

АНДРИЯНОВ Павел Алексеевич

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ЭМЕРДЖЕНТНЫХ
САПРОНОЗНЫХ БАКТЕРИЙ *ELIZABETHKINGIA ANOPHELIS* И
DELFTIA TSURUHATENSIS, ОБЛАДАЮЩИХ ФЕНОТИПОМ
МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ**

1.5.11– Микробиология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в Нижегородском научно-исследовательском ветеринарном институте – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии”.

Научный руководитель:

Ермолаева Светлана Александровна, доктор биологических наук, зав. лабораторией экологии возбудителей инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Сомова Лариса Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории патоморфологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Гостев Владимир Валерьевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии и медицинской эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи.

Защита диссертации состоится «25» апреля 2025 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра:
<http://www.gamaleya.org/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

ВрИО ученого секретаря диссертационного совета

к.б.н.

Кунда М.С.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Эмерджентные инфекционные заболевания можно определить как новые инфекции, возникшие в популяции недавно или уже существующие, заболеваемость или географический охват которых стремительно увеличиваются (ВОЗ, A brief guide to emerging infectious diseases and zoonoses, 2014). Агенты вирусной природы более известны в качестве эмерджентных возбудителей. Однако бактерии, наряду с вирусами, играют важнейшую роль в этиологической структуре эмерджентных инфекций: чуть более половины (54,3%) эмерджентных инфекций имеют бактериальную этиологию (Jones et al., 2008).

Больше половины — 60,3% — эмерджентных возбудителей имеют зоонозное происхождение, в то время как соответственно 39,7% происходят из окружающей среды и не являются зоонозами. Возбудителей, чьим естественным резервуаром является окружающая среда, относят к группе возбудителей сапронозных инфекций, согласно обозначению в отечественной литературе, или — *soilborne/environmental pathogens*, согласно обозначению в международной литературе. Возбудители сапронозных инфекций являются членами микробных почвенных и/или водных экосистем, способными автономно существовать вне макроорганизма хозяина. Характерными чертами возбудителей сапронозов являются убиквитарность, экологическая пластичность и полигостальность, т.е. способность колонизировать и инфицировать широкий круг хозяев (Литвин, Коренберг, 1999). Примерами классических сапронозных возбудителей могут служить *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *Bacillus* spp., *Yersinia pseudotuberculosis*, и др (Hubálek, 2003).

Особый интерес представляет группа так называемых эмерджентных сапронозов. Их появление связано с различными факторами, включая демографические, патогенетические (биология микроорганизма), социально-экономические, эколого-климатические и научно-технические факторы (Kow-Tong Chen, 2022). Ключевыми факторами считаются интенсификация воздействия на популяцию человека естественных резервуаров бактериальных патогенов (контакт с резервуаром), появление вирулентных вариантов, способных вызывать инфекции, а также разработка новых методов диагностики. Отдельным важным фактором является увеличение числа иммунокомпрометированных лиц (Vouga, Greub, 2016). Примечательно, что эмерджентные инфекции, в первую очередь, затрагивают иммунокомпрометированных индивидов, детей и пожилых людей. Резервуаром сапронозов является окружающая среда; интенсивный контакт с естественным резервуаром возбудителя приводит к появлению спорадических случаев (Woolhouse, Gaunt, 2007).

Главной опасностью эмерджентных инфекций считается практически полное отсутствие каких-либо знаний об этиологическом агенте. Помимо этого, эмерджентные инфекции часто имеют тяжелое течение и высокую летальность. Вспышки этих инфекций могут не только привести к большому

количеству жертв по мере их распространения, но и оказать огромное социальное и экономическое воздействие. Кроме того, многие из этих инфекций тяжело поддаются лечению (ВОЗ, A brief guide to emerging infectious diseases and zoonoses, 2014).

Elizabethkingia anophelis и *Delftia tsuruhatensis* являются примерами эмерджентных возбудителей инфекций, вызывающих особые опасения. Оба микроорганизма относятся к аэробным грамотрицательным неферментирующим бактериям. Изначально они были выделены из окружающей среды, но начиная с 2010 годов стали регистрироваться как возбудители внутри- и внебольничных инфекций. Наиболее частыми проявлениями данных инфекций являются пневмония, менингит и сепсис у иммунокомпрометированных и иммунокомпетентных индивидов. Отдельной чертой *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* является широкий профиль естественной устойчивости к антибиотикам. Это значительно усложняет терапию данных инфекций и повышает риск отрицательного исхода. Более того, некоторые авторы подчеркивают высокий адаптационный потенциал данных возбудителей, а также возможность возникновения крупномасштабных вспышек и быстрого глобального распространения (Lin et al., 2019; Bhat et al., 2022).

В целом о данных возбудителях мало что известно, особенно в отношении их механизмов устойчивости и вирулентности, а также о резервуарах, механизмах и путях их передачи. Так же скудны представления о популяционном разнообразии данных бактерий, так как большинство изученных штаммов было выделено из клинических образцов. Информация о данных возбудителях представлена единичными статьями в отечественной литературе. В настоящий момент доступны единичные геномные последовательности штаммов данных микроорганизмов, выделенных в РФ от больных пациентов. Тяжесть клинических проявлений в сочетании с множественной лекарственной устойчивостью подчеркивает необходимость проведения комплексных исследований для лучшего понимания биологии данных возбудителей.

В связи с вышеизложенным, становится актуальной задача по характеристике и изучению данных бактерий, как эмерджентных возбудителей сапронозов.

Степень разработанности темы исследования. Учитывая факт недавнего обнаружения данных микроорганизмов в качестве возбудителей инфекций, информация об их биологических и экологических особенностях как инфекционных агентов ограничена в сравнении с классическими возбудителями. Однако, спорадические внутри- и внебольничные случаи, а также относительно массовые вспышки инфекций, вызванные данными бактериями, привлекли к себе внимание исследователей и позволили получить некий объем информации об их фенотипических и генотипических свойствах.

E. anophelis известна как возбудитель внутри- и внебольничных тяжелых инфекций. Спорадические случаи, а также относительно крупные

вспышки описаны в различных странах мира, в основном в Северной Америке и Азии. Примечательно, что в большинстве случаев конкретный источник инфекции не был обнаружен. Однако многие эпидемиологические исследования показывают, что вода возможно является основным резервуаром для этого патогена (Lee et al., 2021; Yung et al., 2018). Изучение геномов эпидемических штаммов данного микроба выявило наличие уникальных генетических характеристик, в том числе факторов устойчивости, предполагаемых факторов вирулентности, мобильных генетических элементов и др. Однако, исследования данного возбудителя по большей части ограничиваются клиническими штаммами, в то время как информация об штаммах выделенных из иных источников отсутствует. Также среди отечественных источников информация о данном возбудителе представлена единичными статьями (Канашенко и др., 2021; Кондратенко и др., 2021).

D. tsuruhatensis является оппортунистическим нозокомиальным патогеном. Ранее этот вид главным образом изучался в “экологических” целях (разложение органических загрязнителей, стимуляция роста растений). Однако сообщалось, что близкий вид *D. acidovorans* вызывает связанную с катетером бактериемию, эндокардит, инфекции глаз и мочевыводящих путей (Ranc et al., 2018). Первый официально зафиксированный случай заражения человека *D. tsuruhatensis* был зарегистрирован в 2011 году (Preiswerk et al., 2011). Недавние исследования пангенома *D. tsuruhatensis* выявили некоторые предполагаемые факторы вирулентности и устойчивости. Однако потенциальные источники инфекций данной этиологии неизвестны. Информация о данном микроорганизме, как о возбудителе инфекций отсутствует в отечественной литературе.

Цель работы — Провести микробиологическую и молекулярно-генетическую характеристику штаммов эмерджентных возбудителей сапронозных инфекций *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*, выделенных из сырого молока.

Задачи исследования:

1. Выделить изоляты бактерий из сырого коровьего молока, используя подход общего выделения и выделения на среде с добавлением антибиотиков, идентифицировать изоляты методом определения последовательности гена 16S рРНК, сформировать рабочую панель микроорганизмов, относящихся к возбудителям эмерджентных инфекций;
2. Охарактеризовать штаммы рабочей панели классическими микробиологическими методами;
3. Определить профиль чувствительности штаммов рабочей панели к антибиотикам;
4. Провести полногеномное секвенирование и аннотацию полученной сборки;
5. Провести филогенетический анализ изучаемых штаммов;
6. Провести сравнительный геномный анализ факторов устойчивости к

антибиотикам и факторов вирулентности исследуемых штаммов, используя общедоступные геномы ранее описанных штаммов.

Научная новизна. Впервые на территории РФ выделен и охарактеризован штамм эмерджентного патогена *E. anophelis*. Данный вид бактерий впервые был выделен из такого источника как сырое коровье молоко. У штамма *E. anophelis* ML-44 был выявлен ряд генов, кодирующих гомологи известных факторов вирулентности, включая гены, отвечающие за синтез ЛПС и капсулы, пилей IV типа, белков стресса, эффекторов IV и VI систем секреции. В геноме штамма ML-44 были обнаружены множественные гены устойчивости к противомикробным препаратам, включая системы эффлюкса и гены бета-лактамаз, которые определяют МЛУ фенотип. Наличие генов, отвечающих за МЛУ фенотип, согласуется с фенотипически определенным профилем чувствительности штамма ML-44.

Был выделен и охарактеризован штамм эмерджентного нозокомиального патогена *D. tsuruhatensis*, обладающий МЛУ фенотипом. Было выявлено наличие гомологов факторов вирулентности и устойчивости к антибиотикам у штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H. Репертуар последних хорошо согласуется с фенотипическим профилем устойчивости MR-6/3H. Была отмечена необходимость пересмотра систематики рода *Delftia*. Было также показано, что набор гомологов факторов вирулентности мало вариабелен и консервативен между разными видами *Delftia*, что предполагает общность патогенного потенциала возбудителей данного рода.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данные, полученные при изучении микробиологических свойств, включая характер роста на питательных средах, биохимический профиль и т.д., могут быть использованы для идентификации этих возбудителей классическими бактериологическими методами. Полученные профили чувствительности могут быть использованы клиницистами для выбора стратегии антибиотикотерапии инфекций, вызванных данными возбудителями – это особенно актуально, так как данные микроорганизмы имеют природную устойчивость к широкому спектру антибиотиков, включая наиболее важные для эмпирической терапии карбапенемы. Полученные геномные последовательности, депонированные в международную базу данных GenBank, могут быть использованы для сравнительного анализа и молекулярно-эпидемиологического анализа при возникновении вспышек, вызванных данными возбудителями.

Полученные данные о репертуарах факторов устойчивости и вирулентности могут быть использованы для дальнейшего изучения феномена множественной лекарственной устойчивости данных видов микроорганизмов, а также для изучения механизмов патогенеза, что в дальнейшем может быть использовано для создания стратегии лечения и клинических рекомендаций по лечению инфекций, вызванных данными возбудителями.

Методология и методы исследования. В работе использованы современные методы и подходы выделения культур микроорганизмов,

изучения их вирулентности и антимикробной устойчивости, а также проведения сравнительного молекулярно-генетического и биоинформационного анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Непастеризованное коровье молоко может служить источником широкого спектра видов патогенных и условно-патогенных бактерий, относящихся к числу эмерджентных возбудителей инфекций, в том числе, ранее не выделявшихся на территории РФ.
2. Бактерии видов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* проявляют свойства убиквитарности, полигостальности и экологической пластичности и могут контаминировать сырое молоко, что позволяет отнести их к эмерджентным возбудителям сапронозных инфекций, источником которых могут выступать продукты питания.
3. Штаммы *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H имеют фенотип множественной лекарственной устойчивости, который согласуется с обнаруженными генетическими детерминантами.
4. Штаммы *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H несут широкий и разнообразный репертуар факторов вирулентности, который согласуется с клиническими проявлениями инфекций, описанными в литературе. Среди различных штаммов внутри исследуемых видов бактерий наблюдается схожий и консервативный набор гомологов факторов вирулентности.
5. Наличие широкого спектра генетических детерминант устойчивости к антибиотикам, входящих в коровий геном изучаемых эмерджентных возбудителей и не связанных с мобильными генетическими элементами, является свидетельством отбора устойчивых видов бактерий в окружающей среде, что может быть следствием ее контаминации антимикробными препаратами.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов, полученных в ходе диссертационной работы, подтверждается использованием комбинации классических микробиологических и современных молекулярно-биологических методов исследования.

Достоверность результатов описания фенотипических особенностей изучаемых штаммов подтверждается использованием стандартизированных общепринятых методов, сертифицированных микробиологических сред и наборов, международных рекомендаций EUCAST, а также референтных штаммов микроорганизмов для контроля качества.

Достоверность результатов секвенирования подтверждается использованием метода секвенирования по Сенгеру, являющимся “золотым стандартом” для анализа коротких последовательностей ДНК, а также высокопроизводительного секвенирования следующего поколения высокой точности на платформе Illumina. В ходе анализа данных секвенирования по Сенгеру и идентификации были использованы строгие критерии, в том числе

рекомендованные Специальным комитетом по пересмотру определения вида в бактериологии (An *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology). Также в ходе биоинформатического анализа были использованы общепринятые методы для оценки качества библиотек, сборке геномов и оценке их качества, статистической оценке значимости результатов, а также филогенетического анализа и сравнительной геномики.

Апробация результатов. Тема диссертации утверждена на ученом совете ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии». Апробация диссертации состоялась 9.10.2024 года на заседании ученого совета ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (Протокол №1 от 09.10.2024).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: конференции по итогам реализации комплексного плана научных исследований (КПНИ) “Диагностика и мониторинг особо опасных инфекций животных” (г. Самара, Россия) (18-19 апреля 2023 г.); “VIII Национальный конгресс бактериологов” (г. Москва, Россия) (27 — 28 сентября 2023 г.), “Конференция в честь 65 летия ФГБНУ ФИЦВиМ” (пос. Вольгинский, Россия) (13-14 ноября 2023 г.); “II Российский Конгресс по Медицинской Микробиологии и Инфектологии” (29.02.2024-01.03.2024); «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление»: 77-я всероссийская школа-конференция молодых ученых с международным участием (19.04.2024).

Декларация личного участия автора. Следующие аспекты диссертационной работы выполнены автором лично: анализ литературных данных и написание обзора литературы, выделение чистых культур, идентификация и культурально-морфологическая характеристика штаммов, проведение молекулярно-биологических исследований, биоинформатический анализ.

Секвенирование ампликонов генов 16S рРНК по методу Сенгера, а также секвенирование геномов штаммов на платформе Illumina производилось на коммерческой основе в сторонних организациях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Соответствие диссертации паспорту научной специальности 1.5.11 «Микробиология». Основные научные положения диссертации соответствуют пп. 1, 3, 5, 8, 11, 12, 20 паспорта специальности.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 научные статьи в рецензируемых научных изданиях (Scopus/WoS), рекомендованных ВАК, а также 3 тезиса в сборниках конференций с международным участием.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, библиографического списка литературы, включающего 205 источников, в том числе 6 отечественных и 199 зарубежных. Работа содержит 8 таблиц и 14 рисунков.

2. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы исследования

Изоляты микроорганизмов выделяли из проб непастеризованного (сырого) коровьего молока. В работе были использованы 72 пробы сырого коровьего молока, полученные от различных розничных продавцов в г. Нижний Новгород. Молоко происходило от личных подсобных хозяйств Нижегородской области следующих районов: Лысковский, Дальнеконстантиновский, Воротынский, Кстовский, Гагинский, Павловский, Арзамасский.

Для выделения изолятов бактерий использовали 2 подхода:

- Выделение общего пула грамотрицательных бактерий;
- Выделение изолятов с множественной устойчивостью на среде с добавлением антибиотиков.

Методология исследований, представленных в настоящей работе, предполагала использование трех подходов: классическая микробиология и молекулярная биология, а также биоинформатика.

В рамках классической микробиологии были использованы следующие методы: культуральный (бактериологический) метод исследования (выделение чистой культуры из проб сырого коровьего молока, определение культурально-морфологических свойств с использованием различных питательных сред, определение биохимических свойств), микроскопический метод исследования (микроскопия окрашенных препаратов), диско-диффузионный метод оценки чувствительности к антибиотикам.

В рамках молекулярно-биологического подхода были использованы следующие методы: выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, очистка ампликонов, подготовка образцов для секвенирования. Также в работе были использованы следующие биоинформатические методы: анализ качества полученных библиотек, фильтрация и обрезка чтений, сборка геномов *de novo*, филогеномный анализ, поиск гомологов различных факторов, сравнительный геномный анализ.

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Изоляты бактерий, выделенные из образцов сырого молока

Используя подходы общего и выделения на среде с добавлением антибиотиков всего из 72 проб было выделено 120 изолятов бактерий из них: 113 грамотрицательных и 7 грамположительных. 88 изолятов было выделено методом общего выделения на агаре Эндо, 32 изолята было выделено на среде с добавлением антибиотиков.

2.2.1.1 Таксономическое разнообразие штаммов, выделенных из сырого молока

Таксономическое разнообразие идентифицированных штаммов отражено в таблице 1. Среди изолятов, выделенных на агаре Эндо (всего 88 изолятов) 76% (79 изолятов) относились к порядку *Enterobacterales* и были представлены следующими видами: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter murlinae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter sichuanensis*, *Enterobacter tabaci*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli*, *Serratia liquefaciens*, *Hafnia paralvei*, *Kosakonia sacchari*, *Lelliottia amnigena*; 9% (8 изолятов) относились к порядку *Pseudomonadales* и были представлены следующими видами двух родов: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas helmanticensis*, *Pseudomonas marginalis*. 0,88% (1 изолят) относился к порядку *Flavobacteriales* и был представлен видом *Elizabethkingia anophelis*.

Среди изолятов, выделенных с использованием среды с добавлением антибиотиков (32 изолята) 40,6% (13 изолятов) относились к порядку *Lysobacterales* и были представлены следующими видами одного рода: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas pavanii*; 21,8% (7 изолятов) к порядку *Enterobacterales* и были представлены следующими видами трех родов: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter portucalensis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella grimontii*; 9% (3 изолята) к порядку *Caryophanales* и были представлены следующими видами: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Macrococcus caseolyticus*; 9% (3 изолята) к порядку *Pseudomonadales* и были представлены следующим видом: *Pseudomonas aeruginosa*; 6% к порядку *Lactobacillales*: *Enterococcus faecium*; 3% (1 изолят) к порядку *Micrococcales*: *Micrococcus luteus*; 3% (1 изолят) к порядку *Sphingobacteriales*: *Sphingobacterium mizutaii*; 3% (1 изолят) к порядку *Burkholderiales*: *Delftia tsuruhatensis*.

Таблица 1 – Таксономическое разнообразие штаммов, выделенных из сырого молока

Штаммы, выделенные на агаре Эндо				
Таксономическое положение				
Порядок	Семейство	Род	Виды	Общее кол-во
<i>Enterobacterales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>	79
			<i>C. braakii</i>	
			<i>C. murlinae</i>	
		<i>Enterobacter</i>	<i>E. asburiae</i>	
			<i>E. aerogenes</i>	
			<i>E. ludwigii</i>	
			<i>E. sichuanensis</i>	
			<i>E. tabaci</i>	
		<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
			<i>K. michiganensis</i>	
			<i>K. aerogenes</i>	
		<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	

		<i>Serratia</i>	<i>S. liquefaciens</i>	
		<i>Kosakonia</i>	<i>K. sacchari</i>	
		<i>Lelliottia</i>	<i>L. amnigena</i>	
	<i>Hafniaceae</i>	<i>Hafnia</i>	<i>H. paralvei</i>	
<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. baumannii</i>	8
			<i>A. pittii</i>	
	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
			<i>P. helmanticensis</i>	
			<i>P. marginalis</i>	
<i>Flavobacteriales</i>	<i>Weeksellaceae</i>	<i>Elizabethkingia</i>	<i>E. anophelis</i>	1
Штаммы, выделенные на среде с добавлением антибиотиков				
Таксономическое положение				
<i>Lysobacterales</i>	<i>Lysobacteraceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i>	13
			<i>S. pavanii</i>	
<i>Enterobacterales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>	7
			<i>C. portucalensis</i>	
		<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	
		<i>Klebsiella</i>	<i>K. grimontii</i>	
<i>Caryophanales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	3
			<i>S. haemolyticus</i>	
		<i>Macrococcus</i>	<i>M. caseolyticus</i>	
<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	3
<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>	2
<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i>	<i>D. tsuruhatensis</i>	1
<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>	1
<i>Sphingobacterales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>S. mizutaii</i>	1
<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>A. rivipollensis</i>	1

На основании анализа литературных данных, среди всех изолированных штаммов с множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам, наибольший интерес для изучения представляют штаммы *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H. Данные виды бактерий известны как эмерджентные возбудители, способные вызывать тяжелые вне- и внутрибольничные инфекции (Bhat et al., 2022; Hu et al., 2022). На территории России данные микроорганизмы либо выделялись в единичных случаях (Sazonova et al., 2023), либо были выделены впервые в рамках

данной работы. В целом, информация о данных возбудителях крайне ограничена, особенно в отношении их механизмов устойчивости и вирулентности (Chen et al., 2019), а также резервуаров, путей и механизмов передачи (Канашенко и др., 2021; Кондратенко и др., 2024; Ranc et al., 2018). Недостаток данных о популяционном разнообразии этих бактерий, большинство штаммов которых было выделено из клинических образцов, подчеркивает необходимость проведения комплексных исследований для лучшего понимания их биологии (Lau et al., 2016). В отечественной литературе информация о данных возбудителях представлена лишь в единичных статьях, и в настоящий момент доступны только отдельные геномные последовательности штаммов, выделенных в РФ от больных пациентов (Sazonova et al., 2023). Также тяжесть клинических проявлений в сочетании с множественной лекарственной устойчивостью подчеркивает актуальность их изучения и необходимость проведения комплексных исследований с применением классических микробиологических и современных биоинформатических методов для лучшего понимания биологии этих возбудителей (Wang et al., 2019; Lin et al., 2017).

2.2.2 Характеристика целевых штаммов: *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H

2.2.2.1 Характеристика штамма *Elizabethkingia anophelis* ML-44

2.2.2.1.1 Выделение и идентификация штамма *E. anophelis* ML-44 и характеристика биохимических и физиологических свойств

Штамм ML-44 был выделен из пробы сырого коровьего молока. На агаре Эндо штамм ML-44 образовывал колонии молочно-белого цвета диаметром 1–2 мм с гладкой поверхностью. На ТСА штамм образовывал видимые желтоватые колонии с гладкой поверхностью диаметром 3–4 мм в течение 24 ч инкубирования при 37 °С. При характеристике первичных биохимических свойств была обнаружена каталазо- и оксидазоположительная реакция. Микроскопирование мазков культуры, окрашенных по Граму, выявило морфологию типичных грамтрицательных бацилл. Чистая культура была заложена на хранение в рабочую коллекцию ННИВИ — филиала ФГБНУ ФИЦВиМ в 15% растворе глицерина при -80 °С.

Идентификация штамма ML-44 была основана на почти полной последовательности гена 16S рРНК. Итоговый консенсус 16S рРНК штамма ML-44 имел длину 1348 п.о. и был идентичен на 99,71% с последовательностью типового штамма *E. anophelis* JM-87.

Для характеристики биохимических и физиологических свойств *E. anophelis* ML-44 использовали тест-систему ENTEROtest 24 N (Erba Lachema). ML-44 был положительным по оксидазе, каталазе, β-галактозидазе и гидролизу эскулина. Образование кислоты было отмечено при росте в присутствии трегалозы и маннита. Биохимическая активность в отношении следующих субстратов была отрицательной: уреазы, аргинин, орнитин, лизин, цитрат, малонат, ксилоза. Не было обнаружено закисление среды при росте в присутствии салицина, сорбита, мелибиозы, целлобиозы, лактозы,

дульцита, адонитола, арабита, сахарозы, инозитола, раффинозы. Образование сероводорода также не было обнаружено.

2.2.2.1.2 Чувствительность штамма *E. anophelis* ML-44 к антимикробным препаратам

Чувствительность к антибиотикам штамма *E. anophelis* ML-44 определяли с использованием стандартного метода дисковой диффузии к 33 противомикробным препаратам. Протестированные антибиотики и размеры зон ингибирования приведены в. Штамм ML-44 был устойчив к 28 антибиотикам, используемым в клинической практике, включая пенициллин G, ампициллин, амоксициллин-клавуланат, азтреонам, тикарциллин, пиперациллин, пиперациллин-тазобактам, тикарциллин-клавуланат, цефтазидим, цефотаксим, цефепим, имипенем и меропенем, канамицин, неомицин, тобрамицин, гентамицин, амикацин, полимиксин, клиндамицин, кларитромицин, эритромицин, тилозин, налидиксовая кислота, триметоприм, триметоприм-сульфаметоксазол, хлорамфеникол и тетрациклинол. Штамм был чувствителен к рифампицину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, энрофлоксацину и линезолиду.

2.2.2.1.3 Гемолитическая активность штамма *E. anophelis* ML-44

После 48 часов инкубации культуры ML-44 на кровяном агаре с добавлением 5% крови кролика и барана были обнаружены зоны α -гемолиза (изменение цвета среды). Зоны гемолиза были более заметны на агаре с кровью кролика. Гемолитический эффект в отношении эритроцитов барана был менее заметен и имел запаздывающий характер. Отчетливые зоны α -гемолиза были заметны только при механическом удалении биомассы микроба (зоны располагались прямо под колониями).

2.2.2.1.4 Полногеномное секвенирование, сборка и аннотация генома штамма *E. anophelis* ML-44

Подготовленные библиотеки парных чтений были собраны в контиги. Сборка генома штамма ML-44 содержала 31 контиг с суммарной длиной 4,03 млн п.о. и содержанием GC=35.39%, N50=297287 п.о., L50=5. В ходе структурной аннотации в хромосоме ML-44 было обнаружено 3758 открытых рамок считывания (ОРС) из них 47 генов РНК.

В ходе функциональной аннотации обнаруженные ОРС были распределены по подсистемам. Большинство генов было связано с центральным метаболизмом: Аминокислоты и производные (264 гена), Углеводы (131 ген), Кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты (128 генов), Метаболизм белков (126 генов), Нуклеозиды и нуклеотиды (59 генов), Дыхание (56 генов), Жирные кислоты, липиды и изопреноиды (53 гена), Метаболизм ДНК (46 генов), Мембранный транспорт (45 генов).

2.2.2.1.5 Филогеномный анализ штамма *E. anophelis* ML-44 и его внутривидовая принадлежность

Филогенетический анализ штамма ML-44 был проведен с использованием веб-инструмента REALPHY (Рис. 1). Штамм ML-44 формировал монофилетическую группу со штаммом F3201, выделенным от

больного человека в Кувейте в 1982 г. Оба штамма были частью общей клады «*endophytica*» и сформировали отдельный подкластер, отличный от подкластера, который включал штамм JM-87, выделенный из кукурузы. Внутри клады «*anophelis*» разные штаммы сформировали несколько субклад, в том числе отдельную субкладу CSID_3015182678-CSID_3015182681, связанную со вспышкой в Висконсине в 2016 году.

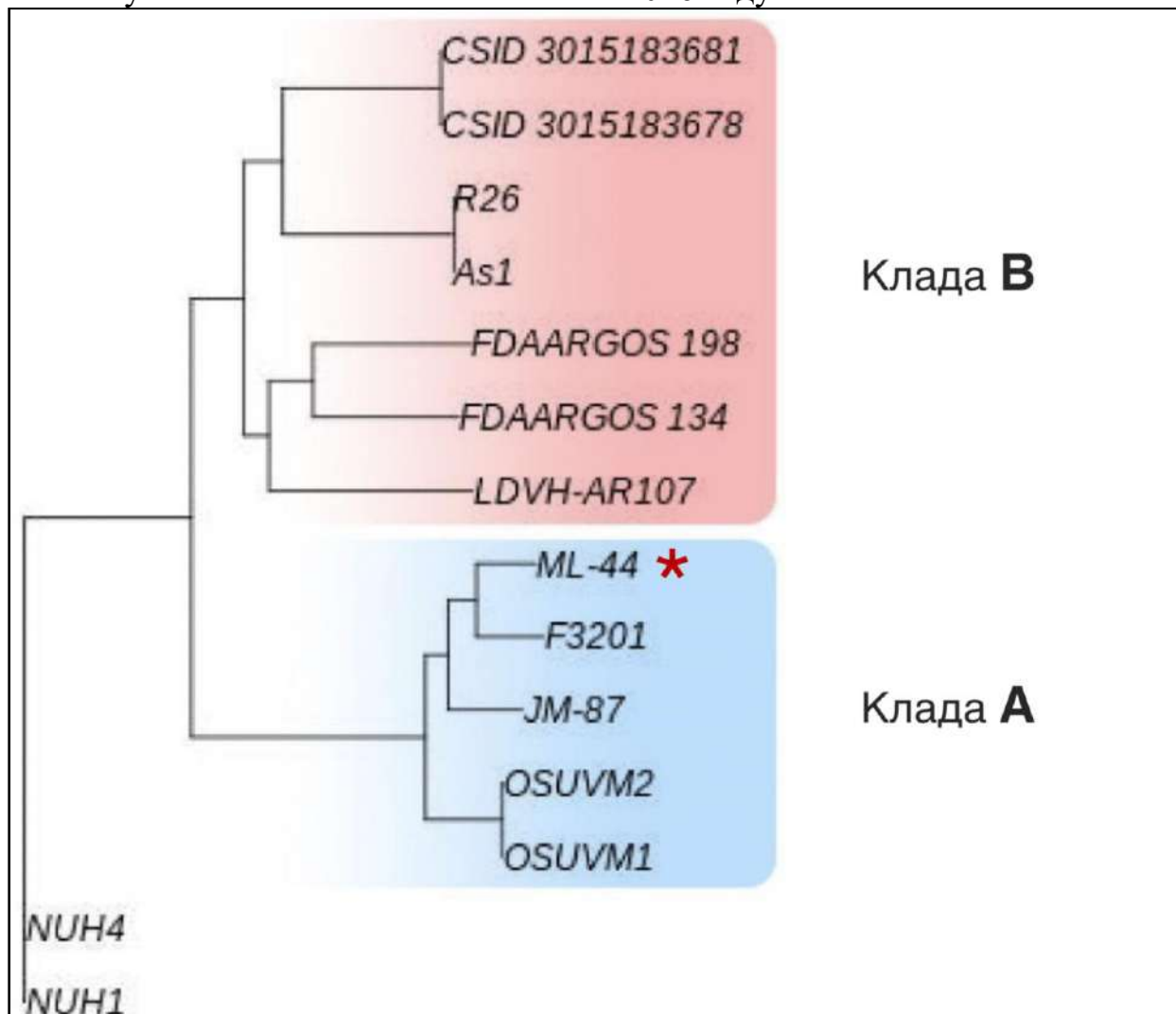


Рис. 1. Реконструкция кладограммы REALPHY. Клада «А» выделена красным цветом, клада «В» выделена синим. Штамм ML-44 отмечен бордовой звездочкой.

Кроме того, был проведен анализ OrthoANI (подсчет средненуклеотидной идентичности), чтобы подтвердить внутривидовую принадлежность штамма ML-44 (Рис. 2). Значение ANI для пары ML-44-F3201 было самым высоким среди всех штаммов *E. anophelis*. Эти данные согласуются с результатами филогенетического анализа REALPHY. На основании результатов расчета ДНК-ДНК гибридизации *in silico* штамм *E. anophelis* ML-44 имел наибольшее сходство с JM-87 (93,5%) и F3201 (93,2%). Кроме того, ни у одного из штаммов уровень DDH не был ниже 70%, что указывает на принадлежность всех штаммов к виду *E. anophelis*.

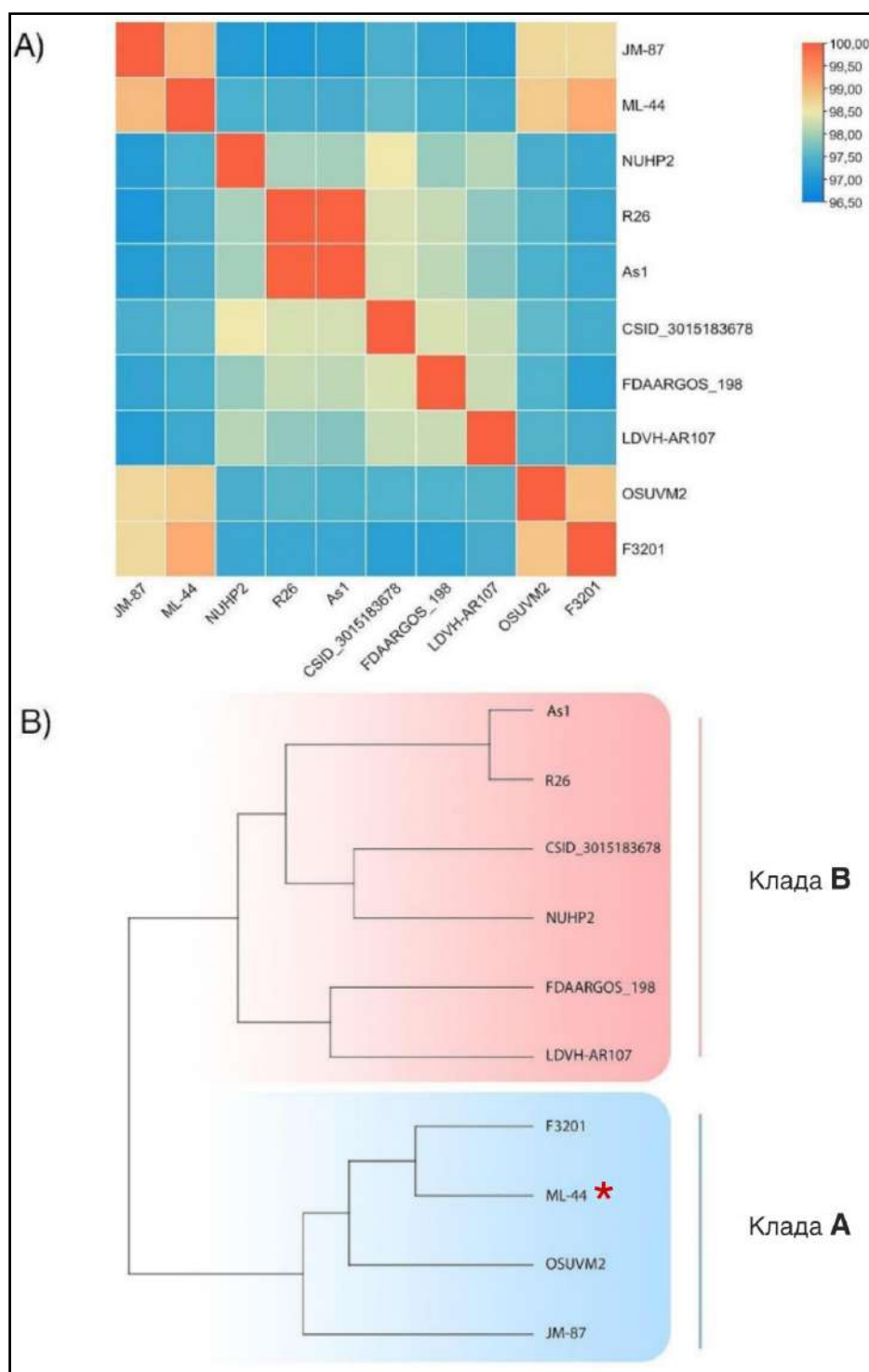


Рис. 2. Результаты анализа OrthoANI (расчет средненуклеотидной идентичности): (A) Тепловая карта, построенная на значениях ANI между штаммом ML-44 и 9 штаммами *E. anophelis*; (B) Кладограмма, реконструированная на основе расчетов OrthoANI.

2.2.2.1.6 Анализ генетических детерминант устойчивости и вирулентности *E. anophelis*

Согласно базе данных CARD, геномы 7 штаммов *E. anophelis* (ML-44, F3201, OSUVM2, JM-87, CSID_3015183678, NUHP2, R26) содержат по меньшей мере 29 различных генов устойчивости к антимикробным веществам, разделенных на три общие группы в соответствии с механизмами

устойчивости: факторы, связанные с эффлюксом антибиотиков, инактивация антибиотиков и модификация мишени. Все штаммы несли от 18 до 21 детерминант устойчивости. Также у всех штаммов обнаружено 9 общих из 14 обнаруженных систем эффлюкса, в то время как гены, кодирующие ферменты инактивирующие антибиотики были специфичны для конкретных штаммов.

Штамм ML-44 нес 18 генов AMR в том числе 11 генов, связанных с эффлюксом антибиотиков (*abeS*, *adeF*, *arlR*, *ceoB*, *macB*, *mefC*, *mexF*, *ranA*, *ranB*, *taeA*, *txR*), 6 генов, связанных с инактивацией антибиотиков (*aadS*, *bla_{B-18}*, *bla_{CME-12}*, *bla_{GOB-41}*, *csp-1*, *catB11*), и один ген измененной мишени антибиотика (*dfrA38*). Обнаруженные детерминанты AMR, по-видимому, обеспечивают устойчивость ML-44 к бета-лактамам, аминогликозидам, макролидам, тетрациклину, фторхинолонам и даже дезинфицирующим средствам. Также в геноме ML-44 были обнаружены четыре различных гена бета-лактамазы, включая *bla_{B-18}*, *bla_{CME-12}*, *bla_{GOB-41}*, *csp-1*, упомянутые выше.

Среди семи проанализированных геномов *E. anophelis* было предсказано 92 гомолога известных факторов вирулентности. Большинство из них были связаны с внешней мембраной (LPS, О-антиген и LOS) и образованием капсулы (гены синтеза экзополисахаридов и альгинатов). Также были обнаружены следующие категории факторов вирулентности: факторы адгезии (CT396), включая пили IV типа (*pilR*), факторы метаболизма гема (*phuS*, *phuU*, *hutC*, *hemB*, *hemE*, *hemH*, *hemL*), факторы синтеза LPS (*acpXL*, *hisF*, *kdsA*, *kdtB*, *lpg0756* и др.), различные транспортные белки (*mgtB*, *ctpV*, *phuU*, *hutC*, *ggt*), факторы реакции на стресс и выживания при стрессе (*katA*, *katG*, *clpE*, *clpP*, *sodB*) и некоторые другие. Штамм ML-44 нес ограниченный набор гомологов ферментов синтеза капсул и факторов, участвующих в синтезе LPS. Некоторые факторы, связанные с вирулентностью, обнаруженные у *E. anopheles*, включая системы поглощения гема и антиоксидантные ферменты (каталаза и супероксиддисмутаза) характерны для многих патогенных бактерий. Анализ гемолитической активности продемонстрировал наличие последней у штамма ML-44. Тем не менее, ген *hlyB*, кодирующий α-гемолизин в штамме типа *E. anophelis* JM87, отсутствовал в ML-44. По всей видимости гемолиз у штамма ML-44 обеспечивается иными факторами.

Среди более специфических факторов вирулентности у всех штаммов *E. anophelis* был обнаружен гомолог белка Mip (**m**acrophage **i**nfectivity **p**otentiator). Белок Mip, впервые обнаруженный у *Legionella pneumophila*, необходим для заражения макрофагов и выживания в простейших. В геноме M-44 было обнаружено несколько эффекторных белков системы секреции IVB типа Dot-Icm (TIVSS), что может быть еще одной особенностью, общей для *E. anophelis* и *L. pneumophila*. Тем не менее, не удалось обнаружить структурные гены TIVSS в геномах *E. anophelis*. Ряд регуляторных и вспомогательных белков системы секреции типа VI (TVISS) позволяют предположить, что штаммы *E. anophelis* также могут нести эту систему секреции. Другим ферментом, который можно отнести к факторам,

ответственным за внутриклеточное выживание, является гомолог металлопротеазы цинка 1 (Zmp1). Zmp1 представляет собой пептидазу, секретируемую микобактериями туберкулеза, которая опосредует ключевые стадии прогрессирования заболевания туберкулезом. В совокупности полученные данные позволили предположить, что *E. anophelis* обладает некоторыми детерминантами, используемыми внутриклеточными паразитами для заражения человека.

В геноме штамма ML-44 не было обнаружено ни одного искомого типа мобильных элементов: плазмид, геномных островов, профагов и интегронов.

2.2.2.2 Характеристика штамма *Delftia tsuruhatensis* MR-6/3H

2.2.2.2.1 Выделение и идентификация штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H и характеристика биохимических и физиологических свойств

Штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H был выделен из пробы сырого коровьего молока, полученного от розничных продавцов в г. Нижний Новгород, Россия. Образцы молока были получены от розничных продавцов в г. Нижний Новгород, Россия. Триптический соевый бульон и агар, содержащие три антибиотика (ампициллин, гентамицин, канамицин), были использованы для выделения. Штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H был единственным представителем, который удалось выделить из данной пробы молока. *D. tsuruhatensis* MR-6/3H образовывал небольшие прозрачные колонии диаметром 1-2 мм на ТСА с антибиотиками и без них в течение 24 часов инкубации при 37 °C. Штамм был протестирован на активность оксидазы и каталазы, обе из которых были положительными. При микроскопическом исследовании мазков, окрашенных по Граму, обнаружены типичные грамотрицательные палочки.

Для идентификации штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H использовали секвенирование и анализ последовательности гена 16S рРНК. Собранный консенсус имел длину 1389 п.о. и процент идентичности 100% как со штаммом *Delftia tsuruhatensis* NBRC 16741(T), так и со штаммом *Delftia lacustris* LMG 24775(T).

Для характеристики биохимических и физиологических свойств штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H использовали тест-систему NefermTest 24 (Erba Lachema). MR-6/3H способен утилизировать следующие субстраты: мочевины, аргинин, орнитин, ацетамид, цитрат. Также был положительным по γ -глутамилтрансферазе и фосфатазе. *D. tsuruhatensis* MR-6/3H не ферментировал следующие субстраты: лактоза, маннитол, трегалоза, ксилоза, арабиноза, малонат, галактоза, мальтоза, целлобиоза, сахароза, инозитол. Также был отрицательным по β -глюкозидазе, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазе, β -галактозидазе.

Профиль *D. tsuruhatensis* MR-6/3H был идентичен профилю типового штамма *Delftia tsuruhatensis* NBRC 16741(T) и отличался от профиля *Delftia lacustris* LMG 24775(T) по неспособности ферментировать малонат и маннитол.

2.2.2.2.2 Чувствительность штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H к антимикробным препаратам

Тестирование чувствительности к противомикробным препаратам было проведено методом дисковой диффузии к 23 антибиотиком на основе руководства EUCAST 2022. *D. tsuruhatensis* MR-6/3H был устойчив к 19 противомикробным препаратам, широко применяемым в клинической практике, включая все протестированные аминогликозиды (гентамицин, амикацин, тобрамицин, канамицин, неомицин), хлорамфеникол, триметоприм-сульфаметоксазол, а также почти все β -лактамы (ампициллин, амоксициллин-клавулановая кислота, азтреонам, меропенем, имипенем, цефтобипрол, цефотаксим, цефепим, пиперациллин, пиперациллин-тазобактам, тикарциллин, тикарциллин-клавулановая кислота). Штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H был чувствителен к цефтазидиму, тетрациклину и обоим фторхинолонам: ципрофлоксацину и левофлоксацину.

2.2.2.2.3 Гемолитическая активность штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H

Штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H не проявлял видимого гемолитического эффекта в отношении эритроцитов человека I группы крови. Данный характер гемолиза классифицируется как гамма-гемолиз. На 5%-ном кровяном агаре штамм MR-6/3H формировал точечные, круглые, беловатые колонии диаметром 0,5–2 мм с целым краем и выпуклым возвышением.

2.2.2.2.4 Полногеномное секвенирование, сборка и аннотация генома штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H

Сборка генома штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H содержала 52 контига с суммарной длиной 6,46 млн п.о. и содержанием GC=66.70%, N50=408932 п.о., L50=6. В ходе структурной аннотации в хромосоме *D. tsuruhatensis* MR-6/3H было обнаружено 6117 открытых рамок считывания (ОРС) из них 47 генов РНК.

В ходе функциональной аннотации обнаруженные ОРС были распределены по подсистемам. Основными подсистемами были: Аминокислоты и производные (388 генов), Углеводы (201 ген), Кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты (219 генов), Метаболизм белков (224 гена), Нуклеозиды и нуклеотиды (99 генов), Дыхание (118 генов), Жирные кислоты, липиды и изопреноиды (120 генов), Метаболизм ДНК (82 гена), Мембранный транспорт (143 гена).

2.2.2.2.5 Филогеномный анализ штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H и его видовая принадлежность

Поскольку метод секвенирования и анализа гена 16S рРНК не имеет достаточного разрешения для идентификации видов рода *Delftia*, для дальнейшей идентификации были использованы подходы, основанные на секвенировании полного генома, такие как расчет ANI (средненуклеотидная идентичность) и TYGS (ДНК-ДНК гибридизация *in silico*). Полученные кладограммы показаны на Рис. 3. Штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H формировал одну кладу с видом *D. tsuruhatensis*. Такая топология наблюдалась на обеих кладограммах. Это указывает на то, что штамм *D.*

tsuruhatensis MR-6/3H принадлежит к виду *D. tsuruhatensis*. Примечательно, что, будучи разными видами, *D. lacustris* и *D. tsuruhatensis* формировали единую кладу (помеченную красным). Кроме того, внутри кластера *D. acidovorans* был идентифицирован предполагаемый подвид (помеченный фиолетовым). Эти наблюдения были подтверждены данными расчета ANI, где значения ANI варьировались между представителями упомянутых клад: 98-100 для клады *D. tsuruhatensis*-*D. lacustris* (образовали общий кластер на матрице), 99-100 для клады *D. acidovorans* FDAARGOS 909-*D. acidovorans* new MAG-209-*D. acidovorans* UBA3003 (также образовали общий кластер на матрице). Члены последней группы (предполагаемый подвид *D. acidovorans*) имели 96 единиц ANI с другими штаммами *D. acidovorans* и 99-100 между собой.

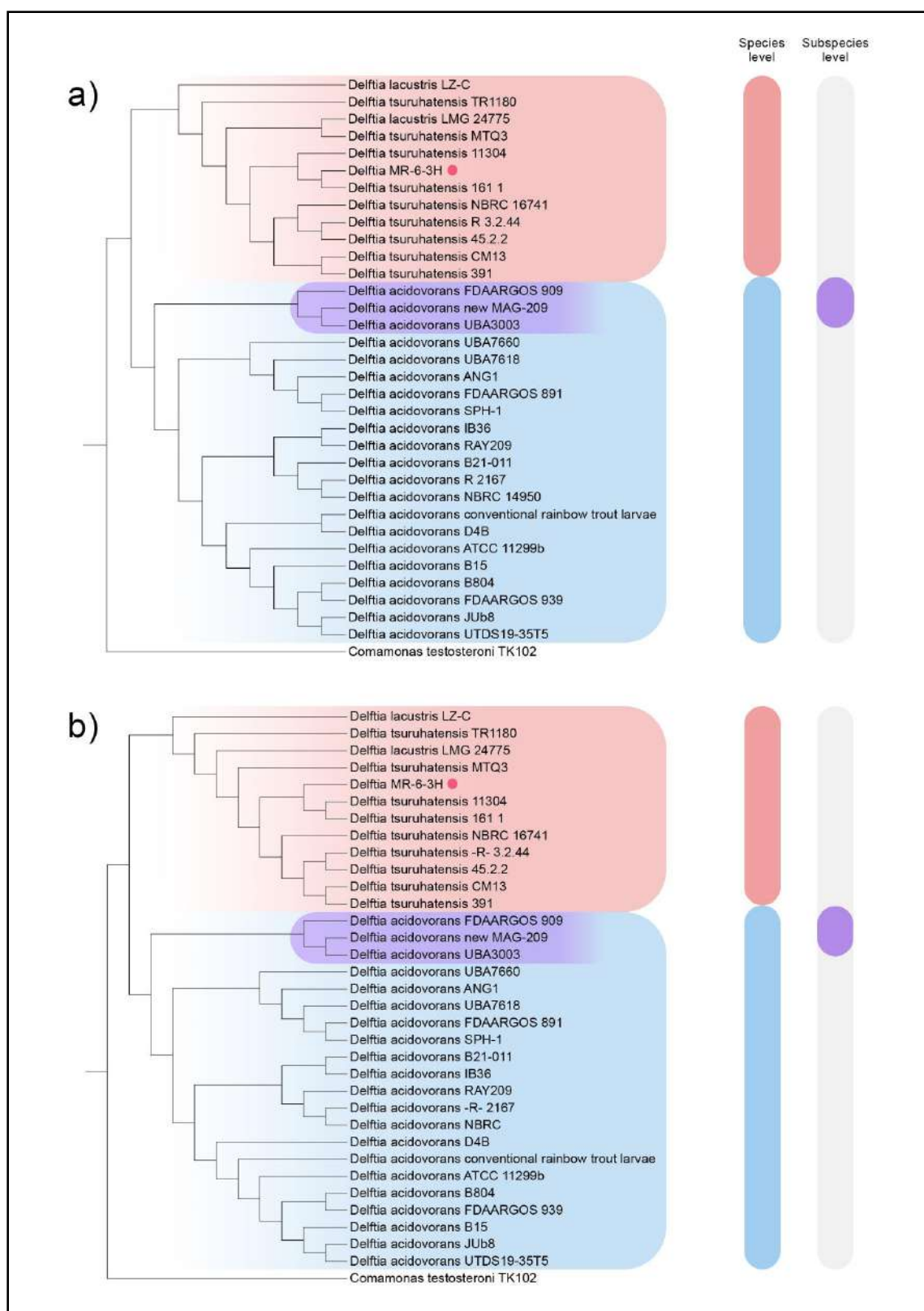


Рис. 3. Реконструкция кладограмм 33 штаммов *Delftia* spp. с штаммом *D. tsuruhatensis* MR-6/3H (отмечен розовым кружком): а) Кладограмма TYGS. б) Кладограмма ANI. Отмечено красным - клада *D. tsuruhatensis/lacustris*, отмечено синим - клада *D. acidovorans*, отмечено фиолетовым - предполагаемый подвид *D. acidovorans*.

Для дальнейшего исследования были выбраны представители клады *D. tsuruhatensis*-*D. lacustris*, к которой принадлежала *D. tsuruhatensis* MR-6/3H. Для выяснения сложных филогенетических взаимосвязей между штаммами *Delftia* spp. и штаммом *D. tsuruhatensis* MR-6/3H был использован веб-инструмент REALPHY (Рис. 5). В целом кладограмма REALPHY была практически идентична кладограммам, полученным с помощью ANI и TYGS. *D. tsuruhatensis* MR-6/3H сформировал кладу со штаммами *D. tsuruhatensis* 161/1 и *D. tsuruhatensis* 11304. Интересно, что оба они имеют клиническое происхождение: штамм *D. tsuruhatensis* 161/1 был выделен от человека больного муковисцидозом в Самаре, *D. tsuruhatensis* 11304 был выделен в Сербии. Упомянутая клада входила в общий филогенетический кластер с типовым штаммом *D. tsuruhatensis* NBRC 16741(T).

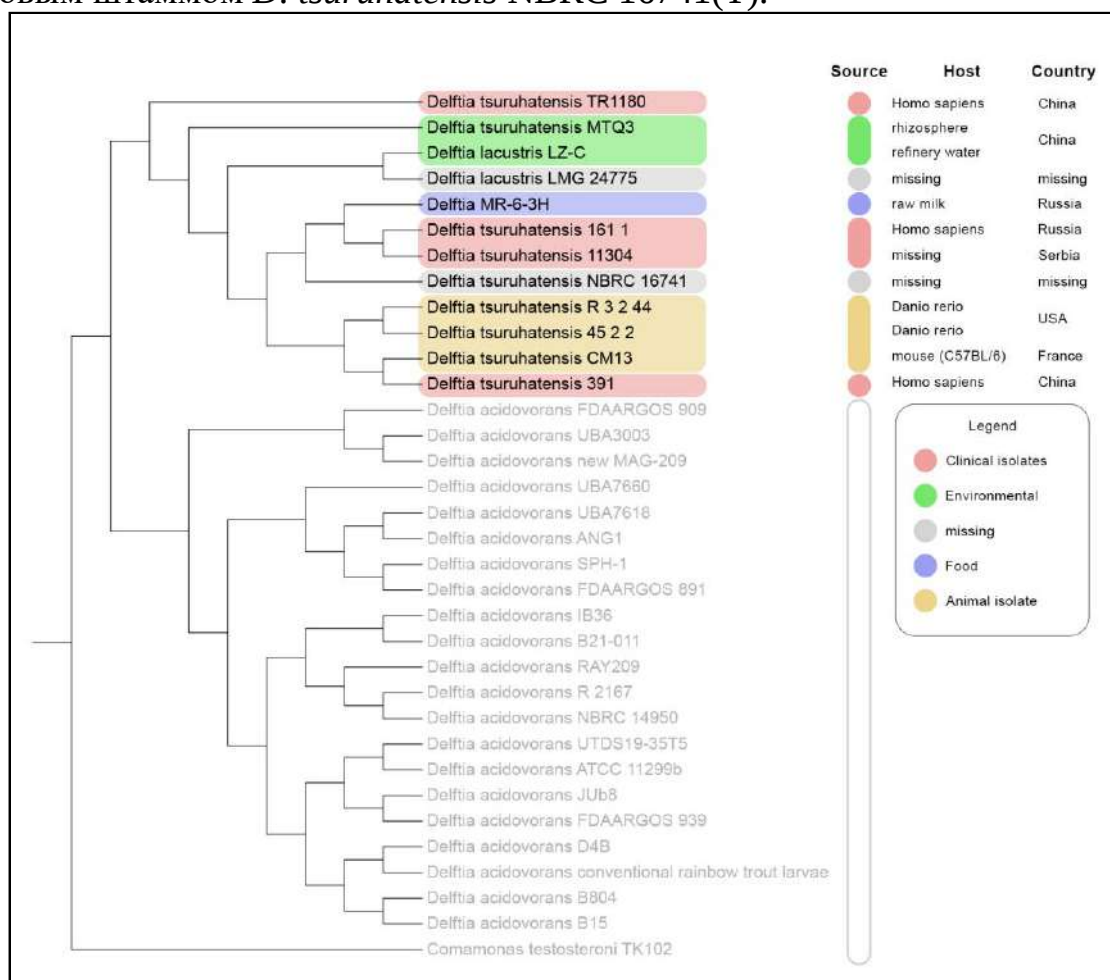


Рис. 4. Кладограмма, построенная с помощью REALPHY, состоящая из 33 различных штаммов *Delftia* spp. и штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H, основанный на REALPHY: штаммы внутри клады *D. tsuruhatensis*/*D. lacustris* отмечены цветом в зависимости от типа источника выделения.

2.2.2.2.6 Анализ генетических детерминант устойчивости и вирулентности *D. tsuruhatensis*

Среди 11 геномов штаммов *D. tsuruhatensis* было предсказано 31 гомолог генов устойчивости, каждый штамм имел от 11 до 17 таких генов. Гены были сгруппированы в 5 подгрупп: эффлюксные насосы, β -лактамазы, ферменты инактивации аминокликозидов, устойчивость к

диаминопиримидину и другие. Во всех геномах, включая *Delftia* MR-6/3H, были обнаружены эффлюксные насосы (*ceoB*, *mexD*, *paer_soxR*, *adeB*, *mdtC*, *oprJ*, *abeS*) и ОХА-926-подобная β -лактамаза, обеспечивающие устойчивость к широкому спектру противомикробных препаратов и дезинфицирующих средств.

Штамм *Delftia* MR-6/3H также содержал три дополнительных гена эффлюксной помпы (*oqxV*, *muxB*, *mexC*), отсутствующих у некоторых других штаммов, которые участвуют в выбросе токсичных субстратов, включая антибактериальные препараты: монобактамы и нитрофурановые соединения.

Некоторые штаммы *Delftia* spp. несли уникальные гены устойчивости с высоким процентом идентичности, которые не наблюдались среди других штаммов, например, *D. tsuruhatensis* 391 обладал геном *sul1*, который придает устойчивость к сульфаниламидным антибиотикам. *D. tsuruhatensis* TR1180 также обладал *sul1*, но дополнительно *dfrA16* (устойчивость к триметоприму), *aadA3* (устойчивость к аминогликозидам), *cmlA9* (устойчивость к сульфаниламидным антибиотикам) и *tet(G)* (устойчивость к тетрациклину). *D. lacustris* LZ-C нес гены *cmx* (устойчивость к амфениколам) и гены *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* (устойчивость к аминогликозидам).

Среди 11 штаммов *Delftia* spp. с помощью BLASTp по VFDB были предсказаны 47 гомологов факторов вирулентности. Каждый штамм имел от 24 до 31 предполагаемых генов вирулентности, которые были разделены на 8 категорий: подвижность, адгезия, иммуномодуляция, выживаемость при стрессе, система секреции, сидерофоры, приспособленность и другие.

Все 11 геномов различных видов *Delftia* несли четыре гена, связанные с подвижностью (*cheY*, *fliP*, *fliI*, *fliN*), ответственные за биосинтез жгутиков. Группа адгезии включала 4 общих гена: *pilT*, *pilT2*, *pilG* и *htpB*. Штаммы клинического и животного происхождения имели три гена иммуномодуляции: *gmd*, *wzt* и *per*. Факторы выживания при стрессе (*katA*, *sodB*, *ClpP*) также были обнаружены у всех штаммов.

Белки системы секреции IV типа (STM0274, VipA, ClpV1) и гены, кодирующие транспорт сидерофоров (*bauD*, *bauC*, *bauB*, *fepC*), были предсказаны во всех геномах. Полные наборы генов сидерофора были обнаружены у штаммов MR-6/3H, 11304, 16741(T), MTQ3, LZ-C. Два фактора приспособленности (*mtrD*, *AcrB*) были идентифицированы только у штамма *D. tsuruhatensis* 391. Кроме того, у всех штаммов *Delftia* spp. наблюдались два фактора, такие как *adeG* (катионный/мультилекарственный откачивающий насос), который связан с образованием биопленки, и *pvdF* (пиовердинсинтетаза F).

По набору гомологов генов вирулентности штамм MR-6/3H был наиболее близок к штаммам 161/1 и TR1180. Более того, штамм нес ген *bauB*, который отсутствовал у двух упомянутых штаммов. Последний кодирует дополнительный периплазматический белок, связывающий сидерофор (часть ABC-транспортера сидерофора железа). Также были обнаружены три гена из категории иммуномодулирующих среди штаммов, которые имели только клиническое и животное происхождение (45.2.2 и CM13), но также в штамме

MR-6/3H: *gmd* (GDP-маннозо-4,6-дегидратаза), *wzt* (АТФ-связывающий белок системы экспорта О-антигена), и *per* (перозаминсинтетаза).

В геноме *Delftia* MR-6/3H не было обнаружено плазмид, геномных островов и интегронов. Однако было идентифицировано 5 профаговых элементов, 2 из которых имели интактный уровень организации. Профаговые элементы не были ассоциированы с генами устойчивости и вирулентности.

ВЫВОДЫ

1. В ходе скрининга патогенных бактерий, контаминирующих сырое коровье молоко, были выделены штаммы эмерджентных возбудителей сапронозов *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*, характеризующиеся множественной антибиотикоустойчивостью: устойчивость к 28 из 33 и к 19 из 23 протестированных антибиотиков, соответственно.

2. Штамм вида *E. anophelis* впервые выделен на территории России. Впервые в мире штамм вида *E. anophelis*, ранее выделявшегося от пациентов, животных и из окружающей среды, выделен из продуктов питания.

3. В геномах штаммов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* обнаружено 17 и 18 генов устойчивости к антимикробным препаратам, соответственно, включая аллели известных β -лактамаз и их гомологов, ферментов инактивации аминогликозидов и эффлюксных систем. Гены устойчивости входят в коровий геном видов, локализованы в хромосоме и, по-видимому, не связаны с мобильными элементами, такими как плазмиды, интегроны, IS-элементы и др.

4. В результате сравнительного геномного анализа установлено, что выделенные из молока штаммы филогенетически близки к клиническим штаммам, выделенным от пациентов, геномы которых содержатся в базе данных GenBank. Исследуемые виды содержат гомологи известных факторов вирулентности, таких как фактор патогенности *Mip Legionella pneumophila* и металлопротеазы *Zmp1 Mycobacterium tuberculosis* для *E. anophelis*, и белки системы секреции IV типа для *D. tsuruhatensis*.

5. В целом, полученные результаты демонстрируют наличие широкого спектра детерминант устойчивости к антибиотикам у эмерджентных возбудителей сапронозов, что может быть свидетельством отбора устойчивых видов бактерий в окружающей среде как следствия ее загрязнения антимикробными препаратами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Andriyanov P. A.** Antimicrobial Resistance and Comparative Genomic Analysis of *Elizabethkingia anophelis* subsp. *endophytica* Isolated from Raw Milk. / Andriyanov P. A., Zhurilov P. A., Kashina D. D., Tutrina A. I., Liskova E. A., Razheva I. V., Kolbasov D. V., Ermolaeva S. A. // *Antibiotics*. - 2022. - Т.11. – с.648.

2. **Andriyanov P. A.** Genomic analysis of multidrug-resistant *Delftia tsuruhatensis* isolated from raw bovine milk. / Andriyanov P. A., Kashina D. D., Menshikova A. N. // *Front Microbiol.* - 2023. - Т.14. – с.1321122.

3. **Andriyanov P.** Large-scale genomic analysis of *Elizabethkingia anophelis*. / Andriyanov P., Zhurilov P., Menshikova A., et al. // *BMC Genomics*. - 2024. - Т.25. – с.1015.

4. Кашина Д. Д. Идентификация, микробиологическая характеристика и оценка чувствительности к антибиотикам штаммов неферментирующих бактерий, выделенных из сырого молока. / Кашина Д. Д., Андриянов П. А. // «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление»: материалы 75-й всероссийской школы-конференции молодых ученых с международным участием. - Нижний Новгород: ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2022. – С. 99.

5. Меньшикова А. Н. Микробиологическая характеристика изолята *Delftia tsuruhatensis*, впервые выделенного из сырого молока. / Меньшикова А. Н., Андриянов П. А., Кашина Д. Д., Климентьева Е. А. // «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление»: материалы 76-й всероссийской школы-конференции молодых ученых с международным участием. - Нижний Новгород: ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2023. – С. 212.

6. Кашина Д. Д. Устойчивость к противомикробным препаратам и геномный анализ *Elizabethkingia anophelis* subsp. *endophytica*, выделенной из сырого молока. / Кашина Д. Д., Андриянов П. А., Тютрина А. И., Меньшикова А. Н., Климентьева Е. А. // «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление»: материалы 77-й всероссийской школы-конференции молодых ученых с международным участием. - Нижний Новгород: ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2024. – С. 164.