

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ»

На правах рукописи

Андрянов 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)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Ермолаева Светлана Александровна

Нижний Новгород – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 Концепция эмерджентности. Эмерджентные инфекции.....	17
1.1.1 Факторы, способствующие возникновению новых инфекций.....	18
1.1.1.1 Интенсификация воздействия потенциальных патогенов на популяцию человека.....	20
1.1.1.2 Иммуносупрессия и оппортунистические инфекции.....	22
1.2 Микробиологическое описание <i>Elizabethkingia anophelis</i>	24
1.2.1 Таксономия и номенклатура.....	24
1.2.2 Экологические особенности <i>E. anophelis</i>	26
1.2.3 Методы и проблемы идентификации <i>E. anophelis</i>	27
1.2.4 Клинические случаи и эпидемиология инфекций, вызываемых <i>E. anophelis</i>	29
1.2.5 Факторы патогенности (вирулентности) <i>E. anophelis</i>	32
1.2.6 Чувствительность к противомикробным препаратам и гены устойчивости к антибиотикам <i>E. anophelis</i>	34
1.2 Микробиологическое описание <i>Delftia tsuruhatensis</i>	36
1.2.1 Таксономия и номенклатура <i>D. tsuruhatensis</i>	37
1.2.2 Распространенность и экология <i>D. tsuruhatensis</i>	39
1.2.4 Случаи инфицирования человека <i>D. tsuruhatensis</i>	41
1.2.6 Чувствительность к противомикробным препаратам и гены устойчивости к антибиотикам <i>D. tsuruhatensis</i>	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1 Выделение изолятов бактерий из проб сырого молока, идентификация, определение профиля чувствительности.....	46
2.1.1 Выделение общего пула грамотрицательных бактерий.....	46
2.1.2 Выделение изолятов с множественной устойчивостью на среде с добавлением антибиотиков.....	47
2.1.3 Идентификация выделенных изолятов.....	48
2.2 Отбор штаммов для рабочей панели.....	50
2.3 Определение чувствительности целевых штаммов <i>E. anophelis</i> ML-44 и <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H.....	50
2.4 Определение гемолитической активности <i>E. anophelis</i> ML-44 и <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H.....	52
2.5 Полногеномное секвенирование, сборка и аннотация геномов.....	53

2.6	Филогенетический анализ штамма <i>E. anophelis</i> ML-44 и определение его внутривидовой принадлежности.....	54
2.7	Филогенетический анализ штамма <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H и определение его видовой принадлежности.....	55
2.8	Сравнительный геномный анализ штаммов <i>E. anophelis</i> ML-44 и <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H: анализ факторов устойчивости и вирулентности..	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		60
3.1	Изоляты бактерий, выделенные из образцов сырого молока.....	60
3.1.1	Таксономическое разнообразие штаммов, выделенных из сырого молока.....	61
3.2	Характеристика целевых штаммов: <i>E. anophelis</i> ML-44 и <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H.....	65
3.2.1	Характеристика штамма <i>Elizabethkingia anophelis</i> ML-44.....	65
3.2.1.1	Выделение и идентификация штамма <i>E. anophelis</i> ML-44.....	65
3.2.1.2	Характеристика биохимических и физиологических свойств <i>E. anophelis</i> ML-44.....	66
3.2.1.3	Чувствительность штамма <i>E. anophelis</i> ML-44 к антимикробным препаратам.....	68
3.2.1.4	Гемолитическая активность штамма <i>E. anophelis</i> ML-44.....	71
3.2.1.5	Полногеномное секвенирование, сборка и аннотация генома штамма <i>E. anophelis</i> ML-44.....	72
3.2.1.6	Филогенетический анализ штамма <i>E. anophelis</i> ML-44 и его внутривидовая принадлежность.....	73
3.2.1.7	Сравнительный геномный анализ штамма <i>E. anophelis</i> ML-44 с геномами штаммов внутри изучаемой панели.....	77
3.2.1.7.1	Анализ генетических детерминант устойчивости <i>E. anophelis</i> и их ассоциации с мобильными генетическими элементами.....	77
3.2.1.7.2	Анализ факторов вирулентности <i>E. anophelis</i>	77
3.2.2	Характеристика штамма <i>Delftia tsuruhatensis</i> MR-6/3H.....	79
3.2.2.1	Выделение и идентификация штамма <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H.....	79
3.2.2.2	Характеристика биохимических и физиологических свойств штамма <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H.....	81
3.2.2.3	Чувствительность штамма <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H к антимикробным препаратам.....	82
3.2.2.4	Гемолитическая активность штамма <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H.	84
3.2.2.5	Полногеномное секвенирование, сборка и аннотация генома	

штамма <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H.....	85
3.2.2.6 Филогенетический анализ штамма <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H и его видовая принадлежность.....	86
3.2.2.7 Сравнительный геномный анализ штамма <i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H с геномами штаммов внутри изучаемой панели.....	90
3.2.2.7.1 Анализ генетических детерминант устойчивости <i>D. tsuruhatensis</i> и их ассоциации с мобильными генетическими элементами.....	90
3.2.2.7.2 Анализ факторов вирулентности <i>D. tsuruhatensis</i>	91
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	109
ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эмерджентные инфекционные заболевания можно определить как новые инфекции, возникшие в популяции недавно или уже существующие, заболеваемость или географический охват которых стремительно увеличиваются [16, 127, 203]. 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 [83].

Большее 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 [4, 203]. Возбудители сапронозных инфекций являются членами микробных почвенных и/или водных экосистем, способными автономно существовать вне макроорганизма хозяина [4]. Характерными чертами возбудителей сапронозов являются убиквитарность, экологическая пластичность и полигостальность, т.е. способность колонизировать и инфицировать широкий круг хозяев [1, 4]. Примерами классических сапронозных возбудителей могут служить *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia cepacia* complex, *Legionella pneumophila*, *Bacillus* spp., *Yersinia pseudotuberculosis*, и др [75].

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 [38]. 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 [118, 176]. 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 [75, 187].

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 [38, 118].

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 москитов и окружающей среды, но начиная с 2010 годов стали регистрироваться как возбудители внутри- и внебольничных инфекций [20, 42, 110]. 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 [20, 73].

В целом о данных возбудителях мало что известно, особенно в отношении механизмов их 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 [24, 64, 93, 139, 197]. Изучение геномов эпидемических штаммов данного микроба выявило наличие уникальных генетических характеристик, в том числе факторов устойчивости, предполагаемых факторов вирулентности, мобильных генетических элементов и др [97]. 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 [4, 87].

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 [145]. Первый официально зафиксированный случай заражения человека *D.*

tsuruhatensis был зарегистрирован в 2011 году [142]. 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 ИССЛЕДОВАНИЯ

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*. Также данный вид бактерий впервые был выделен из такого источника как сырое коровье молоко. Этот факт расширяет понимание потенциальных факторов передачи этого патогена и подчеркивает важность мониторинга молока и молочных продуктов на наличие бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. В результате осуществленного сравнительного филогенетического анализа выделенного штамма и имеющихся в базе данных у выделенного штамма *E. anophelis* 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.

В рамках данной работы из сырого коровьего молока был выделен и охарактеризован штамм эмерджентного нозокомиального патогена *D. tsuruhatensis*, обладающий МЛУ фенотипом. Используя методы биоинформатического анализа, было выявлено наличие гомологов факторов вирулентности и устойчивости к антибиотикам. Репертуар последних хорошо согласуется с фенотипическим профилем устойчивости MR-6/3H. Используя метод филогенетического анализа, 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

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*, филогенетический анализ, поиск гомологов различных факторов, сравнительный геномный анализ.

ОСНОВНЫЕ 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 коровый 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*) [161]. 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 9.10.2024).

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 Сэнгера, а также секвенирование геномов штаммов на платформе Illumina производилось на коммерческой основе в сторонних организациях.

ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 научных 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, выводов, библиографического списка литературы, включающего 205 источников, в том числе 6 отечественных и 199 зарубежных. Работа содержит 8 таблиц и 14 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Концепция эмерджентности. Эмерджентные инфекции.

Известно, что специфические возбудители ассоциируются с определенными заболеваниями (нозоологиями). Исторически сложилось так, что изначально определялось само заболевание с его манифестными проявлениями, а уже позже выделялся возбудитель. Однако с развитием методов идентификации микроорганизмов эта ситуация изменилась. Возбудители многих вновь возникающих заболеваний часто обнаруживаются практически одновременно с клиническими признаками (или в некоторых случаях раньше), ассоциированными с ними. По этой причине термин эмерджентные инфекции включает как возбудителя, так и заболевание. Важно отметить разницу между инфекцией и заболеванием. Инфекция подразумевает, что возбудитель, проник в организм, размножается и персистирует в нем, возможно, без проявления клинических признаков заболевания (носительство). Таким образом, макроорганизм может быть инфицирован агентом, но не иметь инфекционного заболевания, обычно связанного с этим агентом [119].

Согласно определению ВОЗ эмерджентными инфекционными заболеваниями называют абсолютно новые инфекционные болезни, которых раньше не существовало (собственно эмерджентные, новые), либо вернувшиеся, заболеваемость которых в определенное время сошла на нет, но сейчас вновь возрастает (реэмерджентные, вернувшиеся) (<https://www.emro.who.int/health-topics/emerging-diseases/index.html>). Термин происходит от английского слова “emerge” – возникать, в оригинальном варианте используется как “emerging infectious diseases (EID)” или “emerging diseases” – возникающие инфекционные заболевания [83]. Данный термин широко используется в международной литературе. В отечественной литературе термин имеет аналог в виде “новые или возвращающиеся” инфекции [203]. Этиология инфекционных заболеваний в целом может быть

различной. Примерами таких инфекций являются: ВИЧ; классическая холера на Африканском континенте; холера, вызванная *Vibrio cholerae* O139; лихорадка долины Рифт; хантавирусный легочный синдром; болезнь Лайма; гемолитико-уремический синдром и пищевые инфекции, вызываемые определенными штаммами *Escherichia coli* O157:H7 и O104:H4; коронавирусные инфекции: SARS-CoV; MERS-CoV; SARS-CoV-2 и др [27, 125, 127, 185].

В целом среди 1407 известных патогенов человека (на 2005 г.) 117 (13%) рассматриваются ВОЗ и ЦКЗ США (CDC USA) как эмерджентные или реэмерджентные. Из всех видов патогенов 208 являются вирусами и прионами, среди них 77 (37%) считаются эмерджентными или повторно возникающими. Для бактерий это количество составляет 538 и 54 (10%) эмерджентных соответственно; для грибов 317 и 22 (7%) соответственно; для простейших 57 и 14 (25%); для гельминтов 287 и 10 (3%) соответственно [186]. Согласно исследованиям Kate E. Jones с соавторами с 1940 по 2004 г. было отмечено 335 вспышек новых инфекций. Среди них преобладают зоонозы (60,3%): большинство из них (71,8%) имеют происхождение от диких животных. В тоже время 39,7% эмерджентных инфекций имеют не зоонозную природу, т.е. их резервуаром и источником является окружающая среда. При этом чуть более половины (54,3%) эмерджентных инфекций имеют бактериальную этиологию [83].

1.1.1 Факторы, способствующие возникновению новых инфекций

Факторы и причины возникновения эмерджентных инфекций множественны и комплексны. Разные авторы отдают приоритет различным факторам. Однако по большей части основными причинами возникновения новых инфекций являются три аспекта. Во-первых, разработка новых диагностических инструментов позволяет более точно обнаруживать и идентифицировать новые патогены [127]. В данной ситуации случаи инфекции имели место быть в прошлом, однако этиологический агент было сложно установить ввиду несовершенства методологии. Во-вторых,

увеличение частоты и интенсивности контакта с потенциальными патогенами, вызванное в том числе глобальной миграцией населения, интенсивным использованием природных ресурсов, а также изменением экосистем напрямую влияет на возникновение новых инфекций [83]. И, в-третьих, появление более вирулентных штаммов бактерий может также привести к возникновению новых инфекций [126]. При этом возникновение инфекционного заболевания в самом упрощенном виде можно рассматривать как двухэтапный процесс: (1) внедрение возбудителя в новую популяцию восприимчивых хозяев (независимо от того, возник ли возбудитель в окружающей среде, возможно, у другого вида, или как вариант существующей инфекции у человека); (2) закрепление и дальнейшее распространение в популяции хозяина. В ходе второго этапа происходит селективный отбор клонов возбудителя в сторону адаптации к существованию в организме хозяина [118, 127].

Каково бы ни было ее происхождение, инфекция возникает, когда возникает контакт популяции потенциального возбудителя с популяцией потенциально восприимчивого хозяина. Факторы, которые способствуют одному или обоим из этих этапов, будут “ускорять” этот процесс. Примечательно, что большинство эмерджентных инфекций обычно возникают в конкретном регионе, а затем распространяются за его пределы с различной интенсивностью [127].

Как было отмечено выше, “ускорение” возникновения новых инфекций обусловлено рядом факторов. Эти факторы аналогичны тем, что определяют само возникновение нового инфекционного агента. Последние трактуются и классифицируются по-разному, но в широком смысле могут быть сгруппированы как: демографические, патогенетические (биология микроорганизма), социально-экономические, эколого-климатические и научно-технические факторы [38]. Ключевыми факторами принято считать все ту же интенсификацию воздействия на популяцию человека естественных резервуаров бактериальных патогенов (контакт с резервуаром) и появление

более вирулентных штаммов возбудителя, а также разработку и усовершенствование методов диагностики [176]. Отдельным фактором можно выделить возрастающую прослойку иммунокомпрометированных персон в популяции человека [118]. В целом появление новых инфекционных агентов имеет мультифакториальную природу. Процесс возникновения нового инфекционного агента схематично представлен на Рисунке 1.

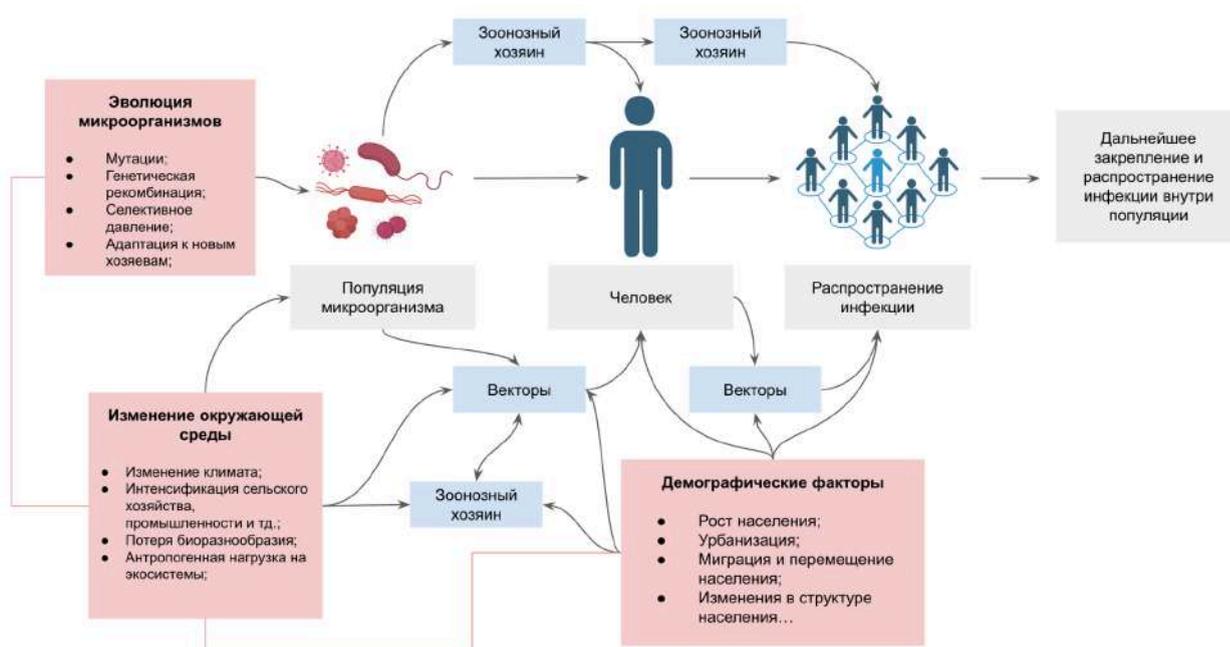


Рисунок 1. Общая схема возникновения нового инфекционного агента (адаптировано из [2, 119]).

1.1.1.1 Интенсификация воздействия потенциальных патогенов на популяцию человека

Фактор интенсификации воздействия бактерий на человека комплексный и включает в себя целый ряд аспектов таких как: глобализация, социо-демографические изменения, антропогенное изменение окружающей среды и др.

Согласно законам эпидемиологии успешность нового патогена определяется не только самим “возникновением” в определенном случае, но и способностью успешно передаваться от источника к восприимчивым

хозяевам – формируя тем самым эпидемический процесс. Таким образом, одним из самых очевидных факторов возникновения и распространения новых инфекций является плотность и скученность населения, которые в свое время сыграли одну из решающих ролей в возникновении и в масштабном распространении таких болезней, как например чума и холера. В настоящее время данный фактор не перестает быть актуальным, так как в последнее время наблюдается усиление урбанизации [70]. Кроме того, особенно актуальным представляется фактор мобильности населения. Массовые миграции населения, особенно возникающие во время войн и общественных беспорядков, приводят к распространению как векторов патогенов, так и их резервуаров [137, 184]. Массовые миграции были отмечены в истории: колонизация Америки, Африки, Азии – в свое время привели к распространению заболеваний эндемичных для своих регионов в новые, что вызвало массовый всплеск заболеваемости среди восприимчивого населения. Так во время тихоокеанской кампании Второй мировой войны североамериканские и европейские солдаты, служившие в Азии, страдали от тропических болезней, таких как малярия, дизентерия, тропическая лихорадка и др [17, 61, 149]. В наше время фактор мобильности вышел на принципиально новый уровень: сегодня можно свободно путешествовать по миру по воздуху и за несколько часов переместиться на другой край света [16]. Все это приводит к массовому обмену микрофлорой, включая потенциально патогенные микроорганизмы. Таким путем, например, в 2003 г. SARS был занесен из Китая в Торонто (Канада), что в дальнейшем вызвало массовую нозокомиальную вспышку [174]. Это показывает, насколько быстро новые инфекционные заболевания могут распространяться в современном мире [159].

Также одним из факторов, способствующих возникновению новых инфекций, является усиление антропогенного воздействия на окружающую среду и вмешательство в уникальные нетронутые биотопы с огромным биоразнообразием, такие как тропические леса Африки, Азии и Южной

Америки. Контакт с новыми эндемичными видами животных потенциально приводит к возникновению новых заболеваний [164, 182].

1.1.1.2 Иммуносупрессия и оппортунистические инфекции

Защита организма от инфекции зависит от сложной интегрированной системы физических барьеров, таких, как например кожа, кислотность желудочного сока и мукоцилиарный клиренс, а также от врожденного иммунитета, представленного фагоцитарными клетками, естественными клетками-киллерами и комплементом, и адаптивного иммунитета, осуществляемого В- и Т-лимфоцитами. У индивида может обнаруживаться недостаточность в одном или нескольких компонентах иммунной защиты организма. Так как каждая функциональная составляющая иммунной системы выполняет свою уникальную роль в защите организма, инфекции, вызванные определенными микроорганизмами, часто связаны с определенными типами иммунодефицита [52].

Индивиды с ослабленным иммунитетом представляют собой гетерогенную группу с повышенным риском заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний по сравнению с общей популяцией из-за измененной восприимчивости к инфекционным агентам в виду иммуносупрессии [8]. Иммуносупрессия может быть вызвана различными факторами, такими как наследственные заболевания, преклонный возраст, ВИЧ-инфекция, лучевая терапия, терапия иммунодепрессивными препаратами (трансплантация, терапия аутоиммунных и опухолевых заболеваний), беременность, недостаточность и неполноценность питания и др [35]. По разным данным в последние годы число индивидов с иммуносупрессией, достигло примерно 2-3% от общей численности населения, и растущее использование супрессоров в ряде клинических учреждений, несомненно, будет способствовать увеличению доли людей с некоторыми иммуносупрессивными проявлениями [8, 32].

Данная группа наиболее восприимчива к инфекционным заболеваниям, включая оппортунистические инфекции. Особенность течения инфекционных заболеваний у иммунокомпрометированных персон заключается в слабо выраженной симптоматике ввиду недостаточности иммунной системы (Рисунок 2). Последним “пользуются” оппортунистические патогены, которые зачастую не способны вызывать серьезные инфекции у здоровых иммунокомпетентных индивидуумов [151].

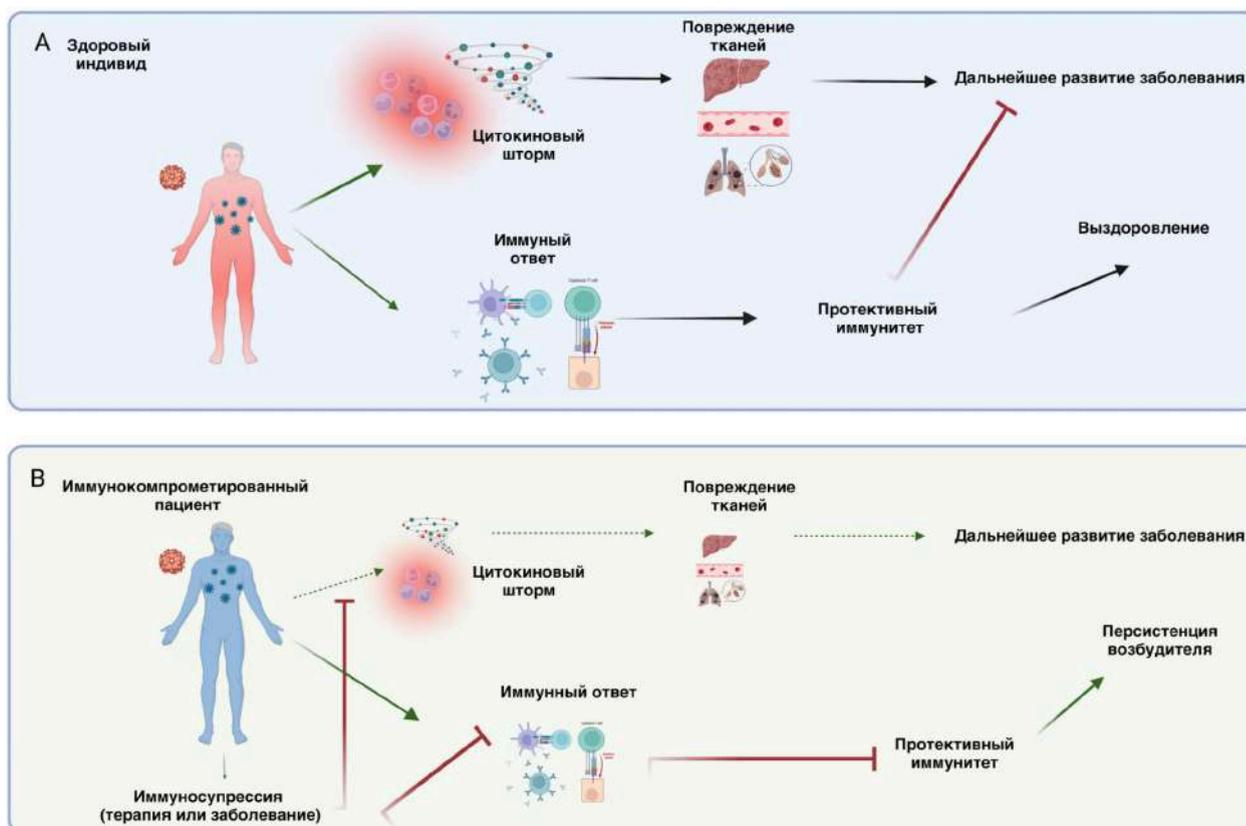


Рисунок 2. Особенности инфекционного процесса на примере вирусных инфекций у здоровых (А) и иммунокомпрометированных персон (В) [8].

Таким образом, ослабленный макроорганизм может служить некой “площадкой” для развития патогенного потенциала микроорганизмов [127]. Постепенное развитие и естественный отбор в итоге могут потенциально приводить к возникновению нового патогена и закрепления его в популяции восприимчивого хозяина [8].

1.2 Микробиологическое описание *Elizabethkingia anophelis*

Elizabethkingia anophelis впервые был выделен из средней кишки комара *Anopheles gambiae* и описан как новый вид в 2011 году. Эта грамотрицательная неферментирующая бактерия имеет палочковидные клетки и колонии с легкой желтой пигментацией. Хорошо растет на большинстве сред общего назначения. Оптимальные условия для роста наблюдаются при температуре от 30-31°C до 37°C. Последовательность гена 16S рНК на 98,6% сходна по последовательности с *Elizabethkingia meningoseptica* и на 98,2% – с *Elizabethkingia miricola*. Что касается липидного состава, то основными жирными кислотами, присутствующими в мембранах штамма R26(T), являются iso-C15:0, iso-C17:0 3-ОН. Что касается полярных липидов, *Elizabethkingia anophelis* содержит дифосфатидилглицерин, фосфатидилинозитол и неизвестный фосфолипид, а также различные неизвестные полярные липиды и гликолипиды. Кроме того, бактерия содержит менахинон МК-6 в качестве основного менахинона. В ходе экспериментов по гибридизации ДНК с родственными видами и выявлению отличительных биохимических свойств было установлено, что штамм R26(T) представляет собой новый вид в роде *Elizabethkingia*. Примечательно, что *Elizabethkingia anophelis* проявляет устойчивость к целому ряду антибиотиков, включая ампициллин, хлорамфеникол, канамицин, стрептомицин и тетрациклин [85].

1.2.1 Таксономия и номенклатура

Согласно нынешним систематическим представлениям, вид *E. anophelis* относится к домену *Bacteria*, филуму *Bacteroidota*, классу *Flavobacteriia*, порядку *Flavobacteriales*, семейству *Weeksellaceae*, роду *Elizabethkingia* [58]. В настоящее время род *Elizabethkingia* включает семь видов, а именно *E. meningoseptica*, *E. miricola*, *E. anophelis*, *E. bruuniana*, *E. ursingii*, *E. occulta*, *E. argenteiflava* [136].

Род *Elizabethkingia* был предложен в 2005 году Kim и соавт., на тот момент он включал два вида: *Elizabethkingia meningoseptica* и *Elizabethkingia miricola*. Виды были разграничены в основном на основе исследований сходства последовательностей генов 16S рРНК. Штаммы этого рода образуют отдельную линию, отличную от типовых штаммов ветви *Chryseobacterium-Bergeyella-Riemerella* семейства *Flavobacteriaceae*, о чем свидетельствует сходство последовательностей 16S рРНК на 90,7-93,9%. Это разделение также подтверждается фенотипическими различиями. С момента представления рода в 2005 году официально не было предложено ни одного дополнительного вида. Представители рода *Elizabethkingia* были идентифицированы в различных образцах, в том числе в клинических источниках. Его распространенность в различных средах обитания подчеркивает его разнообразное распространение и потенциальную приспособляемость [85, 89].

В целом род *Elizabethkingia* имеет весьма запутанную историю. Впервые микроорганизм, принадлежащий к данному роду, был описан американским микробиологом Elizabeth O. King в 1959 как *Flavobacterium meningosepticum* – флавобактерия, вызывавшая вспышки менингита у новорожденных в США [90]. Однако, в 1994 вид был пересмотрен как *Chryseobacterium meningosepticum* [173]. Только в 2005 Kim и соавт. на основании полифазного таксономического анализа, включавшего анализ фенотипа и анализ последовательности гена 16S рРНК, предложил переименовать *C. meningosepticum* в *Elizabethkingia meningoseptica* [89]. К тому времени было описано 2 вида: *E. meningoseptica* и *E. miricola*, последняя была выделена из образца водного конденсата, отобранного на космической станции Мир и описанного в 2003 году [103]. Первый штамм вида *Elizabethkingia anophelis* R26(T) был выделен Kämpfer и соавт. из средней кишки москита *Anopheles gambiae* в Гамбии (Африка) и описан как новый вид в 2011 году [85]. Следующий вид – *Elizabethkingia endophytica*, Kämpfer и соавт. выделил из стебля здоровой 10-дневной сладкой кукурузы (*Zea mays*) и

описал в 2015 [86]. Однако, с появлением и повсеместным распространением секвенирования следующего поколения, а также сравнительного геномного анализа, *E. endophytica* потеряла валидный статус отдельного вида и была реклассифицирована как подвид *E. anophelis* [51]. Более того, с 2020 года подвиды (subsp.) *anophelis* и *endophytica* потеряли свою валидность [59].

1.2.2 Экологические особенности *E. anophelis*

Принято считать, что *E. anophelis* – убиквитарный микроорганизм, широко встречающийся в окружающей среде [73]. Однако изначально данный микроб был выделен из средней кишки москита *Anopheles gambiae* в Гамбии, Африка [85]. В настоящее время известно, что именно *E. anophelis* является одним из резидентных доминантов микробиоты кишечника москитов: комплекса *Anopheles gambiae* и группы *Anopheles funestus*, а также *Aedes aegypti* [54, 56, 170, 178]. Было показано, что эритроциты животных стимулируют рост *E. anophelis in vitro* и *in vivo* [41]. По всей видимости данный микроорганизм способствует лизису эритроцитов и перевариванию крови в кишечнике москита. Геномный анализ штаммов *Elizabethkingia* sp., выделенных от москитов показал наличие ряда генов связанных с транспортировкой/утилизацией сахаров, лизисом эритроцитов и антиоксидантной системой. Аннотация генома и сравнительный геномный анализ штаммов, выделенных из кишечника москита, выявили функциональные характеристики, связанные с симбиотическими отношениями с москитом-хозяином [91]. Также было отмечено, что *E. anophelis* имеет антималярийную активность [14, 132]. Все это указывает на симбиотические взаимоотношения между данным микробом и москитами, а также на возможную перспективу использования *E. anophelis* в борьбе с возбудителем малярии.

Несмотря на то, что конкретный резервуар данного микроорганизма до сих пор неизвестен, в большинстве эпидемиологических исследований авторы рассматривают воду, как резервуар. Исследования данного микроба по

большей части сфокусированы на клинических штаммах, в то время как исследования штаммов альтернативного происхождения ограничены. Однако исследование проб пресной воды, отобранной из различных источников окружающей среды в Австралии показало наличие бактерий рода *Elizabethkingia*. Всего было выделено 667 штаммов, из которых доля *Elizabethkingia* spp. составила 14,09% (94 штамма). В ходе видовой идентификации было выяснено, что 16 штаммов относятся к виду *E. anophelis* [71]. Таким образом, упомянутое исследование подтверждает гипотезу о том, что пресная вода может являться резервуаром данного микроба. С другой стороны, одного хоть и относительно массового исследования недостаточно, чтобы точно определить резервуар. Более того требуются исследования других биотопов, таких, как например почва.

Стоит также отметить, что другие виды рода *Elizabethkingia* выделялись из почвы, кровососущих насекомых, рыб, амфибий и рептилий [77, 81, 99, 120]. Это указывает на убиквитарность и широкую экологическую пластичность представителей данного рода.

1.2.3 Методы и проблемы идентификации *E. anophelis*

Учитывая, что *E. anophelis* вызывает интерес в первую очередь как патоген, проблема быстрой и точной идентификации данного микроорганизма особенно актуальна. В настоящее время в клинической практике распространены методы фенотипической и биохимической идентификации: классическая бактериология и реже использование матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization). Самыми распространенными в настоящее время тест-системами являются API/ID32 Phenotyping Kits (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), Phoenix 100 ID/AST Automated Microbiology System (Becton Dickinson Co., Sparks, MD, USA), Vitek 2 Automated Identification System (bioMérieux), Vitek MS (bioMérieux), and Bruker Biotyper MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) [107, 110]. Однако одной из проблем использования данных подходов является

закрытость и ограниченность баз данных [68]. Так в 2017 году было показано, что все 35 штаммов, изначально определенных как *E. anophelis* с помощью анализа последовательности гена 16S рРНК, были некорректно идентифицированы как *E. meningosepticum* с помощью Vitek 2 [107]. В другом исследовании совпадение результатов идентификации видов между методом 16S рРНК и MALDI-TOF составило 24,5-26,5%. Ошибки в идентификации в описанных случаях были связаны в первую очередь с ограниченностью баз данных [95, 193]. Однако в настоящее время базы данных коммерческих систем MALDI-TOF были расширены, что позволило относительно корректно разделять виды *E. anophelis* и *E. meningosepticum*. Тем не менее прочие виды рода *Elizabethkingia*, способные вызывать инфекции у человека и животных до сих пор отсутствуют в упомянутых базах данных, что опять-таки ведет к некорректной идентификации.

Таким образом, ввиду частой некорректной идентификации *E. anophelis* как *E. meningosepticum*, возникает вопрос о корректной оценке эпидемиологической ситуации. В настоящее время считается, что *E. anophelis* имеет большее клиническое значение, чем *E. meningosepticum*. Большая часть случаев инфекции, где этиологическим агентом считали *E. meningosepticum* на самом деле являлась *E. anophelis* [68, 167]. Данный факт хорошо иллюстрирует один из факторов определяющих обнаружение эмерджентных инфекций – развитие методов диагностики.

Современные молекулярно-генетические методы, такие как секвенирование и анализ последовательности гена 16S рРНК, генов домашнего хозяйства, а также полногеномное секвенирование рассматриваются как наиболее релевантные для точной видовой идентификации *Elizabethkingia* spp. Однако в настоящее время данные методы доступны по большей части только для научно-исследовательских организаций [110].

1.2.4 Клинические случаи и эпидемиология инфекций, вызываемых *E. anophelis*

Первый задокументированный случай заражения *E. anophelis* произошел в 2011 году в Центральноафриканской Республике, где бактерия была выделена из спинномозговой жидкости 8-дневного новорожденного. Из цереброспинальной жидкости были выделены грамотрицательные палочки, после чего была назначена эмпирическая терапия гентамицином. В итоге полученный штамм был идентифицирован путем секвенирования последовательности гена 16S рРНК как *E. anophelis*. Данный случай инфекции закончился летальным исходом, несмотря на первичное улучшение общего состояния [58]. После упомянутого первого случая вспышки внутрибольничных инфекций, вызванных *E. anophelis*, регистрировались в Сингапуре [168], Гонконге [95], Англии [123] и Тайване в 2015–2018 гг [97]. Во всех случаях у штаммов *E. anophelis* отмечался крайне широкий профиль устойчивости к антибиотикам, включая наиболее актуальные: бета-лактамы, фторхинолоны, тетрациклины, аминогликозиды и др. Также отмечалось тяжелое течение инфекции, клиническими проявлениями которой были в основном менингит, пневмония и сепсис. До 2016 года считалось, что *E. anophelis* является новым оппортунистическим патогеном человека, вызывающем инфекции главным образом в нозокомиальных условиях у иммунокомпрометированных пациентов.

Однако в 2016 году в США сразу в 3 штатах была зафиксирована первая массовая внебольничная вспышка, вызванная *E. anophelis*. Всего было лабораторно подтверждено 66 случаев инфекции, среди которых 20 летальных исходов (30,3% летальности). Источник инфекции не был обнаружен. При исследовании самих штаммов с использованием полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа было обнаружено нарушение рамки считывания гена *mutY*, вызванное инсерцией интегративного и конъюгативного элемента (ICE). Ген *mutY* кодирует фермент системы репарации ДНК, нарушение рамки его считывания у

“дикого” варианта инициировало возникновение гипермутабельного варианта *E. anophelis*. Предполагается, что именно высокая частота мутаций ускорила отбор клонов с повышенной вирулентностью в отношении человека, что позволило данному возбудителю вызвать инфекцию у иммунокомпетентных персон [139]. После описанной вспышки в США в 2015-2016 годах, *E. anophelis* стал проблемой мирового масштаба. Практически во всем мире были зарегистрированы единичные случаи как внутрибольничных, так и внебольничных инфекций [28, 133, 158, 197].

Похожая вспышка с наличием внебольничных случаев инфекции была зарегистрирована в 2020-2021 гг во Франции – это первая вспышка в Европе. Исследователи описали 20 случаев инфекции за год, большая часть из которых имела внебольничное происхождение, среди которых зафиксировано 9 летальных исходов. В основном инфекция проявлялась в форме лихорадки, пневмонии и сепсиса. По всей видимости у 5 пациентов развилась фульминантная форма инфекции в виде бактериемии и сепсиса, из-за которой смерть наступила в течение 24 часов. При этом 4 пациента умерли в течение 20 дней не от бактериемии, а от сопутствующих заболеваний. Стоит отметить, что в описанном выше случае средний возраст пациентов составлял 82 года. Филогенетический анализ показал клональное происхождение и исключил внутрибольничную передачу возбудителя [64]. Несмотря на массовый скрининг проб различного происхождения, конкретный источник, пути и механизмы передачи данного возбудителя так и не были выявлены, однако в обоих случаях исследователями было предположено, что источником и, вероятно, фактором передачи являлась водопроводная вода. Также в обоих случаях были отмечены 2 характерные черты инфекций, вызываемых данным возбудителем: множественная лекарственная устойчивость и высокий уровень летальности. По разным оценкам летальность инфекции *E. anophelis* варьирует от 23,4% до 70% в зависимости от конкретного случая: сопутствующие заболевания, локализация инфекции, терапия и т.д [64, 95, 129].

Согласно исследованию Lisa Mallinckrodt и соавт. к марту 2022 года в совокупности по всему миру было зарегистрировано 35 вспышек *E. anophelis*. Большинство вспышек были зарегистрированы в Тайване (n=11), Индии (n=5) и Соединенных Штатах (n=5). Случаи инфекций, вызванных *E. anophelis* фиксировались как среди взрослых (в основном отделения интенсивной терапии), так и среди детей. В 8 из 13 подтвержденных вспышек *E. anophelis* был проведен анализ источника инфекции. Наиболее часто выявляемыми источниками были водопроводные краны с аэраторами, однако также установлены пути передачи инфекции от пациента к пациенту через зараженное медицинское оборудование или донорские ткани [115].

Одни из самых последних случаев были зафиксированы в Непале, Японии и Индии (2022-2023 годы) [36, 76], причем самый последний случай был зарегистрирован в Нидерландах в феврале 2024 года, а также во Вьетнаме в марте 2024 года [24, 48]. Почти все зарегистрированные случаи заражения *E. anophelis* проявляются тяжелыми инфекциями, наиболее частыми из которых являются менингит, пневмония и инфекции кровотока.

Стоит отметить, что на сегодняшний день большинство инфекций данной этиологии зафиксировано в Азии и США. Однако в последние годы случаи инфекций и отдельные вспышки стали регистрироваться в Европе.

В России первая и на данный момент и единственная статья О. В. Кондратенко с соавторами описывает выделение 28 культур *Elizabethkingia* из различного материала, отобранного от больных детей. Выделяемость бактерий рода *Elizabethkingia* составила 0,1%. Видовой репертуар выделенных штаммов был представлен 3 видами: 16 штаммов *E. miricola* (57,1%), 9 штаммов *E. meningoseptica* (32,1%) и 3 штамма *E. anophelis* (10,8%). Стоит отметить, что для видовой идентификации авторами был использован метод MALDI-TOF [3]. Однако как было показано в различных работах, в настоящий момент базы данных систем MALDI-TOF склонны к неточной видовой идентификации бактерий данного рода ввиду их неполноты [95, 193]. Авторы также отмечают недостаточную изученность

видов рода *Elizabethkingia*, их уникальный спектр устойчивости, а также высокий риск различных осложнений, и высокую смертность инфекций данной этиологии [3].

Таким образом *E. anophelis* представляет серьезную угрозу для здоровья человека и животных из-за своей множественной лекарственной устойчивости и способности вызывать тяжелые инфекции. С момента первого задокументированного случая в 2011 году, вспышки инфекций, вызванных этим патогеном, были зарегистрированы по всему миру, включая США, Францию, Непал, Японию, Индию, Нидерланды и Вьетнам. В последнее время появляются данные о встречаемости данного возбудителя на территории России. Отмечается, что, инфекции, вызванные *E. anophelis*, часто имеют тяжелое течение и высокий уровень летальности, что требует дальнейшего изучения механизмов патогенеза и разработки эффективных методов лечения и профилактики.

1.2.5 Факторы патогенности (вирулентности) *E. anophelis*

Точные молекулярные механизмы патогенеза инфекций, вызываемых бактериями рода *Elizabethkingia* и, в частности, видом *E. anophelis* остаются неизвестными [110]. В абсолютном числе исследований факторы вирулентности данного агента предсказывались с помощью биоинформатических методов, а именно метода поиска гомологов (sequence similarity ("homology") searching) [138]. Данный метод можно рассматривать в качестве первичного этапа в определении истинных факторов вирулентности. Однако стоит отметить, что, используя метод поиска гомологов, результаты необходимо интерпретировать со значительной степенью аккуратности. Обнаружение тех или иных кажущихся (putative) гомологов напрямую зависит от используемого программного обеспечения и выбранных параметров. Результаты данного подхода несут больше гипотетический характер, особенно когда конкретные факторы неизвестны. В любом случае для подтверждения роли в патогенезе в качестве факторов вирулентности, обнаруженные гомологи необходимо изучать методами, позволяющими

получить делеционных мутантов по тому или иному предполагаемому фактору вирулентности. Тем не менее такой биоинформатический метод позволяет получить первичные знания о факторах и предположить их роль в развитии инфекций.

Используя различные биоинформатические инструменты, разным исследователям удавалось предсказать до 270 предполагаемых генов факторов вирулентности *Elizabethkingia* spp. Согласно базе данных Virulence Factor Database (VFDB) их можно классифицировать как: факторы адгезии, антимикробной активности, образования биопленок, систем секреции; экзоферменты, экзотоксины, иммуномодуляторы, факторы инвазии, подвижности, метаболические факторы и другие [111, 198]. Так Mingxi Wang и соавт. обнаружили от 25 до 28 факторов вирулентности среди 4 штаммов *E. anophelis*. Отмечалось, что предсказанные факторы вирулентности участвуют в формировании капсулы, биосинтезе и метаболизме липополисахаридов или липидов, реакции на стресс (белок теплового шока, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза), системе секреции и ряде других функций [177]. Jiun-Nong Lin и соавт., изучая клинический штамм *E. anophelis* EM361-97, выделенный в Тайване, обнаружили 25 гомологов факторов вирулентности, к которым относились гены синтеза капсулы, липополисахаридов, эндопептидаза, белки теплового шока, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза, двухкомпонентная регуляторная система и другие [108].

Суммируя репертуар гомологов факторов вирулентности, обнаруженных в различных исследованиях, можно выделить их основные группы: гены, отвечающие за синтез капсулы (*cap*, *cps*-кластер, *rpe*, *pgi*, *algW* и др.); факторы адгезии (*dnaK*, *aatC*, *pilR*, *fleQ*, *htpB*), гены синтеза липополисахаридов (*kdtB*, *tviB*, *galE*, *bplC*, *lipA* и др.), стрессовые факторы (*katA*, *katB*, *katG*, *sodB*, *clpP* и др.), факторы поглощения и метаболизма гема (*phu*-кластер, *hem*-кластер и др.), гемолизин (*hlyB*), факторы метаболизма

железа (*ybtQ* и др.), факторы поглощения магния (*mgtB*, *mgtC*), а также множество других категорий [26, 28, 104, 139, 198].

Таким образом *E. anophelis* вероятно располагает крайне широким репертуаром факторов вирулентности, которые позволяют ей успешно колонизировать организм человека, персистировать в нем и уклоняться от иммунного ответа. Более того, в некоторых работах отмечается взаимосвязь обнаруженных факторов с наблюдаемыми особенностями патогенеза, что косвенно подтверждает их роль [26, 98].

1.2.6 Чувствительность к противомикробным препаратам и гены устойчивости к антибиотикам *E. anophelis*

Примечательной особенностью *E. anophelis* является ее множественная лекарственная устойчивость, которая в большинстве случаев из-за неэффективности терапии является причиной летальных исходов [139, 177]. Спектр устойчивости данного микроорганизма крайне широк и включает от 13 до 16 и более антибиотиков: практически все бета-лактамы (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы), тетрациклин, аминогликозиды, макролиды, хлорамфеникол, нитрофураны, триметоприм-сульфаметоксазол и др [43, 72, 98, 189, 192, 193]. Примечательно, что в последнее время у клинических штаммов обнаруживается устойчивость к фторхинолонам, обусловленная мутациями в гене субъединицы А гиразы (*gyrA*) [80, 106].

E. anophelis – уникальный микроорганизм с точки зрения репертуара врожденных факторов устойчивости. В геноме *E. anophelis* обнаруживаются 3 гена бета-лактамаз различных классов: *bla*_{СМЕ} – сериновая бета-лактамаза расширенного спектра действия – ESBL (класс А по Амблеру), а также *bla*_В и *bla*_{ГОВ} – металло-бета-лактамазы класса В (MBLs) [17, 62, 193]. Комбинация данных ферментов делает данного возбудителя нечувствительным практически ко всем известным бета-лактамам (исключая цефалоспорин

нового поколения – цефидерокол), включая их комбинации с ингибиторами бета-лактамаз (защищенные бета-лактамы) [193].

Кроме устойчивости к бета-лактамам *E. anophelis* также устойчива к аминогликозидам. В геноме данной бактерии обнаруживаются гены аминогликозид-6-аденилилтрансферазы (*aadK*), аминогликозид-О-нуклеотидилтрансферазы (*aadS*), системы эффлюкса RanA/RanB и некоторые другие факторы, обеспечивающие нечувствительность *E. anophelis* к большинству аминогликозидов [109, 177, 193].

Тетрациклины являются важнейшими антибиотиками для гуманной и ветеринарии. В геноме *E. anophelis* обнаруживается ген тетрациклин-инактивирующего фермента (*tetX*) [29, 55]. Однако среди многообразия антибиотиков тетрациклинового ряда, устойчивость обнаруживается непосредственно к тетрациклину, в то время как миноциклин, доксициклин и тигециклин являются эффективными антибиотиками для терапии инфекций, вызванных *E. anophelis*: данные препараты подавляют >90% штаммов [31, 93, 166, 193].

Устойчивость к триметоприм-сульфаметоксазолу частично ассоциирована с мутациями в гене дигидроптероатсинтазы (*folP*). Однако не все устойчивые к триметоприм-сульфаметоксазолу штаммы *E. anophelis* несут мутантную аллель [167]. Одним из дополнительных факторов, определяющих устойчивость к данной комбинации, является наличие гена дигидроптероатсинтазы, устойчивой к сульфаниламидам (*sul2*). Зачастую этот ген связан с интегронами класса I и широко распространен среди различных бактериальных таксонов [189].

Устойчивость к хлорамфениколу обусловлена наличием гена хлорамфениколацетилтрансферазы типа B (*catB*) [60]. Этот ген консервативен во всех идентифицированных штаммах *E. anophelis* [177]. Некоторые авторы предлагали использовать данный ген как мишень для видовой идентификации *Elizabethkingia* ввиду его консервативности [60].

Кроме специфических факторов устойчивости, геном *E. anophelis* кодирует отдельные элементы и целые системы эффлюкса, которые также могут играть роль в формировании фенотипа множественной устойчивости, в том числе к таким антибиотикам как макролиды, фторхинолоны и др [82, 191].

1.2 Микробиологическое описание *Delftia tsuruhatensis*

Delftia – род условно-патогенных, грамотрицательных, аэробных, подвижных, не образующих спор и неферментирующих глюкозу палочек. Представители рода оксидазо- и каталазоположительные микроорганизмы. Также они положительны на ДНКазу, щелочную фосфатазу, С8-эстеразу и липазу, но отрицательны в отношении С14-липазы. Накапливают поли-β-гидроксибутират. Могут восстанавливать нитраты до нитритов, но денитрификации не обнаружено. Не образуют флуоресцентных пигментов. Содержание GC% в ДНК составляет 67–69% [181].

Delftia tsuruhatensis представляет собой грамотрицательную, неферментирующую короткую палочковидную бактерию, способную усваивать терефталат в качестве единственного источника углерода и энергии. Этот новый вид, выделенный из активного ила, собранного на очистных сооружениях бытовых сточных вод в Японии, обладает уникальным сочетанием фенотипических и генотипических характеристик, которые отличают его от других известных видов рода *Delftia*. Типовой штамм, T7T, подвижен, встречается поодиночке или парами и имеет размер клеток 0,7-1,2 мкм в длину и 2,4-4,0 мкм в ширину. Его основными клеточными жирными кислотами являются С16:0, С16:1 и С18:1, также обнаружены значительные количества циклопропановой кислоты (С17:0), 3-ОН С10:0, С12:0, С15:0 и С14:0. Общее содержание GC% ДНК в *D. tsuruhatensis* составляет 66,2%. Этот вид способен расщеплять терефталат до протокатехината с помощью терефталат-1,2-диоксигеназной системы (TERDOS) и может использовать различные источники углерода, включая

ацетамид, β -аланин, цитрат, D-фруктозу, глицерин, изобутират, изофталат, D-маннит, малеат, малонат, фенилацетат., пропионат, протокатехуат, терефталат, D-триптофан и L-триптофан [155].

1.2.1 Таксономия и номенклатура *D. tsuruhatensis*

По современной классификации вид *Delftia tsuruhatensis* входит в род *Delftia*, семейство *Comamonadaceae*, порядок *Burkholderiales*, класс *Betaproteobacteria*, филум *Pseudomonadota*, домен *Bacteria*.

Betaproteobacteria представляет собой класс граммотрицательных аэробных или факультативно-анаэробных микроорганизмов, включающий более 75 родов и 400 видов бактерий. Класс *Betaproteobacteria* описан на основе филогенетического анализа последовательностей 16S рРНК гена. Представители класса *Betaproteobacteria* обитают в самых различных средах, будь то окружающая среда или другие организмы. Есть как гетеротрофные, так и автотрофные виды. Многие представители этого класса имеют важное экономическое и экологическое значение. Типовым порядком класса *Betaproteobacteria* является *Burkholderiales* [22].

Отряд *Burkholderiales* – разнообразный и сложный отряд граммотрицательных аэробных бактерий, относящийся к классу бета-протеобактерий. Филогенетически *Burkholderiales* представляет собой отдельную группу бета-протеобактерий, характеризующуюся уникальным набором последовательностей генов 16S рРНК. Порядок состоит из нескольких семейств, включая *Burkholderiaceae*, *Alcaligenaceae* и *Comamonadaceae*, которые охватывают широкий спектр родов, включая *Burkholderia*, *Pandoraea*, *Lautropia*, *Achromobacter* и *Variovorax* и др. Филогенетический анализ гена 16S рРНК выявил высокую степень разнообразия среди *Burkholderiales*, что позволило выделить множество отдельных линий. Филогенетическое положение некоторых родов семейства *Burkholderiales* остается неоднозначным, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований эволюционных взаимоотношений внутри этого отряда. Адаптивность представителей семейства *Burkholderiales* отражается в

разнообразии размеров и организации их генома, что может способствовать их способности процветать в самых разных условиях – от почвы и воды до человека-хозяина. Клиническая значимость *Burkholderiales* заключается в их способности вызывать тяжелые инфекции, особенно у людей с ослабленным иммунитетом, таких как больные муковисцидозом или пациенты отделений интенсивной терапии [175].

Семейство *Comamonadaceae* образует большой кластер внутри класса *Betaproteobacteria*. Оно постоянно пополняется новыми родами и видами и в настоящее время включает более 100 видов из 29 родов. Эти рода образуют филогенетический кластер с уровнем сходства последовательностей генов 16S рРНК от 93-97 %, однако демонстрируют значительное фенотипическое разнообразие. В их число входят аэробные органотрофы, анаэробные денитрификаторы, бактерии, восстанавливающие Fe^{3+} , окислители водорода, фотоавтотрофные и фотогетеротрофные бактерии и др. Большинство из них являются микроорганизмами, обитающими в водных и почвенных средах; однако некоторые представители *Comamonadaceae* могут быть патогенами, а другие были обнаружены в дождевых червях, рубцовой жидкости и клинических образцах человека. Большинство из них являются мезофилами, хотя некоторые виды были обнаружены в антарктических условиях и горячих источниках [183, 201].

Род *Delftia* в своем составе в настоящее время насчитывает 6 видов: *D. acidovorans*, *D. deserti*, *D. lacustris*, *D. litopenaei*, *D. rhizosphaerae*, *D. tsuruhatensis*. Вышеупомянутая видовая классификация основана на полиморфизме гена 16S рРНК, а также ДНК-ДНК гибридизации. Типовым видом рода является *D. acidovorans*. Впервые он был выделен из почвы города Делфт в Нидерландах в 1926 г. С тех пор виды данного рода обнаруживаются повсеместно. Штаммы видов рода *Delftia* были выделены из почвы, обогащенной индолом и п-гидроксибензоатом, активного ила, сырой нефти, воды и различных клинических образцов, таких как моча, гной и глоточные мазки. Появляется все больше свидетельств разнообразной

метаболической активности представителей рода *Delftia* в окружающей среде, особенно в отношении деградации и минерализации ксенобиотических загрязнителей, таких как анилин, 2-хлоранилин и 3-хлоранилин [20]. Вид *Delftia tsuruhatensis* наиболее близок к таким видам как *D. lacustris* и *D. acidovorans* [136].

1.2.2 Распространенность и экология *D. tsuruhatensis*

Представители рода *Delftia* широко распространены в различных средах обитания, включая почву и сточные воды, растения, здоровых и больных животных-хозяев и человека [53, 124, 142, 146, 162, 183, 190]. Проведя филогеномное сравнение геномов различных видов *Delftia*, Bhat и соавт. идентифицировали две различные группы внутри рода, коррелирующих с источником выделения, одна из которых связана с почвами и ризосферой растений (группа *Delftia acidovorans*), а другая группа, включающая штаммы, полученные от человека и из ила, содержит *D. lacustris* и *D. tsuruhatensis*. Пангеномный анализ, включавший 61 геном *Delftia* spp., выявил открытый тип пангеном и высокую степень генетического разнообразия внутри рода: было идентифицировано более 28000 генных кластеров, из которых только 884 присутствовали во всех геномах. Эта генетическая вариабельность указывает на потенциальную экологическую универсальность и специализацию различных видов *Delftia*. В исследовании также рассматривались промышленно значимые функции *Delftia*, подчеркивалась их роль в качестве универсалов, которые могут обладать способностью адаптироваться к различным условиям окружающей среды [19]. В некоторых работах отмечается биотехнологический потенциал *Delftia* для их потенциального применения в биоремедиации и агрокомплексе (стимуляция роста растений) [7].

D. tsuruhatensis – вид бактерий, ассимилирующих терефталат, был впервые выделен из активного ила, собранного на станции очистки бытовых сточных вод в Японии [155]. Этот граммотрицательный микроорганизм с короткой палочковидной формой играет решающую роль в разложении

терефталата, широко используемого ароматического соединения при производстве полиэтилентерефталата (ПЭТ). Ни один из представителей рода *Delftia* ранее не демонстрировал способность разлагать терефталат. Терефталат представляет собой ароматическое соединение, используемое в производстве полиэтилентерефталата (ПЭТ), и входит в число 50 самых широко производимых химических веществ в мире. При производстве пластиковых бутылок и очистке терефталевой кислоты выбрасывается большое количество терефталата, поэтому биологическая деградация этого соединения представляет большой интерес. Ферментативная система, ответственная за разложение терефталата, была тщательно изучена. У *D. tsuruhatensis* терефталат расщепляется до протокатехуата под действием терефталат-1,2-диоксигеназной системы (TERDOS), а затем протокатехуат метаболизируется по пути мета-расщепления [155].

Способность *D. tsuruhatensis* использовать терефталат в качестве единственного источника углерода и энергии делает его ключевым фактором биологического разложения этого соединения, которое часто выделяется в больших количествах при производстве и очистке ПЭТ. Обогащение активного ила *D. tsuruhatensis* позволяет предположить, что эта бактерия может быть важным компонентом микробных сообществ, участвующих в очистке промышленных сточных вод, что подчеркивает ее потенциал для биотехнологического применения в восстановлении окружающей среды, загрязненной терефталатами.

Примечательно, что *D. tsuruhatensis* как и *E. anophelis* была также обнаружена в составе микробиоты кишечника москитов. Более того, был показан ингибирующий эффект данной бактерии на развитие *Plasmodium falciparum*. *D. tsuruhatensis* способна синтезировать гидрофобное вещество, названное harman, которое и обладает свойствами ингибирования развития женских гамет малярийного плазмодия. Было обнаружено, что harman является контактным ядом, который также может проникать через кутикулу комаров и убивать развивающихся малярийных паразитов. Проведенные

полевые испытания в Буркина-Фасо (Африка) в сочетании с модельными исследованиями показали, что бактерия может быть использована в местах размножения комаров в качестве компонента борьбы с малярией [74].

1.2.4 Случаи инфицирования человека *D. tsuruhatensis*

Delftia tsuruhatensis является оппортунистическим патогеном. Ранее этот вид главным образом изучался лишь в экологических целях (разложение органических загрязнителей, стимуляция роста растений) и редко выявлялся у людей в качестве инфекционного агента. Однако сообщалось, что близкий вид *Delftia acidovorans* вызывает связанную с катетером бактериемию, эндокардит, инфекции глаз и мочевыводящих путей [21, 145].

Первый официально зафиксированный случай заражения человека *D. tsuruhatensis* был зарегистрирован в 2011 году. 53-летняя женщина с тяжелой идиопатической легочной гипертензией поступила в поликлинику с гриппоподобными симптомами, ознобом и ухудшением общего состояния. В течение последних 18 месяцев ее лечили непрерывным внутривенным введением препаратов через нетуннелируемый центральный венозный катетер (ЦВК), расположенный в правой подключичной вене. Впоследствии из ЦВК был выделен штамм *D. tsuruhatensis* IMM1. При определении его антибиотикочувствительности диско-диффузионным методом большие зоны ингибирования наблюдались при применении амоксициллина-клавуланата, пиперациллина-тазобактама, цефтриаксона, цефтазидима, цефотаксима, цефепима, цiproфлоксацина, левофлоксацина, имипенема, меропенема и эртапенема, тогда как микроорганизм был признан устойчивым к ампициллину, цефалотину, цефуроксиму, гентамицину, тобрамицину, амикацину и колистину из-за отсутствия зоны ингибирования. Хинолоны, а именно цiproфлоксацин, обладают широким спектром активности в отношении аэробных грамотрицательных микроорганизмов, включая грамотрицательные палочки неферментирующие глюкозу, поэтому пациентку начали лечить цiproфлоксацином. Состояние больной быстро улучшилось, исчезли лихорадка и озноб, а после ее перевели на домашнее лечение.

Повторное амбулаторное наблюдение в течение следующих 12 недель показало стабильное клиническое состояние без каких-либо осложнений [142].

Еще один случай инфицирования человека *D. tsuruhatensis* был зарегистрирован в 2015 году. У недоношенной девочки была врожденная патология сердца, по поводу которой в 4-месячном возрасте была произведена операция по установке кардиостимулятора. Через два дня после операции у младенца развилась пневмония, связанная с гипоксией после ИВЛ, что потребовало взятия проб аспирации бронхов, которые были отправлены в лабораторию клинической микробиологии для анализа. Колонии *D. tsuruhatensis* были выделены в чистой культуре. Идентификация проводилась с помощью анализа последовательности гена 16S рРНК. Определение чувствительности к противомикробным препаратам методом МПК (минимальная подавляющая концентрация, мг/мл) показало, что штамм устойчив к амоксициллину и амоксициллину-клавуланату, но чувствителен к цефтриаксону, эртапенему, имипенему и офлоксацину. Девочке было назначено лечение цефтазидимом в течение 10 дней. Через месяц у ребенка появилась лихорадка; рентгенограмма грудной клетки выявила пневмонию. Была начата терапия имипенемом, ванкомицином и амикацином. После выделения из проб аспирации бронхов *D. tsuruhatensis* лечение было скорректировано – начали вводить аэрозоль тобрамицина. В дальнейшем самочувствие больной постепенно ухудшалось. Она умерла в возрасте 6 месяцев, через 12 дней после последнего выделения *D. tsuruhatensis*. Повторные выделения микроорганизма от одного и того же больного исключают возможную контаминацию. Кроме того, клинические признаки, такие как пневмония с вентилятор-ассоциированной гипоксией, скорее подтверждают инфекцию, чем колонизацию. Однако у пациентки развилась рецидивирующая пневмония, несмотря на успешную первую терапию цефтазидимом [145].

В исследовании Alexandre Ranc и соавт. было подсчитано, что всего за период с 2008 до 2015 года в госпиталях Марселя (Франция) микроорганизм *D. tsuruhatensis* был выделен 13 раз у 11 пациентов из образцов дыхательных путей. Учитывая наличие сосудистого катетера и пребывание в больнице более 48 часов, все зарегистрированные случаи инфекции были связаны с оказанием медицинской помощи. Скорее всего, случаев заражения человека *D. tsuruhatensis* было больше, но из-за частой ошибочной идентификации *D. tsuruhatensis* как *D. acidovorans*, их не удалось выявить [45].

Таким образом, *D. tsuruhatensis* является новым патогеном, по крайней мере, у пациентов с ослабленным иммунитетом. На сегодняшний момент было показано, что данный микроорганизм может вызывать инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи.

1.2.6 Чувствительность к противомикробным препаратам и гены устойчивости к антибиотикам *D. tsuruhatensis*

Различные штаммы *D. tsuruhatensis* проявляют устойчивость к бета-лактамам, аминогликозидным, тетрациклиновым и сульфаниламидным антибиотикам, однако они обычно чувствительны к фениколам, фторхинолонам и макролидам [42]. Примечательно, что исследование чувствительности *D. tsuruhatensis* к антибиотикам в 2018 году показало, что выделенный из образцов бронхов недоношенного ребенка штамм был отнесен к категории устойчивых к амоксициллину-клавуланату (МПК >256 мг/л). Это свидетельствует о потенциальной эволюции лекарственной устойчивости штаммов *D. tsuruhatensis* [45].

В целом данные по конкретным факторам устойчивости *D. tsuruhatensis* ограничены. В исследовании Cong Cheng и соавт. описываются геномные характеристики штамма *D. tsuruhatensis* TR1180, выделенного из образца мокроты пациентки из Китая. С помощью филогенетического анализа и анализа средней нуклеотидной идентичности (ANI) TR1180 был идентифицирован как представитель вида *D. tsuruhatensis*. Геном TR1180 состоит из единственной кольцевой хромосомы размером 6711018 п.о.

Анализ показал, что TR1180 проявляет устойчивость к бета-лактамам, аминогликозидным, тетрациклиновым и сульфаниламидным антибиотикам, оставаясь при этом чувствительным к фениколам, фторхинолонам и макролидам. Примечательно, что штамм содержал 17 генов, связанных с устойчивостью к антибиотикам (*bla*_{OXA-118}, *oqxB*, *dfrA16*, *aac(6')*-Ib3, *aadA2*, *2sull1*, *floR*, *tet(G)* и др.), а также гены устойчивости к тяжелым металлам, что коррелирует с его профилем чувствительности к противомикробным препаратам. Геномный анализ штамма TR1180 выявил уникальную и важную особенность в виде наличия геномного островка длиной 38 тыс. п.о., окруженного парой прямых повторов длиной 29 п.о. Этот островок содержал In4-подобный интегрон, который включал специфические гены устойчивости к антибиотикам. Интегроны – это генетические элементы, которые играют одну из ключевых ролей в приобретении и распространении генов устойчивости к антибиотикам среди бактерий. Присутствие этого In4-подобного интегрона в геномном островке TR1180 указывает на механизм, с помощью которого *D. tsuruhatensis* потенциально приобретает и переносит гены устойчивости, что способствует его множественной лекарственной устойчивости. Поиск BLAST в базе данных нуклеотидов GenBank NCBI показал, что общая структура In4-подобного элемента у *D. tsuruhatensis* TR1180 напоминает структуру таковых у представителей трех разных порядков: *Neisseriales*, *Burkholderiales* и *Enterobacterales*. Это свидетельствует о наличии горизонтального переноса генов у *D. tsuruhatensis*, что является основным фактором генетического разнообразия бактерий. Сходство In4-подобных элементов у разных штаммов предполагает, что горизонтальный перенос генов In4-подобных элементов может происходить не только среди близких представителей, но и среди филогенетически отдаленных друг от друга бактерий [42].

Пангеномный анализ *D. tsuruhatensis*, проведенный Zhiqiu Yin и соавт. выявил наличие разнообразных мобильных генетических элементов, массивных геномных перестроек и горизонтального переноса генов, что

свидетельствует о генетической пластичности, проявляемой *D. tsuruhatensis*. Было обнаружено 1573 генных кластеров, участвующих в горизонтальном переносе генов (11,3% от общего числа кластеров), из которых 662 принадлежали коровому геному, 623 - дополнительному геному и 288 были штамм-специфичными кластерами. Горизонтальный перенос генов был идентифицирован как важнейший механизм, формирующий генетическое разнообразие *D. tsuruhatensis* и способствующий формированию различных геномных признаков, в том числе устойчивости к антибиотикам [188]. В связи с этим, можно сделать вывод, что спорадический горизонтальный перенос генов может быть основным фактором приобретения *D. tsuruhatensis* устойчивости к антимикробным препаратам [195].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Выделение изолятов бактерий из проб сырого молока, идентификация, определение профиля чувствительности

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.

2.1.1 Выделение общего пула грамотрицательных бактерий

Образцы непастеризованного молока серийно разбавляли и высевали на агар Эндо. После 20-24 ч инкубации при 37 °С выросшие колонии в независимости от признака ферментации лактозы были пересеяны твердую среду ТСА (HiMedia, Индия) для получения чистых культур. С целью проверки чистоты культур проводили окрашивание по Граму и световую микроскопию мазков. Дополнительно определяли первичные свойства. Для определения оксидазной активности использовали тест-полоски ОХИ-тест (Erba Lachema, Брно, Чехия). Для определения каталазной активности использовали 3% раствор перекиси водорода. Чистые культуры хранили при -80 °С в ТСБ (HiMedia, Индия) с 15% глицерином. Общая схема выделения представлена на Рисунке 3.

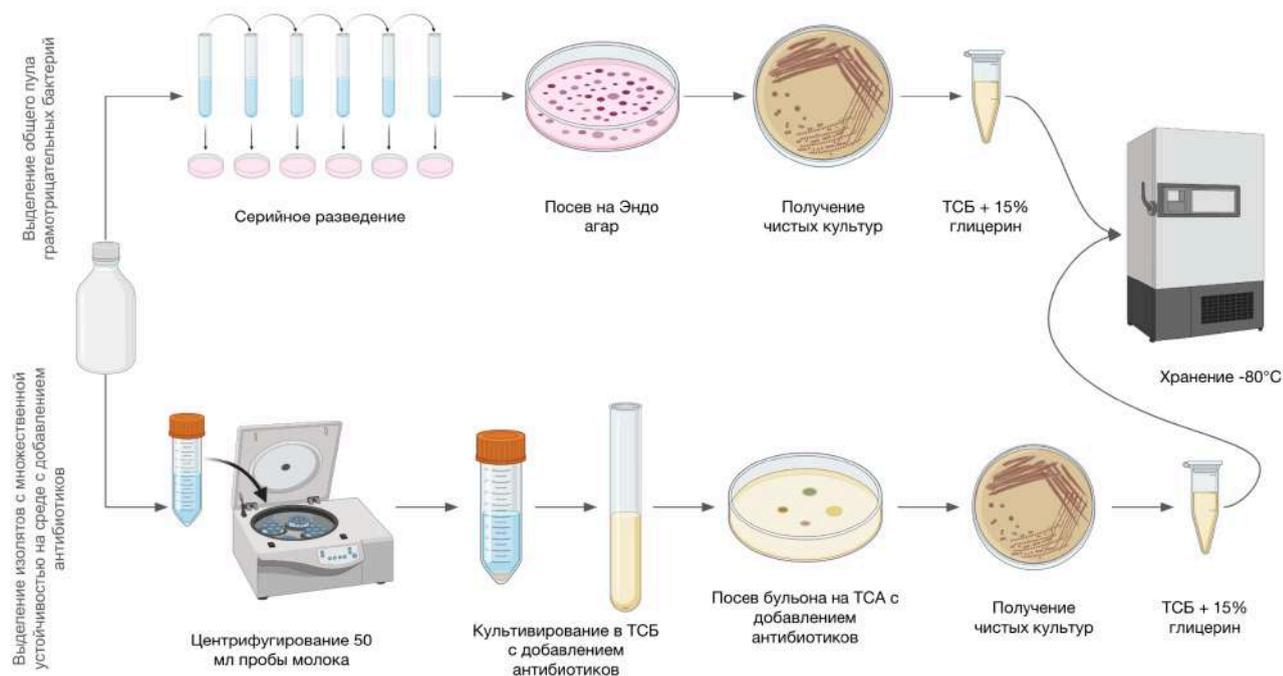


Рисунок 3. Схема выделения общего пула грамотрицательных бактерий (сверху) и изолятов с множественной лекарственной устойчивостью (снизу).

2.1.2 Выделение изолятов с множественной устойчивостью на среде с добавлением антибиотиков

Для седиментации и концентрирования бактериальной массы 50 мл пробы молока центрифугировали при 8000 об/мин в течение 15 мин. Затем осадок разбавляли 2,5 мл фосфатного буферного раствора с pH 7,2 (HiMedia, Индия) и смешивали с 2,5 мл ТСВ (HiMedia, Индия) с добавлением антибиотиков для придания селективных свойств. Использовали следующие препараты в конечной концентрации: 50 мкг/мл ампициллина, 25 мкг/мл гентамицина, 25 мкг/мл канамицина. Для ингибирования роста грибов использовали 50 мкг/мл флуконазола в среде. Ампициллин был выбран как представитель бета-лактамов со сравнительно широким антимикробным спектром (повышенная активность в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий) [148]. Гентамицин (II поколение аминогликозидов) и канамицин (I поколение аминогликозидов) были использованы в качестве представителей аминогликозидов для расширения

спектра действия благодаря синергическому эффекту *in vitro* с ампициллином [171]. Полученный бульон инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. После инкубации бульон высевали на ТСА (HiMedia, Индия) также с добавлением указанных выше концентраций противомикробных препаратов. Инокулированные чашки инкубировали при 37 °С в течение 18-24 часов. Видимые колонии дополнительно проверяли на чистоту с помощью окрашивания по Граму и микроскопии. Дополнительно определяли первичные свойства. Для определения оксидазной активности использовали тест-полоски ОХИ-тест (Erba Lachema, Брно, Чехия). Для определения каталазной активности использовали 3% раствор перекиси водорода. Исходную культуру перед использованием хранили при -80 °С в ТСБ (HiMedia, Индия) с 15% глицерином. Общая схема выделения представлена на рисунке 3.

2.1.3 Идентификация выделенных изолятов

Идентификацию изолятов бактерий проводили методом секвенирования и анализа последовательности гена 16S рРНК. Данный метод обладает сравнительно высокой точностью и подходит для идентификации большинства видов бактерий [161]. Бактериальную ДНК выделяли из суточных культур, используя набор для выделения “ДНК-сорб-В” (AmpliSens, Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Для проведения ПЦР использовали амплификатор T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Для амплификации гена 16S рРНК использовали универсальные праймеры 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' и 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' [180].

Итоговая ПЦР смесь (25 мкл) содержала:

- 18,5 мкл деионизованной свободной от нуклеаз воды;
- 2,5 мкл 10X Encyclo буфера, 0,5 мкл dNTP (дезоксинуклеотидов) (по 10 мМ каждого основания);
- 1 мкл прямого (Forward) праймера (10 пкмоль);

- 1 мкл обратного (Reverse) праймера (10 пкмоль);
- 0,5 мкл термостабильной ДНК-полимеразы 50X Encyclo «Евроген» (Россия);
- 1 мкл целевой ДНК.

Все компоненты смеси тщательно перемешивали при помощи мини-центрифуги/вортекса Микроспин FV-2400 (BioSan, Латвия). Для постановки ПЦР использовали следующий режим на 30 циклов:

- Денатурация 95 °С, 30 сек.;
- Отжиг 55 °С, 40 сек.;
- Элонгация 72 °С, 1 мин. 30 сек.

Результаты ПЦР оценивали с помощью метода горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Целевые фрагменты размером ~1500 пн были вырезаны из геля. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора diaGene (ДИА-М, Россия). Концентрацию ДНК после очистки оценивали визуально методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле. Секвенирование ампликонов было проведено Центром коллективного пользования «ГЕНОМ» на коммерческой основе. Пробоподготовку образцов для проведения секвенирования проводили также согласно рекомендациям Центра коллективного пользования «ГЕНОМ».

Для проведения биоинформатического анализа полученных прочтений пользовались программным обеспечением Unipro UGENE [134]. В программу загружали файлы, содержащие чтения по направлению прямого праймера (Forward) (5'-3') и обратного праймера (Reverse) (3'-5'), оценивали качество полученной хроматограммы. Выделяли участок с хорошим качеством прочтения (области с чистым, неперекрывающимся сигналом) по направлению прямого и обратного праймеров (последний предварительно конвертировали в направлении от 5' к 3' концу и комплементировали – reverse/complement), создавали 2 последовательности и выравнивали

прочтения друг на друга с помощью алгоритма попарного локального выравнивания Смита-Ватермана. В итоге получали перекрывающиеся области, тем самым собирали консенсусную последовательность. Для определения таксономической принадлежности использовали курируемую базу данных референсных последовательностей генов 16S рРНК - EZBioCloud [196]. Достоверной идентификацией считали процент нуклеотидной идентичности последовательности $>99,5\%$, при длине консенсуса ≥ 1300 пар нуклеотидов [161].

2.2 Отбор штаммов для рабочей панели

На основании анализа таксономического разнообразия выделенных штаммов в рабочую панель было отобрано два наиболее актуальных микроорганизма для дальнейшего исследования: *Elizabethkingia anophelis* ML-44 и *Delftia tsuruhatensis* MR-6/3H. Согласно литературным данным, данные виды бактерий являются возбудителями эмерджентных инфекций и обладают фенотипом множественной лекарственной устойчивости [19, 41, 72, 110]. Более того, выделение этих микроорганизмов из такого источника, как сырое молоко, описано в единичных публикациях (для *D. tsuruhatensis*) либо не описано вовсе (для *E. anophelis* ML-44). Биологические свойства этих микроорганизмов, особенно штаммов, выделенных из молока, также остаются малоизученными [3, 87, 145].

2.3 Определение чувствительности целевых штаммов *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H

Оценку чувствительности бактерий к антимикробным препаратам проводили по методу Кирби-Бауэра в соответствии с рекомендациями EUCAST. Использовали агар Мюллера-Хинтона (МХА) без добавления дополнительных ингредиентов.

В связи с тем, что штаммы *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H, отобранные для исследования, мало изучены, в EUCAST

отсутствуют указания по выбору тестовых антибиотиков. Однако в данном мануале описывается порядок действий в подобных ситуациях. EUCAST позволяет интерпретировать результаты диско-диффузионного теста для неисследованных видов: в этом случае разрешается интерпретировать размеры зон ингибирования по наиболее таксономически близкому представителю. Кроме того, в связи с малой изученностью упомянутых видов, нами был максимально расширен спектр антибиотиков для тестирования.

Для определения чувствительности штамма *E. anophelis* ML-44 были использованы следующие антибиотики (33 в сумме): канамицин (30 мкг), неомицин (30 мкг), гентамицин (10 мкг), тобрамицин (10 мкг), амикацин (30 мкг), амоксициллин-клавуланат (20-10 мкг), ампициллин (10 мкг), азтреонам (30 мкг), пиперациллин-тазобактам (30-6 мкг), тикарциллин (75 мкг), пиперациллин (30 мкг), тикарциллин-клавуланат (75-10 мкг), цефтазидим (10 мкг), цефотаксим (5 мкг), цефепим (30 мкг), имипенем (10 мкг), меропенем (10 мкг), пенициллин G (1 единица), клиндамицин (2 мкг), кларитромицин (15 мкг), эритромицин (15 мкг), тилозин (15 мкг), левофлоксацин (5 мкг), энрофлоксацин (5 мкг), ципрофлоксацин (5 мкг), налидиксовая кислота (30 мкг), триметоприм (5 мкг), рифампицин (5 мкг), линезолид (30 мкг), хлорамфеникол (30 мкг), тетрациклин (30 мкг), триметоприм-сульфаметоксазол (1,25–23,75 мкг) и полимиксин (300 ед). Пограничные значения (ПЗ) чувствительности к синегнойной палочке были экстраполированы для большинства противомикробных препаратов из-за отсутствия ПЗ для рода *Elizabethkingia*. Для интерпретации макролидов (кларитромицин, эритромицин, тилозин) использовали ПЗ *Campylobacter jejuni*; для клиндамицина, линезолида *Enterococcus* spp.; для рифампицина, налидиксовой кислоты и триметоприм-сульфаметоксазола *Haemophilus influenzae*, а для тетрациклина *Yersinia enterocolitica*.

Для определения чувствительности штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H были использованы следующие антибиотики (23 в сумме): ампициллин (10

мкг), амоксициллин-клавулановая кислота (20-10 мкг), азтреонам (30 мкг), меропенем (10 мкг), имипенем (10 мкг), цефтобипрол (5 мкг), цефотаксим (5 мкг), цефепим (30 мкг), цефтазидим (10 мкг), пиперациллин (30), пиперациллин-тазобактам (100-10 мкг), тикарциллин (75 мкг), тикарциллин-клавулановая кислота (75-10 мкг), гентамицин (10 мкг), амикацин (30 мкг), тобрамицин (10 мкг), канамицин (30 мкг), неомицин (10 мкг), ципрофлоксацин (5 мкг), левофлоксацин (5 мкг), хлорамфеникол (30 мкг), тетрациклин (30 мкг), триметоприм-сульфаметоксазол (1,25-23,75 мкг). Поскольку для представителей рода *Delftia* в EUCAST 2022 нет ПЗ для интерпретации результатов ДДМ были использованы следующие ПЗ: *Burkholderia pseudomallei*, *Enterobacteriales*. В качестве эталонного штамма для контроля качества использовали *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

После инкубации проводили измерение зон подавления роста бактерий. Ориентировались на зону полного подавления роста микроорганизмов, определяемую невооруженным глазом, при расположении чашки на расстоянии примерно 30 см от глаз над черной матовой поверхностью при рассеянном освещении. Измерение диаметра зон подавления проводили с точностью до миллиметра при помощи специализированной линейки (Himedia, Индия).

2.4 Определение гемолитической активности *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H

Гемолитическая активность бактерий обусловлена экспрессией гемолизинов – цитотоксических белков, вызывающих лизис эритроцитов и зачастую других эукариотических клеток. Для определения гемолитической активности использовали основу колумбийского кровяного агара (Himedia, Индия) с с 5% (об.-об.) кроличьей крови и кровяным агаром с 5% овечьей кровью – для *E. anophelis* ML-44 и с 5% крови человека I группы – для *D. tsuruhatensis* MR-6/3H. Суточные культуры штаммов *E. anophelis* ML-44 и *D.*

tsuruhatensis MR-6/3H высевали штрихом на поверхность агара и инкубировали в течение 48 ч при 37 °С. Положительную реакцию расценивали как четкую зону лизиса эритроцитов (бета-гемолиз) или изменение цвета (альфа-гемолиз). Отсутствие гемолитической активности расценивали как гамма-гемолиз.

2.5 Полногеномное секвенирование, сборка и аннотация геномов

Геномную ДНК выделяли из суточных культур *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H с помощью набора QIAamp (Qiagen) в соответствии с инструкцией производителя. Качество выделенной ДНК оценивали визуально с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле. Концентрацию ДНК оценивали флуориметрическим методом с использованием набора Qubit dsDNA BR Assay Kit (Fisher Scientific) на флуориметре Qubit 3.0 (Fisher Scientific). Полученный образец ДНК был секвенирован на платформе Illumina HiSeq 1500 (Illumina) методом парных чтений длиной 150 п.о. в ООО “Геноаналитика” (Москва, Россия).

Биоинформатическую обработку результатов секвенирования проводили на он-лайн сервере Galaxy Europe [6]. Оценку качества полученных парных библиотек прочтений оценивали с использованием программного обеспечения FastQC 0.11.9 [205]. Библиотеки были обрезаны (тримминг) с помощью программного обеспечения Trimmomatic 0.4.8 с использованием автоматического режима удаления адаптеров [23].

Прочтения собирали в контиги с использованием программного обеспечения Unicycler 0.4.8 с настройками по умолчанию. Для оценки качества сборок геномов использовали программу QUAST v5.0.2 [67]. Аннотацию полученных геномов проводили на сервере Rapid Annotations Subsystems Technology (RAST) [14, 25].

2.6 Филогенетический анализ штамма *E. anophelis* ML-44 и определение его внутривидовой принадлежности

Для проведения филогенетического анализа использовали программное обеспечение REALPHY 1.13, основанное на анализе драфт-сборок и полногеномных последовательностей [18]. Анализ проводили с параметрами по умолчанию. Для анализа штамма *E. anophelis* ML-44 было использовано 13 геномов штаммов *Elizabethkingia anophelis* различного происхождения полученных из NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Таблица 1). Среди них 7 являлись штаммами клинического происхождения или ассоциированными с человеком, 3 выделены из животных (2 из лошади и 1 из рыбы), 3 были выделены из внешней среды.

С целью подтверждения внутривидовой принадлежности был проведен OrthoANI анализ, основанный на вычислении средненуклеотидной идентичности (average nucleotide identity - ANI), с использованием программного обеспечения Orthologous Average Nucleotide Identity Software Tool (OAT) с параметрами по умолчанию. Пограничным значением для видовой идентификации считали 95% идентичности [96]. Тепловая карта значений средненуклеотидной идентичности различных штаммов была визуализирована в Tbttools [36]. Для подтверждения результатов OrthoANI анализа использовали метод *in silico* ДНК-ДНК-гибридизации с использованием инструмента Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC 3.0) на сервере Type (Strain) Genome Server (TYGS). Пограничным значением гибридации для видовой идентификации считали 70% [121]. Геном штамма ML-44 гибридовали с 20 общедоступными геномами штаммов *E. anophelis* различного происхождения. Использовали формулу 2 для оценки значений ДНК-ДНК гибридации, поскольку она не зависит от длины генома и уровня сборки генома и может быть использована как для полных, так и для драфт-сборок. Все кладограммы были визуализированы и отредактированы в iTOL v5 [100].

Таблица 1 – Список геномов штаммов *E. anopheles*, использованных для филогенетического анализа с указанием метаданных.

Идентиф. номер GenBank	Штамм	Источник	Регион/ Страна	Дата выделения
LFKT01	As1	Москит (<i>Anopheles gambiae</i>)	США	2013
CP014805.2	CSID_3015183678	<i>Homo sapiens</i>	США	2016
CP015068.2	CSID_3015183681	<i>Homo sapiens</i>	США	2016
CP016374.1	F3201	<i>Homo sapiens</i>	Кювейт	1982
CP014021.1	FDAARGOS 134	<i>Homo sapiens</i>	США	2014
CP023010.2	FDAARGOS 198	<i>Homo sapiens</i>	Швеция	НД
CP016372.1	JM-87	Кукуруза (<i>Zea mays</i>)	США	2011
FTPG01	LDVH-AR107	Карп (<i>Cyprinus carpio</i>)	Франция	2004
ASYH01	NUH1	<i>Homo sapiens</i>	Сингапур	2012
ASYI01	NUH4	<i>Homo sapiens</i>	Сингапур	2012
ASYF01	NUHP2	<i>Homo sapiens</i>	Сингапур	2012
PJMA01	OSUVM1	Стойло для лошадей	США	2016
PJLZ01	OSUVM2	Лошадь (<i>Equus caballus</i>)	США	2016
CP023401.1	R26	Москит (<i>Anopheles gambiae</i>)	Швеция	2005

2.7 Филогенетический анализ штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H и определение его видовой принадлежности

Для филогенетического анализа штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H использовали программное обеспечение REALPHY 1.13 с параметром длины считывания 150 п.о. (RL=150), что позволяет сравнивать различные виды [19]. Список геномов штаммов, использованных для филогенетического анализа отражен в Таблице 2. Штаммы были отобраны на основе их

происхождения, а представители с отсутствующим происхождением были исключены (за исключением типовых штаммов). В качестве аутгруппы использовали *Comamonas testosteroni* TK102. *Delftia acidovorans* 2167(T), *D. lacustris* LMG 24775(T) и *D. tsuruhatensis* NBRC 16741(T) были использованы в качестве референсных геномов.

Определение внутривидовой принадлежности проводили с использованием сервера Average Nucleotide Identity Matrix calculator (ANI-matrix), разработанного Kostas lab, который вычисляет средненуклеотидную идентичность (average nucleotide identity - ANI) между загруженными последовательностями в режиме "все против всех". Пограничным значением ANI считали 95% идентичности (два генома принадлежат к одному виду, если их ANI > 95%) [150]. Для подтверждения результатов ANI-анализа использовали веб-инструмент Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC 3.0) на сервере Type (Strain) Genome Server (TYGS), основанный на вычислении ДНК-ДНК-гибридизации *in silico*. Для оценки значений ДНК-ДНК гибридации использовали формулу 2. Пограничным значением гибридации для видовой идентификации считали 70% [121].

Все кладограммы были визуализированы и отредактированы в iTOL v5 [100].

Таблица 2 – список геномов штаммов *Delftia* spp., использованных для филогенетического анализа с указанием метаданных.

Идентиф. номер GenBank	Вид	Штамм	Источник/ тип источника	Хозяин/ Источник	Страна
GCF_024655835.1	<i>D. tsuruhatensis</i>	3.2.44	Животное	<i>Danio rerio</i>	США
GCF_023958235.1	<i>D. tsuruhatensis</i>	45.2.2	Животное	<i>Danio rerio</i>	США
GCF_001753225.1	<i>D. tsuruhatensis</i>	CM13	Животное	Мышь (C57BL/6)	Франция
GCF_004353655.1	<i>D. tsuruhatensis</i>	11304	Клинический	Нет данных	Сербия
GCF_023631505.1	<i>D. tsuruhatensis</i>	161/1	Клинический	<i>Homo sapiens</i>	Россия:

Идентиф. номер GenBank	Вид	Штамм	Источник/ тип источника	Хозяин/ Источник	Страна
					Самара
GCF_000710165.1	<i>D. tsuruhatensis</i>	391	Клинический	<i>Homo sapiens</i>	Китай
GCF_009362995.1	<i>D. tsuruhatensis</i>	TR1180	Клинический	<i>Homo sapiens</i>	Китай
GCF_001021565.1	<i>D. tsuruhatensis</i>	MTQ3	Внешняя среда	Ризосфера	Китай
GCF_001571325.1	<i>D. tsuruhatensis</i>	NBRC 16741	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCF_001017795.1	<i>D. lacustris</i>	LZ-C	Внешняя среда	Сточные воды нефтеперераба тывающего завода	Китай
GCF_900107225.1	<i>D. lacustris</i>	LMG 24775	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCF_903469625.1	<i>D. acidovorans</i>	conventio nal rainbow trout larvae	Животное	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (личинка радужной форели)	Франция
GCA_016790545.1	<i>D. acidovorans</i>	MAG-20 9	Внешняя среда	Ил	Китай
GCA_001969245.1	<i>D. acidovorans</i>	ANG1	Внешняя среда	Почва	США
GCF_002751115.2	<i>D. acidovorans</i>	B15	Внешняя среда	Ризосфера	Бельгия
GCA_022393415.1	<i>D. acidovorans</i>	B21-011	Внешняя среда	Сельскохозяйст венная почва	Канада
GCF_013423845.1	<i>D. acidovorans</i>	B804	Внешняя среда	Почва	Китай
GCA_018887285.2	<i>D. acidovorans</i>	D4B	Внешняя среда	Почва	США
GCF_016405945.1	<i>D. acidovorans</i>	IB36	Внешняя среда	Почва	Дания
GCF_002443055.1	<i>D. acidovorans</i>	RAY209	Внешняя среда	Рапс	Канада

Идентиф. номер GenBank	Вид	Штамм	Источник/ тип источника	Хозяин/ Источник	Страна
GCA_002346955.1	<i>D. acidovorans</i>	UBA3003	Внешняя среда	Металл	США
GCA_002484215.1	<i>D. acidovorans</i>	UBA7618	Внешняя среда	Почва	США
GCA_002483375.1	<i>D. acidovorans</i>	UBA7660	Внешняя среда	Вода	Бразилия
GCF_022117555.1	<i>D. acidovorans</i>	UTDS19-35T5	Внешняя среда	Почва	США
GCF_000741825.1	<i>D. acidovorans</i>	2167	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCF_900215545.1	<i>D. acidovorans</i>	ATCC 11299b	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCF_016027775.1	<i>D. acidovorans</i>	FDAAR GOS_891	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCF_016027075.1	<i>D. acidovorans</i>	FDAAR GOS_909	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCF_016026535.1	<i>D. acidovorans</i>	FDAAR GOS_939	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCF_003752215.1	<i>D. acidovorans</i>	JUb8	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCF_001598795.1	<i>D. acidovorans</i>	NBRC 14950	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCF_000018665.1	<i>D. acidovorans</i>	SPH-1	Нет данных	Нет данных	Нет данных
GCA_000739375.1	<i>C. testosteroni</i>	TK102	Нет данных	Нет данных	Нет данных

2.8 Сравнительный геномный анализ штаммов *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H: анализ факторов устойчивости и вирулентности

Сравнительный анализ обоих штаммов проводили с использованием веб-сервера Galaxy Europe [6].

Для анализа штамма *E. anophelis* ML-44 использовали панель геномов 7 штаммов, включая ML-44. Факторы вирулентности и детерминанты устойчивости к противомикробным препаратам были предсказаны среди 14

штаммов *E. anophelis* с использованием программного обеспечения BLASTp 2.12.0 и базы данных факторов вирулентности Virulence Factor Database (VFDB) [111], а также базы данных генов устойчивости The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) соответственно [10]. Были установлены следующие параметры отсечки поиска: Bitscore > 100, E-value $\leq 1 \times 10^{-30}$, Identity > 40%, Query Coverage > 50. Данные параметры использовались в обоих поисках (VFDB и CARD). Гены субъединицы А гиразы (*gyrA*) выравнивали с помощью UGENE 39.0 [134], используя алгоритм ClustalW 2.0 [94].

Для анализа штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H использовали панель геномов 11 штаммов видов *D. tsuruhatensis*, *D. lacustris*, *D. acidovorans*, включая штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H (MR-6/3H, 161/1, 11304, 391, TR1180, 45.2.2, CM13, NBRC 16741(T), MTQ3, LZ-C, LMG 24775). Факторы устойчивости и вирулентности были предсказаны с помощью программного обеспечения BLASTp v2.12.0 и базы данных факторов вирулентности VFDB [111], а также базы данных генов устойчивости CARD соответственно [10]. В обоих случаях использовались следующие параметры отсечки поиска: Bitscore >100, E-value $\leq 1e-30$, Identity $\geq 60\%$, Query Coverage $\geq 80\%$.

Ассоциацию предсказанных факторов устойчивости с мобильными генетическими элементами обоих штаммов проводили с использованием открытых репозиторий программного обеспечения предустановленных на локальный персональный компьютер с системой Linux Ubuntu 24.04. Следующие типы мобильных генетических элементов были включены в поиск: геномные острова [18], плазмиды [200], профаговые геномы (элементы) [11] и интегроны [131]. Обнаруженные последовательности были функционально аннотированы [13, 25] и использованы для поиска факторов устойчивости по идентичной схеме, описанной выше.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изоляты бактерий, выделенные из образцов сырого молока

Используя подход общего выделения и выделения на среде, содержащей антибиотики, всего из 72 проб, было выделено 120 изолятов бактерий из них: 113 грамотрицательных и 7 грамположительных (Рисунок 4). 88 изолятов было выделено методом общего выделения на агаре Эндо, 32 изолята было выделено на среде с антибиотиками (Рисунок 5).

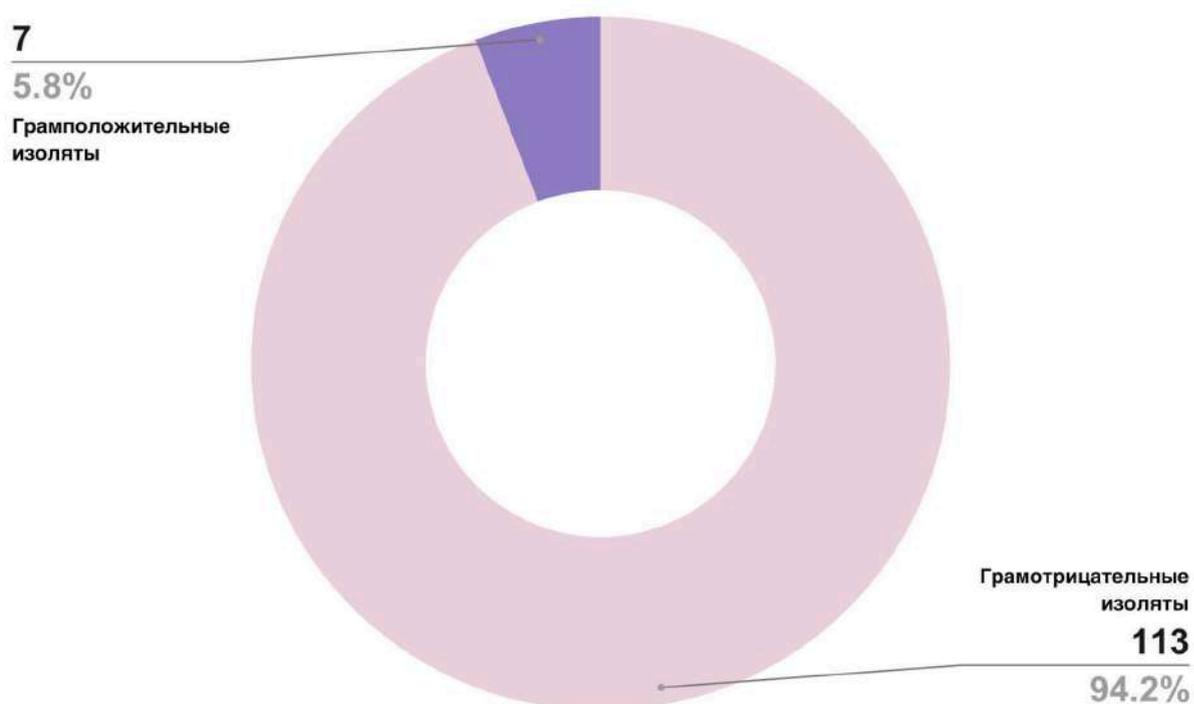


Рисунок 4. Диаграмма соотношения выделенных изолятов двумя подходами в отношении окраски по Граму: грамотрицательные - розовым, грамположительные - фиолетовым.

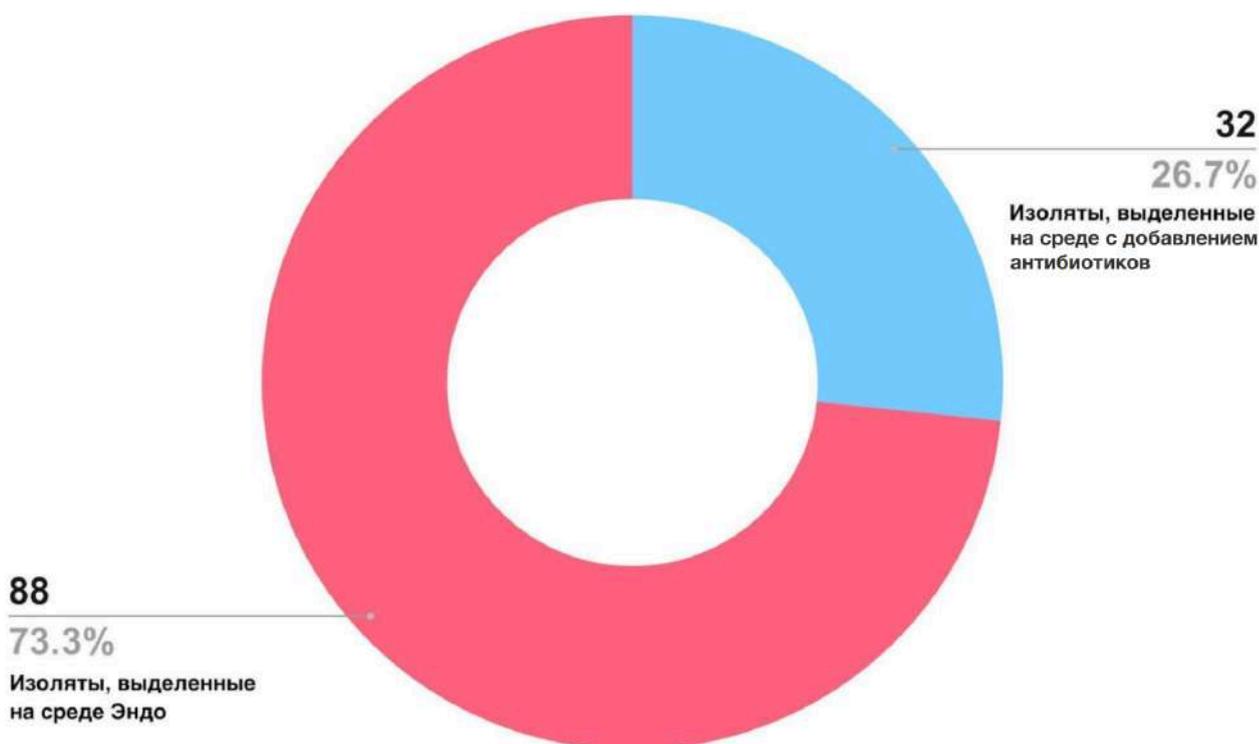


Рисунок 5. Диаграмма соотношения выделенных изолятов двумя подходами: общее выделение на агаре Эндо - красным, выделение на среде с добавлением антибиотиков - голубым.

3.1.1 Таксономическое разнообразие штаммов, выделенных из сырого молока

Выделенные изоляты были идентифицированы с помощью метода секвенирования и анализа последовательности гена 16S рРНК. Таксономическое разнообразие идентифицированных штаммов отражено в таблице 3.

Среди изолятов, выделенных на агаре Эндо (всего 88 изолятов) 89,7% (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*. ~1% (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 3 – 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. murliniae</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 [20, 42, 110]. Данные микроорганизмы либо выделялись в единичных случаях на территории России [154], либо были выделены впервые в рамках данной работы. В целом, информация о данных возбудителях крайне ограничена, особенно в отношении их механизмов устойчивости и вирулентности [39], а также резервуаров, путей и механизмов передачи [3, 87, 145]. 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 [95]. 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 [154]. 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 [108, 177].

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

3.2.1 Характеристика штамма *Elizabethkingia anophelis* ML-44

3.2.1.1 Выделение и идентификация штамма *E. anophelis* ML-44

Штамм ML-44 был выделен в ходе мониторинговых исследований из пробы сырого коровьего молока, полученного от розничных продавцов в г. Нижний Новгород, Россия. Единичные морфологически отличные колонии были отобраны с агара Эндо и пересеены на триптон-соевый агар (ТСА) (HiMedia, Индия) для получения чистой культуры. 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 грамотрицательных бацилл (Рисунок 6). 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. Чтения последовательности были получены с помощью универсальных праймеров 27f и 1492r. 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. Культура была обозначена как *E. anophelis* ML-44.

В дополнение к *E. anophelis* ML-44 из того же образца молока были выделены *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter aerogenes*.

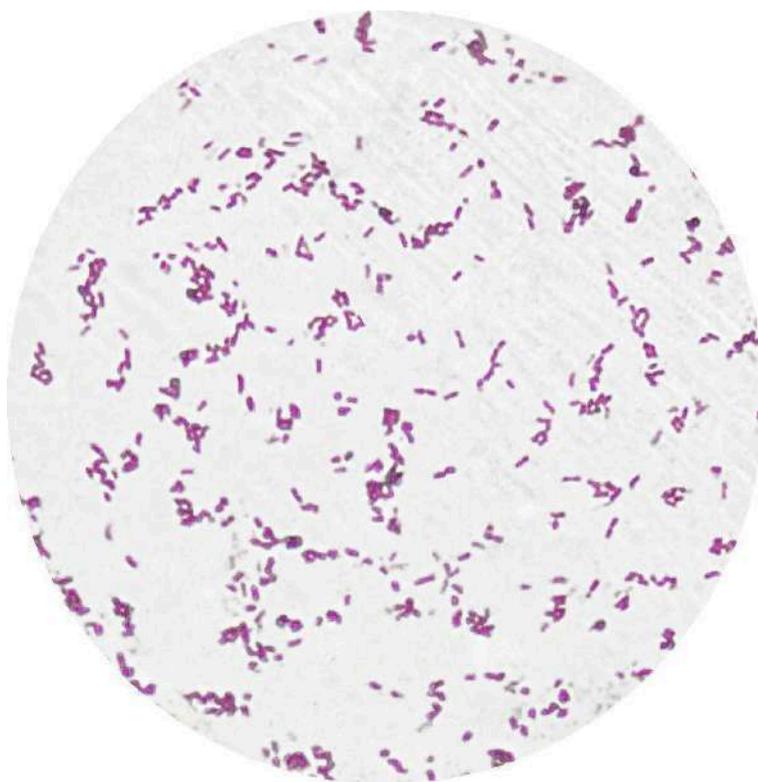


Рисунок 6. Микроскопия мазка штамма *E. anophelis* ML-44, окрашенного по Граму (увеличение x1600).

3.2.1.2 Характеристика биохимических и физиологических свойств *E. anophelis* ML-44

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.

Полученный биохимический профиль штамма ML-44 практически полностью совпадал с профилем штамма *E. anophelis* R26, за исключением продукции кислоты при росте на сахарозе, целлобиозе и лактозе (Таблица 4). Это указывает на более низкую метаболическую активность штамма ML-44, а также на внутривидовую вариабельность данных признаков.

Таблица 4 – Биохимические характеристики штамма *Elizabethkingia anophelis* ML-44 в сравнении с типовым штаммом *E. anophelis* R26

Характеристика	<i>E. anophelis</i> ML-44	<i>E. anophelis</i> R26
Оксидаза	+	+
Каталаза	+	+
Гидролиз эскулина	+	+
β -галактозидазная активность (ОНПГ)	+	+
Уреазная активность	-	-
Аргининдигидролаза	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	-	-
Лизиндекарбоксилаза	-	-
Производство H ₂ S	-	-
Цитрат Симмонса	-	-
Утилизация малоната	-	-
Активность β -ксилозидазы	-	-
Продукция кислоты из:		
Трегалоза	+	НД
Маннитол	+	+
Салицин	-	НД
Сорбит	-	-

Таблица 4 – Биохимические характеристики штамма *Elizabethkingia anophelis* ML-44 в сравнении с типовым штаммом *E. anophelis* R26

Характеристика	<i>E. anophelis</i> ML-44	<i>E. anophelis</i> R26
Мелибиоза	-	-
Целлобиоза	-	+
Лактоза	-	+
Дульцитол	-	НД
Арабитол	-	НД
Сахароза	-	+
Инозитол	-	-
Раффиноза	-	-

Примечание: НД — нет данных.

3.2.1.3 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 Таблице 5. 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 тетрациклин. Штамм был чувствителен к рифампицину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, энрофлоксацину и линезолиду.

На основании полученного профиля чувствительности штамм был расценен, как имеющий множественную лекарственную устойчивость (Multidrug-resistant, MDR, МЛУ) [113].

Таблица 5 – Антибиотики, использованные для оценки чувствительности штамма *E. anophelis* ML-44: профиль чувствительности с указанием ДЗПР (диаметров зон подавления роста)

Класс антибиотиков	Антибиотик	Интерпретация	ДЗПР, мм
Аминогликозиды			
	Амикацин	У	0
	Гентамицин	У	0
	Канамицин	У	0
	Неомицин	У	0
	Тобрамицин	У	0
β-лактамы: пенициллины			
	Пенициллин	У	0
	Ампициллин	У	0
	Тикарциллин	У	0
	Пиперациллин	У	14
	Амоксициллин-клавуланат	У	0
	Тикарциллин-клавуланат	У	13
	Пиперациллин-тазобактам	У	16
β-лактамы: цефалоспорины			
	Цефтазидим	У	0
	Цефотаксим	У	0
	Цефепим	У	10
β-лактамы: карбапенемы			
	Имипенем	У	0
	Меропенем	У	0
β-лактамы: монобактамы			
	Азтреонам	У	0

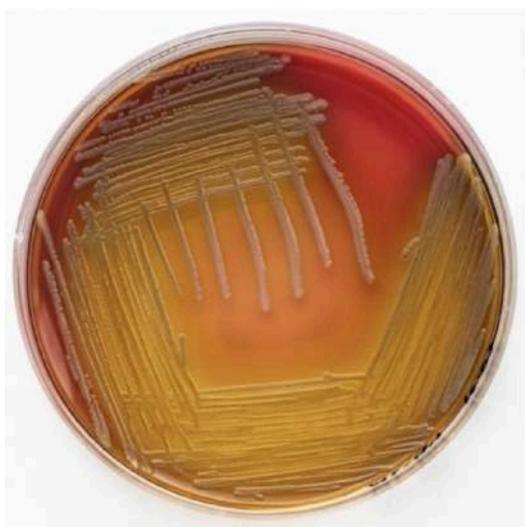
Таблица 5 – Антибиотики, использованные для оценки чувствительности штамма *E. anophelis* ML-44: профиль чувствительности с указанием ДЗРП (диаметров зон подавления роста)

Класс антибиотиков	Антибиотик	Интерпретация	ДЗРП, мм
Фторхинолоны			
	Ципрофлоксацин	Ч	32
	Левифлоксацин	Ч	30
	Энрофлоксацин	И	28
	Налидиксовая кислота	У	18
Макролиды			
	Кларитромицин	У	20
	Эритромицин	У	19
	Тилозин	У	13
Прочие			
	Линезолид	Ч	22
	Рифампицин	Ч	20
	Тетрациклин	У	18
	Триметоприм	У	13
	Триметоприм-сульфаметоксазол	У	0
	Хлорамфеникол	У	0
	Клиндамицин	У	17
	Полимиксин В	У	0

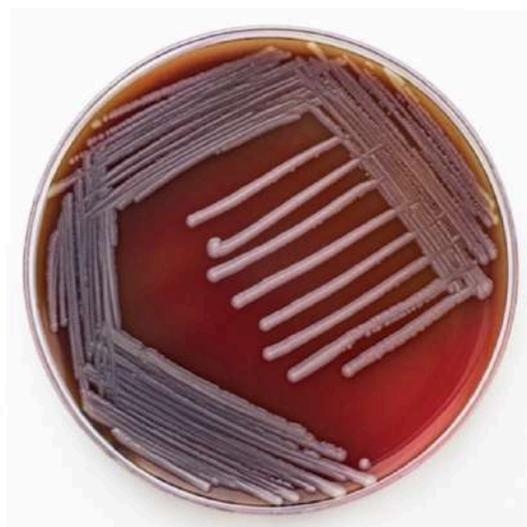
Примечание: ДЗРП – Диаметр зоны подавления роста, Ч – чувствительный при стандартном режиме дозирования, И – чувствительный при повышенной экспозиции, У – устойчивый.

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

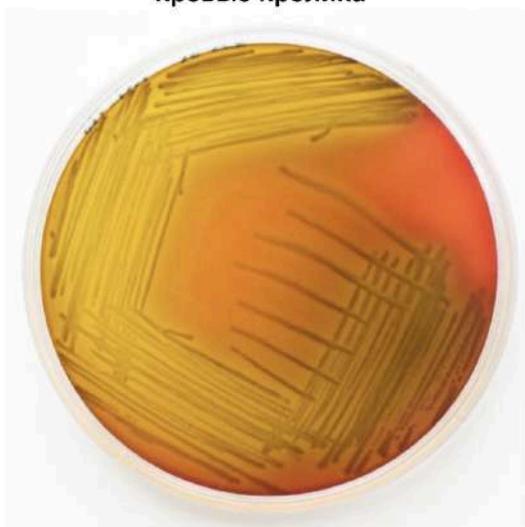
После 48 часов инкубации культуры ML-44 на кровяном агаре с добавлением 5% крови кролика и барана были обнаружены зоны α -гемолиза (изменение цвета среды). Зоны гемолиза были более заметны на агаре с кровью кролика. Гемолитический эффект в отношении эритроцитов барана был менее заметен и имел запаздывающий характер. Отчетливые зоны α -гемолиза были заметны только при механическом удалении биомассы микроба (зоны располагались прямо под колониями). Также при росте на кровяном агаре штамм ML-44 не синтезировал желтый пигмент: колонии были белыми, полупрозрачными (Рисунок 7).



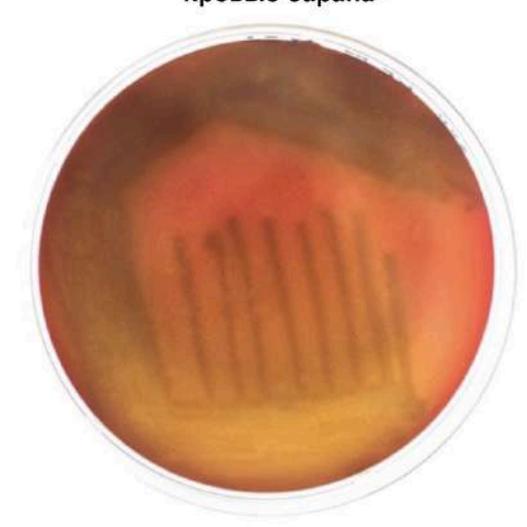
Кровяной агар с 5% кровью кролика



Кровяной агар с 5% кровью барана



Кровяной агар с 5% кровью кролика
(фотография чашки снизу)



Кровяной агар с 5% кровью барана
(фотография чашки снизу)

Рисунок 7. Штамм *E. anophelis* ML-44 на кровяном агаре с добавлением 5% крови кролика (слева) и 5% крови барана (справа) после 48-часовой инкубации при 37 °С.

3.2.1.5 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. Сборка генома *E. anophelis* ML-44 была депонирована в базу данных GenBank под следующим номером доступа JAJNCD000000000.1.

В ходе функциональной аннотации обнаруженные ОРС были распределены по подсистемам. Подсистема – это набор функционально-связанных ролей отдельного набора ОРС. Часто ОРС, принадлежащие одной подсистеме, участвуют в конкретном биологическом процессе, например, синтезе белка. Основными подсистемами были: “Кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты” (128 генов), “Клеточная стенка и капсула” (27 генов), “Вирулентность, инфекции и защита” (36 генов), “Метаболизм калия” (9 генов), “Разное” (13 генов), “Фаги, профаги, мобильные элементы, плазмиды” (11 генов), “Мембранный транспорт” (45 генов), “Поглощение и метаболизм железа” (18 генов), “Метаболизм РНК” (35 генов), “Нуклеозиды и нуклеотиды” (59 генов), “Метаболизм белков” (126 генов), “Регуляция и клеточная сигнализация” (3 генов), “Вторичный метаболизм” (8 генов), “Метаболизм ДНК” (46 генов), “Жирные кислоты, липиды и изопреноиды” (53 генов), “Метаболизм азота” (7 генов), “Персистенция и споруляция” (3 генов), “Дыхание” (56 генов), “Реакция на стресс” (26 генов), “Метаболизм ароматических соединений” (13 генов), “Аминокислоты и производные” (264 генов), “Метаболизм серы” (12 генов), “Метаболизм фосфора” (12 генов), “Углеводы” (131 генов).

3.2.1.6 Филогенетический анализ штамма *E. anophelis* ML-44 и его внутривидовая принадлежность

Филогенетический анализ штамма ML-44 был проведен с использованием веб-инструмента REALPHY (Рисунок 8). Штамм ML-44 формировал монофилетическую группу со штаммом F3201, выделенным от больного человека в Кувейте в 1982 г. Оба штамма были частью общей клады «А» и сформировали отдельный подкластер, отличный от подкластера, который включал штамм JM-87, выделенный из кукурузы. Внутри клады «В»

разные штаммы сформировали несколько субклад, в том числе отдельную субкладу CSID_3015182678-CSID_3015182681, связанную со вспышкой в Висконсине в 2016 году. Типовой штамм R26, выделенный из москита, относился к кладе «B».

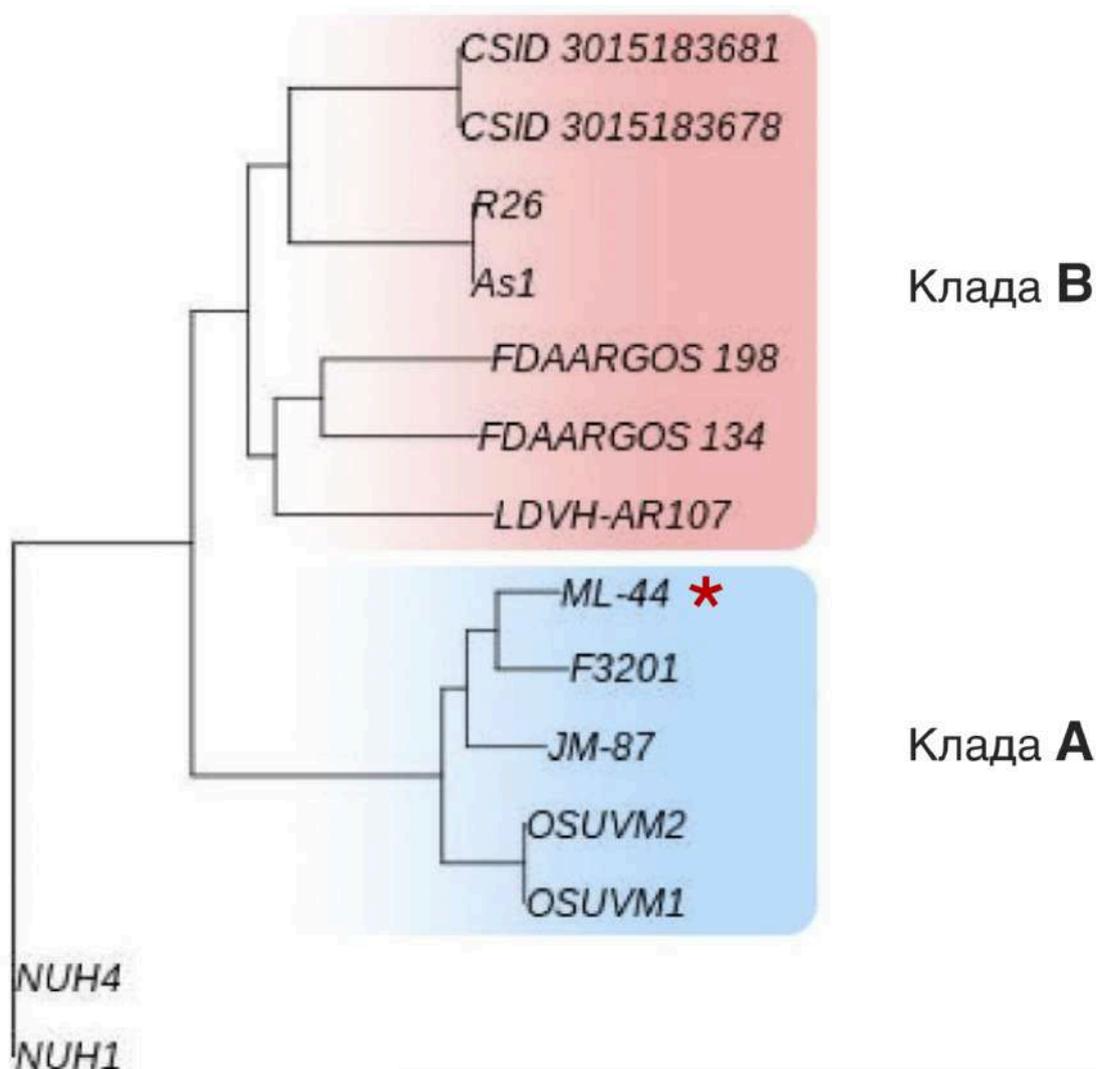


Рисунок 8. Реконструкция кладограммы REALPHY. Штамм ML-44 отмечен бордовой звездочкой.

Кроме того, был проведен анализ OrthoANI (подсчет средненуклеотидной идентичности). Значение ANI для пары ML-44-F3201 было самым высоким среди всех штаммов *E. anophelis* (Рисунок 9). 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*.

Таблица 6 – Результаты расчета ДНК-ДНК гибридизации *in silico* (DDH) между геномом штамма *E. anophelis* ML-44 и другими исследуемыми геномами *E. anophelis*

Геном сравнения	Референсный геном	DDH (f2), %
ML-44	JM-87	93,50
ML-44	F3201	93,20
ML-44	OSUVM2	90,50
ML-44	FDAARGOS_198	79,70
ML-44	CSID_3015183678	79,30
ML-44	NUHP2	78,30
ML-44	LDVH-AR107	78,00
ML-44	R26	77,30
ML-44	As1	77,00

Примечание – для расчета использовалась формула 2 (f2).

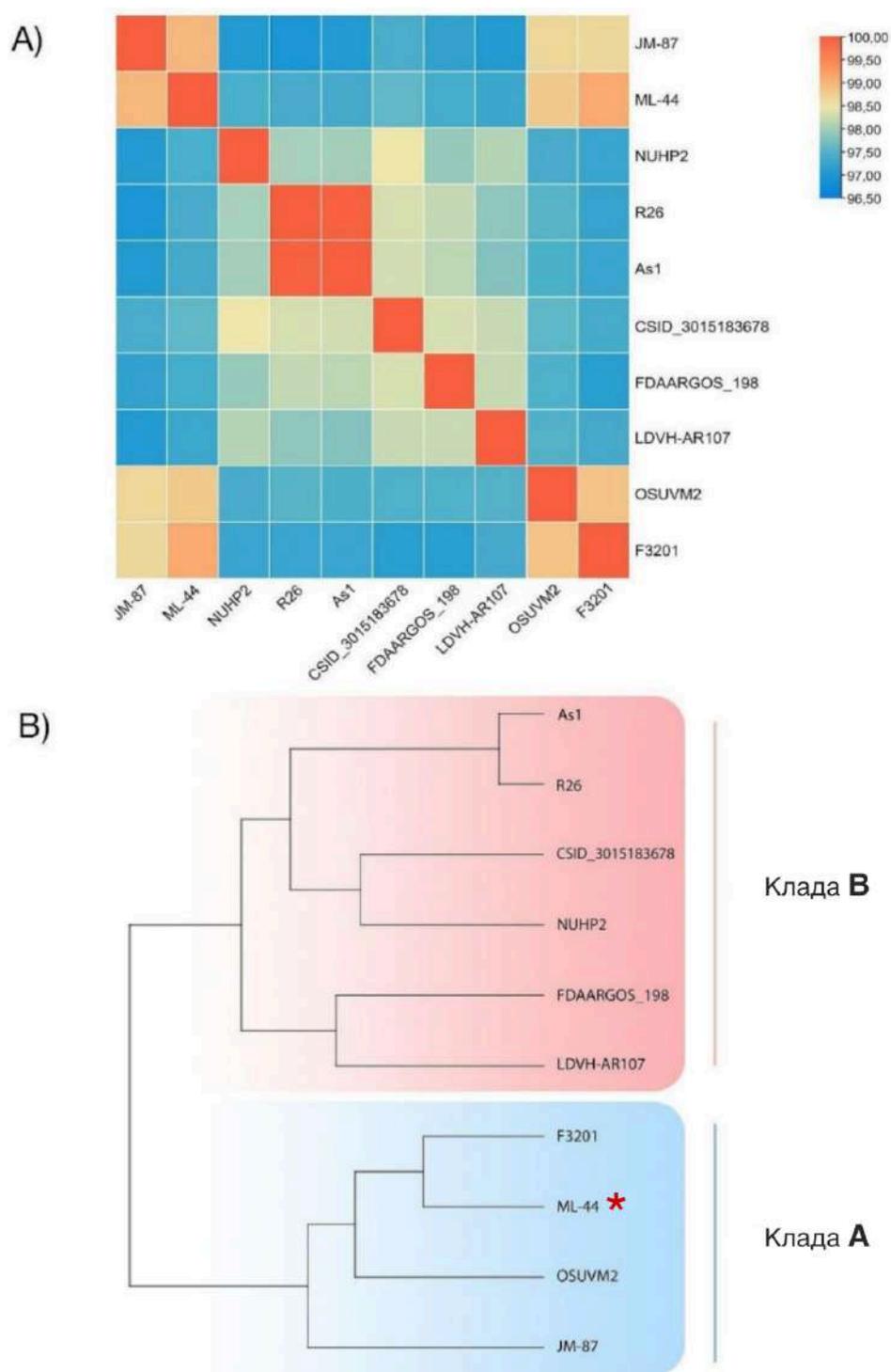


Рисунок 9. Результаты анализа OrthoANI (расчет средненуклеотидной идентичности): (А) Тепловая карта, построенная на значениях ANI между штаммом ML-44 и 9 штаммами *E. anopheles*; (В) Кладограмма, реконструированная на основе расчетов OrthoANI. Штамм ML-44 отмечен бордовой звездочкой.

3.2.1.7 Сравнительный геномный анализ штамма *E. anophelis* ML-44 с геномами штаммов внутри изучаемой панели

3.2.1.7.1 Анализ генетических детерминант устойчивости *E. anophelis* и их ассоциации с мобильными генетическими элементами

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 (AMR), 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 AMR. Также у всех штаммов обнаружено 9 общих из 14 обнаруженных систем эффлюкса, в то время как гены, кодирующие ферменты инактивирующие антибиотики были специфичны для конкретного штамма.

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}* и *csp-1*.

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

3.2.1.7.2 Анализ факторов вирулентности *E. anophelis*

Среди семи проанализированных геномов *E. anophelis* было предсказано 92 гомолога известных факторов вирулентности. Большинство из них были связаны с внешней мембраной (LPS, O-антиген и LOS) и

образованием капсулы (гены синтеза экзополисахаридов и альгинатов). Также были обнаружены следующие категории: факторы адгезии (СТ396), 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 потенциатора инфекционности макрофагов (Mip). 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*. В данном случае можно предположить наличие гомологичных структурных генов TIVSS у *E. anophelis*, которые не удается обнаружить используемыми методами. 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.

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

3.2.2.1 Выделение и идентификация штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H

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. Триптон-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 °С. Штамм был протестирован на активность оксидазы и каталазы, обе из которых были положительными. При микроскопическом исследовании мазков, окрашенных по Граму, обнаружены типичные грамотрицательные палочки (Рисунок 10).

Для идентификации штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H использовали секвенирование и анализ последовательности гена 16S рРНК с универсальными праймерами 27f и 1492r. 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). Метод секвенирования и анализа 16S рРНК подходит для видовой идентификации большинства видов бактерий [161]. Однако при идентификации штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H этим методом был получен неопределенный результат: штамм MR-6/3H имел одинаковый процент идентичности сразу с двумя видами *D. tsuruhatensis* и *D. lacustris*. Аналогичные наблюдения относительно идентификации *Delftia* методом 16S рРНК были описаны в литературе [41,

142]. По всей видимости, виды *D. tsuruhatensis* и *D. lacustris* крайне близки друг к другу филогенетически и имеют идентичные последовательности вышеупомянутого гена. Это делает невозможным точную видовую идентификацию данных бактерий методом анализа гена 16S рРНК. Однако, данная проблема может быть решена с использованием NGS технологий, конкретно – с помощью полногеномного секвенирования. Методы вычисления средненуклеотидной идентичности (ANI) и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации основаны на анализе полногеномных последовательностей и в настоящее время являются золотыми стандартами, применяемыми в таксономии для изучения видового разнообразия бактерий [63, 121]. Данные методы были применены в дальнейшем, чтобы уточнить видовую принадлежность штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3Н.



Рисунок 10. Микроскопия мазка штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3Н, окрашенного по Граму (увеличение x1600).

3.2.2.2 Характеристика биохимических и физиологических свойств штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H

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 отличается от профиля *Delftia lacustris* LMG 24775(T) по неспособности ферментировать малонат и маннитол (Таблица 7).

Таблица 7 – Биохимические характеристики штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H в сравнении с типовым штаммом *D. tsuruhatensis* NBRC 16741.

Характеристика	<i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H	<i>D. tsuruhatensis</i> NBRC 16741(T)
Оксидаза	+	+
Каталаза	+	+
Гидролиз эскулина	–	–
Фосфатаза	+	+
β - глюкозидаза	–	–
β - галактозидаза aGA	–	–
β - галактозидаза bGA	–	–
N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза	–	–
Уреазная активность	+	+

Таблица 7 – Биохимические характеристики штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H в сравнении с типовым штаммом *D. tsuruhatensis* NBRC 16741.

Характеристика	<i>D. tsuruhatensis</i> MR-6/3H	<i>D. tsuruhatensis</i> NBRC 16741(T)
Аргининдигидролаза	+	+
Орнитиндекарбоксилаза	+	+
Лизиндекарбоксилаза	–	–
Ацетамид	+	+
Цитрат Симмонса	+	+
Утилизация малоната	–	–
Гаммаглутамилтрансфераза	+	+
Продукция кислоты из:		
Трегалоза	–	–
Маннитол	–	–
Ксилоза	–	–
Арабиноза	–	–
Галактоза	–	–
Мальтоза	–	–
Целлобиоза	–	–
Лактоза	–	–
Сахароза	–	–
Инозитол	–	–

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

Тестирование чувствительности к противомикробным препаратам было проведено методом дисковой диффузии к 23 антибиотикам на основе руководства EUCAST 2022 (Таблица 8). *D. tsuruhatensis* MR-6/3H была устойчива 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.

Таблица 8 – Антибиотики, использованные для оценки чувствительности штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H: профиль чувствительности с указанием диаметров зон подавления роста (ДЗПР)

Класс антибиотиков	Антибиотик	Интерпретация	ДЗПР, мм
Аминогликозиды	Амикацин	У	0
	Гентамицин	У	0
	Канамицин	У	11
	Неомицин	У	0
	Тобрамицин	У	0
β -лактамы: пенициллины	Ампициллин	У	0
	Пиперациллин	У	19
	Тикарциллин	У	0
	Амоксициллин-клавуланат	У	0
	Пиперациллин-тазобактам	У	18
	Тикарциллин-клавуланат	У	17
β -лактамы: цефалоспорины	Цефепим	У	11
	Цефотаксим	У	15

Класс антибиотиков	Антибиотик	Интерпретация	ДЗРП, мм
	Цефтазидим	Ч	32
	Цефтобипрол	У	12
β-лактамы: карбапенемы	Меропенем	У	22
	Имипенем	У	29
β-лактамы: монобактамы	Азтреонам	У	16
Фторхинолоны	Ципрофлоксацин	Ч	33
	Левифлоксацин	Ч	28
Прочие	Хлорамфеникол	У	19
	Тетрациклин	Ч	31
	Триметоприм-сульфаметоксазол	У	0

Примечание: Ч - чувствительный при стандартном режиме дозирования, У - устойчивый.

3.2.2.4 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 (Рисунок 11). Гемолитическая активность не описана для *D. tsuruhatensis* в литературных источниках и по всей видимости не характерна для представителей данного вида.



Рисунок 11. Штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H на кровяном агаре с добавлением 5% крови человека I группы.

3.2.2.5 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. Сборка генома *D. tsuruhatensis* MR-6/3H была депонирована в базу данных GenBank под следующим номером доступа JAPMID000000000.

В ходе функциональной аннотации обнаруженные ОРС были распределены по подсистемам. Основными подсистемами были: “Кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты” (219 генов), “Клеточная стенка и капсула” (25 генов), “Вирулентность, инфекции и защита” (66 генов), “Метаболизм калия” (11 генов), “Разное” (45 генов), “Фаги, профаги, мобильные элементы, плазмиды” (12 генов), “Мембранный транспорт” (143 генов), “Поглощение и метаболизм железа” (17 генов), “Метаболизм РНК” (51 генов), “Нуклеозиды и нуклеотиды” (99 генов), “Метаболизм белков” (224 генов), “Подвижность и хемотаксис” (63 гена), “Регуляция и клеточная

сигнализация” (50 генов), “Вторичный метаболизм” (6 генов), “Метаболизм ДНК” (82 генов), “Жирные кислоты, липиды и изопреноиды” (120 генов), “Метаболизм азота” (29 генов), “Персистенция и споруляция” (1 ген), “Дыхание” (118 генов), “Реакция на стресс” (79 генов), “Метаболизм ароматических соединений” (45 генов), “Аминокислоты и производные” (388 генов), “Метаболизм серы” (9 генов), “Метаболизм фосфора” (25 генов), “Углеводы” (201 генов).

3.2.2.6 Филогенетический 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 Рисунке 12. штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H формировал одну кладу с видом *D. tsuruhatensis*. Такая топология наблюдалась на обеих кладограммах. Это указывает на то, что *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). Типовые штаммы *D. tsuruhatensis* NBRC 16741(T) и *D. tsuruhatensis* LZ-C(T) относились также к одной кладе. Кроме того, внутри кластера *D. acidovorans* был идентифицирован предполагаемый подвид (помеченный фиолетовым). Эти наблюдения были подтверждены данными расчета ANI (Рисунок 13), 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). У членов последней

группы (предполагаемый подвид *D. acidovorans*) было 96 единиц ANI с другими штаммами *D. acidovorans* и 99-100 между собой.

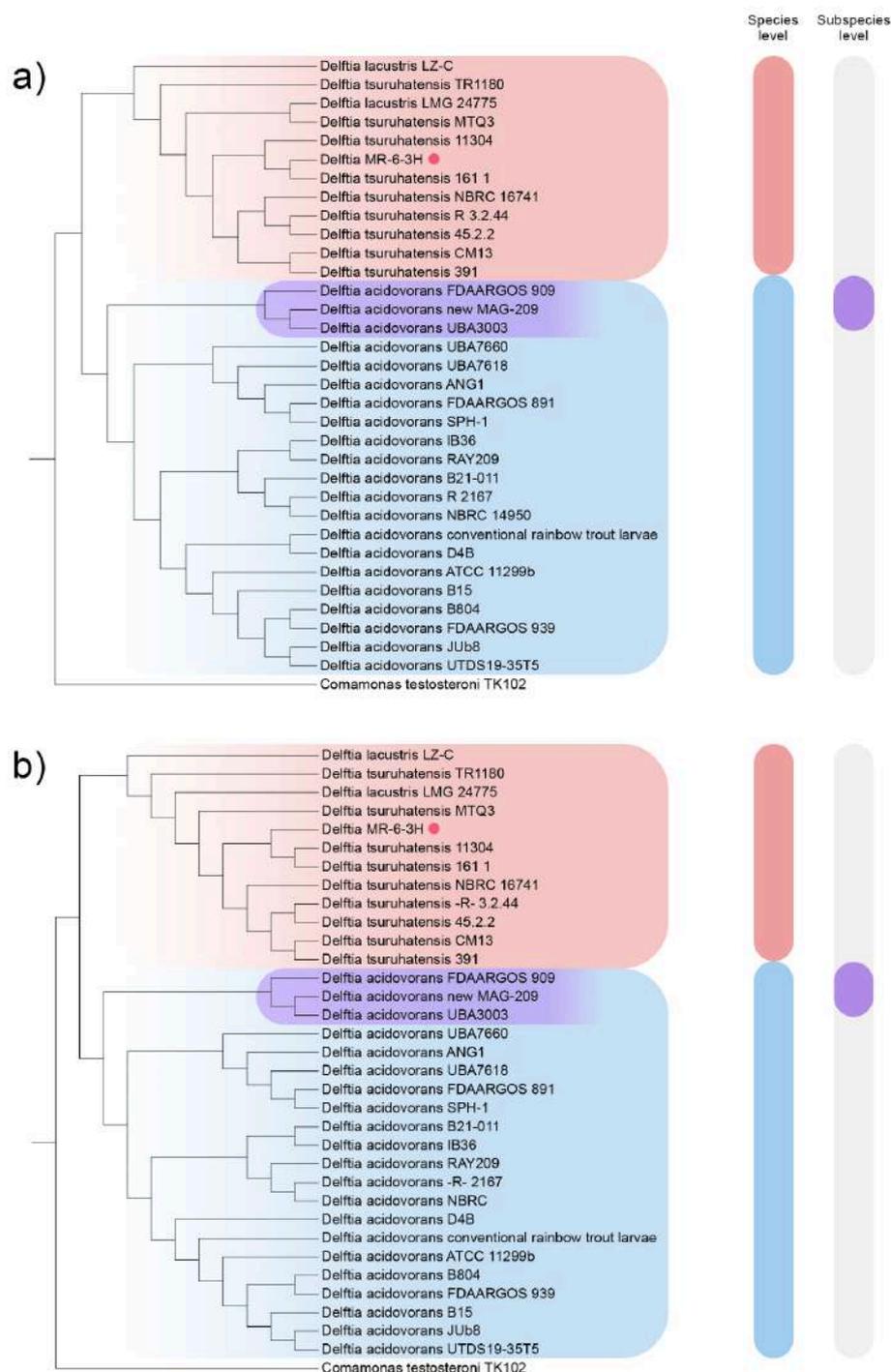


Рисунок 12. Реконструкция кладограмм 33 штаммов *Delftia* spp. с штаммом *D. tsuruhatensis* MR-6/3H (отмечен розовым кружком): а) Кладограмма TYGS. б) Кладограмма ANI. Отмечено красным - клада *D. tsuruhatensis/lacustris*, отмечено синим - клада *D. acidovorans*, отмечено фиолетовым - предполагаемый подвид *D. acidovorans*.

человека больного муковисцидозом в Самаре в феврале 2020 года. Штамм *D. tsuruhatensis* 11304 был выделен в Сербии в марте 2019 года. Упомянутая клада входила в общий филогенетический кластер с типовым штаммом *D. tsuruhatensis* NBRC 16741(T).

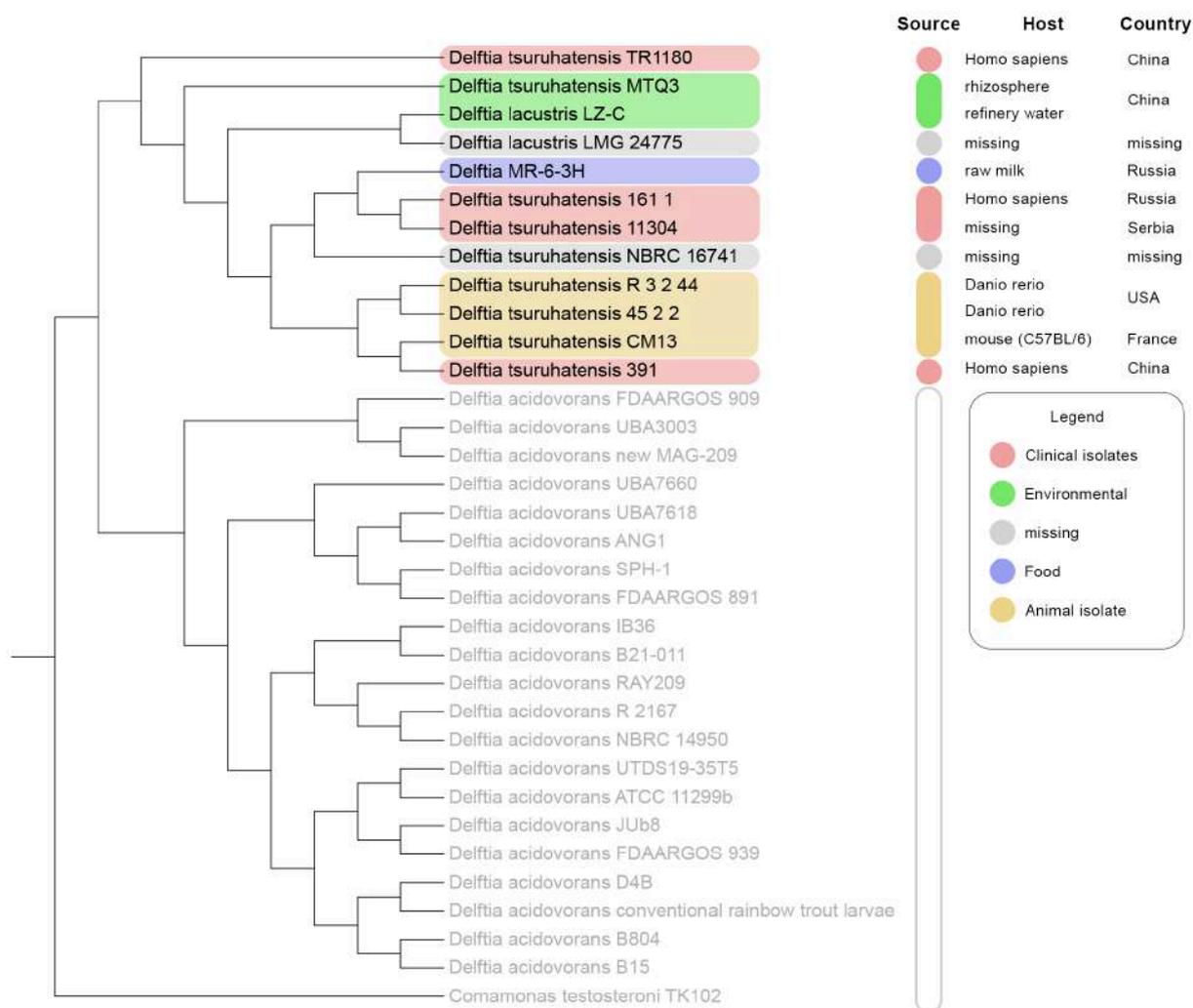


Рисунок 14. Кладограмма, построенная с помощью REALPHY, состоящая из 33 различных штаммов *Delftia* spp. и штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H, основанный на REALPHY: штаммы внутри клады *D. tsuruhatensis*/*D. lacustris* отмечены цветом в зависимости от типа источника выделения.

3.2.2.7 Сравнительный геномный анализ штамма *D. tsuruhatensis*

MR-6/3H с геномами штаммов внутри изучаемой панели

3.2.2.7.1 Анализ генетических детерминант устойчивости *D. tsuruhatensis* и их ассоциации с мобильными генетическими элементами

Среди одиннадцати штаммов *D. tsuruhatensis* был предсказан 31 гомолог генов устойчивости. Индивидуально каждый штамм обладал от 11 до 17 генами устойчивости. Все обнаруженные гомологи были сгруппированы в 5 подгрупп по механизму резистентности: эффлюксные насосы, β -лактамазы, ферменты инактивации аминогликозидов, устойчивость к диаминопиримидину и другие. Во всех протестированных геномах, включая *Delftia* MR-6/3H, наблюдались следующие факторы: эффлюксные насосы (*ceoB*, *mexD*, *paer_soxR*, *adeB*, *mdtC*, *oprJ*, *abeS*) и OXA-926-подобная β -лактамаза. Эти гены придают устойчивость к широкому спектру противомикробных препаратов, а также дезинфицирующих средств, например: пенамам, цефалоспорином, карбапенемам, аминогликозидам, фторхинолонам, фенолам, диаминопиримидиновым антибиотикам, тетрациклину, аминкумарину, макролидным антибиотикам, антисептику акрифлавины и различным дезинфицирующим средствам. Кроме того, штамм *Delftia* MR-6/3H содержал три дополнительных гена эффлюксной помпы, которые отсутствовали у некоторых других штаммов: *oqxV*, *tuxV*, *mexC*. Известно, что последние участвуют в выбросе из клетки токсичных субстратов, включая широкий спектр антибактериальных препаратов. Примечательно, что они могут выводить монобактамы, а также 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 *sull*, который придает устойчивость к сульфаниламидным антибиотикам. *D. tsuruhatensis* TR1180 также обладал *sull*, 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).

В геноме *Delftia* MR-6/3H были идентифицированы пять профаговых геномов. Два интактных профага имели длину генома 46,5 т.п.н. при GC%=64,82%, что наиболее близко соответствовало фагу *Burkholderia* ВсерMig1, и длину генома 38 т.п.н. при GC%=64,31%, что наиболее близко соответствовало фагу *Pseudomonas* JBD18. Профаг, подобный ВсерMig1, содержал 32 гена, среди которых были интегразы, белки капсида и терминаза, а также фагоподобные белки и гипотетические белки. Профаг, подобный JBD18, содержал 44 гена, среди которых были белки капсида и фагоподобные белки и гипотетические белки, при этом наблюдалось отсутствие интегразы. Другие профаги также содержали различные белки капсидов и гипотетические белки, но интегразы отсутствовали. Ни в одном из профаговых геномов не было обнаружено факторов устойчивости.

В геноме *Delftia* MR-6/3H не было обнаружено плазмид, геномных островов и интегронов.

3.2.2.7.2 Анализ факторов вирулентности *D. tsuruhatensis*

47 гомологов факторов вирулентности были предсказаны среди одиннадцати штаммов *Delftia* spp. с помощью поиска BLASTp по VFDB. Индивидуально каждый штамм обладал от 24 до 31 предполагаемыми генами вирулентности. Все наблюдаемые факторы сформировали 8 групп в зависимости от категории их вирулентности: подвижность, адгезия, иммуномодуляция, выживаемость при стрессе, система секреции, сидерофоры, приспособленность и другие. У всех 11 видов *Delftia* были обнаружены четыре фактора, связанных с подвижностью (*cheY*, *fliP*, *fliI*, *fliN*). Эти факторы ответственны за биосинтез жгутиков, их сборку и функционирование, что согласуется с фенотипом подвижности видов рода

Delftia. Группа адгезии содержала 4 гена, общих для всех штаммов: *pilT*, *pilT2*, *pilG* – белки твитчинг-подвижности и *htpB* (белок теплового шока). Примечательно, что среди штаммов, которые имели только клиническое и животное происхождение имели три гена из категории иммуномодуляции: *gmd* (GDP-маннозо-4,6-дегидратаза), *wzt* (АТФ-связывающая система экспорта O-антигена) и *per* (перозаминсинтетаза). Факторы выживания при стрессе, такие как *katA* (каталаза), *sodB* (супероксиддисмутаза) и *ClpP* (АТФ-зависимая протеаза Clp) также были обнаружены у всех штаммов. Некоторые белки, относящиеся к системе секреции IV типа, были обнаружены во всех геномах: STM0274 (белок секреции VI типа семейства EyrB), *VipA* (белок, формирующий каналцы) и *ClpV1* (АТФазы семейства AAA системы секреции VI типа). Также были предсказаны гены, кодирующие транспорт сидерофоров, среди них два белка-пермеазы (*bauD*, *bauC*), периплазматический белок, связывающий сидерофор (*bauB*), и АТФазу-переносчик ферриэнтеробактина ABC (*fepC*). Полные наборы вышеуказанных генов сидерофора были обнаружены только у следующих штаммов *Delftia*: MR-6/3H, 11304, 16741(T), MTQ3, LZ-C. Два фактора “приспособленности” были идентифицированы только у штамма *D. tsuruhatensis* 391, который был выделен от человека: *mtrD* (белок системы множественной переносимой резистентности MtrD) и AcrB (белок устойчивости к акрифлавину B). 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).

Штамм MR-6/3H был наиболее близок к штаммам 161/1 и TR1180 по набору генов вирулентности. 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).

Полученные результаты подчеркивают разнообразие факторов вирулентности среди штаммов *Delftia* spp. и их потенциальную роль в патогенезе. Дальнейшие исследования необходимы для более глубокого понимания механизмов вирулентности и разработки эффективных мер профилактики и лечения инфекций, вызванных этими микроорганизмами.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Виды микроорганизмов, штаммы которых были исследованы в рамках данной диссертационной работы, – *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* – являются эмерджентными бактериальными патогенами. В последнее время было зафиксировано множество индивидуальных случаев инфекций, а также масштабных вспышек, вызванных данными возбудителями. Стоит отметить, что количество случаев инфекций данной этиологии растет с каждым годом, более того, расширяется их географический охват [73]. *E. anophelis* способна вызывать тяжелые инфекции как у иммунокомпрометированных, так и у иммунокомпетентных лиц, как во внутрибольничных, так и во внебольничных условиях. *D. tsuruhatensis* в настоящее время известна как редкий возбудитель нозокомиальных инфекций. Данные микроорганизмы имеют широкий спектр устойчивости к антибиотикам, который по большей части обусловлен наличием природных («врожденных») факторов. Широкий спектр устойчивости сильно затрудняет терапию, зачастую делая её бесполезной. Случаи инфекций, вызванных данными возбудителями, также описываются в литературе как имеющие тяжелое течение, иногда с фульминантно развивающейся симптоматикой и высокой летальностью. Манифестация инфекций, вызванных данными возбудителями, проявляется в виде пневмонии, менингита, инфекции мягких тканей и инфекции кровотока. Примечательно, что оба микроорганизма являются естественными обитателями различных биотопов окружающей среды, преимущественно почвы и воды, что позволяет классифицировать их как сапронозных возбудителей. Однако на данный момент в большинстве исследований не удалось определить точный источник инфекции и её резервуар. В настоящей работе представлены результаты исследования двух штаммов вышеупомянутых видов: *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H, выделенных из сырого коровьего молока. Исследованы их фенотипические и генотипические особенности, включая особенности геномной организации, а также проведён сравнительный геномный анализ. В дальнейшем для удобства

повествования и структуризации информации обсуждение результатов будет представлено отдельно для *E. anophelis* ML-44 и *D. tsuruhatensis* MR-6/3H.

В рамках настоящей диссертационной работы описывается первый задокументированный случай выделения *E. anophelis* в России. Кроме того, это первый случай выделения данного микроорганизма из пищевого источника, такого как сырое молоко. В целом характер фенотипа штамма *E. anophelis* ML-44 был практически идентичен описанному фенотипу типового штамма подвида *E. anophelis* R26, за исключением некоторых физиологических особенностей [86]. Примечательно, что штамм ML-44 проявлял гемолитическую активность в отношении эритроцитов кролика и барана. В настоящее время, насколько известно из литературных данных, это первый штамм *E. anophelis*, обладающий гемолитической активностью. Визуально гемолиз происходил более эффективно в отношении эритроцитов кролика по сравнению с эритроцитами барана. Это можно объяснить специфичностью гемолизина (или спектра гемолизинов), продуцируемого данным штаммом. Эритроциты различных видов млекопитающих имеют различный липидный состав, что, вероятно, и обуславливает наблюдаемый эффект [130].

Еще одной важной характеристикой штамма ML-44 является его пищевое происхождение. В настоящее время установлено, что *E. anophelis* является одним из доминирующих резидентов микробиоты кишечника различных видов moskitov [54, 56, 170, 178]. Тем не менее, нет никаких доказательств того, что москиты служат переносчиками этих бактерий для человека. *E. anophelis* также выделяли из различных сред, таких как водопроводная вода и раковины в больницах, пресные воды, растения, животные и человек [29, 36, 82, 86, 123]. Такой широкий спектр источников данного микроорганизма позволяет предположить, что его резервуаром является окружающая среда во всем ее многообразии. По всей видимости, *E. anophelis* может напоминать по своей экологии такие относительно хорошо известные патогены, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*,

Listeria monocytogenes, *Yersinia pseudotuberculosis* и др. Перечисленные микроорганизмы являются возбудителями сапронозных инфекций, так как их резервуаром и источником является окружающая среда [5, 203]. Возбудители сапронозов обычно характеризуются полигостальностью, то есть способностью колонизировать широкий спектр хозяев, включая людей, диких и домашних животных, растения и простейших [117, 143]. Также в базе данных GenBank и SRA обнаруживаются геномные последовательности и библиотеки, полученные от штаммов, выделенных от американской лягушки-быка (*Lithobates catesbeianus*), из кишечника жука (*Heterelmis comalensis*), из внутренних органов карпа (*Cyprinus carpio*) и даже от простейших (информация о конкретном виде отсутствует). Все это подтверждает тезис о том, что резервуаром *E. anophelis* является окружающая среда. Более того, широкий спектр организмов различных видов, от которых выделялись штаммы данного патогена, указывает на его полигостальность (способность колонизировать широкий спектр организмов и, вероятно, вызывать у них инфекционный процесс). Это также одно из примечательных свойств возбудителей сапронозов.

Известно, что сапронозные бактерии часто встречаются на фермах, пищевых предприятиях и в пищевых продуктах, при этом источником контаминации перечисленных объектов сапронозными бактериями является окружающая среда [57, 88]. Обнаружение *E. anophelis* в сыром молоке косвенно подтверждает гипотезу о его принадлежности к разнообразной группе патогенных микроорганизмов, обитающих в окружающей среде. В рамках данного исследования невозможно установить конкретный источник данного микроорганизма, и можно только предполагать, произошла ли контаминация молока в результате инфекционного процесса у животного, например, субклинического мастита, или контаминация могла произойти во время транспортировки и реализации молока. Тем не менее, молоко в данном случае может служить источником *E. anophelis*. Эти данные подчеркивают важность строгого контроля качества и безопасности молочной продукции на

всех этапах от производства до реализации. Важно также учитывать, что *E. anophelis* может представлять потенциальную угрозу для здоровья человека, особенно для лиц с ослабленным иммунитетом.

В настоящее время нет данных о том, может ли *E. anophelis* вызывать инфекции у животных. Однако в исследовании William L. Johnson и соавторов сообщалось о выделении двух штаммов *E. anophelis* из аспирата, отобранного из гортанных мешочков (sacci laryngis) 9-летней лошади с симптомами удушья [82]. Стоит отметить, что кроме *E. anophelis* также были выделены такие микроорганизмы, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Chryseobacterium* spp. Филогенетический анализ выявил высокое сходство штаммов *E. anophelis* с клиническими штаммами, что может отражать вероятность передачи данного микроба от животных человеку. Однако прямых свидетельств передачи *E. anophelis* от животных человеку и наоборот на данный момент не обнаружено. Интересно, что в рамках нашей работы оба штамма от лошади образовали одну филогенетическую линию со штаммом JM-87, штаммом клинического происхождения F3201 и штаммом ML-44, выделенным из образца сырого молока в России. Также в ходе анализа дендрограммы в исследовании William L. Johnson и соавторов обращает на себя внимание дихотомия филогенетического дерева, характер которой напоминает результаты, полученные в ходе нашей работы. Таким образом, некоторые штаммы *E. anophelis* обладают подтвержденным патогенным потенциалом в отношении человека, а также вероятно способны колонизировать верхние дыхательные пути лошади.

В результате анализа гомологов факторов вирулентности было показано, что все геномы штаммов *E. anophelis* обладают сходным репертуаром факторов вирулентности. Наряду с уже описанными в литературе факторами вирулентности *E. anophelis*, такими как *katG*, *IlpA*, *ClpP*, *rmlA*, *htpB*, *DnaK* и т.д., которые могут опосредовать процессы инвазии, защиты от иммунных факторов и персистенцию [177], в ходе данной работы

нами было обнаружено, что все исследуемые геномы несут гомолог гена усилителя инфекционности макрофагов (macrophage infectivity potentiator – *mip*). В ходе анализа литературных данных было обнаружено, что фактор *Mip* потенцирует внутриклеточный инфекционный цикл *L. pneumophila* и инвазию внутрь свободноживущих простейших и макрофагов [46, 147]. Другим фактором вирулентности, обнаруженным у ML-44 и других штаммов, принадлежащих к обоим подвидам *E. anophelis*, является гомолог металлопротеиназы *M. tuberculosis* *Zmp1*, которая может обеспечивать выживание в макрофагах за счет инактивации инфламмосомы и ингибирования созревания фагосом [30, 144, 156]. Обнаруженные факторы защиты от стресса, такие как каталаза, супероксиддисмутаза могут участвовать в нейтрализации активных форм кислорода, синтезируемых фагоцитами [116]. Наличие этих факторов, а также эффекторов системы секреции IV типа позволяет предположить, что *E. anophelis* может проходить внутриклеточную стадию во время инфекционного процесса. Наличие упомянутых факторов согласуется с тезисом о сапронозной природе данного возбудителя, так как эти факторы могут способствовать выживанию в организме простейших в течение всего периода существования в окружающей среде. Наличие геномов в базах данных, выделенных от простейших, опять же подтверждает данный тезис. В совокупности полученные данные показали, что геномы штаммов *E. anophelis* несут общий репертуар гомологов факторов вирулентности. Однако стоит упомянуть об ограничениях используемого метода: обнаруженные гомологи факторов вирулентности требуют более глубокого изучения с применением тестирования их роли на различных моделях *in situ* и/или *in vivo*. Это позволит более точно определить их вклад в патогенез, а также разработать эффективные меры профилактики и лечения инфекций, вызванных *E. anophelis*.

Известно, что *E. anophelis* обладает высокой устойчивостью ко многим антибактериальным препаратам. Этот феномен обусловлен наличием

множества хромосомно кодируемых генов устойчивости, включая различные ферменты, инактивирующие антибиотики, а также системы эффлюкса [82]. В целом результаты анализа факторов устойчивости, полученные в данной работе, согласуются с результатами, описанными в литературных источниках [79, 95, 97]. В ходе определения профиля чувствительности нами была обнаружена устойчивость к бета-лактамам: пенициллинам, цефалоспорином, азтреонаму и карбапенемам. Это согласуется с тем фактом, что геном ML-44 содержит множество детерминант устойчивости [193]. В геноме ML-44 были обнаружены четыре различных гена бета-лактамазы, такие как *bla*_{B-18}, *bla*_{CME-12}, *bla*_{GOB-41} и *csp-1*. Первые три специфичны для рода *Elizabethkingia* и придают устойчивость к пенамам, цефалоспорином, карбапенемам [17, 34, 64]. Устойчивость к карбапенемам вызывает особые опасения, поскольку последние часто используются в эмпирической антимикробной терапии при острых инфекциях, вызванных грамотрицательными палочками [172]. Фермент CSP-1 представляет собой металло-бета-лактамазу, впервые выделенную из *Campytophaga sputigena* в 2010 году. Известно, что он придает устойчивость к амоксициллину, тикарциллину, цефалоспорином узкого спектра действия, цефтазидиму, цефотаксиму и азтреонаму у рекомбинантного штамма *E. coli* TOP10 [65].

Штамм ML-44 был также устойчив ко всем протестированным аминогликозидным антибиотикам. Наличие гена *aadS*, вероятно, обусловило устойчивость штамма ML-44 к аминогликозидам. Интересно, что последний ген не активен у представителей *Bacteroides* дикого типа, и его экспрессия зависит от трансактивирующей хромосомной мутации. Белок AadS гомологичен стрептомицинзависимой аденилтрансферазе грамположительных бактерий [157]. Кроме того, устойчивость к аминогликозидам может быть опосредована присутствием гомологичной системы RanA/RanB ABC-эффлюкса. Ранее было показано, что этот эффлюкс придает устойчивость к стрептомицину и амикацину и органическим растворителям, таким как диметилсульфоксид и некоторые спирты.

Примечательно, что эта система также участвует в вирулентности *R. anatipestifer* [102]. Фенотипическая устойчивость к тетрациклину у ML-44 может быть обусловлена наличием гомологов генов *adeF*, *tetB(46)* и *txR*, которые были обнаружены в геноме ML-44 [50, 169, 179]. Эти факторы являются компонентами механизма эффлюкса, которые играют особую роль в обеспечении устойчивости к тетрациклину. Другие гены, связанные с системами оттока, такие как *abeS*, *arlR*, *ceoB*, *macB*, идентифицированные в хромосоме ML-44, могут быть опосредовать устойчивость к макролидам, фениколу, плевромутилину, аминогликозидам и даже к дезинфицирующим средствам и интеркалирующим красителям. Согласно результатам дискового диффузионного теста, штамм *E. anophelis* ML-44 не имел фенотипа резистентности к фторхинолонам. Наиболее часто встречающимся механизмом резистентности к последним является мутация в субъединице фермента ДНК-гиразы. Ранее Lin и соавт. показали значительное повышение уровня МПК левофлоксацина и ципрофлоксацина, вызванное заменами Ser83Ile, Ser83Arg или Ala709Ser в субъединице *gyrA* у 11 клинических штаммов *E. anophelis* [109]. Чтобы подтвердить результаты фенотипической оценки чувствительности к фторхинолонам, нами были выровнены последовательности аминокислотной последовательности гена *gyrA* штамма ML-44 с другими субъединицами гиразы А, полученных из различных *E. anophelis*, в том числе из генома штамма EM361-97, у которого имеется замена Ser83Ile и повышена МПК фторхинолонов [108]. ML-44 содержит Ser в позиции 83, что подтверждает фенотипический профиль чувствительности нашего штамма к фторхинолонам.

Несмотря на обнаруженную корреляцию между фенотипической устойчивостью и установленными гомологами генов устойчивости, содержащимися в хромосоме ML-44, необходимо признать ограниченность данного исследования. В настоящее время отсутствуют критерии для определения чувствительности *E. anophelis* к противомикробным препаратам методом дисковой диффузии. Профиль чувствительности к таким

антибиотикам, как тикарциллин-клавуланат, пиперациллин, пиперациллин-тазобактам и цефепим, для которых в нашем исследовании был зафиксирован диаметр зоны ингибирования отличный от нуля, не могут быть интерпретированы с абсолютной уверенностью. Чувствительность *E. anophelis* к вышеупомянутым защищенным бета-лактамам долгое время оставалась предметом дискуссий. Однако в 2024 году Mei-Chen Tan и соавторы показали, что ни один из анализов чувствительности к пиперациллину-тазобактаму не коррелировал удовлетворительно с результатами определения минимальной бактерицидной концентрации и наблюдениями *in vivo* у клинических штаммов *Elizabethkingia* spp. Кроме того, присутствие гена *blaB* у *Elizabethkingia* spp. значительно повышало МПК данной комбинации и, следовательно, снижало ее клиническую эффективность *in vivo*, что указывает на природную устойчивость *Elizabethkingia* spp. Таким образом, для защищенных бета-лактамов, как минимум для пиперациллин-тазобактама, экспериментально установлена природная резистентность [165]. Возвращаясь к методологии, по данным Chiu С.-Т. и соавт., метод дисковой диффузии и Etest не подходят для оценки чувствительности *E. anophelis* из-за высокой частоты ошибок [44]. Только миноциклин, рифампицин, левофлоксацин и цефтазидим могут быть использованы для тестирования чувствительности данного микроорганизма методом дисковой диффузии. Тем не менее, метод дисковой диффузии по-прежнему является наиболее удобным, недорогим и широко используемым методом в лабораторной практике. В связи с этим требуется разработка критериев для определения чувствительности *E. anophelis* к противомикробным препаратам, а также разработка четких и клинически обоснованных схем лечения, поскольку данный микроб обладает высокой патогенностью и предельным потенциалом резистентности. Таким образом, данные, полученные в ходе данной работы, могут быть полезны для разработки критериев по оценке чувствительности *E. anophelis* к антибиотикам.

В целом, полученные данные показали, что сырое молоко может быть источником штаммов *E. anophelis*, обладающих набором факторов вирулентности и устойчивостью к широко используемым противомикробным препаратам.

Необходим дальнейший мониторинг различных источников, а также дальнейшие исследования штаммов, выделенных из них, для более глубокого изучения биологии данного патогена.

Delftia tsuruhatensis известна как бактерия, способная положительно влиять на динамику роста растений, разлагать некоторые органические поллютанты в окружающей среде и в целом – это перспективный организм в плане биотехнологии. Однако также она способна вызывать инфекции у человека и в настоящее время рассматривается как новый условно-патогенный микроорганизм с естественной устойчивостью к некоторым противомикробным препаратам. В рамках данной диссертационной работы была проведена характеристика штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H, выделенного из образца сырого коровьего молока.

Ранее штаммы *D. tsuruhatensis* были выделены из широкого спектра источников, таких как активный ил, морская вода, почва, ризосфера, рисовая шелуха и свиной навоз, рыба (*Danio rerio* и *Oreochromis niloticus*), мыши (инбредный штамм C57BL/6), а также от больных людей [33, 39, 66, 84, 101, 141, 142, 152, 155, 199]. Примечательно, что о выделении пяти штаммов *D. tsuruhatensis* из сырого молока также ранее сообщалось Elionora Hantsis-Zacharov и Malka Halpern в 2007 году в Израиле [69]. Это указывает на убиквитарную природу *D. tsuruhatensis*. Недавние геномные исследования рода *Delftia* показали, что представители последнего кодируют широкий спектр различных по функционалу белков (имеют открытый пангеном), которые позволяют им преуспевать во многих экологических нишах [20, 195]. Однако сведения о микробиологическом и геномном анализе штаммов *D. tsuruhatensis*, выделенных из пищевых продуктов и сырого молока, отсутствуют или ограничены. В настоящем исследовании не представляется

возможным определить конкретный источник штамма MR-6/3H, поскольку образцы непастеризованного молока могут быть контаминированы из различных источников – от самой коровы до рук продавцов. Однако в ранее опубликованных исследованиях, где из сырого молока было выделено пять штаммов *D. tsuruhatensis*, сообщалось, что доение осуществлялось с использованием современных автоматизированных доильных установок, а пробы молока отбирались в стерильных условиях [69]. Это снижает вероятность контаминации и может указывать на то, что само по себе сырое молоко может быть источником *D. tsuruhatensis*. Однако необходимы дополнительные исследования для выяснения возможных источников этой бактерии. В целом широкое распространение в окружающей среде, отмеченное во множестве исследований, а также способность вызывать инфекции позволяет классифицировать данный микроорганизм как сапронозный. Однако на данный момент, в отличие от *E. anophelis*, инфекции *D. tsuruhatensis* были зафиксированы только среди пациентов с ослабленной иммунной системой, во внутрибольничных условиях. Это позволяет уточнить определение данного микроорганизма как нового (эмерджентного) возбудителя нозокомиальных инфекций.

Метод секвенирования гена 16S рРНК рекомендован для идентификации и разграничения большинства видов бактерий [161]. Однако при идентификации с помощью этого метода мы столкнулись с некоторыми сложностями: штамм MR-6/3H имел одинаковый процент идентичности как с последовательностью гена вида *D. tsuruhatensis*, так и с *D. lacustris*. О подобных наблюдениях уже сообщалось исследователями, которые имели дело с идентификацией *Delftia*, когда секвенирование гена 16S рРНК не позволило разграничить виды *D. tsuruhatensis* и *D. lacustris* [142, 194]. В нашем случае вышеупомянутая проблема была решена с помощью применения методов определения средней нуклеотидной идентичности (ANI) и использования сервера типирования (идентификации), основанного на геноме (TYGS), которые являются методами “золотого стандарта” в

современной таксономии, основанными на секвенировании нового поколения. Интересно, что, согласно нашему анализу, виды *D. tsuruhatensis* и *D. lacustris* образуют общую кладу. Это наблюдение также подтверждается значениями матрицы ANI, а также филогенией REALPHY. О схожих результатах недавно сообщали Bhat и соавт. [20]. Наши результаты показывают, что *D. tsuruhatensis* и *D. lacustris* принадлежат к одному виду. Данное наблюдение подтверждается четкой кластеризацией изучаемых видов — типовые геномы штаммов отдельных видов *D. acidovorans* и *D. tsuruhatensis* формировали различные кластеры, однако типовой геном (и нетиповые геномы) штамма *D. lacustris* кластеризовался с *D. tsuruhatensis*. Такая таксономическая неопределенность могла возникнуть из-за того, что вышеупомянутые виды были первоначально описаны на основе филогении по 16S рРНК, разрешение которой в действительности не позволяет разделить виды рода *Delftia*, и традиционной ДНК-гибридизации (DDH), которая подвержена ошибкам и является неточным методом по сравнению с современными *in silico* методами, такими как ANI и TYGS [63, 121]. Аналогичным образом, на всех трех кладограммах обнаруживается кластер, состоящий из трех штаммов в кластере видов *D. acidovorans*. Предположительно, эти штаммы могут принадлежать к подвиду *D. acidovorans*. Об этом же наблюдении недавно сообщалось Bhat и соавт [20]. Однако данный результат необходимо интерпретировать с осторожностью, так как таксономия прокариот имеет множество неразрешенных моментов, один из которых — критерии для описания подвида. Мы предполагаем, что виды рода *Delftia* требуют таксономического пересмотра с использованием полифазного таксономического подхода. Стоит отметить, что таксономические методы, основанные на полногеномном секвенировании наиболее эффективны при использовании в сочетании с другими фенотипическими, экологическими и молекулярно-биологическими данными.

D. tsuruhatensis известна как новый условно-патогенный микроорганизм для человека. На сегодняшний день известно об инфекциях, вызываемых этой бактерией, только у людей с ослабленным иммунитетом и новорожденных. *D. tsuruhatensis* может вызывать тяжелые, опасные для жизни инфекции, проявляющиеся в основном в виде пневмонии и катетерных инфекций кровотока [142, 145, 163, 194]. Интересно, что штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H, выделенный из сырого молока, был филогенетически близок к штаммам, имеющим клиническое происхождение (*D. tsuruhatensis* 161/1 и *D. tsuruhatensis* 11304): они формировали единую кладу. Примечательно, что штамм *D. tsuruhatensis* 161/1 был выделен в Самаре, Россия, в начале 2020 года от пациента с муковисцидозом. Штамм *D. tsuruhatensis* 11304 был выделен в 2014 году в Сербии, но конкретный источник не указан в базе данных. Наблюдаемая дисперсная филогенетическая структура относительно источника выделения изучаемой панели штаммов (отсутствие четкой кластеризации по типу источника), также коррелирует с общностью обнаруженных факторов вирулентности для всех штаммов.

Сравнительный анализ предполагаемых генов вирулентности выявил сходный набор генов, обнаруженных у вышеупомянутых штаммов. Геном штамма MR-6/3H содержит гены, которые связаны со жгутиковым аппаратом (*cheY*, *tufA*, *flgG*, *fliI* и *fliN*), что коррелирует с подвижным фенотипом *Delftia* spp. Жгутики известны как важный фактор вирулентности, который отвечает как за подвижность, так и за адгезию таких патогенов, как синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) и кишечная палочка (*Escherichia coli*). Также была предсказана другая группа генов (*tufA*, *pilT*, *htpB*, *pilT2* и *pilG*), кодирующих факторы адгезии, включая фактор элонгации Tu, белки твитчинг-подвижности (TMPs) и белок теплового шока HtpB. Например, было показано, что TMPs являются одними из основных факторов вирулентности *P. aeruginosa*, которые участвуют не только в подвижности, но и в инвазии в многослойный эпителиальный барьер [9]. Липополисахарид

(ЛПС), также известный как эндотоксин, является компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий, который вносит значительный вклад в вирулентность благодаря своим иммуномодулирующим и провоспалительным свойствам [12]. У штамма *D. tsuruhatensis* MR-6/3H были обнаружены три гена синтеза и экскреции ЛПС: *gmd*, *wzt* и *per*. В геноме MR-6/3H также были обнаружены другие типы предполагаемых генов вирулентности, кодирующих элементы системы секреции IV типа, факторы выживания при стрессе (каталаза, супероксиддисмутаза и уреаза), сидерофоры и т.д. Это указывает на то, что MR-6/3H обладает особым набором факторов, которые могут придавать вирулентность, сравнимую со свойствами штаммов клинического происхождения: *D. tsuruhatensis* 161/1 и *D. tsuruhatensis* 11304. Примечательно, что аналогичный набор предполагаемых генов вирулентности был обнаружен у *D. tsuruhatensis* 11304 [42]. Упомянутые выше гены, кодирующие синтез и экскрецию ЛПС, наблюдались только у штаммов, имеющих клиническое или животное происхождение. Помимо иммуномодулирующего эффекта, который оказывает ЛПС, решающая роль этого фактора в колонизации животных и человека была также отмечена в отношении таких патогенов, как *Aeromonas hydrophila* [122], *Salmonella enterica* серовар Typhimurium [105], *Helicobacter pylori* и *P. aeruginosa* [114]. Вероятно, ассоциация наличия генов ЛПС с животным и человеческим происхождением некоторых штаммов не случайна. Тем не менее, предсказанные факторы вирулентности были обнаружены с использованием модели гомологии белков на уровне генотипа и нуждаются в дальнейшем экспериментальном исследовании, чтобы показать их вклад в вирулентность *D. tsuruhatensis*.

Устойчивость к противомикробным препаратам является важнейшей проблемой глобального здравоохранения. Большое количество патогенов приобретают гены резистентности и обмениваются ими, что приводит к неэффективности противомикробной терапии [128]. О резистентности, в частности о множественной лекарственной устойчивости (МЛУ)

клинических штаммов *D. tsuruhatensis*, сообщалось несколько раз. В 2011 году Preiswerk и соавт. сообщили о первом случае инфекции *D. tsuruhatensis*, при которой штамм, выделенный из крови, был устойчив к ампициллину, цефалоспорином I и II поколений, всем тестируемым аминогликозидам и колистину, но был чувствителен к амоксициллину-клавуланату, пиперациллину-тазобактаму, цефалоспорином III поколения, фторхинолонам и карбапенемам [142]. В другом случае, о котором сообщалось в 2021 году, штамм, выделенный из образца мокроты TR1180, был резистентен к β -лактамам (ампициллину и цефазолину), всем протестированным аминогликозидам, тетрациклину и триметоприму-сульфаметоксазолу [194]. Оба вышеупомянутых профиля чувствительности весьма схожи. Наш штамм MR-6/3H имел почти такой же фенотип, включая устойчивость почти ко всем β -лактамам, всем аминогликозидам, хлорамфениколу и триметоприму-сульфаметоксазолу, но был чувствителен к цефтазидиму, тетрациклину, ципрофлоксацину и левофлоксацину. В целом, фенотип штамма MR-6/3H коррелировал с наблюдаемым резистентом, за исключением тетрациклина и фторхинолонов. Можно предположить, что устойчивость к последним опосредована нарушениями в некоторых системах, кодирующих системы эффлюкса, нарушенной регуляцией этих генов, а также снижением их экспрессии. С другой стороны, устойчивость к фторхинолонам у грамотрицательных бактерий обычно связана с мутациями в гене *gyrA* (ДНК-гираза) и, в меньшей степени, с эффлюксами [78]. Анализ резистента также выявил сходство между предполагаемыми факторами резистентности, которые в основном были связаны с эффлюксом, у разных штаммов *Delftia*. Системы эффлюкса способны выделять из клетки широкий спектр токсичных соединений, включая антибиотики. В 2021 году Cong Cheng и соавт. сообщили о схожих факторах устойчивости, включая разнообразные эффлюксные насосы (*mexC*, *mexD*, *oprJ*, *muxB*, *oqxV*, *adeB*, *adeS*, *mdtC* и др.), при анализе штамма *D. tsuruhatensis* TR1180 с множественной лекарственной устойчивостью [135]. По-видимому, основной механизм природной

резистентности видов *Delftia* связан с регуляцией проницаемости мембран и систем оттока, что характерно для *P. aeruginosa*, которая использует системы множественного оттока лекарственных средств (Mex) и в основном порины [195]. Кроме того, мы обнаружили родоспецифичную β -лактамазу, кодируемую хромосомно, которая была близка к *Klebsiella* OXA-926 бета-лактамазе с идентичностью аминокислотной последовательности 70-73% в зависимости от конкретного штамма. Последний был выявлен в 2021 году у *Klebsiella pneumoniae* ST29 [112]. OXA относится к β -лактамазам класса D, которые обладают различной субстратной специфичностью по отношению к β -лактамам, но также могут быть мобилизованы плазмидами [153]. Сообщалось, что OXA-926 снижает чувствительность к пиперациллину, пиперациллин-тазобактаму и цефалотину, а также обеспечивает частичную устойчивость к авибактаму. Конкретная субстратная специфичность обнаруженной OXA- β -лактамазы *Delftia* spp. неясна, но сам факт ее существования вызывает опасения по поводу вероятности ее мобилизации и дальнейшей эволюции в клинических штаммах *D. tsuruhatensis*. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными результатами геномного исследования TR1180 [42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время наблюдается рост числа новых (эмерджентных) инфекционных агентов, вызванный различными факторами, большинство из которых имеют антропогенный характер. Наряду с новыми вирусными инфекциями, немалое значение имеют новые бактериальные инфекции. В отличие от вирусных агентов, бактериальные часто имеют происхождение, не связанное с животными, способны автономно существовать в окружающей среде и, таким образом, являются возбудителями эмерджентных сапронозных инфекций. К таким возбудителям относятся *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*. Данные микроорганизмы привлекают внимание исследователей как возбудители внутри- и внебольничных инфекций, лечение которых осложнено природной множественной лекарственной устойчивостью возбудителей.

В результате проведенного исследования впервые в России выделен и охарактеризован штамм *E. anophelis*, также данный вид бактерий впервые в мире выделен из сырого молока. Однако в рамках данного исследования не представляется возможным идентифицировать точное происхождение данного штамма, так как цепь “производства” молока комплексная и контаминация могла произойти на любом этапе. Тем не менее присутствие данных возбудителей в сыром молоке вызывает опасения. Штамм *E. anophelis* ML-44, выделенный из молока, обладает гемолитической активностью, не описанной ранее. Широкое распространение *E. anophelis* в окружающей среде, включая водопроводную воду, пресные воды, растения, животных и человека, подчеркивает его убиквитарность. *E. anophelis* обладает факторами вирулентности, включая гомолог гена усилителя инфекционности макрофагов *L. pneumophila* (Mip) и гомолог металлопротеиназы *M. tuberculosis* Zmp1, что позволяет предположить, что он может проходить внутриклеточную стадию во время инфекционного процесса. Однако для подтверждения этой гипотезы требуются углубленные экспериментальные исследования. Высокая устойчивость *E. anophelis* к антибиотикам, включая

бета-лактамы, аминогликозиды, тетрациклины и прочие, делает его особенно опасным патогеном с точки зрения антимикробной терапии инфекций. Стоит также подчеркнуть необходимость разработки критериев для определения чувствительности *E. anophelis* к противомикробным препаратам, а также разработать схемы лечения. Дальнейший мониторинг различных источников необходим для более глубокого изучения биологии *E. anophelis* и разработки эффективных мер профилактики и лечения инфекций, вызванных этим патогеном.

Исследованный в настоящей работе штамм *D. tsuruhatensis* MR-6/3H, выделенный из сырого молока, был филогенетически близок к штаммам клинического происхождения и обладал общим с последними набором предполагаемых факторов вирулентности. Сырое молоко может быть возможным источником, а также потенциальным путем передачи *D. tsuruhatensis*. Однако конкретный источник этого штамма остается неясным. MR-6/3H также демонстрировал фенотип множественной лекарственной устойчивости, что также соответствовало проведенному резистомному анализу. Носительство различных генов, кодирующих эффлюксные насосы, указывает на то, что механизмы устойчивости к противомикробным препаратам *D. tsuruhatensis* основаны главным образом на эффлюксе молекул антибиотиков. Однако, учитывая ограничения подхода NGS, необходимы дальнейшие эксперименты для выяснения того, какие конкретные гены ответственны за устойчивость к противомикробным препаратам, а также за патогенность *D. tsuruhatensis*. В целом род *Delftia* требует таксономической ревизии, что отмечено как в результате данной диссертационной работы, так и в некоторых других исследованиях. Кроме того, учитывая повсеместное распространение, высокую экологическую пластичность, наличие некоторых предполагаемых факторов вирулентности и детерминанты внутренней резистентности, *D. tsuruhatensis* обладает большими возможностями для успеха в качестве нового нозокомиального патогена. Для надлежащего надзора за *D. tsuruhatensis* необходимы дальнейшие эпидемиологические

исследования, в частности выявление источника инфекции, а также разработка клинических рекомендаций по антимикробной терапии.

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ТСА – триптон-соевый агар

ТСБ – триптон-соевый бульон

ОРС – открытая рамка считывания

п.о. – пар оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МХА – агар Мюллера-Хинтона

ANI – average nucleotide identity (средненуклеотидная идентичность)

BLAST – basic local alignment search tool

CARD – Comprehensive Antibiotic Resistance Database

dNTP (deoxynucleoside triphosphate) - дезоксинуклеозидтрифосфат

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Европейский комитет по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам)

ICE – integrative and conjugative element (интегративно-конъюгативный элемент)

MBLs – металло-бета-лактамазы

SARS – severe acute respiratory syndrome (тяжелый острый респираторный синдром)

TYGS – Type Strain Genome Server (Геномный центр типовых штаммов)

TIVSS – type IV secretion system (система секреции 4 типа)

VFDB – Virulence Factor Database

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Годова Г. В. Овощные растения как возможные резервуары листерий. / Годова Г. В., Пушкарева В. И., Калашникова Е. А., Борисова Е. Ю., Ермолаева С. А., Литвин В. Ю. // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2009. – №4. – с.80–89.
2. Собянин К. А. Роль природных вариантов факторов инвазии *Listeria monocytogenes* в перинатальном листериозе. / Собянин К. А., Сысолятина Е. В., Чаленко Я. М., Лаврикова А. Я., Калинин Е. В., Пушкарева В. И., Ермолаева С. А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – №4. – с.114–118.
3. Кондратенко О. В. Инфекции, ассоциированные с бактериями рода *Elizabethkingia*, у детей с муковисцидозом и оперированными по причине врожденных пороков сердца: микробиологические особенности и клиническое значение // Архив педиатрии и детской хирургии. – 2024. – № 1. – с.113–120.
4. Литвин Ю. В. Природная очаговость болезней: развитие концепции к исходу века. / Литвин Ю. В., Коренберг Э. И. // Паразитология. – 1999. – №33 (3). – с.179–191.
5. Adgamov R. R. Ecological and genetic mechanisms of development of epidemiologically significant strains of sapronosis causative agents. / Adgamov R. R., Timchenko N. F., Zaitseva E. A., Pushkareva V. I., Kolbasov D. V., Egorova I. Yu., Pukhovskaya N. M., Musatov Yu. S., Ivanov L. I., Ermolaeva S. A. // Biology Bulletin Reviews. – 2013. – Т.3, №2. – с.125–138.
6. Galaxy Community. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. / Galaxy Community // Nucleic Acids Research. – 2022. – Т.50, №W1. – с.W345–W351.

7. Agafonova N. V. A novel Delftia plant symbiont capable of autotrophic methylotrophy. / Agafonova N. V., Doronina N. V., Kaparullina E. N., Fedorov D. N., Gafarov A. B., Sazonova O. I., Sokolov S. L., Trotsenko Yu. A. // Mikrobiologiya. – 2017. – T.86, №1. – c.88–98.
8. Agrati C. Emerging viral infections in immunocompromised patients: A great challenge to better define the role of immune response. / Agrati C., Bartolini B., Bordoni V., Locatelli F., Capobianchi M. R., Di Caro A., Castilletti C., Ippolito G. // Frontiers in Immunology. – 2023. – T.14. – 1147871.
9. Alarcon I. The Role of Twitching Motility in Pseudomonas aeruginosa Exit from and Translocation of Corneal Epithelial Cells. / Alarcon I., Evans D. J., Fleiszig S. M. J. // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2009. – T.50, №5. – c.2237–2244.
10. Alcock B. P. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. / Alcock B. P., Huynh W., Chalil R., Smith K. W., Raphenya A. R., Wlodarski M. A., Edalatmand A., Petkau A., Syed S. A., Tsang K. K., Baker S. J. C., Dave M., McCarthy M. C., Mukiri K. M., Nasir J. A., Golbon B., Imtiaz H., Jiang X., Kaur K., Kwong M., Liang Z. C., Niu K. C., Shan P., Yang J. Y. J., Gray K. L., Hoad G. R., Jia B., Bhandu T., Carfrae L. A., Farha M. A., French S., Gordzevich R., Rachwalski K., Tu M. M., Bordeleau E., Dooley D., Griffiths E., Zubyk H. L., Brown E. D., Maguire F., Beiko R. G., Hsiao W. W. L., Brinkman F. S. L., Van Domselaar G., McArthur A. G. // Nucleic Acids Research. – 2023. – T.51, №D1. – c.D690–D699.
11. Arndt D. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. / Arndt D., Grant J. R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D. S. // Nucleic Acids Research. – 2016. – T.44, №W1. – c.W16–W21.

12. Aurell C. A. Critical aggregation concentrations of gram–negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). / Aurell C. A., Wistrom A. O. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1998. – T.253, №1. – c.119–123.
13. Aziz R. K. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. / Aziz R. K., Bartels D., Best A. A., DeJongh M., Disz T., Edwards R. A., Formsma K., Gerdes S., Glass E. M., Kubal M., Meyer F., Olsen G. J., Olson R., Osterman A. L., Overbeek R. A., McNeil L. K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G. D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. // *BMC Genomics*. – 2008. – T.9. – 75.
14. Bahia A. C. Exploring Anopheles gut bacteria for Plasmodium blocking activity. / Bahia A. C., Dong Y., Blumberg B. J., Mlambo G., Tripathi A., BenMarzouk–Hidalgo O. J., Chandra R., Dimopoulos G. // *Environmental Microbiology*. – 2014. – T.16, №9. – c.2980–2994.
15. Baker R. E. Infectious disease in an era of global change. / Baker R. E., Mahmud A. S., Miller I. F., Rajeev M., Rasambainarivo F., Rice B. L., Takahashi S., Tatem A. J., Wagner C. E., Wang L.–F., Wesolowski A., Metcalf C. J. E. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2022. – T.20. – c.193–205.
16. Beadle C. History of malaria in the United States Naval Forces at war: World War I through the Vietnam conflict. / Beadle C., Hoffman S. L. // *Clinical Infectious Diseases*. – 1993. – T.16, №2. – c.320–329.
17. Bellais S. Genetic–biochemical analysis and distribution of the Ambler class A beta–lactamase CME–2, responsible for extended–spectrum cephalosporin resistance in *Chryseobacterium* (Flavobacterium) *meningosepticum*. / Bellais S., Poirel L., Naas T., Girlich D., Nordmann P. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – T.44, №1. – c.1–9.
18. Bertelli C. Enabling genomic island prediction and comparison in multiple genomes to investigate bacterial evolution and outbreaks. / Bertelli C., Gray K. L., Woods N., Lim A. C., Tilley K. E., Winsor G. L., Hoad G. R., Roudgar A., Spencer

A., Peltier J., Warren D., Raphenya A. R., McArthur A. G., Brinkman F. S. L. // *Microbial Genomics*. – 2022. – T.8, №5. – Article mgen000818.

19. Bertels F. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. / Bertels F., Silander O. K., Pachkov M., Rainey P. B., van Nimwegen E. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2014. – T.31, №5. – C.1077–1088.

20. Bhat S. V. Phylogenomic analysis of the genus *Delftia* reveals distinct major lineages with ecological specializations. / Bhat S. V., Maughan H., Cameron A. D. S., Yost C. K. // *Microbial Genomics*. – 2022. – T.8, №9. – mgen000864.

21. Bilgin H. *Delftia acidovorans*: A rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. / Bilgin H., Sarmis A., Tigen E., Soyletir G., Mulazimoglu L. // *Case Reports in Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. – 2015. – T.26, №5. – c.277–279.

22. Boden R. Reclassification of *Thiobacillus aquaesulis* (Wood & Kelly, 1995) as *Annwoodia aquaesulis* gen. nov., comb. nov., transfer of *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904) from the Hydrogenophilales to the Nitrosomonadales, proposal of Hydrogenophilalia class. nov. within the 'Proteobacteria', and four new families within the orders Nitrosomonadales and Rhodocyclales. / Boden R., Hutt L. P., Rae A. W. // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2017. – T.67, №5. – c.1191–1205.

23. Bolger A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. / Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. // *Bioinformatics*. – 2014. – T.30, №15. – c.2114–2120.

24. Brandsema B. Neonatal *Elizabethkingia anophelis* meningitis originating from the water reservoir of an automated infant milk dispenser, the Netherlands, February 2024. / Brandsema B., Fleurke G.-J., Rosema S., Schins E. M. W., Helfferich J., Bathoorn E. // *Eurosurveillance*. – 2024. – T.29, – №14.

25. Brettin T. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. / Brettin T., Davis J. J., Disz T., Edwards R. A., Gerdes S., Olsen G. J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G. D., Shukla M., Thomason J. A., Stevens R., Vonstein V., Wattam A. R., Xia F. // *Scientific Reports*. – 2015. – T.5. – c.8365.
26. Breurec S. Genomic epidemiology and global diversity of the emerging bacterial pathogen *Elizabethkingia anophelis*. / Breurec S., Criscuolo A., Diancourt L., Rendueles O., Vandenbogaert M., Passet V., Caro V., Rocha E. P. C., Touchon M., Brisse S. // *Scientific Reports*. – 2016. – T.6. – 30379.
27. Buchholz U. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. / Buchholz U., Bernard H., Werber D., Böhmer M. M., Remschmidt C., Wilking H., Deleré Y., an der Heiden M., Adlhoch C., Dreesman J., Ehlers J., Ethelberg S., Faber M., Frank C., Fricke G., Greiner M., Höhle M., Ivarsson S., Jark U., Kirchner M., Koch J., Krause G., Lubert P., Rosner B., Stark K., Kühne M. // *N Engl J Med*. – 2011. – T.365, №19. – c.1763–1770.
28. Bulagonda E. P. Comparative genomic analysis of a naturally competent *Elizabethkingia anophelis* isolated from an eye infection. / Bulagonda E. P., Manivannan B., Mahalingam N., Lama M., Chanakya P. P., Khamari B., Jadhao S., Vasudevan M., Nagaraja V. // *Sci Rep*. – 2018. – T.8, №1. – c.8447.
29. Burnard D. Comparative Genomics and Antimicrobial Resistance Profiling of *Elizabethkingia* Isolates Reveal Nosocomial Transmission and In Vitro Susceptibility to Fluoroquinolones, Tetracyclines, and Trimethoprim–Sulfamethoxazole. / Burnard D., Gore L., Henderson A., Ranasinghe A., Bergh H., Cottrell K., Sarovich D. S., Price E. P., Paterson D. L., Harris P. N. A. // *J Clin Microbiol*. – 2020. – T.58, №9. – c.e00730–20.
30. Calamita H. The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is

required for full virulence. / Calamita H., Ko C., Tyagi S., Yoshimatsu T., Morrison N. E., Bishai W. R. // Cell Microbiol. – 2005. – T.7, №2. – c.233–244.

31. Yasmin M. Characterization of a Novel Pathogen in Immunocompromised Patients: Elizabethkingia Anopheles. / Yasmin M., Marshall S., Marshall E., Cmolik A., Boucher H., Vila A., Bonomo R. A. // Open Forum Infect Dis. – 2020. – T.7. – c.S725.

32. Chaaban S. Bacterial Infections Associated with Immunosuppressive Agents Commonly Used in Patients with Interstitial Lung Diseases. / Chaaban S., Sadikot R. T. // Pathogens. – 2023. – T.12, №3. – c.464.

33. Chaires A. Draft Genome Sequence of Delftia tsuruhatensis Strain 45.2.2, Colonizer of Zebrafish, Danio rerio, Skin Mucus. / Chaires A., Thomas K., Estes A. M., Jozwick A. K. // Microbiol Resour Announc. – 2022. – T.11, №11. – c.e0066622.

34. Chang T.–Y. In vitro activities of imipenem, vancomycin, and rifampicin against clinical Elizabethkingia species producing BlaB and GOB metallo–beta–lactamases. / Chang T.–Y., Chen H.–Y., Chou Y.–C., Cheng Y.–H., Sun J.–R. // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2019. – T.38, №11. – c.2045–2052.

35. Chastain D. Urgent need to address infectious diseases due to immunosuppressive therapies. / Chastain D., Stover K. R. // Ther Adv Infect Dis. – 2023. – T.10. – c.20499361231168512.

36. Chaudhary S. The First Reported Case of Elizabethkingia anophelis From Nepal. / Chaudhary S., Rijal A., Rajbhandari P., Acharya A. B. // Cureus. – 2023. – T.15, №9. – c.e45346.

37. Chen C. TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. / Chen C., Chen H., Zhang Y., Thomas H. R., Frank M. H., He Y., Xia R. // Mol Plant. – 2020. – T.13, №8. – c.1194–1202.

38. Chen K.–T. Emerging Infectious Diseases and One Health: Implication for Public Health. / Chen K.–T. // *Int J Environ Res Public Health*. – 2022. – T.19, №15. – c.9081.
39. Chen, L. Ammonium removal characteristics of *Delftia tsuruhatensis* SDU2 with potential application in ammonium-rich wastewater treatment / Chen L., Chen L., Pan D., Ren Y., Zhang J., Zhou B., Lin J. // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2023. – T. 20. – c. 3911–3926.
40. Chen S. Comparative genomic analyses reveal diverse virulence factors and antimicrobial resistance mechanisms in clinical *Elizabethkingia meningoseptica* strains. / Chen S., Soehnlén M., Blom J., Terrapon N., Henrissat B., Walker E. D. // *PLoS One*. – 2019. – T.14, №10. – c.e0222648.
41. Chen S. *Elizabethkingia anophelis*: Molecular Manipulation and Interactions with Mosquito Hosts. / Chen S., Bagdasarian M., Walker E. D. // *Appl Environ Microbiol*. – 2015. – T.81, №6. – c.2233–2243.
42. Cheng C. Genomic Analysis of *Delftia tsuruhatensis* Strain TR1180 Isolated From A Patient From China With In4–Like Integron–Associated Antimicrobial Resistance. / Cheng C., Zhou W., Dong X., Zhang P., Zhou K., Zhou D., Qian C., Lin X., Li P., Li K., Bao Q., Xu T., Lu J., Ying J. // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2021. – T.11. – c.663933.
43. Chiang M.–H. Proteomic Network of Antibiotic–Induced Outer Membrane Vesicles Released by Extensively Drug–Resistant *Elizabethkingia anophelis*. / Chiang M.–H., Chang F.–J., Kesavan D. K., Vasudevan A., Xu H., Lan K.–L., Huang S.–W., Shang H.–S., Chuang Y.–P., Yang Y.–S., Chen T.–L. // *Microbiol Spectr*. – 2022. – T.10, №4. – c.e0026222.
44. Chiu C.–T. Comparative Analysis of Gradient Diffusion and Disk Diffusion with Agar Dilution for Susceptibility Testing of *Elizabethkingia anophelis*. / Chiu C.–T., Lai C.–H., Huang Y.–H., Yang C.–H., Lin J.–N. // *Antibiotics (Basel)*. – 2021. – T.10, №4. – c.450.

45. Cho S.-M. First Identification of IMP-1 Metallo- β -Lactamase in *Delftia tsuruhatensis* Strain CRS1243 Isolated From a Clinical Specimen. / Cho S.-M., Hong S. G., Lee Y., Song W., Yong D., Jeong S. H., Lee K., Chong Y. // *Ann Lab Med.* – 2021. – T.41, №4. – c.436–438.
46. Cianciotto N. P. *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. / Cianciotto N. P., Fields B. S. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – T.89, №11. – c.5188–5191.
47. Cock P. J. A. NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. / Cock P. J. A., Chilton J. M., Grüning B., Johnson J. E., Soranzo N. // *Gigascience.* – 2015. – T.4. – c.39.
48. Commans F. Whole-genome sequence and resistance determinants of four *Elizabethkingia anophelis* clinical isolates collected in Hanoi, Vietnam. / Commans F., Hayer J., Do B. N., Tran T. T. T., Le T. T. H., Bui T. T., Le H. S., Bañuls A.-L., Bui T. S., Nguyen Q. H. // *Sci Rep.* – 2024. – T.14, №1. – c.7241.
49. Couvin D. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. / Couvin D., Bernheim A., Toffano-Nioche C., Touchon M., Michalik J., Néron B., Rocha E. P. C., Vergnaud G., Gautheret D., Pourcel C. // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – T.46, №W1. – c.W246–W251.
50. Coyne S. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. / Coyne S., Rosenfeld N., Lambert T., Courvalin P., Périchon B. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – T.54, №10. – c.4389–4393.
51. Doijad S. Taxonomic reassessment of the genus *Elizabethkingia* using whole-genome sequencing: *Elizabethkingia endophytica* Kämpfer et al. 2015 is a later subjective synonym of *Elizabethkingia anophelis* Kämpfer et al. 2011. / Doijad S., Ghosh H., Glaeser S., Kämpfer P., Chakraborty T. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2016. – T.66, №11. – c.4555–4559.

52. Dropulic L. Overview of Infections in the Immunocompromised Host. / Dropulic L., Lederman H. M. // *Microbiol Spectr.* – 2016. – T.4, №4. – c.10.1128/microbiolspec.DMIH2–0026–2016.
53. Dunning Hotopp J. C. Horizontal gene transfer between bacteria and animals. / Dunning Hotopp J. C. // *Trends Genet.* – 2011. – T.27, №4. – c.157–163.
54. Silva B. Microbiota identified from preserved Anopheles. / Silva B., Matsena Zingoni Z., Koekemoer L. L., Dahan–Moss Y. L. // *Malar J.* – 2021. – T.20. – c.230.
55. Fang L.–X. Emerging High–Level Tigecycline Resistance: Novel Tetracycline Destructases Spread via the Mobile Tet(X). / Fang L.–X., Chen C., Cui C.–Y., Li X.–P., Zhang Y., Liao X.–P., Sun J., Liu Y.–H. // *Bioessays.* – 2020. – T.42, №8. – c.e2000014.
56. Fofana A. Analyzing gut microbiota composition in individual Anopheles mosquitoes after experimental treatment. / Fofana A., Gendrin M., Romoli O., Yarbanga G. A. B., Ouédraogo G. A., Yerbanga R. S., Ouédraogo J.–B. // *iScience.* – 2021. – T.24, №12. – c.103416.
57. Franco–Frías E. Analysis of bacterial communities by 16S rRNA gene sequencing in a melon–producing agro–environment. / Franco–Frías E., Mercado–Guajardo V., Merino–Mascorro A., Pérez–Garza J., Heredia N., León J. S., Jaykus L.–A., Dávila–Aviña J., García S. // *Microbial Ecology.* – 2021. – T.82, №3. – c.613–622.
58. Frank T. First case of Elizabethkingia anophelis meningitis in the Central African Republic. / Frank T., Gody J. C., Nguyen L. B. L., Berthet N., Le Fleche–Mateos A., Bata P., Rafai C., Kazanji M., Breurec S. // *Lancet.* – 2013. – T.381, №9880. – c.1876.
59. García–López M. Analysis of 1,000 Type–Strain Genomes Improves Taxonomic Classification of Bacteroidetes. / García–López M., Meier–Kolthoff J.

P., Tindall B. J., Gronow S., Woyke T., Kyrpides N. C., Hahnke R. L., Göker M. // *Front Microbiol.* – 2019. – T.10 –c.2083.

60. Ghafoori S. M. Structural characterization of a Type B chloramphenicol acetyltransferase from the emerging pathogen *Elizabethkingia anophelis* NUHP1. / Ghafoori S. M., Robles A. M., Arada A. M., Shirmast P., Dranow D. M., Mayclin S. J., Lorimer D. D., Myler P. J., Edwards T. E., Kuhn M. L., Forwood J. K. // *Sci Rep.* – 2021. – T.11. – c.9453.

61. Gibbons R. V. Dengue and US military operations from the Spanish–American War through today. / Gibbons R. V., Streitz M., Babina T., Fried J. R. // *Emerg Infect Dis.* – 2012. – T.18, №4. – c.623–630.

62. González L. J. Carbapenem resistance in *Elizabethkingia meningoseptica* is mediated by metallo- β -lactamase BlaB. / González L. J., Vila A. J. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2012. – T.56, №4. – c.1686–1692.

63. Goris J. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole–genome sequence similarities. / Goris J., Konstantinidis K. T., Klappenbach J. A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J. M. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2007. – T.57, №1. – c.81–91.

64. Guerpillon B. *Elizabethkingia anophelis* outbreak in France. / Guerpillon B., Fangous M. S., Le Breton E., Artus M., le Gall F., Khatchatourian L., Talarmin J. P., Plesiat P., Jeannot K., Saidani N., Rolland–Jacob G. // *Infect Dis Now.* – 2022. – T.52, №5. – c.299–303.

65. Guillon H. Characterization of CSP–1, a novel extended–spectrum beta–lactamase produced by a clinical isolate of *Capnocytophaga sputigena*. / Guillon H., Eb F., Mammeri H. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – T.54, №5. – c.2231–2234.

66. Guo H. Comparative Genomic Analysis of *Delftia tsuruhatensis* MTQ3 and the Identification of Functional NRPS Genes for Siderophore Production. / Guo H.,

Yang Y., Liu K., Xu W., Gao J., Duan H., Du B., Ding Y., Wang C. // *Biomed Res Int.* – 2016. – T.2016. – c.3687619.

67. Gurevich A. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. / Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. // *Bioinformatics.* – 2013. – T.29, №8. – c.1072–1075.

68. Han M.–S. Relative prevalence and antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Elizabethkingia* species based on 16S rRNA gene sequencing. / Han M.–S., Kim H., Lee Y., Kim M., Ku N. S., Choi J. Y., Yong D., Jeong S. H., Lee K., Chong Y. // *J Clin Microbiol.* – 2017. – T.55, №1. – c.274–280.

69. Hantsis–Zacharov E. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. / Hantsis–Zacharov E., Halpern M. // *Appl Environ Microbiol.* – 2007. – T.73, №22. – c.7162–7168.

70. Hazarie S. Interplay between population density and mobility in determining the spread of epidemics in cities. / Hazarie S., Soriano–Paños D., Arenas A., Gómez–Gardeñes J., Ghoshal G. // *Commun Phys.* – 2021. – T.4. – c.191.

71. Hem S. Genomic analysis of *Elizabethkingia* species from aquatic environments: Evidence for potential clinical transmission. / Hem S., Jarocki V. M., Baker D. J., Charles I. G., Drigo B., Aucote S., Donner E., Burnard D., Bauer M. J., Harris P. N. A., Wyrsh E. R., Djordjevic S. P. // *Curr Res Microb Sci.* – 2021. – T.3. – c.100083.

72. Hu S. Biofilm formation and antibiotic sensitivity in *Elizabethkingia anophelis*. / Hu S., Lv Y., Xu H., Zheng B., Xiao Y. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2022. – T.12. –c.953780.

73. Hu S. Population genomics of emerging *Elizabethkingia anophelis* pathogens reveals potential outbreak and rapid global dissemination. / Hu S., Xu H., Meng X., Bai X., Xu J., Ji J., Ying C., Chen Y., Shen P., Zhou Y., Zheng B., Xiao Y. // *Emerg Microbes Infect.* – 2022. – T.11. – c.2590–2599.

74. Huang W. Delftia tsuruhatensis TC1 symbiont suppresses malaria transmission by anopheline mosquitoes. / Huang W., Rodrigues J., Bilgo E., Tormo J. R., Challenger J. D., De Cozar-Gallardo C., Pérez-Victoria I., Reyes F., Castañeda-Casado P., Gnambani E. J., Hien D. F. de S., Konkobo M., Urones B., Coppens I., Mendoza-Losana A., Ballell L., Diabate A., Churcher T. S., Jacobs-Lorena M. // Science. – 2023. – T.381, №6657. – c.533–540.
75. Hubálek Z. Emerging human infectious diseases: anthroponoses, zoonoses, and sapronoses. / Hubálek Z. // Emerg Infect Dis. – 2003. – T.9, №3. – c.403–404.
76. Ichiki K. Genomic and phylogenetic characterization of Elizabethkingia anophelis strains: The first two cases of life-threatening infection in Japan. / Ichiki K., Ooka T., Shinkawa T., Inoue S., Hayashida M., Nakamura D., Akimoto M., Yoshimitsu M., Kawamura H., Nakamura M., Obama Y., Gotoh Y., Hayashi T., Nishi J., Ishitsuka K. // J Infect Chemother. – 2023. – T.29, №4. – c.376–383.
77. Jacobs A. Biofilm formation and adherence characteristics of an Elizabethkingia meningoseptica isolate from Oreochromis mossambicus. / Jacobs A., Chenia H. Y. // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2011. – T.1. –c.10–16.
78. Jacoby G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. / Jacoby G. A. // Clin Infect Dis. – 2005. – T.41. – c.S120–126.
79. Janda J. M. Mini review: New pathogen profiles: Elizabethkingia anophelis. / Janda J. M., Lopez D. L. // Diagn Microbiol Infect Dis. – 2017. – T.88, №2. – c.201–205.
80. Jian M. J. Fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant Elizabethkingia anophelis: phenotypic and genotypic characteristics of clinical isolates with topoisomerase mutations and comparative genomic analysis. / Jian M. J., Cheng Y. H., Chung H. Y., Cheng Y. H., Yang H. Y., Hsu C. S., Perng C. L., Shang H. S. // J Antimicrob Chemother. – 2019. – T.74, №6. – c.1503–1510.

81. Jiang H.–Y. Diets alter the gut microbiome of crocodile lizards. / Jiang H.–Y., Ma J.–E., Li J., Zhang X.–J., Li L.–M., He N., Liu H.–Y., Luo S.–Y., Wu Z.–J., Han R.–C., Chen J.–P. // *Front Microbiol.* – 2017. – T.8. – c.2073.
82. Johnson W. L. The draft genomes of *Elizabethkingia anophelis* of equine origin are genetically similar to three isolates from human clinical specimens. / Johnson W. L., Ramachandran A., Torres N. J., Nicholson A. C., Whitney A. M., Bell M., Villarma A., Humrighouse B. W., Sheth M., Dowd S. E., McQuiston J. R., Gustafson J. E. // *PLoS One.* – 2018. – T.13, №7. – c.e0200731.
83. Jones K. E. Global trends in emerging infectious diseases. / Jones K. E., Patel N. G., Levy M. A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J. L., Daszak P. // *Nature.* – 2008. – T.451, №7181. – c.990–993.
84. Juárez–Jiménez B. Metabolic characterization of a strain (BM90) of *Delftia tsuruhatensis* showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols. / Juárez–Jiménez B., Manzanera M., Rodelas B., Martínez–Toledo M. V., González–López J., Crognale S., Pesciaroli C., Fenice M. // *Biodegradation.* – 2010. – T.21, №3. – c.475–489.
85. Kämpfer P. *Elizabethkingia anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Anopheles gambiae*. / Kämpfer P., Matthews H., Glaeser S. P., Martin K., Lodders N., Faye I. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2011. – T.61. – c.2670–2675.
86. Kämpfer P. *Elizabethkingia endophytica* sp. nov., isolated from *Zea mays* and emended description of *Elizabethkingia anophelis* Kämpfer et al. 2011. / Kämpfer P., Busse H.–J., McInroy J. A., Glaeser S. P. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2015. – T.65, №7. – c.2187–2193.
87. Kanashenko M. E. Studying the sensitivity profile of *Elizabethkingia meningoseptica* to antibacterial drugs and disinfectants. / Kanashenko M. E., Mitskevich I. P., Kartsev N. N., Astashkin E. I., Detusheva E. V., Khramov M. V., Svetoch E. A., Fursova N. K. // *Clinical laboratory diagnostics.* – 2021. – T.66, №4. – c.242–247.

88. Kim H. Evaluating the Prevalence of Foodborne Pathogens in Livestock Using Metagenomics Approach. / Kim H., Cho J. H., Song M., Cho J. H., Kim S., Kim E. S., Keum G. B., Kim H. B., Lee J.-H. // *J Microbiol Biotechnol.* – 2021. – T.31, №12. – c.1701–1708.
89. Kim K. K. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. / Kim K. K., Kim M. K., Lim J. H., Park H. Y., Lee S.-T. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2005. – T.55, №3. – c.1287–1293.
90. King E. O. Studies on a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants. / King E. O. // *Am J Clin Pathol.* – 1959. – T.31, №3. – c.241–247.
91. Kukutla P. Insights from the Genome Annotation of *Elizabethkingia anophelis* from the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. / Kukutla P., Lindberg B. G., Pei D., Rayl M., Yu W., Steritz M., Faye I., Xu J. // *PLoS One.* – 2014. – T.9, №5. – c.e97715.
92. Kuo S.-C. Susceptibility of *Elizabethkingia* spp. to commonly tested and novel antibiotics and concordance between broth microdilution and automated testing methods. / Kuo S.-C., Tan M.-C., Huang W.-C., Wu H.-C., Chen F.-J., Liao Y.-C., Wang H.-Y., Shiau Y.-R., Lauderdale T.-L. // *J Antimicrob Chemother.* – 2021. – T.76, №3. – c.653–658.
93. Kyritsi M. A. First reported isolation of an emerging opportunistic pathogen (*Elizabethkingia anophelis*) from hospital water systems in Greece. / Kyritsi M. A., Mouchtouri V. A., Pournaras S., Hadjichristodoulou C. // *J Water Health.* – 2018. – T.16, №1. – c.164–170.
94. Larkin M. A. Clustal W and Clustal X version 2.0. / Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace

I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. // *Bioinformatics*. – 2007. – T.23, №21. – c.2947–2948.

95. Lau S. K. P. Elizabethkingia anophelis bacteremia is associated with clinically significant infections and high mortality. / Lau S. K. P., Chow W.–N., Foo C.–H., Curreem S. O. T., Lo G. C.–S., Teng J. L. L., Chen J. H. K., Ng R. H. Y., Wu A. K. L., Cheung I. Y. Y., Chau S. K. Y., Lung D. C., Lee R. A., Tse C. W. S., Fung K. S. C., Que T.–L., Woo P. C. Y. // *Sci Rep*. – 2016. – T.6. – c.26045.

96. Lee I. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. / Lee I., Ouk Kim Y., Park S. C., Chun J. // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2016. – T.66, №2. – c.1100–1103.

97. Lee Y. L. A dominant strain of Elizabethkingia anophelis emerged from a hospital water system to cause a three–year outbreak in a respiratory care center. / Lee Y. L., Liu K. M., Chang H. L., Lin J. S., Kung F. Y., Ho C. M., Lin K. H., Chen Y. T. // *J Hosp Infect*. – 2021. – T.108. – c.43–51.

98. Lee Y. L. The Evolutionary Trend and Genomic Features of an Emerging Lineage of Elizabethkingia anophelis Strains in Taiwan. / Lee Y. L., Liu K. M., Chang H. L., Liao Y. C., Lin J. S., Kung F. Y., Ho C. M., Lin K. H., Chen Y. T. // *Microbiol Spectr*. – 2022. – T.10, №1. – c.e0168221.

99. Lei X. P. Elizabethkingia miricola infection in Chinese spiny frog (Quasipaa spinosa). / Lei X. P., Yi G., Wang K. Y., OuYang P., Chen F., Huang X. L., Huang C., Lai W. M., Zhong Z. J., Huo C. L., Yang Z. X. // *Transbound Emerg Dis*. – 2019. – T.66, №2. – c.1049–1053.

100. Letunic I. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. / Letunic I., Bork P. // *Nucleic Acids Res*. – 2021. – T.49, №W1. – c.W293–W296.

101. Li H. Isolation and appraisal of a non–fermentative bacterium, Delftia tsuruhatensis, as denitrifying phosphate–accumulating organism and optimal

growth conditions. / Li H., Liu H., Zeng Q., Xu M., Li Y., Wang W., Zhong Y. // Journal of Water Process Engineering. – 2020. – T.36. – c.101296.

102. Li S. RanB, a putative ABC-type multidrug efflux transporter contributes to aminoglycosides resistance and organic solvents tolerance in *Riemerella anatipestifer*. / Li S., Chen Q., Gong X., Liu Y., Zheng F. // Veterinary Microbiology. – 2020. – T.243. – c.108641.

103. Li Y. *Chryseobacterium miricola* sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir. / Li Y., Kawamura Y., Fujiwara N., Naka T., Liu H., Huang X., Kobayashi K., Ezaki T. // Systematic and Applied Microbiology. – 2003. – T.26, №4. – c.523–528.

104. Li Y. Complete Genome Sequence and Transcriptomic Analysis of the Novel Pathogen *Elizabethkingia anophelis* in Response to Oxidative Stress. / Li Y., Liu Y., Chew S. C., Tay M., Salido M. M., Teo J., Lauro F. M., Givskov M., Yang L. // Genome Biology and Evolution. – 2015. – T.7, №6. – c.1676–1685.

105. Licht T. R. Role of lipopolysaccharide in colonization of the mouse intestine by *Salmonella typhimurium* studied by in situ hybridization. / Licht T. R., Krogfelt K. A., Cohen P. S., Poulsen L. K., Urbance J., Molin S. // Infection and Immunity. – 1996. – T.64, №9. – c.3811–3817.

106. Lin I. F. Mutant Prevention Concentrations of Ciprofloxacin and Levofloxacin and Target Gene Mutations of Fluoroquinolones in *Elizabethkingia anophelis*. / Lin I. F., Lai C. H., Lin S. Y., Lee C. C., Lee N. Y., Liu P. Y., Yang C. H., Huang Y. H., Lin J. N. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2022. – T.66, №7. – c.e0030122.

107. Lin J. N. Comparison of four automated microbiology systems with 16S rRNA gene sequencing for identification of *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia* species. / Lin J. N., Lai C. H., Yang C. H., Huang Y. H., Lin H. F., Lin H. H. // Sci Rep. – 2017. – T.7, №1. – c.13824.

108. Lin J. N. Genomic features, phylogenetic relationships, and comparative genomics of *Elizabethkingia anophelis* strain EM361–97 isolated in Taiwan. / Lin J. N., Lai C. H., Yang C. H., Huang Y. H., Lin H. H. // *Sci Rep.* – 2017. – T.7, №1. – c.14317.
109. Lin J. N. Clinical manifestations, molecular characteristics, antimicrobial susceptibility patterns and contributions of target gene mutation to fluoroquinolone resistance in *Elizabethkingia anophelis*. / Lin J. N., Lai C. H., Yang C. H., Huang Y. H., Lin H. H. // *J Antimicrob Chemother.* – 2018. – T.73, №9. – c.2497–2502.
110. Lin J. N. *Elizabethkingia* Infections in Humans: From Genomics to Clinics. / Lin J. N., Lai C. H., Yang C. H., Huang Y. H. // *Microorganisms.* – 2019. – T.7, №9. – c.295.
111. Liu B. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. / Liu B., Zheng D., Jin Q., Chen L., Yang J. // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – T.47, №D1. – c.D687–D692.
112. Liu L. KPC–2–Producing Carbapenem–Resistant *Klebsiella pneumoniae* of the Uncommon ST29 Type Carrying OXA–926, a Novel Narrow–Spectrum OXA β –Lactamase. / Liu L., Feng Y., Wei L., Xiao Y., Zong Z. // *Front Microbiol.* – 2021. – T.12. – c.701513.
113. Magiorakos A. P. Multidrug–resistant, Extensively Drug–resistant and Pandrug–resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. / Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson–Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L. // *Clin Microbiol Infect.* – 2012. – T.18, №3. – c.268–281.
114. Maldonado R. F. Lipopolysaccharide Modification in Gram–negative Bacteria During Chronic Infection. / Maldonado R. F., Sá–Correia I., Valvano M. A. // *FEMS Microbiol Rev.* – 2016. – T.40, №4. – c.480–493.

115. Mallinckrodt L. Review on Infection Control Strategies to Minimize Outbreaks of the Emerging Pathogen *Elizabethkingia anophelis*. / Mallinckrodt L., Huis In 't Veld R., Rosema S., Voss A., Bathoorn E. // *Antimicrob Resist Infect Control*. – 2023. – T.12, №1. – c.97.
116. Mandell G. L. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal--leukocyte interaction. / Mandell G. L. // *J Clin Invest*. - 1975. - T.55, №3. – c.561-566.
117. Matz C. Off the Hook—How Bacteria Survive Protozoan Grazing. / Matz C., Kjelleberg S. // *Trends Microbiol*. – 2005. – T.13, №7. – c.302–307.
118. McArthur D. B. Emerging Infectious Diseases. / McArthur D. B. // *Nurs Clin North Am*. – 2019. – T.54, №2. – c.297–311.
119. Institute of Medicine (US) Committee on Emerging Microbial Threats to Health, Lederberg, J., Shope, R. E., Oaks, S. C., Jr. (Eds.). *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. / Lederberg J., Shope R. E., Oaks S. C. Jr. (Eds.). // National Academies Press (US). – 1992.
120. Mee, P. T., Lynch, S. E., Walker, P. J., Melville, L., Duchemin, J. B. Detection of *Elizabethkingia* spp. in *Culicoides* Biting Midges, Australia. / Mee P. T., Lynch S. E., Walker P. J., Melville L., Duchemin J. B. // *Emerg Infect Dis*. – 2017. – T.23, №8. – c.1409–1410.
121. Meier–Kolthoff, J. P., Göker, M. TYGS is an automated high–throughput platform for state–of–the–art genome–based taxonomy. / Meier–Kolthoff J. P., Göker M. // *Nat Commun*. – 2019. – T.10, №1. – c.2182.
122. Merino S. The role of the O–antigen lipopolysaccharide on the colonization in vivo of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. / Merino S., Rubires X., Aguillar A., Guillot J. F., Tomás J. M. // *Microb Pathog*. – 1996. – T.20, №6. – c.325–333.

123. Moore L. S. P. Waterborne Elizabethkingia meningoseptica in Adult Critical Care. / Moore L. S. P., Beeching N. J., Crook D. W., Fawcett N., Hopkins S., Johnson A. P. // Emerg Infect Dis. – 2016. – T.22, №1. – c.9–17.
124. Morel M. A. Delftia sp. JD2: a potential Cr(VI)–reducing agent with plant growth–promoting activity. / Morel M. A., Ubalde M. C., Braña V., Castro–Sowinski S. // Arch Microbiol. – 2011. – T.193, №1. – c.63–68.
125. Morens D. M. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID–19. / Morens D. M., Fauci A. S. // Cell. – 2020. – T.182, №5. – c.1077–1092.
126. Morens D. M. The challenge of emerging and re–emerging infectious diseases. / Morens D. M., Folkers G. K., Fauci A. S. // Nature. – 2004. – T.430, №6996. – c.242–249.
127. Morse S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. / Morse S. S. // Emerging infectious diseases. – 1995. – T.1, №1. – c.7–15.
128. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. / Antimicrobial Resistance Collaborators // Lancet (London, England). – 2022. – T.399, №10325. – c.629–655.
129. Navon L. Investigation of Elizabethkingia anophelis Cluster – Illinois, 2014–2016. / Navon L., Clegg W. J., Morgan J., Austin C., McQuiston J. R., Blaney D. D., Walters M. S., Moulton–Meissner H., Nicholson A. // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2016. – T.65, №48. – c.1380–1381.
130. Nelson G. J. Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species. / Nelson G. J. // Biochim Biophys Acta. – 1967. – T.144, №2. – c.221–232.
131. Néron B., Littner E., Haudiquet M., Perrin A., Cury J., Rocha E. P. C. IntegronFinder 2.0: Identification and Analysis of Integrons across Bacteria, with a Focus on Antibiotic Resistance in Klebsiella. / Néron B., Littner E., Haudiquet M., Perrin A., Cury J., Rocha E. P. C. // Microorganisms. – 2022. – T.10, №4. – c.700.

132. Ngwa C. J. 16S rRNA gene-based identification of *Elizabethkingia meningoseptica* (Flavobacteriales: Flavobacteriaceae) as a dominant midgut bacterium of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) with antimicrobial activities. / Ngwa C. J., Glöckner V., Abdelmohsen U. R., Scheuermayer M., Fischer R., Hentschel U., Pradel G. // *J Med Entomol.* – 2013. – T.50, №2. – c.404–414.
133. Nielsen H. L. Rare *Elizabethkingia anophelis* meningitis case in a Danish male. / Nielsen H. L., Tarpgaard I. H., Fuglsang-Damgaard D., Thomsen P. K., Brisse S., Dalager-Pedersen M. // *JMM Case Rep.* – 2018. – T.5, №8. – c.e005163.
134. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. / Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team // *Bioinformatics.* – 2012. – T.28, №8. – c.1166–1167.
135. Pang Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. / Pang Z., Raudonis R., Glick B. R., Lin T. J., Cheng Z. // *Biotechnology advances.* – 2019. – T.37, №1. – c.177–192.
136. Parte A. C. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. / Parte A. C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J. P., Reimer L. C., Göker M. // *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* – 2020. – T.70, №11. – c.5607–5612.
137. Pearce-Duvet J. M. The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture and domestic animals in the evolution of human disease. / Pearce-Duvet J. M. // *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society.* – 2006. – T.81, №3. – c.369–382.
138. Pearson W. R. An introduction to sequence similarity ("homology") searching. / Pearson W. R. // *Current protocols in bioinformatics.* – 2013. – T.3. –c.3.1.1–3.1.8.

139. Perrin A. Evolutionary dynamics and genomic features of the Elizabethkingia anophelis 2015 to 2016 Wisconsin outbreak strain. / Perrin A., Larsonneur E., Nicholson A. C., Edwards D. J., Gundlach K. M., Whitney A. M., Gulvik C. A., Bell M. E., Rendueles O., Cury J., Hugon P., Clermont D., Enouf V., Loparev V., Juieng P., Monson T., Warshauer D., Elbadawi L. I., Walters M. S., Crist M. B., ... Brisse S. // Nature communications. – 2017. – T.8. – c.15483.
140. Potter S. C. HMMER web server: 2018 update. / Potter S. C., Luciani A., Eddy S. R., Park Y., Lopez R., Finn R. D. // Nucleic acids research. – 2018. – T.46, №W1. – c.W200–W204.
141. Preena P. G. Antimicrobial Resistance analysis of Pathogenic Bacteria Isolated from Freshwater Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) Cultured in Kerala, India. / Preena P. G., Dharmaratnam A., Swaminathan T. R. // Current microbiology. – 2020. – T.77, №11. – c.3278–3287.
142. Preiswerk B. Human infection with Delftia tsuruhatensis isolated from a central venous catheter. / Preiswerk B., Ullrich S., Speich R., Bloemberg G. V., Hombach M. // Journal of medical microbiology. – 2011. – T.60, №Pt 2. – c.246–248.
143. Pushkareva V. I. Listeria monocytogenes virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate Tetrahymena pyriformis, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. / Pushkareva V. I., Ermolaeva S. A. // BMC microbiology. – 2010. – T.10. – c.26.
144. Raman S. Transcription regulation by the Mycobacterium tuberculosis alternative sigma factor SigD and its role in virulence. / Raman S., Hazra R., Dascher C. C., Husson R. N. // Journal of bacteriology. – 2004. – T.186, №19. – c.6605–6616.
145. Ranc A. Delftia tsuruhatensis, an Emergent Opportunistic Healthcare-Associated Pathogen. / Ranc A., Dubourg G., Fournier P. E., Raoult D., Fenollar F. // Emerging infectious diseases. – 2018. – T.24, №3. – c.594–596.

146. Rani R. Effect of endosulfan tolerant bacterial isolates (*Delftia lacustris* IITISM30 and *Klebsiella aerogenes* IITISM42) with *Helianthus annuus* on remediation of endosulfan from contaminated soil. / Rani R., Kumar V., Gupta P., Chandra A. // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2019. – T.168. – c.315–323.
147. Rasch J. *Legionella*–protozoa–nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on *Caenorhabditis elegans* colonization. / Rasch J., Krüger S., Fontvieille D., Ünal C. M., Michel R., Labrosse A., Steinert M. // *International journal of medical microbiology : IJMM*. – 2016. – T.306, №6. – c.443–451.
148. Breeze A. C. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 6th edn. / Breeze A. C. // *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. – 2007. – T.92, №2. – c.F156.
149. Robson D. Consequences of captivity: health effects of far East imprisonment in World War II. / Robson D., Welch E., Beeching N. J., Gill G. V. // *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*. – 2009. – T.102, №2. – c.87–96.
150. Rodriguez–R L. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. / Rodriguez–R L., Konstantinidis K. T. // *PeerJ Preprints*. – 2016. – DOI: 10.7287/peerj.preprints.1900v1.
151. Rubin R. H. Fungal and bacterial infections in the immunocompromised host. / Rubin R. H. // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. – 1993. – Suppl 1: S42–S48.
152. Saffarian A., Mulet C., Tournebize R., Naito T., Sansonetti P. J., Pédrón T. Complete genome sequence of *Delftia tsuruhatensis* CM13 isolated from murine proximal colonic tissue. / Saffarian A., Mulet C., Tournebize R., Naito T., Sansonetti P. J., Pédrón T. // *Genome Announc*. – 2016. – T.4, №6. – e01398–16.
153. Sawa T., Kooguchi K., Moriyama K. Molecular diversity of extended–spectrum β –lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. / Sawa T., Kooguchi K., Moriyama K. // *J Intensive Care*. – 2020. – T.8. – c.13.

154. Sazonova O. I. Characterization and genomic analysis of the naphthalene-degrading *Delftia tsuruhatensis* ULwDis3 isolated from seawater. / Sazonova O. I., Ivanova A. A., Delegan Y. A., Streletskii R. A., Vershinina D. D., Sokolov S. L., Vetrova A. A. // *Microorganisms*. – 2023. – T.11, №4. – c.1092.
155. Shigematsu T. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. / Shigematsu T., Yumihara K., Ueda Y., Numaguchi M., Morimura S., Kida K. // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2003. – T.53, №5. – c.1479–1483.
156. Sklar J. G. M. tuberculosis intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates. / Sklar J. G., Makinoshima H., Schneider J. S., Glickman M. S. // *Mol Microbiol*. – 2010. – T.77, №3. – c.605–617.
157. Smith C. J. Activation of a cryptic streptomycin-resistance gene in the *Bacteroides* erm transposon, Tn4551. / Smith C. J., Owen C., Kirby L. // *Mol Microbiol*. – 1992. – T.6, №16. – c.2287–2297.
158. Snesrud E. Clinical and Genomic Features of the First Cases of *Elizabethkingia anophelis* Infection in New York, Including the First Case in a Healthy Infant Without Previous Nosocomial Exposure. / Snesrud E., McGann P., Walsh E., Ong A., Maybank R., Kwak Y., Campbell J., Jones A., Vore K., Hinkle M., Lesho E. // *J Pediatr Infect Dis Soc*. – 2019. – T.8, №3. – c.269–271.
159. Sorvillo F. J. Emerging Infections: A Guide to Diseases, Causative Agents, and Surveillance. / Sorvillo F. J. // *Emerg Infect Dis*. – 2014. – T.20, №10. – c.1782.
160. Soto-Rodríguez S. A. Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. / Soto-Rodríguez S. A., Cabanillas-Ramos J., Alcaraz U., Gomez-Gil B., Romalde J. L. // *J Appl Microbiol*. – 2013. – T.115, №3. – c.654–662.

161. Stackebrandt E. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. / Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., Grimont P. A. D., Kämpfer P., Maiden M. C. J., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Trüper H. G., Vauterin L., Ward A. C., Whitman W. B. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2002. – T.52, №3. – c.1043–1047.
162. Stolze Y. IncP-1 β plasmids of *Comamonas* sp. and *Delftia* sp. strains isolated from a wastewater treatment plant mediate resistance to and decolorization of the triphenylmethane dye crystal violet. / Stolze Y., Eikmeyer F., Wibberg D., Brandis G., Karsten C., Krahn I., Schneiker-Bekel S., Viehöver P., Barsch A., Keck M., Top E. M., Niehaus K., Schlüter A. // *Microbiology (Reading, England)*. – 2012. – T.158, №8. – c.2060–2072.
163. Tabak O. Port-related *Delftia tsuruhatensis* bacteremia in a patient with breast cancer. / Tabak O., Mete B., Aydin S., Mandel N. M., Otlu B., Ozaras R., Tabak F. // *The new microbiologica*. – 2013. – T.36, №2. – c.199–201.
164. Tajudeen Y. A. Zoonotic Spillover in an Era of Rapid Deforestation of Tropical Areas and Unprecedented Wildlife Trafficking: Into the Wild. / Tajudeen Y. A., Oladunjoye I. O., Bajinka O., Oladipo H. J. // *Challenges*. – 2022. – T.13, №2. – c.41.
165. Tan M. C. In vitro and in vivo evidence discourages routine testing and reporting of piperacillin/tazobactam susceptibility of *Elizabethkingia* species. / Tan M. C., Huang Y. C., Chen P. J., Huang W. C., Hsu S. Y., Wang H. Y., Liou C. H., Sun J. R., Lauderdale T. Y., Kuo S. C. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2024. – T.79, №1. – c.200–202.
166. Tang H. J. Molecular characteristics and in vitro effects of antimicrobial combinations on planktonic and biofilm forms of *Elizabethkingia anophelis*. / Tang H. J., Lin Y. T., Chen C. C., Chen C. W., Lu Y. C., Ko W. C., Chen H. J., Su B. A., Chang P. C., Chuang Y. C., Lai C. C. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2021. – T.76, №5. – c.1205–1214.

167. Teng L. C. Elizabethkingia Intra–Abdominal Infection and Related Trimethoprim–Sulfamethoxazole Resistance: A Clinical–Genomic Study. / Teng L. C., Wang J. M., Lu H. Y., Mao Y. C., Lai K. L., Tseng C. H., Huang Y. T., Liu P. Y. // *Antibiotics* (Basel, Switzerland). – 2021. – T.10, №2. – c.173.
168. Teo J. First case of *E. anophelis* outbreak in an intensive–care unit. / Teo J., Tan S. Y., Tay M., Ding Y., Kjelleberg S., Givskov M., Lin R. T., Yang L. // *Lancet* (London, England). – 2013. – T.382, №9895. – c.855–856.
169. Teo J. W. Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harveyi*. / Teo J. W., Tan T. M., Poh C. L. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2002. – T.46, №4. – c.1038–1045.
170. Terenius O. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. / Terenius O., Lindh J. M., Eriksson–Gonzales K., Bussière L., Laugen A. T., Bergquist H., Titanji K., Faye I. // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2012. – T.80, №3. – c.556–565.
171. Thieme L. In vitro synergism and anti–biofilm activity of ampicillin, gentamicin, ceftaroline and ceftriaxone against *Enterococcus faecalis*. / Thieme L., Klinger–Strobel M., Hartung A., Stein C., Makarewicz O., Pletz M. W. // *J Antimicrob Chemother.* – 2018. – T.73, №6. – c.1553–1561.
172. Trifi A. Appropriateness of empiric antimicrobial therapy with imipenem/colistin in severe septic patients: observational cohort study. / Trifi A., Abdellatif S., Abdennebi C., Daly F., Nasri R., Touil Y., Ben Lakhal S. // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* – 2018. – T.17, №1. – c.39.
173. Vandamme P. New Perspectives in the Classification of the Flavobacteria: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. / Vandamme P., Bernadet J.–F., Segers P., Kersters K., Holmes B. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 1994. – T.44, №4. – c.500–510.
174. Varia M., Wilson S., Sarwal S., McGeer A., Gournis E., Galanis E., Henry B., Hospital Outbreak Investigation Team. Investigation of a nosocomial outbreak of

severe acute respiratory syndrome (SARS) in Toronto, Canada / Varia M., Wilson S., Sarwal S., McGeer A., Gournis E., Galanis E., Henry B. // CMAJ: Canadian Medical Association journal – 2003. – T.169, №4. – c.285–292.

175. Voronina O. L., Kunda M. S., Ryzhova N. N., Aksenova E. I., Semenov A. N., Lasareva A. V., Amelina E. L., Chuchalin A. G., Lunin V. G., Gintsburg A. L. The Variability of the Order Burkholderiales Representatives in the Healthcare Units / Voronina O. L., Kunda M. S., Ryzhova N. N., Aksenova E. I., Semenov A. N., Lasareva A. V., Amelina E. L., Chuchalin A. G., Lunin V. G., Gintsburg A. L. // BioMed research international. – 2015. – T.2015. – c.680210.

176. Vouga M., Greub G. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond / Vouga M., Greub G. // Clin Microbiol Infect. – 2016. – T.22, №1. – c.12–21.

177. Wang M., Gao H., Lin N., Zhang Y., Huang N., Walker E. D., Ming D., Chen S., Hu S. The antibiotic resistance and pathogenicity of a multidrug-resistant Elizabethkingia anophelis isolate / Wang M., Gao H., Lin N., Zhang Y., Huang N., Walker E. D., Ming D., Chen S., Hu S. // MicrobiologyOpen. – 2019. – T.8, №11. – e804.

178. Wang Y. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito Anopheles gambiae in Kenya / Wang Y., Gilbreath T. M., 3rd, Kukutla P., Yan G., Xu J. // PloS One. – 2011. – T.6, №9. – c.e24767.

179. Warburton P. J. TetAB46, a predicted heterodimeric ABC transporter conferring tetracycline resistance in Streptococcus australis isolated from the oral cavity / Warburton P. J., Ciric L., Lerner A., Seville L. A., Roberts A. P., Mullany P., Allan E. // J Antimicrob Chemother. – 2013. – T.68, №1. – c.17–22.

180. Weisburg W. G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. // J Bacteriol. – 1991. – T.173, №2. – c.697–703.

181. Wen A. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. / Wen A., Fegan M., Hayward C., Chakraborty S., Sly L. I. // *Int J Syst Bacteriol.* – 1999. – T.49, №2. – c.567–576.
182. White R. J. Emerging zoonotic diseases originating in mammals: a systematic review of effects of anthropogenic land–use change. / White R. J., Razgour O. // *Mammal Rev.* – 2020. – T.50, №4. – c.336–352.
183. Willems A. The Family Comamonadaceae. / Willems A. // *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria.* – 2014. – c.777–851.
184. Wilson M. E. Travel and the emergence of infectious diseases. / Wilson M. E. // *Emerg Infect Dis.* – 1995. – T.1, №2. – c.39–46.
185. de Wit E. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. / de Wit E., van Doremalen N., Falzarano D., Munster V. J. // *Nat Rev Microbiol.* – 2016. – T.14, №8. – c.523–534.
186. Woolhouse M. E. Host range and emerging and reemerging pathogens. / Woolhouse M. E., Gowtage-Sequeria S. // *Emerg Infect Dis.* – 2005. – T.11, №12. – c.1842–1847.
187. Woolhouse M. Ecological origins of novel human pathogens. / Woolhouse M., Gaunt E. // *Crit Rev Microbiol.* – 2007. – T.33, №4. – c.231–242.
188. Xu H. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. / Xu H., Davies J., Miao V. // *J Bacteriol.* – 2007. – T.189, №17. – c.6276–6283.
189. Xu L. Isolation of *Elizabethkingia anophelis* From COVID–19 Swab Kits. / Xu L., Peng B., He Y., Cui Y., Hu Q., Wu Y., Chen H., Zhou X., Chen L., Jiang M., Zuo L., Chen Q., Wu S., Liu Y., Qin Y., Shi X. // *Front Microbiol.* – 2022. – T.12. – c.799150.

190. Yan H. Synergistic removal of aniline by carbon nanotubes and the enzymes of *Delftia* sp. XYJ6. / Yan H., Yang X., Chen J., Yin C., Xiao C., Chen H. // *J Environ Sci (China)*. – 2011. – T.23, №7. – c.1165–1170.
191. Yang C. Comparison of three species of *Elizabethkingia* genus by whole-genome sequence analysis. / Yang C., Liu Z., Yu S., Ye K., Li X., Shen D. // *FEMS Microbiol Lett*. – 2021. – T.368, №5. – c.fnab018.
192. Yao M., Huang L. Leukopenia After Meningitis due to Infection with *Elizabethkingia anophelis* Combined with Septicaemia: case report and literature review. / Yao M., Huang L. // *Research Square*. – 2023. – DOI: 10.21203/rs.3.rs-2820864/v1.
193. Yasmin M. Characterization of a Novel Pathogen in Immunocompromised Patients: *Elizabethkingia anophelis*—Exploring the Scope of Resistance to Contemporary Antimicrobial Agents and β -lactamase Inhibitors. / Yasmin M., Rojas L. J., Marshall S. H., Hujer A. M., Cmolik A., Marshall E., Boucher H. W., Vila A. J., Soldevila M., Diene S. M., Rolain J. M., Bonomo R. A. // *Open Forum Infect Dis*. – 2023. – T.10, №2. – c.ofad014.
194. Ye J. X. Enhancing Chlorobenzene Biodegradation by *Delftia tsuruhatensis* Using a Water–Silicone Oil Biphase System. / Ye J. X., Lin T. H., Hu J. T., Poudel R., Cheng Z. W., Zhang S. H., Chen J. M., Chen D. Z. // *Int J Environ Res Public Health*. – 2019. – T.16, №9. – c.1629.
195. Yin Z. Pan-Genome Analysis of *Delftia tsuruhatensis* Reveals Important Traits Concerning the Genetic Diversity, Pathogenicity, and Biotechnological Properties of the Species. / Yin Z., Liu X., Qian C., Sun L., Pang S., Liu J., Li W., Huang W., Cui S., Zhang C., Song W., Wang D., Xie Z. // *Microbiol Spectr*. – 2022. – T.10, №2. – c.e0207221.
196. Yoon S. H. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. / Yoon S. H., Ha S. M.,

Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2017. – T.67, №5. – c.1613–1617.

197. Yung C. F. Elizabethkingia anophelis and Association with Tap Water and Handwashing, Singapore. / Yung C. F., Maiwald M., Loo L. H., Soong H. Y., Tan C. B., Lim P. K., Li L., Tan N. W., Chong C. Y., Tee N., Thoon K. C., Chan Y. H. // *Emerg Infect Dis.* – 2018. – T.24, №9. – c.1730–1733.

198. Zajmi A. Epidemiology and Characteristics of Elizabethkingia spp. Infections in Southeast Asia. / Zajmi A., Teo J., Yeo C. C. // *Microorganisms.* – 2022. – T.10, №5. – c.882.

199. Zheng R. C. Isolation and characterization of Delftia tsuruhatensis ZJB-05174, capable of R-enantioselective degradation of 2,2-dimethylcyclopropanecarboxamide. / Zheng R. C., Wang Y. S., Liu Z. Q., Xing L. Y., Zheng Y. G., Shen Y. C. // *Research in Microbiology.* – 2007. – T.158, №3. – c.258–264.

200. Zhu Q. Plasmer: an Accurate and Sensitive Bacterial Plasmid Prediction Tool Based on Machine Learning of Shared k-mers and Genomic Features. / Zhu Q., Gao S., Xiao B., He Z., Hu S. // *Microbiology Spectrum.* – 2023. – T.11, №3. – c.e0464522.

201. Oren A. Notification that new names of prokaryotes, new combinations and new taxonomic opinions have appeared in volume 65, part 10, of the IJSEM. / Oren A., Garrity G. M. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2016. – T.66, №1. – c.4–6.

202. A brief guide to emerging infectious diseases and zoonoses [Электронный ресурс]. URL: <https://iris.who.int/handle/10665/204722> (дата обращения: 29.07.2024).

203. Soil born human diseases - Publications Office of the EU [Электронный ресурс]. URL:

<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ee3d1682-0ea4-483d-9a3d-92e83812b6c9/language-en> (дата обращения: 29.07.2024).

204. Новые и возвращающиеся инфекции в России: медико-географический аспект [Электронный ресурс]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/novye-i-vozvraschayuschiesya-infektsii-v-rossii-m-ediko-geograficheskiy-aspekt/viewer> (дата обращения: 29.07.2024).

205. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Электронный ресурс]. URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (дата обращения: 22.06.2023).