

Опыт культивирования и молекулярно-генетическая характеристика полных геномов *M. pneumoniae*, изолированных в России

Мацвай А.Д.¹, Безруков В.М.², Николаева П.А.¹, Стеценко И.Ф.¹, Нурмуханова В.А.¹, Дикая Г.С.¹, Гордукова М.А.³, Галеева Е.В.³, Шипулин Г.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² ООО «Клиника новых медицинских технологий АрхиМед», Москва, Россия

³ ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

Контактный адрес:

Алина Дмитриевна Мацвай
Эл. почта: amatsvay@cspfmba.ru

Ключевые слова: *M. pneumoniae*, микоплазменная пневмония, культивирование, полногеномное секвенирование, филогенетический анализ.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование выполнено в рамках проекта государственного задания № 388-00099-23-02.

Соответствие принципам этики: исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, протокол №01/06/24. Все участники исследования подписывали информированное согласие.

Цель. В 2023–2024 году в Москве был отмечен рост заболеваемости пневмонией, вызванной *M. pneumoniae*. Для изучения молекулярно-генетических особенностей патогена, наибольшей информативностью обладают полногеномные последовательности. Однако, в настоящее время количество геномных данных *M. pneumoniae* крайне ограничено. Геномные данные актуальных для Российской Федерации изолятов до настоящего исследования в открытых источниках отсутствовали. Таким образом, целью исследования стало получение культур и полногеномных последовательностей изолятов *M. pneumoniae*, актуальных для РФ, их полная аннотация и изучение молекулярно-генетических характеристик.

Материалы и методы. Используя клинический материал от пациентов с подтвержденной микоплазменной инфекцией, были получены культуры *M. pneumoniae*, для которых было проведено полногеномное секвенирование с последующей сборкой и аннотацией генома патогена.

Результаты. Мы получили три полные кольцевые последовательности генома *M. pneumoniae*, содержащие типичный набор генов и факторов вирулентности. Изоляты относились к различным сиквенс-типам ST3 и ST20 и содержали ранее неописанные мутации в белках цитoadгезии. С использованием всех доступных в открытых источниках геномных данных *M. pneumoniae*, проведен филогенетический анализ, мультилокусное типирование, а также сравнительный анализ клинически значимых генов.

Выводы. В этом исследовании мы охарактеризовали первые полногеномные последовательности *M. pneumoniae*, полученные на территории РФ, а также привели детальные методики культивирования патогена и процесса обработки данных, которые могут быть использованы для дальнейшего расширения объема доступных данных о генетической структуре патогена.

Original Article

Cultivation and molecular characterization of complete genome sequences of *M. pneumoniae* isolated in Russia

Matsvay A.D.¹, Bezrukov V.M.², Nikolaeva P.A.¹, Stetsenko I.F.¹, Nurmukanova V.A.¹, Dikaya G.S.¹, Gordukova M.A.³, Galeeva E.V.³, Shipulin G.A.¹

¹ Federal State Budgetary Institution "Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks" of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² "ArchiMed Clinic of New Medical Technologies, LLC", Moscow, Russia

³ "G. Speransky Children's Hospital No. 9", Moscow, Russia

Contacts:

Alina D. Matsvay
E-mail: amatsvay@cspfmba.ru

Key words: Pneumonia, Mycoplasma, Genomics, Phylogeny, Russia

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: the research was carried out within the framework of the state assignment project No. 388-00099-23-02.

Ethical compliance:

Objective. In 2023–2024, a significant increase in the incidence of pneumonia caused by *M. pneumoniae* has been reported in Russia and China. Despite being one of the primary causative agents of community-acquired lower respiratory tract infections in children, due to the difficulties in obtaining a culture of this pathogen, the amount of genomic data on *M. pneumoniae* is currently extremely limited, with fewer than 300 genomic sequences available, of which only 79 are complete. Until this study, no genomic data for isolates relevant to the Russian Federation were available.

Materials and methods. Using biological material from patients with confirmed mycoplasma infection, cultures of *M. pneumoniae* were obtained, for which whole-genome sequencing was carried out, followed by assembly and annotation of the pathogen genome.

Results. We have obtained and characterized three complete circular genome sequences of *M. pneumoniae*, first described for Russia. Utilizing all genomic sequences of *M. pneumoniae* available in public

Мацвай А.Д. и соавт.

databases, we conducted a phylogenetic analysis as well as a comparative analysis of clinically significant genes, revealing previously undescribed mutations in cytoadherence proteins.

Conclusions. In this study, we characterized the first full genome sequences of *M. pneumoniae* isolated in the Russian Federation, as well as provided detailed methods for cultivating the pathogen and the data processing process, which can be used to further expand the amount of available data on the genetic structure of the pathogen.

Введение

Mycoplasma pneumoniae (*Mycoplasma pneumoniae* в устаревшей версии таксономии) – мельчайший прокариотический организм, с небольшим геномом, размер которого в среднем составляет всего около 800 тыс. оснований [1]. *M. pneumoniae* является одним из основных возбудителей внебольничных инфекций нижних дыхательных путей у детей и подростков [2]. Однако сообщается и о вспышках пневмоний, вызванных *M. pneumoniae* среди взрослого населения, в особенности в коллективах полужакрытого или закрытого типа. Так, данный патоген входит в этиологическую структуру, а по некоторым данным является одним из основных возбудителей бактериальной пневмонии у военнослужащих, о чем сообщалось учеными из России, Китая и США [3-7].

По данным Роспотребнадзора, в 2023 году в Москве был отмечен рост заболеваемости микоплазменной пневмонией. Показатель заболеваемости на 100 000 населения составил: 48,75, что в 12,8 раза выше чем в 2022 г., в 15,4 раза выше, чем в 2021 г. и в 5,4 раза выше, чем в 2020 году [8]. Наибольшую долю заболевших составляли дети. Так среди заболевших микоплазменной пневмонией в 2023 г. доля заболевших детей составила 74,8%, в 2022 г. – 71,7%, что связано с особенностями формирования детской иммунной системы и посещением организованных коллективов. Эти данные коррелируют с сообщениями о резком подъеме заболеваемости *M. pneumoniae* в Китае в 2023 году, при значительном возрастании числа случаев тяжелых и осложнённых инфекций, что не может не вызывать отдельного опасения [9].

Для идентификации *M. pneumoniae* в клинической практике используются микробиологические, серологические и молекулярные методы [1]. Последние получили широкое распространение в связи с быстротой получения результата, а также трудностями в получении культуры этого патогена. Также распространение получили молекулярные методы детекции клинически значимых мутаций гена 23SrRNA, связанные с резистентностью патогена к макролидам [6, 10]. Однако для изучения молекулярных детерминант вирулентности и контагиозности патогена, изучения указанных локусов недостаточно.

Основным фактором патогенности *M. pneumoniae* является ее способность к адгезии к эпителиальной ткани дыхательных путей, для чего патоген формирует специальную органеллу прикрепления, поверхностные компоненты которой также обладают иммуногенными

свойствами [2]. В качестве иммунодоминантных белков были выделены адгезины P1 и P40/P90 [11]. При этом, оперон адгезина содержит повторяющиеся участки, RepMP, обуславливающие способность *M. pneumoniae* к гомологической рекомбинации, которая служит источником варибельности в антигенных областях P1 и P40/P90, обеспечивая уклонение от иммунной системы хозяина [12]. С помощью *in vitro* исследований были выделены области этих белков, обладающие наибольшей генетической и клинической изменчивостью [11]. В геноме патогена также присутствует иммуноглобулин-связывающий белок (IbpM, ген MPN400), обладающей способностью образовывать прочные связи с иммуноглобулинами человека, классов M, A и G, являющийся частью системы уклонения от иммунитета [13]. Кроме этого, вирулентность *M. pneumoniae* усиливается способностью патогена к продукции CARDS токсина (токсин респираторного дистресс-синдрома), кодируемого геном MPN372 и сходного с субъединицей S1 коклюшного токсина [14].

Полногеномные последовательности обеспечивают максимальную информативность для задач молекулярно-генетических особенностей и эволюции патогенных микроорганизмов. Однако, в настоящее время количество геномных данных изолятов *M. pneumoniae* крайне ограничено. Так, на момент проведения данного исследования, в открытых источниках доступно лишь 286 полногеномных последовательностей патогена, из них всего 79 имеют статус полных. Данные о геномах изолятов *M. pneumoniae*, циркулирующих на территории России, в открытых источниках до настоящего исследования отсутствовали.

Цель исследования: таким образом, нашей целью стало получение полногеномных последовательностей изолятов *M. pneumoniae*, актуальных для РФ, их полная аннотация и изучение молекулярно-генетических характеристик.

Материалы и методы

Сбор образцов

Исследование проведено в г. Москва, Россия. Клинический материал, используемый в исследовании был получен от педиатрических пациентов, поступивших в инфекционное отделение ГБУЗ «ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ» с (1) симптомами острых респираторных инфекций верхних и нижних дыхательных

путей, а также (2) положительным результатом исследования клинического материала на содержание ДНК *M. pneumoniae*, полученным методом ПЦР; (3) отрицающих прием антибактериальной терапии до поступления в отделение. Для проведения исследования использовались мазки и соскобы клеток, взятые с задней стенки глотки.

Культивирование

Исследуемый материал помещался в пробирку с питательной средой, содержащей: сердечно-мозговую вытяжку (Becton Dickinson Microbiology Systems, США, кат. № 237500) – 15,0 г/л; основу бульона для микоплазм (Becton Dickinson microbiology systems, США, кат. № 211458) – 5,0 г/л; дрожжевой экстракт (Becton Dickinson microbiology systems, США, кат. № 211929) – 3,0 г/л; феноловый красный, натриевая соль (Sigma, США, кат. № P5530) – 0,02 г/л; глюкозу – 5,0 г/л; среду 199 (Научно-производственное предприятие «ПанЭко», Россия, кат. № C230п) – 150,0 мл/л; сыворотку крови эмбриональную телячью (Biopharm, Мексика, кат. № FB-1001A/500), предварительно инактивированную нагреванием при температуре 56 °С в течение 30 минут – 200,0 мл/л; ампициллина натриевую соль (PanReas AppliChem, Германия, кат. № A0839.0100) – 1,0 г/л; амфотерицин В (ОАО «Синтез», Россия) – 0,01 г/л; ванкомицин (АО НПЦ «Эльфа») – 0,1 г/л; полимиксина В сульфат (Sigma-Aldrich, США, кат. № P4932) – 500000 ЕД/л; рН 7,4.

Для посева образца биологического материала осуществлялось приготовление 2-х десятикратных разведений исходного образца в питательной среде для снижения концентрации в среде возможных ингибиторов роста *M. pneumoniae*. Постановку опыта сопровождали контролем пророста среды. Засеянные пробирки инкубировали при температуре 37°С в течение 2-х недель. Учёт результатов проводили путем визуального контроля засеянных пробирок: рост *M. pneumoniae* сопровождается снижением рН среды, и как следствие, изменением цвета среды с оранжево-красного на жёлтый. Подтверждение получения культуры *M. pneumoniae*, проводили методом ПЦР с использованием набора реагентов АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomydia pneumoniae*-FL (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора).

Высокопроизводительное секвенирование

Выделение тотальной ДНК из культурального материала проводили набором DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) по протоколу производителя с соблюдением рекомендаций для проведения экстракции из бактериальных культур. Входной контроль качества образца ДНК, проводили путем измерения концентрации на приборе Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) по стандартному протоколу производителя.

Подготовка библиотек для высокопроизводительного секвенирования осуществлялась с использованием набора реагентов Illumina DNA Prep (Illumina, San Diego, CA USA). Оценку качества готовой библиотеки, проводили путем измерения концентрации на приборе Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) и определения профиля длин фрагментов библиотеки на приборе 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, Santa Clara, CA USA) с использованием набора реагентов High Sensitivity DNA kit (Agilent, Santa Clara, CA USA). Секвенирование было проведено на платформе MiSeq (Illumina San Diego, CA USA) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) (Illumina San Diego, CA USA) из расчета 15% мощности платформы на 1 образец.

Обработка данных секвенирования

Бейсколлинг и демультиплексирование было осуществлено стандартным программным обеспечением, поставляемым с секвенирующей платформой. Оценка качества полученных данных осуществлялась программным обеспечением FastQC (v0.11.9) [15]; для фильтрации данных по качеству использовался trimmomatic (v0.39) [16]. Сборка *de novo* осуществлялась с использованием программного обеспечения SPAdes genome assembler (v3.15.5) [17] со следующими, отличными от стандартных, настройками: используемые размеры *k*-меров 1,31,55,77,99,127, активированная опция “--isolat”. Полировка контигов и получение финальных сборок осуществлялось с использованием pilon (v1.24) [18]. Аннотирование полученных сборок геномов проводили программным пакетом PGAP [19].

Для получения геномных сборок *M. pneumoniae*, доступных в базе данных NCBI datasets использовали ncbi-genome-download (v0.3.3) [20]. Для повторной аннотации всех анализируемых геномных последовательностей использовали prokka (v1.14.6) [21]. Идентификацию, классификацию и группировку семейств ортологичных генов в бактериальных пангеномах осуществляли pirate (v1.0.5) [22]. Для пан-геномного анализа использовали Roary (v3.13.0) [23]. MLST анализ проводили с использованием mlst (v2.23.0) [https://github.com/tseemann/mlst]. Филогенетический анализ осуществлён с помощью iqtree (v2.2.2.7) [24]. Частичная автоматизация обработки данных проводилась с использованием Nextflow (v23.10.1) [25] и пайплайна bactopia (v3.0.0) [26]. Для детекции точечных мутаций в отдельных генах использовали bwa (v0.7.17) [27] и пакеты программ samtools (v1.10) и bcftools (v1.10.2) [28].

Результаты

Выбор образцов и культивирование

Всего в исследование было включено 17 образцов, удовлетворяющих критериям включения, из которых для 3-х удалось успешно получить культуру патогена (далее образцы А, В и С). По результатам проведенного

Таблица 1. Результаты таксономической классификации полученных для каждого образца контигов; приведены результаты для контигов длиной более 500 нуклеотидов и таксономических групп, составляющих более 0,01% геномных данных

Таксон	Образец А, доля от геномных данных, %	Образец В, доля от геномных данных, %	Образец С, доля от геномных данных, %
<i>Mycoplasmoides pneumoniae</i>	100,00%	96,84%	99,96%
<i>Metamycoplasma salivarium</i>	-	3,07%	-
<i>Caudoviricetes</i> spp.	-	0,08%	-
<i>Homo sapiens</i>	-	-	0,02%
<i>Rhodococcus</i> spp.	-	-	0,01%

шот-ган секвенирования ДНК, выделенной из образцов культур, и последующей сборки *de novo*, было получено 11, 200 и 86 контигов, длиной более 500 нуклеотидов для исследуемых образцов А, В и С соответственно. Для удаления возможных контаминантных генетических последовательностей, а также для оценки эффективности культивирования патогена, мы провели таксономическую классификацию полученных контигов (Таблица 1).

Таким образом, для образцов А и С удалось получить чистые культуры *M. pneumoniae*; наблюдались лишь незначительные примеси геномной ДНК человека и *Rhodococcus* spp., вероятно связанные с условиями работы лаборатории. В образце В мажорным компонентом также был организм изучаемого патогена, однако около 3% геномных данных принадлежали родственному *M. pneumoniae* организму *Metamycoplasma salivarium* (*Mycoplasma salivarium*).

Получение полногеномных последовательностей и аннотация

Для каждого из трех образцов (далее изоляты А, В и С) была получена полная последовательность кольцевых геномов *M. pneumoniae* (Таблица 2), контаминация в сборках отсутствовала. Мы аннотировали полный спектр ожидаемых кодируемых участков и соответствующих им белковых последовательностей. Различий в наборе белковых последовательностей, кодируемых геномами изолятов А, В и С, так же, как и существенных различий в копиях соответствующих генов, по сравнению со всеми известными геномами *M. pneumoniae* обнаружено не было.

Геномные последовательности с полной аннотацией доступны в базе данных NCBI GenBank (BioProject Accession: PRJNA115704, GenBank Accessions: CP169363, CP169364, CP169365). Для *M. salivarium*, обнаруженной в образце В, также удалось собрать полную последовательность генома. Это первая полная кольцевая последовательность генома *M. salivarium*, доступная в открытых базах данных (GenBank Accession: CP169362).

Таблица 2. Общая характеристика полученных полногеномных последовательностей изолятов *M. pneumoniae*

Параметр	Изолят А	Изолят В	Изолят С
Размер генома	816 423 bp	816 417 bp	816 376 bp
%GC	40,17%	40,25%	40,20%
Среднее покрытие генома	1 215 X	1 599 X	1 357 X
Кол-во обнаруженных генов	767	770	768
Кол-во обнаруженных CDS	724	727	725
Кол-во CDS соответствующих белку	687	691	689
Кол-во генов, кодирующих РНК	43	43	43
Обнаруженные рибосомальные гены	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)
Кол-во обнаруженных псевдогенов	37	36	36

Филогенетический анализ и мультилокусное типирование

Для проведения сравнительного, а также филогенетического анализа корового генома, из базы данных NCBI datasets, были получены все доступные на дату проведения исследования геномные сборки *M. pneumoniae* уровня: полная, скаффолд, контиги. Всего было получено 286 последовательностей, из которых 79 – полногеномные последовательности, 31 – сборки уровня скаффолдов, 176 – сборки уровня контигов. Дополнительно для каждой геномной последовательности было проведено мультилокусное типирование и определение сиквенс типа. Для определения структуры набора данных, мы построили распределение количества геномных последовательностей *M. pneumoniae* по дате и географической локации получения изолята (Рисунок 1), из которого видно, что 35% последовательностей были получены из одного региона (Тайвань). В целом, наиболее представленным является азиатский регион, включающий также Китай, Японию и Южную Корею (80% данных), еще около 10% данных были получены из США, а на европейский регион приходится чуть более 8% данных. Распределение имеющихся данных по сиквенс-типам также характеризуется неравномерностью. Так, наиболее представленным сиквенс-типом на сегодняшний день является ST3 (N = 129, 45%). Более того, данный тип является также самым географически распространенным. Так, представители ST3 встречались в 9 различных местностях. Следующим по распространенности в мире стал ST2, данные о представителях которого были зафиксированы в 7 географических удаленных странах. Однако при этом, к ST2 были отнесены лишь 8% геномных последовательностей (N = 23). Информация о геномах изолятов *M. pneumoniae* из Российской Федерации отсутствовала.

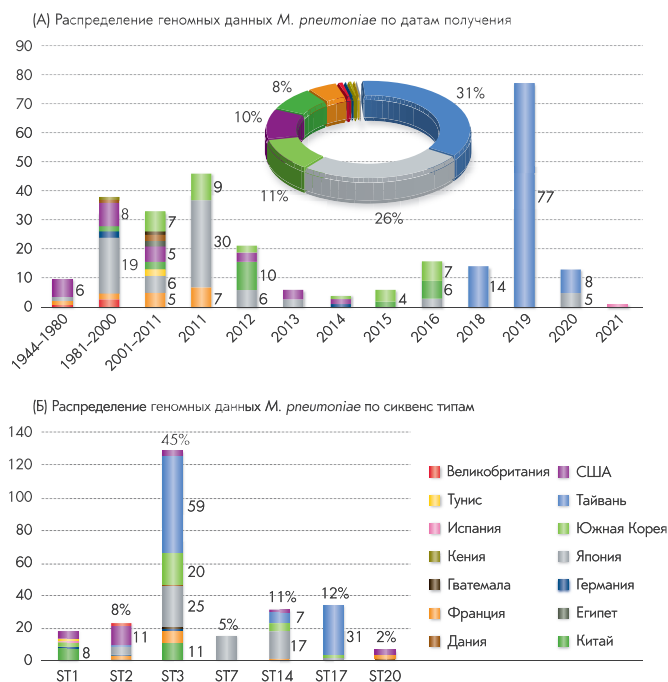


Рисунок 1. Структура набора геномных данных *M. pneumoniae*, доступных в базе данных NCBI datasets: (А) – распределение геномных данных по датам забора биологических образцов, использовавшихся для получения геномной последовательности; при отсутствии указанной даты забора, в качестве даты получения геномной последовательности использовалась дата загрузки геномной последовательности в базу данных; цветами обозначены страны, указанные в поле «geo_loc_name» атрибутов биообразца; обозначения цветов приведены в легенде на рисунке; (Б) – распределение геномных данных по сиквенс-типам, где приведены сиквенс-типы, составляющие более 1% от выборки данных; цветами обозначены страны, указанные в поле «geo_loc_name» атрибутов биообразца; обозначения цветов приведены в легенде на рисунке.

Для всех геномных данных *M. pneumoniae*, полученных из открытых источников, в совокупности с исследуемыми изолятами, была проведена повторная аннотация генома, а также идентификация, классификация и группировка семейств ортологичных генов с последующим филогенетическим анализом полученных кор-геномов. Полученное филогенетическое дерево (Рисунок 2) состоит из 2-х макро-клад, соответствующих исторически разошедшимся линиям патогена, определяемым 1-м и 2-м подтипами адгезина P1. Внутри первой макро-клады можно выделить 3 основных клады, для которых основными сиквенс-типами являются ST1, ST3 и ST17 соответственно (клады 1-1, 1-2 и 1-3). Внутри клады 1-2 можно выделить отдельную ветвь, в которую группируются изоляты, относящиеся к сиквенс-типу 20. Вторая макро-клада, наиболее ранние представители которой относятся к сиквенс-типам 2 и 4, в современное время представлена тремя основными линиями, соответствующими

штаммами ST2, ST7 и ST14 соответственно (клады 2-1, 2-2 и 2-3). Полученные в Российской Федерации изоляты *M. pneumoniae* относятся к разным сиквенс-типам – 3 и 20, клады 1-2. Изолят А, ST20, относится к ветке, для которой первый изолят был обнаружен во Франции, 1999 год. Наиболее филогенетически близким к изоляту А из известных геномных последовательностей оказался также изолят из Франции, 2011 год. Кроме того, данная ветка включает изоляты *M. pneumoniae* из США и Египта. Изоляты В и С филогенетически близки друг другу и располагаются на другой ветви филогенетического дерева, для которой самый ранний изолят был получен в Германии, в 1993 году. Представители этой суб-клады также были обнаружены во Франции, США, Японии и Южной Корее.

Анализ клинически значимых генов

В геномах всех трех изолятов был выявлен набор факторов вирулентности, типичный для *M. pneumoniae*: ген *mprA* адгезина P1 подтипа 1, а также адгезинов *r40/p90*, *p200*, ген *p30/p32*, ген мембранного белка *r65*; гены внутренних компонент органеллы прикрепления *hmw*, *hmw2*, *hmw3*; и ген *CARDS* токсина *MPN372*.

Для выявления возможных молекулярных особенностей основных адгезинов P1 и P40/90, мы провели сравнение полученных для изолятов А, В и С последовательностей с выборкой из всех доступных последовательностей (выборка сравнения, N = 125 для адгезина P1 первого подтипа; N = 50 для адгезина P40/90 и N = 16 для адгезина P40/90 соответствующего первому подтипу P1 – использовалась для расчета частот в различающейся между подтипами адгезина части P40/90, обозначены (*)). В таблице (Таблица 3) приведены все выявленные отличия от референсной последовательности для исследуемых изолятов, а также частоты указанных аминокислотных замен в выборке сравнения.

Для изолята А была выявлена редкая аминокислотная замена адгезина P1 179E>K, которая встречается лишь в 5 известных изолятах (GCF 002128065.1, GCF 002128145.1, GCF 001272775.1, GCF 001272735.1, GCF 001272755.1), родственных изоляту А согласно филогенетическому анализу. Мутация расположена в β-пропеллерной области N-концевого домена. Для изолятов В и С была обнаружена замена 1239Q>E, не описанная ранее, приводящая к изменению заряда функциональной группы. Мутация расположена на поверхности «короны» белка, вблизи от известных эпитопов для которых имеются экспериментальные подтверждения ингибирования цитоадгезии. Кроме того, для всех трех изолятов была получена различная длина полисеринового участка адгезина P1, который, однако обладает высокой вариабельностью в выборке сравнения.

Для последовательностей адгезина P40/90 все выявленные аминокислотные отличия находятся в короне N-концевого домена. Замена 172G > S, характерная для всех трех полученных изолятов, встречается только в одной из известных ранее последовательно-

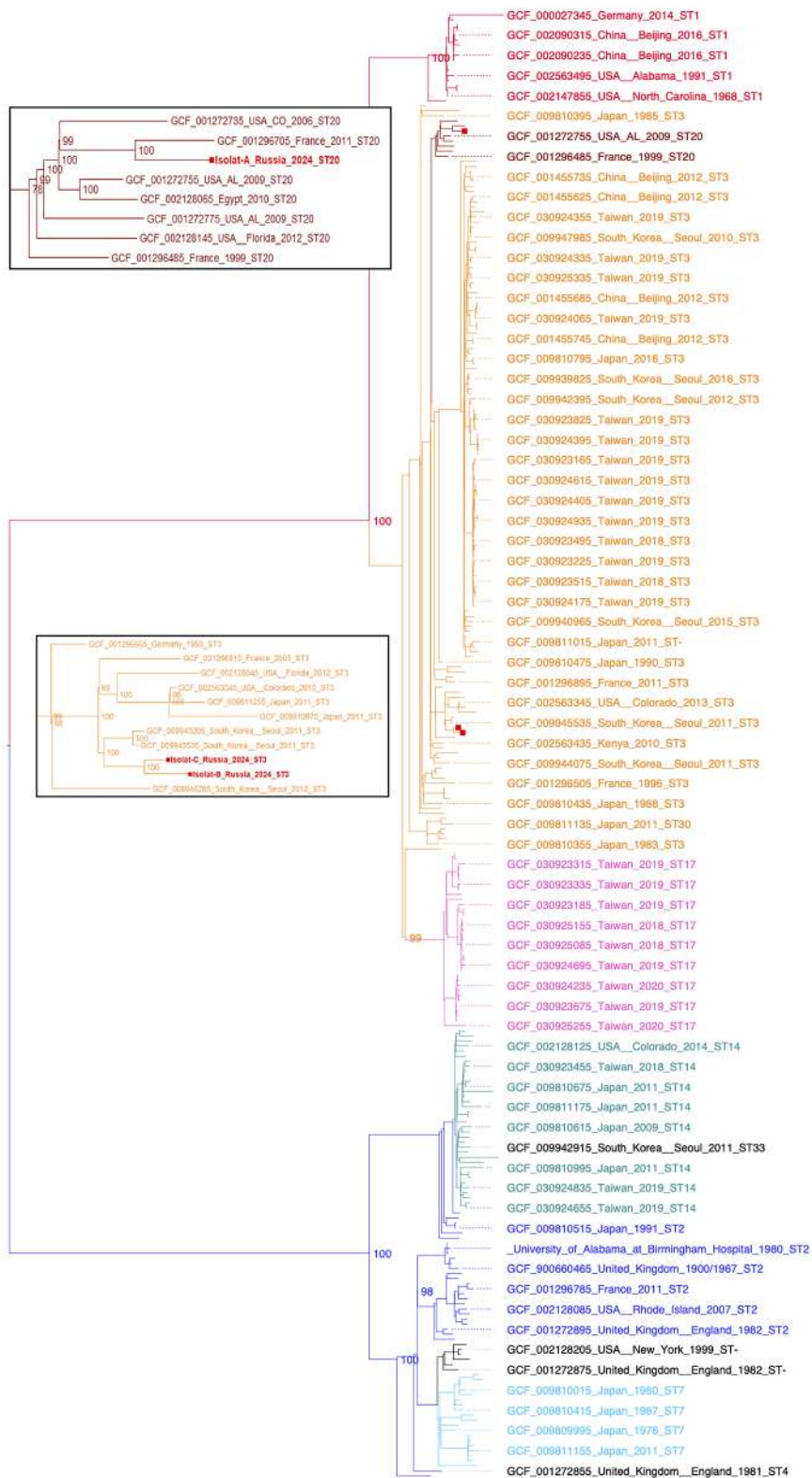


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, построенное по кор-геному *M. pneumoniae*, сопровождаемое данными о результатах мультилокусного типирования, где оттенками красного обозначена макроклада 1, оттенками синего – макроклада 2. Различные оттенки вышеуказанных цветов обозначают клады геномных последовательностей, относящихся к одному сиквенс-типу. Черным цветом обозначены сиквенс-типы, представленные единичными последовательностями, а также клады, для которых не удалось определить сиквенс-тип стандартным MLST. Красными квадратами отмечено положение на дереве исследуемых изолятов А, В и С. Субклады, к которым относятся изоляты А, В и С показаны в укрупненном масштабе. На данном рисунке опущена часть подписей и значений бутстреппинга. Полную версию филогенетического дерева можно найти в приложении (<https://cmac-journal.ru/supplementary/2024/3/cmasc.26.3.1.pdf>).

Таблица 3. Молекулярные особенности первичной структуры адгезина P1 изолятов А, В и С в сравнении с выборкой всех доступных последовательностей первого подтипа; (*) обозначены позиции, находящиеся в различающейся между подтипами части белка, для которых использовалась сокращенная выборка последовательностей адгезина P40/90, соответствующих первому подтипу адгезина P1.

Белок адгезии	Позиция в первичной последовательности	Изолят А, частота в выборке	Изолят В, частота в выборке	Изолят С, частота в выборке	Консервативность позиции в выборке
P1	179	K, 4%	E, 96%	E, 96%	96%
P1	646-652	S(9), 15%	S(11), 6.25%	S(13), 2.5%	52%
P1	1232	E, 0%	Q, 100%	Q, 100%	100%
P40/90	169	G, 34%	G, 34%	G, 34%	76%
P40/90	172	S, 2%	S, 2%	S, 2%	96%
P40/90	217	G, 36%	G, 36%	G, 36%	54%
P40/90	225	Q, 100%	E, 0%	E, 0%	100%
P40/90	361(*)	A, 100%	T, 0%	T, 0%	100%
P40/90	373(*)	S, 11%	S, 11%	S, 11%	89%
P40/90	419(*)	S, 0%	S, 0%	S, 0%	100%

стей (GCF_009939845.1). Также во всех трех изолятах была обнаружена замена 419P > S, не описанная ранее для последовательностей, соответствующих первому подтипу адгезина. В последовательности адгезина P40/90 изолятов В и С, кроме того, были обнаружены не описанные ранее мутации 361A > T и 225Q > E, последняя из которых находится вблизи сайта связывания с сиаловыми кислотами и сахарами (Рисунок 3).

Также было проведено сравнение аминокислотной последовательности CARDS токсина и иммуноглобулин-связывающего белка (IbpM), не показавшее каких-либо отличий для исследуемых изолятов в сравнении со выборкой всех доступных последовательностей соответствующих белков ($N = 289$ и $N = 288$ соответственно).

Для выявления возможных мутаций, обуславливающих устойчивость *M. pneumoniae* к антибиотикам, относящимся к группе макролидов, мы провели анализ гена 23S rRNA, относительно референсной последовательности дикого типа (*M. pneumoniae* gene for 23S rRNA, GenBank: X68422.1). Для всех исследуемых изолятов были получены идентичные последовательности гена 23S rRNA и выявлено одно отличие от варианта гена дикого типа: A1290G. Отличия от дикого типа в регионе 2058-2065 для всех исследованных изолятов отсутствовали.

Обсуждение

Несмотря на клиническую значимость *M. pneumoniae*, как возбудителя в том числе тяжелых форм внебольничной пневмонии, количество имеющейся геномной информации патогена в настоящее время крайне ограничено [12]. В первую очередь, это связано с особенностями строения патогена, затрудняющими применения стандартных микробиологических методик. Так, несмотря на то, что способ культивирования *M. pneumoniae* был предложен более 60-и лет назад [29], являясь облигатным внутриклеточным паразитом, патоген характери-

зуется плохим ростом, требует дорогостоящих сыровоточных сред и осуществления трудоемкой методики, доступной для ограниченного количества лабораторий [1]. Отдельной трудностью является получение чистых культур, не содержащих посторонних организмов, в частности представителей микрофлоры слизистых оболочек, неизбежно попадающих в образец с клиническим материалом. Нам удалось получить значительный рост возбудителя в трех случаях из семнадцати. Все полученные культуры не содержали значимого количества контаминант. Одна из полученных культур, при этом, содержала небольшое количество микоплазмы другого вида – *M. salivarium*, известной как комменсал полости рта. В литературе имеются данные о способности этого вида микоплазм вызывать тяжелые инвазивные инфекции у лиц с ослабленным иммунитетом [30]. Однако в данном случае, как мы полагаем, в совокупности с присутствием в материале конвенционального патогена, *M. salivarium* оказалось в культуре случайно, находясь среди прочих микроорганизмов, населяющих полость рта пробанда. Данный опыт, однако, иллюстрирует необходимость проверки получаемых культур микоплазм на видовую принадлежность, потому как обеспечиваемые при культивировании условия подходят в том числе для комменсальных видов, составляющих микробиом слизистых оболочек.

Для всех полученных культур нам удалось осуществить полногеномное секвенирование и последующую сборку кольцевых геномов, структура которых оказалась типичной для *M. pneumoniae* [1]. Нам удалось идентифицировать все гены, входящие в коровый геном патогена, так же, как и гены, кодирующие компоненты органеллы прикрепления, являющиеся факторами вирулентности. Для изолята А была получена уникальная последовательность адгезина P1, отличающаяся от всех известных последовательностей 2 аминокислотными заменами, расположенными в N-концевом домене, одна из которых, 1232Q>E находится в поверхностной области короны, вблизи от участка, обладающего важными иммуноген-

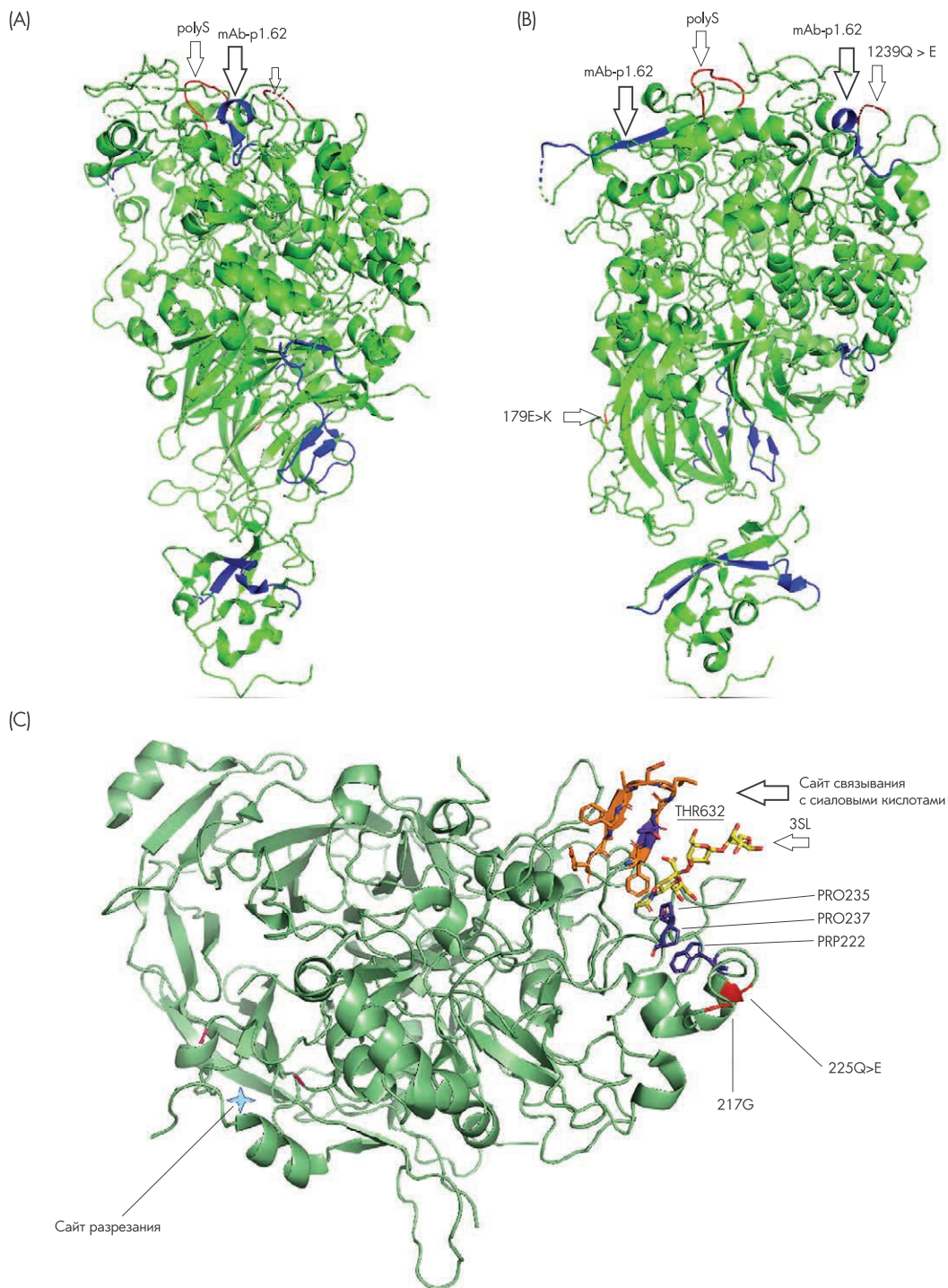


Рисунок 3. (A) и (B) – пространственная структура адгезина P1, в различных проекциях, где синим цветом обозначены эпитопы, для которых имеются экспериментальные подтверждения ингибирования цитоадгезии; красным цветом обозначены области, содержащие обнаруженные аминокислотные замены; (C) – пространственная структура адгезина P40/90, где фиолетовым и оранжевым цветом обозначены участки, формирующие сайт связывания с сialовыми кислотами и сахарами; голубым обозначен участок, относящийся к не визуализированной части белка, содержащий сайты разрезания P40 и P90, края которой отмечены розовым цветом; красным цветом обозначены области, содержащие обнаруженные аминокислотные замены.

ными свойствами [11]. Для адгезина P40/90 изолятов В и С также были выявлены неописанные ранее аминокислотные замены, располагающиеся на поверхностных структурах белка вблизи от известных активных сайтов, приводящие к изменению характеристик функциональных групп. Однако вследствие гораздо меньшей изученности структуры и иммуногенных функций данного типа адгезина, выводы о возможных модифицирующих свойствах данных замен остаются задачами будущих исследований. Отдельно также стоит отметить малый размер выборки сравнения для данного типа адгезина, связанный, в первую очередь, с трудностями сборки и аннотации соответствующей части генома.

Анализ гена *23S rRNA*, мутации в котором связаны с возникновением резистентности *M. pneumoniae* к макролидным антибиотикам [6], показал, что исследуемые изоляты не обладают детерминантами устойчивости. Выявленную мутацию A1290G, связывали с резистентностью к макролидам (63%) лишь в комбинации с мутацией A2063G [31], однако в геноме изолята мутация A2063G отсутствует. Кроме того, имеются данные, о том, что данная мутация A1290G, без связи с другими мутациями в области 2058-2065 не связана с устойчивостью к макролидам [32]. Наши результаты контрастируют с сообщениями из Китая о том, что вспышка 2023 года связана с приобретением штаммов *M. pneumoniae* 100% устойчивости к макролидам из-за приобретения мутации A2063G [9,33]. Более ранние исследования по типированию *M. pneumoniae*, циркулирующих в Москве, также не обнаруживали большой доли резистентных штаммов – на 2018 год этот показатель составлял 7% [34].

Результаты проведенного филогенетического анализа полностью совпали с таковыми, полученными в недавнем исследовании Yu-Chia Hsieh и соавторов [12], за разницей выбранных обозначений клад. Кроме того, в нашем исследовании большее внимание было уделено соответствующим филогении сиквенс-типам, определяемым MLST, как показателям, которые могут быть использованы в рутинной практике. Необходимо также отметить, что полученная филогения кроме того, коррелирует с исторически определяемыми подтипами 1 и 2 адгезина P1, линии которых представляют собой 2 эволюционно разошедшиеся макро-клады.

Японские ученые обнаружили тенденцию к чередованию преобладающих штаммов подтипов адгезина P1 в 2-3 летних эпидемических сезонах, вероятнее всего связанного с накоплением иммунокомпетентного к соответствующему типу штаммов населения [35]. Хотя были зарегистрированы случаи одновременной циркуляции штаммов обоих типов [12]. Все исследованные нами изоляты *M. pneumoniae* относились к штаммам адгезина P1 типа 1, однако к различным сиквенс-типам, лежащим на дистантных ветвях филогенетического дерева. Отметим, что все исследованные нами изоляты *M. pneumoniae* можно считать актуальными для РФ на эпидемический сезон 2023-2024 и что они были получены на одной территории в короткий промежуток вре-

мени. Поэтому даже с учетом крайне малого количества образцов, можно считать характер текущей вспышки заболеваемости гетерогенным. Что, однако, не является исключением и было описано в исследованиях из разных стран [12, 34, 36].

Оба сиквенс-типа, к которым были отнесены исследуемые изоляты, лежат внутри одной клады, для которой была показана повышенная относительно других клад мутабельность геномов, самая высокая скорость рекомбинации и соответствующее генетическое разнообразие [12]. Более того, для генетических линий данной клады была зафиксирована повышенная частота мутаций, связанных с макролид-резистентностью [36]. В совокупности, эти факторы могут значительно повысить потенциал антигенной изменчивости штаммов *M. pneumoniae*, делая данную генетическую линию самым эпидемиологически успешным генотипом, о чем свидетельствует данные о его глобальном распространении.

Однако, необходимо отметить, что эти выводы основываются на ограниченном размера выборке геномных данных, доступных в настоящее время для *M. pneumoniae*, которые, кроме того, отличаются неравномерностью глобальной представленности. Так, более трети доступных данных были получены из одного региона и, более того, одной группой ученых в рамках одного исследования, в которое были включены преимущественно образцы, полученные в 2019 году [12]. Таким образом, малый размер выборки, а также неравномерная представленность отдельных географических регионов, является основным ограничивающим фактором, в том числе влияющим на достоверность получаемых результатов.

Заключение

В этом исследовании нам удалось получить и охарактеризовать полногеномные последовательности изолятов *M. pneumoniae*, циркулирующих в г. Москва. Это первые полные последовательности генома данного патогена, полученные на территории Российской Федерации. Используя все геномные последовательности *M. pneumoniae*, доступные в открытых базах данных, мы провели филогенетический анализ, а также сравнительный анализ клинически значимых генов, выявив ранее неописанные мутации в белках цитоадгезии.

Основным препятствием для изучения молекулярно-генетических особенностей и эволюции *M. pneumoniae* является ограниченный размер выборки доступных геномных данных. Несмотря на глобальную распространённость патогена и высокую клиническую значимость, на сегодняшний день доступно лишь менее трехсот геномных последовательностей из счетного количества стран. Мы надеемся, что наше исследование, сопровождаемое детальной методикой культивирования *M. pneumoniae* позволит расширить объем доступных данных о генетической структуре патогена, позволив, тем самым, значительно повысить качество исследований в данной области.

Литература

1. Edelstein I.A. *Mycoplasma pneumoniae* – modern data on the structure, molecular biology and epidemiology of the pathogen. *Klinicheskaa mikrobiologia i antimikrobnaa himioterapia*. 2023;25(4):332-349. Russian. (Эйдельштейн И.А. *Mycoplasma pneumoniae* – современные данные о строении, молекулярной биологии и эпидемиологии возбудителя. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2023;25(4):332-349.) DOI: 10.36488/смас.2023.4.332-349
2. Hu J., Ye Y., Chen X., Xiong L., Xie W., Liu P. Insight into the pathogenic mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr Microbiol*. 2023;80(1):14. DOI: 10.1007/s00284-022-03103-0
3. Speranskaya E.V., Brusnigina N.F., Efimov E.I., Dobrotina I.S., Samokhina L.P. Etiology of community-acquired pneumonia in the military personnel. *Klinicheskaa mikrobiologia i antimikrobnaa himioterapia*. 2018;20(2):150-155. Russian. (Сперанская Е.В., Бруснигина Н.Ф., Ефимов Е.И., Добротина И.С., Самохина Л.П. Оценка этиологической структуры внебольничной пневмонии у военнослужащих. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018;20(2):150-155.) DOI: 10.36488/смас.2018.2.150-155
4. Zhang X., Han M.N., Dong J.H., Li X.X., Hu X.Y., Wang Z., et al. Outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* at a military academy. *Mil Med Res*. 2020;7(1):60. DOI: 10.1186/s40779-020-00289-x
5. Gray G.C., Duffy L.B., Paver R.J., Putnam S.D., Reynolds R.J., Cassell G.H. *Mycoplasma pneumoniae*: a frequent cause of pneumonia among U.S. marines in Southern California. *Mil Med*. 1997;162(8):524-526. DOI: 10.1093/milmed/162.8.524
6. Ivanova O.V., Edelstein I.A., Romashov O.I., Kozlov R.S. Effect of 23S rRNA gene mutations in *Mycoplasma pneumoniae* on severity of community-acquired pneumonia in young adult patients treated at the Smolensk military hospital. *Klinicheskaa mikrobiologia i antimikrobnaa himioterapia*. 2020;22(4):306-312. Russian. (Иванова О.В., Эйдельштейн И.А., Ромашов О.И., Козлов Р.С. Оценка влияния мутаций в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*, обуславливающих устойчивость к макролидам, на тяжесть течения внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста, находившихся на лечении в Смоленском военном госпитале. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2020;22(4):306-312.) DOI: 10.36488/смас.2020.4.306-312
7. Edelstein I.A., Ivanova O.V., Romashov O.I., Kozlov R.S. Course of lower respiratory tract infection in young people treated at the military hospital of Smolensk garrison with detected *Mycoplasma pneumoniae* carrying a macrolide-resistant mutation in 23S rRNA gene. *Pathogens*. 2023;12(1):103. DOI: 10.3390/pathogens12010103
8. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2022: State report. Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare; 2023. 368 p. ISBN 978-5-7508-2012-2. Russian. (О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2023. 368 с. ISBN 978-5-7508-2012-2.)
9. Wang F., Cheng Q., Duo H., Wang J., Yang J., Jing S., et al. Childhood *Mycoplasma pneumoniae*: epidemiology and manifestation in Northeast and Inner Mongolia, China. *Microbiol Spectr*. 2024;e00097-24. DOI: 10.1128/spectrum.00097-24
10. Nguyen D.D., Ho N.T., Dover L.G., Vo A.H.M., Ly H.T.T., Doan P.M., et al. Novel variant and known mutation in 23S rRNA gene of *Mycoplasma pneumoniae*, Northern Vietnam, 2023. *Emerg Infect Dis*. 2024;30(5):1034-1036. DOI: 10.3201/eid3005.231632
11. Vizarraga D., Kawamoto A., Matsumoto U., Illanes R., Pérez-Luque R., Martín J., et al. Immunodominant proteins P1 and P40/P90 from human pathogen *Mycoplasma pneumoniae*. *Nat Commun*. 2020;11(1):5188. DOI: 10.1038/s41467-020-18777-y
12. Hsieh Y.C., Li S.W., Chen Y.Y., Kuo C.C., Chen Y.C., Chang I.Y.F., et al. Global genome diversity and recombination in *Mycoplasma pneumoniae*. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(1):111-117. DOI: 10.3201/eid2801.210497
13. Blötz C., Singh N., Dumke R., Stülke J. Characterization of an immunoglobulin binding protein (IbpM) from *Mycoplasma pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2020;11:685. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00685
14. Li G., Fan L., Wang Y., Huang L., Wang M., Zhu C., et al. High co-expression of TNF- α and CARDS toxin is a good predictor for refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Mol Med*. 2019;25(1):38. DOI: 10.1186/s10020-019-0105-2
15. Schmieler R., Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinforma Oxf Engl*. 2011;27(6):863-864. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr026
16. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
17. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455-477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
18. Walker B.J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*. 2014;9(11):e112963. DOI: 10.1371/journal.pone.0112963
19. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(14):6614-6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569

20. Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R., Canese K., Chan J., Comeau D.C., et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D20-D26. DOI: 10.1093/nar/gkab1112
21. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinforma Oxf Engl.* 2014;30(14):2068-2069. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153
22. Bayliss S.C., Thorpe H.A., Coyle N.M., Sheppard S.K., Feil E.J. PIRATE: a fast and scalable pangenomics toolbox for clustering diverged orthologues in bacteria. *GigaScience.* 2019;8(10):giz119. DOI: 10.1093/gigascience/giz119
23. Page A.J., Cummins C.A., Hunt M., Wong V.K., Reuter S., Holden M.T.G., et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691-3693. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421
24. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268-274. DOI: 10.1093/molbev/msu300
25. Di Tommaso P., Chatzou M., Floden E.W., Barja P.P., Palumbo E., Notredame C. Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nat Biotechnol.* 2017;35(4):316-319. DOI: 10.1038/nbt.3820
26. Petit R.A., Read T.D. Bactopia: a flexible pipeline for complete analysis of bacterial genomes. *mSystems.* 2020;5(4):e00190-20. DOI: 10.1128/mSystems.00190-20
27. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl.* 2009;25(14):1754-1760. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324
28. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience.* 2021;10(2):giab008. DOI: 10.1093/gigascience/giab008
29. Baernstein H.D., Quilligan J.J. Cultivation of *Mycoplasma pneumoniae* (Eaton agent). *J Bacteriol.* 1963;86(2):339-339. DOI: 10.1128/jb.86.2.339-339.1963
30. Xiao L., Totten A.H., Crabb D.M., Atkinson T.P., Waites K.B. Antimicrobial susceptibilities and mechanisms of resistance of commensal and invasive *Mycoplasma salivarium* isolates. *Front Microbiol.* 2022;13:914464. DOI: 10.3389/fmicb.2022.914464
31. Ma Z., Zheng Y., Deng J., Ma X., Liu H. Characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in children in Shenzhen, China: macrolide resistance of *M. pneumoniae*. *Pediatr Pulmonol.* 2014;49(7):695-700. DOI: 10.1002/ppul.22851
32. Liu Y., Ye X., Zhang H., Xu X., Li W., Zhu D., et al. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* isolates and molecular analysis of macrolide-resistant strains from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):2160-2162. DOI: 10.1128/AAC.01684-08
33. Li H., Li S., Yang H., Chen Z., Zhou Z. Resurgence of *Mycoplasma pneumoniae* by macrolide-resistant epidemic clones in China. *Lancet Microbe.* 2024;5(6):e515. DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00405-6
34. Voronina E.N., Gordukova M.A., Turina I.E., Mishukova O.V., Dymova M.A., Galeeva E.V., et al. Molecular characterization of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Moscow from 2015 to 2018. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(2):257-263. DOI: 10.1007/s10096-019-03717-6
35. Kenri T., Suzuki M., Sekizuka T., Ohya H., Oda Y., Yamazaki T., et al. Periodic genotype shifts in clinically prevalent *Mycoplasma pneumoniae* strains in Japan. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:385. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00385
36. Kenri T., Yamazaki T., Ohya H., Jinnai M., Oda Y., Asai S., et al. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated in Japan during 2019 and 2020: spread of p1 gene type 2c and 2j variant strains. *Front Microbiol.* 2023;14:1202357. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1202357