\_MLST и включали: CC36, CC179, CC239, CC2296, CC801 (Таблица 1). В России также циркулировали генетические линии, распространенные повсеместно (CC81, CC156, CC289), странах Азии (CC236/271/320) и Европы (CC63, CC180, CC230, CC315, CC505, CC801). В России не были распространены генетические линии, циркулировавшие преимущественно в странах Северной Америки, Южной Америки и Африки: CC66 и CC191; CC90; CC1094; CC217; CC344 и CC448; CC306; CC199 (Таблица 1).

Таблица 1 – Генетические линии пневмококка, распространенные в России и в мире

SC_MLST	Клональные комплексы	Серотип	Распространенность	Период (гг.)
SC2_MLST	CC236, CC271, CC320	19F, 19A	Россия, Азия, Северная Америка	1997 – 2016
SC3_MLST	CC62	11A	Европа (в т.ч. Россия), Северная Америка	2001 – 2016
SC4_MLST	CC81	23F, 19F	Повсеместно (в т.ч. Россия)	1984 – 2013
SC5_MLST	CC180	3	Европа (в т.ч. Россия), Северная Америка	1988 – 2016
	CC230	19F	Европа (в т.ч. Россия), Азия	2002 – 2012
	CC289	5	Повсеместно (в т.ч. Россия)	2004 - 2010
	CC315	6E	Европа (в т.ч. Россия), Азия	2001 - 2013
	CC505	3	Европа (в т.ч. Россия)	1989 – 2017
	CC66	9N	Европа, Северная Америка	2001 – 2013
	CC191	7F	Европа (в т.ч. Россия), Северная Америка	1984 – 2014
	CC193	21	Европа	
	CC376	6A	Северная Америка	2001 – 2004

Таблица 1 – продолжение таблицы

SC_MLST	Клональные комплексы	Серотип	Распространенность	Период (гг.)
SC6_MLST	<b>CC9</b>	14	Европа (в т.ч. <b>Россия</b> )	2009 - 2013
	<b>CC123</b>	17F	Европа (в т.ч. <b>Россия</b> )	1939 – 2017
	CC113	18BC	Европа, Северная Америка	2004 - 2009
	CC124	14	Европа, Северная Америка	2001 – 2009
	CC185	6E	Южная Африка	1984 - 1990
	CC327	6A	Европа	
SC7_MLST	CC90	7F	Европа, Азия, Северная Америка	1988 – 2013
SC8_MLST	<b>CC156</b>	9A, 35B	повсеместно (в т.ч. <b>Россия</b> )	2001 – 2016
	CC1094	6A	Южная Африка	1978 - 1988
SC9_MLST	<b>CC36</b>	23F	<b>Россия</b>	2001 – 2017
	<b>CC179</b>	19F	<b>Россия</b>	2012-2016
	<b>CC239</b>	9V	<b>Россия</b>	1989 - 2011
	<b>CC2296</b>	1	<b>Россия</b>	1981 - 2011
	<b>CC801</b>	4	<b>Россия, Чешская Республика</b>	2008 – 2017
	<b>CC63</b>	15A	повсеместно (в т.ч. <b>Россия</b> )	1988 - 2012
	CC205	4	Европа	
CC217	1	Африка, Азия	2004 – 2010	
SC10_MLST	CC344	б/к	Европа	1997 – 1999
	CC448	б/к	Северная Америка, Европа, Австралия	1995 - 2002
SC11_MLST	<b>CC3544</b>	7F	<b>Россия</b>	2017
	CC218	12F	Европа	
	CC304	1	Европа	2009
	CC306	1	Европа	2010 – 2012
SC12_MLST	CC199	19A, 15BC	Северная Америка, Европа	2001 – 2014

Примечания: жирным шрифтом и серым цветом выделены генетические линии, распространенные в России; б/к - бескапсульный; в т.ч. – «в том числе»

SC\_MLST и группы A/B1/B2 ассоциировались с доминирующими серотипами: группа A – 23F, 19F, 14, 23A; группа B1 – 11A, 19F, 19A, 1, 9N; группа B2 – 6A/B/E, 3, 19A, 7F, 5.

Серотипы, SC\_MLST и группы A/B1/B2 ассоциировались с источником выделения изолята. Наиболее четкой была ассоциация инвазивных изолятов (кровь, ликвор) с серотипами: 14, 23F, 3, 6E, 7F, 18BC, 1, 9N, 10A, 4. Редко ассоциировались с инвазивными заболеваниями серотипы 19A, 6A, 11A, 15BC.

К группам A и B1 относились изоляты, выделенные до 1960 г., а также большая часть изолятов, выделенных в период 1960-2000 гг. Группа B2 ассоциировалась с серотипами, не входящими в состав вакцины ПКВ7. Эта картина согласуется с данными о наиболее распространенных серотипах, циркулировавших в мире до начала массовой вакцинации в 2001 г. (Liñares J. et al., 2010).

Большая часть популяции относилась к гомогенной ветви B, группа A была значительно более гетерогенной. Основной вклад в деление популяции на группы A/B1/B2 вносили гены *gki* (ген глюкокиназы) и *spr* (ген сигнальной пептидазы I). Ген *gki* участвовал в формировании групп B1 и B2. Ген *spr* делил популяцию на группы A и B. Сигнальная пептидаза I – связанная с мембраной сериновая протеаза, ответственная за процессинг секретируемых через мембрану

белков-предшественников, у большинства представителей группы В должна быть гомологична по структуре и субстратной специфичности.

Ген *xpt* (ген ксантинфосфорибозилтрансферазы) вносил большой вклад в расщепление популяции на инвазивные и неинвазивные штаммы. Ксантинфосфорибозилтрансфераза превращает ксантин в ксантозин-5'-монофосфат, который может быть повторно использован для синтеза ДНК и РНК, что может быть важно для потенциала вирулентности. Клад, представленный ассоциируемыми с вирулентностью генетическими линиями, преимущественно включал изоляты, принадлежащие группам А и В2. Аналогичные ассоциированные с инвазивными изолятами групп А и В2 клады были идентифицированы при кластеризации по генам *gki* и *gdh*, продукты которых регулируют поток глюкозы в клетку. Возможно, что на фоне вакцинации ПКВ7 происходило распространение генетических линий группы В2, ассоциированных с повышенной вирулентностью, имеющих сходные с группой А метаболические типы.

#### **Анализ популяции *S. pneumoniae* по ядерной части генома**

Для ряда редких сиквенс-типов, циркулирующих в России, было установлено родство с распространенными клональными комплексами. Значительная часть редких сиквенс-типов российской популяции пневмококков была представлена инвазивными штаммами, которые кластеризовались в виде отдельных ветвей филогенетического дерева и для них не удалось установить родственных клональных групп. Все изоляты данных редких сиквенс-типов были выделены после 2011 года. Таким образом, на фоне вакцинации в мире вакцинами ПКВ7 и ПКВ13 происходило распространение в России инвазивных изолятов редких генетических линий, многие из которых ассоциировались с невакцинными серотипами (6С, 8, 10А, 16F, 17F, 22В, 22F, 25F, 34).

#### **Гены, формирующие группы А/В1/В2А**

Перечень 181 значимых генов включал компоненты различных метаболических путей: биосинтеза жирных кислот, метаболизма галактозы, фруктозы и маннозы, пирувата, пуриновых оснований, биотина, цистеина и метионина, аланина, аспартата и глутамата, фенилаланина, аргинина, а также факторы вирулентности (АВС-транспортёры, компоненты PTS-системы, металл-транспортёрная АТФаза Р-типа, фибронектин / фибриноген-связывающий белок FpbS, спермидин/путресцин-связывающий белок PotD и другие). Наилучшие маркеры групп А/В1/В2 – ген *accC* (ацетил-СоА-карбоксилаза, участвующей в первых реакциях синтеза жирных кислот); ген *ciaH* (сенсорной гистидин-киназы двухкомпонентной регуляторной системы CiaRH); ген *fabZ* ((3R)-гидроксимиристоил-дегидратаза, участвующей в биосинтезе жирных кислот и биосинтезе липида А).

#### **Гены, участвующие в формировании SC\_MLST**

Перечень 125 значимых генов включал: компоненты метаболизма углеводов (глюкокиназа, лактатдегидрогеназа и др.), метаболизма пуринов, транскрипции генов рибосомальной РНК, трансляции, гомологичной рекомбинации, CiaRH регуляторной системы, синтеза жирных кислот, синтеза пептидогликана.

Большая часть представителей группы SC5\_MLST (группа В2) может обладать общими особенностями сигнальной регуляторной системы CiaRH, но при этом представители данного сиквенс-кластера очень гетерогенны по гену *rpsC*, кодирующему белок S3 малой субъединицы 30S рибосомы (вся остальная популяция пневмококка консервативна по гену *rpsC*). Возможно, данный факт отражает распространение генетических линий группы В2 на фоне вакцинации ПКВ7.

Наблюдалась тенденция в дивергенции кладов генетических линий по гену *comX\_1* (ген регулятора транскрипции генных кластеров, кодирующей систему компетентности): CC344+CC448+CC242 (SC10\_MLST) и CC236/CC271/CC320 (SC2\_MLST). Также ряд других генов вносили значительный вклад в расщепление популяции на группы SC\_MLST.

#### **Гены, участвующие в формировании серотипов**

Перечень > 1000 значимых генов включал: гены *cps*-локуса, компоненты АТФ-синтазного комплекса, гены метаболизма углеводов, пуринов и пиримидинов, синтеза метионина, синтеза пептидогликана и клеточной стенки.

Ген *atpG* расщеплял популяцию пневмококка на две группы (гетерогенную и гомогенную). Гомогенная группа включала изоляты серотипов 1, 3, 6А, 7F, 9А, 9N, 11А, 15BC, 19А, 19F, 23F. AtpG является компонентом АТФ-синтазного комплекса, выполняющего функцию накопления энергии за счет мембранного потенциала, сформированного в цепи переноса электронов. Возможно, вариант AtpG, ассоциирующийся с гомогенной группой и большим разнообразием серотипов, позволяет пневмококкам преодолеть fitness-cost, связанный с возможностью синтеза различных типов капсулы. Интересно, что варианты *agaD-1* и *atpG-1* ассоциированы с похожим гомогенным кладом, представленным распространенными генетическими линиями и разнообразными серотипами. Возможно, АТФ-синтазный комплекс и компоненты фосфотрансферной системы детерминируют формирование типов капсулы и метаболический тип *agaD-1* и *atpG-1* является оптимальным для роста и адаптации большинства пневмококков.

### **Деление популяции на штаммы, чувствительные и резистентные к бета-лактамам антибиотикам**

Помимо генов, кодирующих известные мишени бета-лактамовых антибиотиков, с помощью алгоритма XGBoost были идентифицированы гены некоторых консервативных гипотетических белков, а также ген *rpoB* (ген бета-субъединицы РНК-полимеразы), которые вносили вклад в деление популяции пневмококков на резистентные и чувствительные штаммы. RpoB может опосредовать дополнительный механизм регуляции экспрессии генов, поскольку мутации в генах РНК-полимеразы могут приводить к неравномерной транскрипции некоторых оперонов (Aiba Y. et al., 2013; Panchal V.V. et al., 2020).

### **Взаимодействие генов, участвующих в делении популяции на группы**

Оценка топологии и кластеризации филогенетических деревьев, построенных по последовательностям ключевых идентифицированных генов проводилась с помощью параметров «Matching split distance» (соответствие дистанций расщепления) и «MatchingCluster» (соответствие кластеров).

Расщепление популяции пневмококка по компонентам углеводного метаболизма (*gnd*, *dexB*) коррелировало с кластеризацией популяции по генам синтеза пептидогликана и регуляции экспрессии полисахаридной капсулы (*wzg-wzh-wze*), а также по гену поверхностной гликозидазы StrH (фактор вирулентности). Расщепление по гену *rpoB* коррелировало с расщеплением по регуляторным генам экспрессии полисахаридной капсулы. Расщепление популяции по гену *aroE* (синтез ароматических соединений) коррелировало с кластеризацией популяции по генам углеводного обмена, гену регулятора ответа *relA* (ГТФ-пирофосфокиназа), генам синтеза пептидогликана и клеточного деления (*murD*, *pbp1A*), регуляторным генам экспрессии полисахаридной капсулы (*wzg-wzh-wze*), а также по гену *strH*.

Таким образом, особенности метаболизма углеводов и ароматических аминокислот (пневмококки способны синтезировать фенилаланин, тирозин и триптофан) детерминируют регуляцию клеточных процессов пневмококка и фенотипические особенности, в том числе устойчивость к антибиотикам и вирулентность.

### **Оценка вклада рекомбинаций в структуру популяции**

Генетические линии отличались размером рекомбинационных блоков и значением скорости рекомбинаций  $\mu_{r/m}$  (3,16–38,85, среднее значение 14,04). Наиболее высокой рекомбинационной активностью характеризовались генетические линии: CC90<sup>6E</sup>, CC217<sup>1</sup>, CC236/CC271/CC320<sup>19F</sup>, CC81<sup>23F</sup>, CC289<sup>5</sup>, CC1094<sup>6AE</sup>, CC156<sup>35B</sup>, CC304/CC306<sup>1</sup>, CC124<sup>14</sup>, CC199<sup>19A</sup>. Резистентные к бета-лактамам антибиотикам изоляты ассоциировались с серотипами, отличающимися высокой эффективностью рекомбинаций (23F, 19F, 6E, 6A, 14, 19A).

### **Системы рестрикции анализируемых изолятов**

В анализируемых геномах пневмококков идентифицированы метилтрансферазы СРМ I и II типа. Наблюдалась ассоциация вариантов генов S-субъединиц с источником выделения изолятов. Среди инвазивных изолятов, выделенных из крови и ликвора, преобладали штаммы, имеющие варианты S-субъединиц, специфичные для изолятов групп А и В2. Некоторые

варианты S-субъединиц изолятов группы В1 ассоциировались преимущественно с носительством.

## 2. Детерминанты резистентности изолятов *S. pneumoniae*

В первичной выборке, чувствительные к пенициллину изоляты ассоциировались с генетическими линиями (в порядке убывания процента чувствительных изолятов): СС62<sup>11А</sup>, СС191<sup>7F</sup>, СС113<sup>18BC</sup>, СС123<sup>17F</sup>, СС124<sup>14</sup>, СС327<sup>6А</sup>, СС433<sup>7F</sup>. Резистентные к пенициллину изоляты принадлежали преимущественно: СС81<sup>23F,19F</sup>, СС90<sup>6E</sup>, СС236<sup>19F</sup>, СС271<sup>19F</sup>, СС320<sup>19F,19A</sup>, СС448 (бескапсульные пневмококки).

Резистентные к макролидам изоляты принадлежали преимущественно СС81<sup>23F,19F</sup>, СС90<sup>6E</sup>, СС236<sup>19F</sup>, СС271<sup>19F</sup>, СС320<sup>19F,19A</sup>, СС448 (бескапсульные пневмококки). Некоторый процент резистентных к макролидам изолятов составлял практически все генетические линии пневмококка. Резистентность к макролидам была обусловлена наличием различных транспозонов семейства Tn916 во всех устойчивых штаммах. При этом вариант транспозона ассоциировался с генетической линией.

Ген 23S-рНК-метилтрансферазы *ermB* присутствовал у большинства резистентных к макролидам изолятов в составе кассеты OMEGA. Ген *ermB* отсутствовал у резистентных к макролидам изолятов СС236, СС156, СС376, а также у отдельных изолятов СС81. Резистентность к макролидам у изолятов данного сиквенс-типа была обусловлена только наличием MEGA-кассеты с генами *mef(E)/mel* в транспозонах семейства Tn916.

Резистентные к тетрациклину штаммы практически полностью были представлены генетическими линиями СС81<sup>23F,19F</sup>, СС90<sup>6E</sup>, СС185<sup>6E</sup>, СС236<sup>19F</sup>, СС271<sup>19F</sup>, СС320<sup>19A</sup>. Клональные комплексы СС53<sup>8</sup>, СС62<sup>11А</sup>, СС1012<sup>11А</sup>, СС180<sup>3</sup>, СС505<sup>3</sup>, СС448 (бескапсульные пневмококки) были полностью чувствительны к тетрациклину. Резистентность к тетрациклину была обусловлена наличием гена *tetM*, кодирующего белок, ответственный за инактивацию тетрациклина и защиту рибосом-мишеней. Ген *tetM* присутствовал в составе конъюгативных транспозонов семейств Tn916 и Tn5253 в устойчивых к тетрациклину изолятов, принадлежащих СС81, СС344, СС242, СС63, СС179, СС 236, СС271, СС320, СС315, СС90, а также резистентных изолятов редких сиквенс-типов.

Таким образом, наличие резистентности к антибиотикам различных классов ассоциировалось с принадлежностью изолята к генетической линии и серотипу.

### Динамика циркуляции генетических линий в России в различные периоды с 1980 по 2017 гг. Ассоциация с резистентностью к антибиотикам

Для анализа российских изолятов анализируемый период (с 1980 по 2017 гг.) был разбит на четыре временных интервала: с 1980 по 2001 гг. (до начала повсеместного применения ПКВ7); с 2002 по 2010 гг. (период повсеместного внедрения ПКВ7 в мире); с 2011 по 2014 гг. (период повсеместного применения ПКВ10 и ПКВ13 в мире); с 2015 по 2017 гг. (ранний период после начала вакцинации ПКВ13 в России).

В период с 1980-2001 гг. в России были распространены генетические линии пневмококка, ассоциирующиеся с чувствительностью к пенициллинам и макролидам: СС102<sup>18ABCF</sup>, СС1527<sup>12F</sup>, СС2296<sup>1</sup>, СС180<sup>3</sup>. Среди резистентных изолятов доминировала генетическая линия СС236<sup>19F</sup>. Наиболее распространенные серотипы в период с 1980 по 2001 гг. включали: 1, 18ABCF, 19F, 3, 12F, 6B, 14.

В период 2002-2010 гг. в России происходило распространение генетических линий, ассоциированных с резистентностью: СС81<sup>23F</sup>, СС361<sup>19A</sup>, СС236<sup>19F</sup>, СС315<sup>6B</sup>, СС162<sup>19A</sup>, СС30 (ST1500<sup>23F</sup>), СС143<sup>14</sup>, СС230<sup>19F,19A</sup>, СС276<sup>19A</sup>. В этот период наблюдалось распространение серотипа 19A (штаммы ассоциировались с различными генетическими линиями).

В период 2011-2014 гг. российская популяция пневмококков была преимущественно представлена генетическими линиями, ассоциирующимися с мультирезистентностью к пенициллинам и макролидам: СС320<sup>19A</sup>, СС236<sup>19F</sup>, СС315<sup>6B</sup>, СС143<sup>14,19A</sup>, СС180<sup>3,19A</sup>, СС239<sup>19F</sup>, СС505<sup>3,6ABCD,19A</sup>, СС271<sup>19F,19A</sup>, СС230<sup>19A</sup>, СС276 (ST276, ST1611, ST10431 - серотипы 19F/19A), СС361 (ST663, ST9658, ST10434 - серотипы 19F/19A), СС156 (ST156, ST875 - серотип 14), СС10253,19F. На фоне повсеместного применения вакцин ПКВ7 и ПКВ13 в мире, в России произошло значительное снижение распространенности серотипа 23F, при этом значительно

распространился серотип 19А. Детерминанты резистентности приобрели ранее чувствительные к антибиотикам СС180, СС505, по-видимому, в связи с переключением ряда их представителей с серотипа 3 на серотип 19А.

В ранний период после внедрения вакцинации ПКВ13 в России (с 2015 по 2017 гг.) чувствительные к антибиотикам изоляты были представлены в основном СС505<sup>3</sup>, циркуляция которого сохранилась на высоком уровне. Резистентные к антибиотикам изоляты были представлены преимущественно СС320<sup>19А</sup>, СС179<sup>19F</sup>, СС236<sup>19F</sup>, СС311<sup>19А,23F</sup>, а также редкими сиквенс-типами, родственными циркулировавшим ранее клональным комплексам: СС15<sup>серотип 14</sup> (ST15, ST13658, ST13665, ST13844), СС143<sup>серотип 14</sup> (ST12618, ST13659, ST13661, ST13664). Таким образом, в ранний период после начала вакцинации в России появляются редкие сиквенс-типы, ассоциированные с резистентностью к антибиотикам.

### **Значимые однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с резистентностью к бета-лактамам антибиотикам у изолятов СС320**

Помимо генов, кодирующих белки Pbp1A, Pbp2B и Pbp2X, для развития резистентности критичны мутации в генах, отвечающих за синтез пептидогликана (*mraW* и *mraY*), клеточное деление (*ftsL*, *gpsB*), кодирующих шапероны (*clpL*, *clpX*), а также обеспечивающих процесс генетической рекомбинации (*recU*). У резистентных к пенициллину штаммов *S.pneumoniae* наблюдается высокая частота полиморфизма в генах, входящих в состав *dcw*-кластера (division and cell wall), отвечающего за синхронизацию процессов синтеза пептидогликана и клеточного деления. У всех резистентных к пенициллину штаммов *S.pneumoniae*, являющихся однолокусными вариантами ST236, обнаружены мутации в белке RegR, который относится к регуляторам транскрипции, принадлежащим к семейству LacI/GalR. Таким образом, развитие резистентности к антибиотикам часто связано со множеством механизмов адаптации.

### **3. Поиск сочетанных рекомбинаций в геномных локусах, детерминирующих серотиповую принадлежность и устойчивость к бета-лактамам антибиотикам**

Анализ рекомбинаций в геномах изолятов СС320 и СС90 показал, что мультирезистентные генетические линии характеризовались наличием большого числа предковых клонально-ассоциированных рекомбинаций в генах, ассоциированных с различными метаболическими путями, а также кодирующих факторы вирулентности, белки клеточного деления, компоненты фосфотрансферной системы, транспортеры, ферменты модификации нуклеиновых кислот, регуляторы транскрипции и трансляции, участвующие в репарации и гомологичной рекомбинации ДНК белки. В генетических линиях СС90 и СС236/СС271/СС320 рекомбинации ассоциировались с генами-мишенями бета-лактамов антибиотиков, при этом гены *cps*-локуса не участвовали в рекомбинациях.

### **4. Анализ генов пенициллин-связывающих белков**

С целью установления возможного донора детерминант резистентности в анализируемой популяции пневмококков был проведен филогенетический анализ последовательностей транспептидазных доменов генов пенициллин-связывающих белков, *pbp2x*, *pbp2b* и *pbp1a*, являющихся первичными мишенями для бета-лактамов антибиотиков. В качестве референсных последовательностей были использованы последовательности областей транспептидазных доменов соответствующих генов, принадлежащих стрептококкам других видов. Полученные результаты подтверждают данные предыдущих исследований о событиях рекомбинации между *S. mitis* и *S. pneumoniae*. Донорами для рекомбинаций в генах *pbp1a* и *pbp2x* анализируемой популяции являлись представители других стрептококков. Изоляты СС236/СС271/СС320 в гене *pbp1a* имеют следы независимых рекомбинаций. Изоляты СС90 в гене *pbp2x* имеют также следы независимых рекомбинаций.

### **5. Гены вирулентности, продукты которых могут быть потенциальными мишенями для создания белковой антипневмококковой вакцины**

Перечень 214 генов, ассоциирующихся с вирулентностью, включал гены поверхностных и мембранных белков *strH*, *nanA*, *phs*, *nanB*, *oppC*, *pcpA*, *wzd*. Ген *strH* (ген экзо-β-D-N-ацетилглюкозаминидазы, участвующей в деградации N-связанных гликанов хозяина) показал максимальную ассоциацию с инвазивностью и источником выделения (кровь, ликвор, жидкость среднего уха, носоглотка). С источником выделения «кровь» ассоциировалось ограниченное

число вариантов гена *strH* и генетических линий. Белок StrH экспрессируется вместе с другими важнейшими факторами вирулентности: ферментами NanA (Нейроминидаза А), GH2 (BgaA, бета-галактозидаза А), GH85 (EndoD) и GH125. Уровень экспрессии StrH зависит от условий окружения, в котором находится пневмококк. Экспрессия белка регулируется уровнем углеводов в среде. В условиях дефицита углеводов экспрессия StrH повышается и пневмококк начинает разрушать ткани хозяина.

Выше было показано, что особенности метаболизма пневмококка детерминируют его значительный вирулентный потенциал и белок StrH оказывается на стыке метаболических путей. Так, расщепление популяции по вариантам гена *strH* коррелирует с расщеплением пневмококков по компонентам углеводного метаболизма (*gnd*, *dexB*), путям синтеза ароматических аминокислот (*aroE*), регуляторному гену *relA* (ГТФ-пирофосфокиназа), генам синтеза пептидогликана и клеточного деления (*murD*, *pbp1A*), регуляторным генам экспрессии полисахаридной капсулы (*wzg-wzh-wze*).

Известно, что основной трудностью создания универсальных антипневмококковых белковых вакцин является вариабельность белков (что снижает эффективность таких вакцин). Однако варианты белка StrH могут быть использованы в качестве одной из мишеней химерной белковой вакцины. Возможно, это позволит модулировать вирулентный потенциал пневмококка.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Применение антипневмококковых конъюгированных вакцин оказывает влияние на структуру популяции *S. pneumoniae*. В мире проводилось несколько исследований по изучению эффекта антипневмококковой вакцинации с использованием данных полногеномного секвенирования пневмококка (Croucher N. J. et al., 2013; Croucher N. J. et al., 2014; Chewapreecha C. et al., 2014; Croucher N. J. et al., 2015; Lees J. A. et al., 2017; Corander J. et al., 2017; Gladstone R. A. et al., 2019). В данных исследованиях также использовался байесовский анализ структуры популяции, который позволяет получить надежную и специфическую кластеризацию набора данных. В опубликованных за последние 15 лет работах сообщалось, что генотип может ассоциироваться с инвазивностью для некоторых генетических линий пневмококка. Международная программа по изучению структуры популяции пневмококка, созданная в последние годы и использующая данные полногеномного секвенирования, позволила охарактеризовать и сравнить генетические линии пневмококка из разных стран, оценить международные данные по серотиповому составу, устойчивости к антибиотикам и географическому распространению (Gladstone R.A. et al., 2019). В этом исследовании также были установлены глобальные генетические линии пневмококка, их ассоциация с инвазивностью и резистентностью, приведены доказательства того, что генотип может влиять на инвазивность.

Для характеристики популяции *S. pneumoniae*, циркулирующих в России, в нашем исследовании были использованы дополнительные методы, которые позволили получить новую информацию. Удалось установить филогенетические взаимосвязи для редких сиквенс-типов, которыми представлена более половины популяции пневмококков в России. Благодаря этому была получена связанная филогенетическая картина. Установлена взаимосвязь циркулирующих в России генетических линий с распространенными в различное время в разных регионах эпидемическими клонами. Выявлена тенденция к преимущественному распространению в России антибиотикорезистентности среди отдельных генетических линий. Также было установлено деление глобальной популяции пневмококков на 3 группы.

Увеличение знаний о географическом распространении, распределении устойчивости к антибиотикам, существовании невакцинных серотипов и вкладе различных генетических линий в развитие инвазивных заболеваний обеспечивает полезный контекст для оценки воздействия вакцин. Полученные геномные данные предоставляют значительный ресурс для дальнейшего изучения биологии пневмококка и осуществления контроля над пневмококковой инфекцией.

### Выводы:

1. Мировая популяция *S. pneumoniae* представлена тремя глобальными группами А, В1 и В2. В настоящее время в популяции пневмококка эволюционирует генетически гетерогенная группа В, представители которой ассоциируются преимущественно с разными серотипами, но тем не менее, имеют характерные общие метаболические особенности. В группе А доминируют серотипы 23F, 19F, 14, 23А; в группе В1 – серотипы 11А, 19F, 19А, 1, 9N; в группе В2 – серотипы 6А/В/Е, 3, 19А, 7F, 5. Группа В2 ассоциируется преимущественно с серотипами, не входящими в состав вакцины ПКВ7. Наибольший вклад в деление на глобальные группы вносят гены, кодирующие: сигнальную пептидазу I, участвующую в процессинге секретируемых белков; гены глюкокиназы и глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназы, регулирующие поток глюкозы в клетку. Принадлежность к генетическим линиям определяется структурой базовых систем метаболизма: типа системы рестрикции-модификации ДНК; CiaN сенсорной гистидин-киназы (компонент двухкомпонентной сигнальной системы CiaHR, регулятор компетентности / вирулентности); АссС - ацетил-СоА-карбоксилазы (участвует в первых реакциях синтеза жирных кислот).
2. Происходившие в 2000 – 2010 гг. изменения в структуре популяции пневмококков, циркулировавших в Российской Федерации, были обусловлены изменениями в структуре глобальной популяции в ответ на массовую вакцинацию ПКВ7 в различных регионах мира. Происходивший в этот период рост устойчивости к бета-лактамам и макролидным антибиотикам связан с преимущественным глобальным распространением серотипа 19А, не входящего в состав ПКВ7.
3. Возможно, АТФ-синтазный комплекс и компоненты фосфотрансферазной системы детерминируют формирование типов капсулы и метаболический тип *agaD-1* и *atpG-1* является оптимальным для роста и адаптации большинства пневмококков. Серотип-специфичная вакцинация, приводящая к исключению из циркуляции распространенных генетических линий пневмококка, обладающих большей способностью к адаптации за счет энерго-обеспечивающих систем (АТФ, НАДФН, фосфотрансферазные системы), может приводить к распространению генетических линий, характеризующихся большей вирулентностью.
4. Наличие резистентности к антибиотикам различных классов ассоциируется с принадлежностью изолята к генетической линии и серотипу. Наши данные подтверждают данные других авторов о серотипах, ассоциирующихся с высокой частотой рекомбинаций (6А, 6Е, 23F, 19F, 14, 19А). Резистентные к бета-лактамам антибиотикам изоляты ассоциируются с серотипами, отличающимися высокой эффективностью рекомбинаций. Рекомбинации в генах, кодирующие первичные мишени бета-лактамовых антибиотиков, Pbp1A, Pbp2B и Pbp2X, ассоциируются с множеством адаптивных рекомбинаций ядерного генома, в частности, в генах, кодирующих белки клеточного деления, и других. При этом не наблюдается ассоциированных рекомбинаций в *cps*-локусе. Мультирезистентные изоляты (к пенициллину и эритромицину) составляют 75,45% резистентных к пенициллину изолятов. Возможно, интеграция транспозонов Tn916 и Tn5253, обуславливающих резистентность к макролидам, так же как и рекомбинации, была более эффективной на этапе стабилизации генетических линий, у пневмококков, ассоциирующихся с серотипами 6А, 6Е, 23F, 19F, 14, 19А. Донорами для рекомбинаций в генах *pbp1a* и *pbp2x* являлись представители других стрептококков (*S. mitis* и *S. oralis*). Изоляты, принадлежащие к клонам СС236/СС271/СС320, в гене *pbp1a* имеют также следы независимых рекомбинаций. Изоляты СС90 в гене *pbp2x* имеют также следы независимых рекомбинаций. Для гена *pbp2b* сложно сделать предположение о том, кто выступал возможным донором.
5. Особенности метаболизма углеводов и ароматических аминокислот детерминируют регуляцию клеточных процессов пневмококка и фенотипические особенности, в том числе устойчивость к антибиотикам и вирулентность. Расщепление популяции по вариантам гена *strH* коррелирует с кластеризацией по компонентам углеводного метаболизма (*gnd*, *dexB*), путям синтеза ароматических аминокислот (*aroE*), регуляторному гену *relA* (ГТФ-пирофосфокиназа), генам синтеза пептидогликана и клеточного деления (*murD*, *pbp1A*), регуляторным генам экспрессии полисахаридной капсулы (*wzg-wzh-wze*). Белок StrH, кодирующий экспрессируемую

на поверхности клеточной стенки экзо-β-D-N-ацетилглюкозаминидазу, оказывается на стыке метаболических путей и может быть использован как мишень для белковой вакцины. Возможно, это позволит модулировать вирулентный потенциал пневмококка. Необходимы дополнительные исследования для оценки антигенного потенциала StrH.

### Рекомендации по использованию результатов исследования

1. Проведенные исследования имеют теоретическое значение, так как дополняют и уточняют существующие представления об эволюции *S. pneumoniae*, его метаболических особенностях и возможностях адаптации.
2. Полученные результаты позволят в дальнейшем оценивать изменения в ходе дальнейшего мониторинга эпидемиологической ситуации в России, а также анализировать генетические процессы, детерминирующие ответ популяции пневмококка на методы профилактики и лечения пневмококковых заболеваний.
3. Подходы филогенетического анализа могут быть использованы в практической и научной работе.
4. Результаты использования предложенной методики исследования могут быть использованы при чтении лекций и проведении практических занятий.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

#### Опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК МОН РФ:

1. **Цветкова, И. А.** SNP-полиморфизм в геномах изолятов *Streptococcus pneumoniae* CC320, устойчивых к бета-лактамам антибиотикам. / Цветкова И. А., Волкова, М. О., Калиногорская О. С. [и др.]. // Антибиотики и химиотерапия. - 2016. - Т. 61, № 11-12. - С. 11-12. – URL: <https://www.antibiotics-chemotherapy.ru/jour/article/view/694>.
2. **Цветкова, И. А.** Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг. / Цветкова И. А., Беланов С. С., Гостев В. В. [и др.]. // Антибиотики и химиотерапия. - 2019. - Т. 64, № 5-6. - С. 22-31. – doi: 10.24411/0235-2990-2019-100027.
3. **Sidorenko, S.** Multicenter study of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar. / Sidorenko S., Rennert W., Lobzin Y. [et al.]. // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. - 2020. V. 96, №1. - P. 114914. – doi: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2019.114914. – JCR=2.499.

#### Публикации в других изданиях, тезисы докладов:

- Belanov, S.** Prevalence of PI-I and PI-2 among *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy nasopharyngeal carriers and children with acute otitis media. / S. Belanov, I. Tsvetkova, S. Sidorenko // ECCMID-XXIV, Barcelona, Spain, 10-13.05.2014. - P1446.
- Belanov, S.** Evaluation of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19A/F, isolated from children with pneumococcal infections: bioinformatic assay. / S. Belanov, I. Tsvetkova, V. Gostev, S. Sidorenko. // ECCMID-XXV, Copenhagen, Denmark, 25-28.04.2015. - P0178.
- Tsvetkova, I.** *Streptococcus pneumoniae* clonal complex 320 – evolutionary relationships with other genetic lineages. / I. Tsvetkova, V. Gostev, S. Belanov, S. Sidorenko. // The 10th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD 2018), Glasgow, Scotland, 26–30.06.2016. - ISPPD-0698.
- Mokhov, A.** Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal fluid using droplet digital PCR method. / Mokhov A., Sopova J. V., Tsvetkova I. [et al.]. // ECCMID-XXVII, Vienna, Austria, 22-25.04.2017. - EP0941.
- Tsvetkova, I.** Polymorphism in the genomes of the CC320 isolates of *Streptococcus pneumoniae* resistant to beta-lactam antibiotics. / Tsvetkova I., Volkova M., Kalinogorskaya O. [et al.]. // 7th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics (ProkaGENOMICS), 19-22.09.2017, Göttingen, Germany. - Poster ID83. – URL: <https://fems->

microbiology.org/opportunities/prokagenomics-2017-7th-european-conference-prokaryotic-fungal-genomics/

**Цветкова, И. А.** Клональная структура популяции *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге и распространение резистентности к антибактериальным препаратам. / Цветкова И. А., Беланов С. С., Гостев В. В. [и др.]. // Проблемы медицинской микологии. - 2018. - Т. 20, №2 - С. 126.

**Никитина, Е. В.** Динамика серотипового состава *Streptococcus pneumoniae* у детей в г. Санкт-Петербурге на фоне вакцинации. / Никитина Е. В., Мохов А. С., Цветкова И. А. [и др.]. // Проблемы медицинской микологии. – 2018. - Т. 20, №2 - С. 98.

**Цветкова, И. А.** Полногеномный анализ *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от пациентов с менингитами. / И. А. Цветкова // 4-5я Российская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов», 14-15 ноября 2018 г. - Москва, 2018. - Доклад. URL: <https://expodata.info/2018/11/14/vi-rossiyskaya-nauchno-prakticheskaya-konf/>

**Tsvetkova, I.** Antimicrobial Resistance and Clonality of *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Russia. / Tsvetkova I., Belanov S., Gostev V. [et al]. // Bioinformatics: from Algorithms to Applications 2019 (BiATA 2019), 20-22.06.2019, Saint-Petersburg, Russia. - Доклад. URL: <http://biata2019.spbu.ru/program/>

**Tsvetkova, I.** Antimicrobial resistance and clonality of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia. / Tsvetkova I., Belanov S., Gostev V. [et al]. // 2-й Российский микробиологический конгресс, 23-27 сентября, 2019, Саранск. Материалы конгресса. - С. 169.

**Муравьев, А. А.** Эпидемиология серотипов *S. pneumoniae*, выделенных у лиц старше 18 лет: здоровых носителей, пациентов с острым средним отитом, внебольничной пневмонией и инвазивной пневмококковой инфекцией (исследование «SPECTRUM»). / Муравьев А. А., Чагарян А. Н., Иванчик Н. В. [и др.]. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2019. - Т. 21, № 4. - С. 275-281. – doi: 10.36488/cmac.2019.4.275-281.

**Tsvetkova, I. A.** Mechanisms of virulence regulation and global distribution of vaccine candidate antigens in the high virulent *Streptococcus pneumoniae* strains. / Tsvetkova I. A., Likholetova D. V., Gostev V. V. [et al]. // 12th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD-12), 21-25.06.2020, Toronto, Canada. – P654. – URL: <https://cslide.ctimeetingtech.com/isppd20/attendee/eposter/poster/654>

### Список сокращений

ПИ – Пневмококковая инфекция

ПКВ7 – Пневмококковая конъюгированная 7-валентная вакцина

ПКВ13 – Пневмококковая конъюгированная 13-валентная вакцина

ПСБ – Пенициллин-связывающий белок

СРМ – Система рестрикции-модификации

MLST – Схема мультилокусного сиквенс-типирования

СС – Clonal complex (Клональный комплекс)

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (Центры по контролю и профилактике заболеваний США)

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control (Европейский центр профилактики и контроля заболеваний)

PMEN – Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (Пневмококковая молекулярно-эпидемиологическая сеть)

PubMLST – публичная база данных для молекулярного типирования и анализа геномного разнообразия микроорганизмов (один из подходов – по данным Multi Locus Sequence Typing, MLST)

SC – Sequence cluster (Сиквенс-кластер)

SC\_MLST – сиквенс-кластер, идентифицированный по конктенатам генов MLST

SNPs – Single nucleotide polymorphisms (Однонуклеотидные полиморфизмы)