

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 невакцированными 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 невакцированных 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 невакцированных 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 невакцированными 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, 23А, в группе В1 – серотипы 11А, 19F, 19А, 1, 9N, а в группе В2 – серотипы 6А/В/Е, 3, 19А, 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 19А, 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

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

Показана ассоциация варибельности гена *strH*, кодирующего экспрессируемую на поверхности клеточной стенки экзо- β -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). 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-β-D-N-ацетилглюкозаминидаза) оказывается на стыке метаболических путей и вариабельность гена *strH*, кодирующего экспрессируемую на поверхности клеточной стенки экзо-β-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^{23F,19F}, CC505³, CC236^{19F}, CC2296^{1,19F}, CC315^{6B}, CC663^{19A}, CC239^{19F,9A/V}, CC180³, CC230^{19A}, CC1025^{3,19F}, CC143^{19A,14}. 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	CC9	14	Европа (в т.ч. Россия)	2009 - 2013
	CC123	17F	Европа (в т.ч. Россия)	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	CC156	9A, 35B	повсеместно (в т.ч. Россия)	2001 – 2016
	CC1094	6A	Южная Африка	1978 - 1988
SC9_MLST	CC36	23F	Россия	2001 – 2017
	CC179	19F	Россия	2012-2016
	CC239	9V	Россия	1989 - 2011
	CC2296	1	Россия	1981 - 2011
	CC801	4	Россия, Чешская Республика	2008 – 2017
	CC63	15A	повсеместно (в т.ч. Россия)	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	CC3544	7F	Россия	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^{6E}, CC217¹, CC236/CC271/CC320^{19F}, CC81^{23F}, CC289⁵, CC1094^{6AE}, CC156^{35B}, CC304/CC306¹, CC124¹⁴, CC199^{19A}. 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^{11А}, СС191^{7F}, СС113^{18BC}, СС123^{17F}, СС124¹⁴, СС327^{6А}, СС433^{7F}. Резистентные к пенициллину изоляты принадлежали преимущественно: СС81^{23F,19F}, СС90^{6E}, СС236^{19F}, СС271^{19F}, СС320^{19F,19A}, СС448 (бескапсульные пневмококки).

Резистентные к макролидам изоляты принадлежали преимущественно СС81^{23F,19F}, СС90^{6E}, СС236^{19F}, СС271^{19F}, СС320^{19F,19A}, 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^{23F,19F}, СС90^{6E}, СС185^{6E}, СС236^{19F}, СС271^{19F}, СС320^{19A}. Клональные комплексы СС53⁸, СС62^{11А}, СС1012^{11А}, СС180³, СС505³, 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^{18ABCF}, СС1527^{12F}, СС2296¹, СС180³. Среди резистентных изолятов доминировала генетическая линия СС236^{19F}. 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^{23F}, СС361^{19A}, СС236^{19F}, СС315^{6B}, СС162^{19A}, СС30 (ST1500^{23F}), СС143¹⁴, СС230^{19F,19A}, СС276^{19A}. 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^{19A}, СС236^{19F}, СС315^{6B}, СС143^{14,19A}, СС180^{3,19A}, СС239^{19F}, СС505^{3,6ABCD,19A}, СС271^{19F,19A}, СС230^{19A}, 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 СС505³, циркуляция которого сохранилась на высоком уровне. Резистентные к антибиотикам изоляты были представлены преимущественно СС320^{19А}, СС179^{19F}, СС236^{19F}, СС311^{19А,23F}, а также редкими сиквенс-типами, родственными циркулировавшим ранее клональным комплексам: СС15^{серотип 14} (ST15, ST13658, ST13665, ST13844), СС143^{серотип 14} (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-лактамов 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*), путем 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)