

На правах рукописи



Зайцев Сергей Сергеевич

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АБОРТОГЕННЫХ ИНФЕКЦИЙ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ
МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Федорова Валентина Анатольевна

Официальные оппоненты: **Забережный Алексей Дмитриевич**
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (Московская обл.), директор

Богданов Ильгизар Исмаилович
кандидат ветеринарных наук, доцент
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»,
первый проректор - проректор по научной работе и цифровой трансформации

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

Защита диссертации состоится «__» 2023 года в__⁰⁰ на заседании диссертационного совета 35.2.035.01 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, УК №3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Вавиловского университета и на сайте: www.vavilovsar.ru

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина зд. 4, стр.3, ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Карпунина Лидия Владимировна

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Инфекционные болезни (ИБ) — это обширная группа патологий, этиологическим фактором которых являются инфекционные агенты — патогенные или условно-патогенные микроорганизмы. Среди наиболее значимых ИБ в сфере животноводства особое место занимают болезни репродуктивной системы сельскохозяйственных животных (СХЖ), которые приводят к снижению продуктивности поголовья, качества животноводческой продукции и наносят тем самым значительный экономический ущерб указанной отрасли сельского хозяйства. Данная группа ИБ характеризуется хроническим воспалением уrogenитального тракта, инфекционными абортами, мертворождением или появлением больного потомства, а также, в некоторых случаях, приводит к развитию бесплодия продуктивных животных (Клинико–эпизоотологическое проявление..., 2018).

Другой глобальной проблемой в сфере животноводства является появление различных патогенов, включая возбудителей оппортунистических инфекций, резистентных к противомикробным средствам, а, в некоторых случаях, и к целым классам препаратов. Согласно утвержденной единой «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2030 года», включая предупреждение и ограничение распространения устойчивости микроорганизмов к антибиотикам в здравоохранении, сельском хозяйстве, в том числе животноводстве (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017 г. № 2045-р)», контроль за распространением антибиотикорезистентных штаммов, циркулирующих на территории Российской Федерации (РФ), является приоритетной задачей.

В связи с этим, несомненно, важным является совершенствование диагностики ИБ животных, включая индикацию возбудителей непосредственно в биоматериале больных СХЖ. Не менее актуальным следует считать изучение генетического биоразнообразия патогенных микроорганизмов, в том числе, ретроспективно, циркулирующих на территории РФ и других сопредельных стран, для выявления конкретных клональных линий возбудителей ИБ СХЖ и особенностей их молекулярной эволюции.

Очевидно, что решение вышеуказанных проблем возможно с применением молекулярно-генетических методов, в том числе с использованием технологий секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS), представленных платформами второго и третьего поколения (NGS-2 и NGS-3, соответственно). Указанные подходы позволяют получать информацию о первичной нуклеотидной последовательности геномов микроорганизмов, а также отслеживать появление различных генетических изменений (мутации, рекомбинации) во всем геноме, а не только в целевых генах, изучать эволюцию и распространенность патогенных микроорганизмов.

Степень разработанности темы. Как известно, к возбудителям ИБ, ассоциированным с развитием инфекционных абортов у СХЖ, относят обширный ряд бактериальных патогенов (Абдыкадырова А.А., 2011; Клинико–

эпизоотологическое проявление..., 2018; Abortion in small ruminants..., 2012), включающих *Chlamydia spp.*, *Listeria spp.* и др. Согласно списку Международного эпизоотического бюро (МЭБ), основным этиологическим фактором инфекционных абортос СХЖ хламидийной природы считаются представители вида *Chlamydia abortus* (<https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/>). Однако, судя по данным литературы (Вафин Р.Р., 2003; Papp J.R., Shewen P.E., 1997; Isolation of an avian..., 1998; Serosurvey of sheep and..., 2001; Szeredi L., Bacsadi A., 2002; Doosti A., Arshi A., 2012; Development and evaluation of..., 2017; The role of zoonotic..., 2017; An epizootic of *Chlamydia*..., 2018; Detection of *Chlamydia* species..., 2020; A 25-year retrospective study..., 2021; Epidemiology of *Chlamydia*..., 2021), хламидии других видов, в частности, *Chlamydia psittaci*, также способны вызывать инфекционные аборты у продуктивных животных. Не маловажную роль в развитии инфекционных абортос играют условно-патогенные микроорганизмы, в том числе, относящиеся к роду *Enterobacter spp.* (Weber R., Hospes R., Wehrend A., 2018). Очевидно, такое разнообразие возбудителей инфекционных абортос у СХЖ существенно затрудняет выявление конкретного этиологического агента.

До недавнего времени, основным методом выявления возбудителя ИБ являлось получение «чистой» культуры патогена из биоматериала животного с последующим культивированием микроорганизмов на дифференциально-диагностических средах. Однако указанный метод имеет ряд существенных ограничений, связанных с выявлением патогенов, таких как хламидии, которые невозможно культивировать на искусственных питательных средах. Кроме того, у СХЖ с инфекционными абортос не всегда удается выявить этиологический агент с использованием микробиологических методов и ПЦР диагностики, основанной на применении моно- или мультиплексных тест-систем, поскольку возбудителями могут оказаться условно-патогенные микроорганизмы, ранее не ассоциированные с данными ИБ. Более того, появление среди данной группы патогенов штаммов с лекарственной резистентностью диктует необходимость своевременной индикации и более детальной молекулярно-генетической характеристики возбудителей ИБ, что возможно с использованием современных платформ секвенирования 2-ого и 3-ого поколения.

На сегодняшний день в мировую базу данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) депонированы полногеномные последовательности 25 штаммов *C. psittaci*, детектированных в разных странах мира как у человека, так и у животных. При этом среди всех представленных изолятов только два штамма *C. psittaci* были выделены на территории РФ из биоматериала человека с хламидийной инфекцией. К началу наших исследований секвенирование полных геномов указанных патогенов, выделенных от СХЖ, циркулирующих на территории РФ и способных вызывать вспышки инфекционных абортос, не производилось. Важно отметить, что в доступной литературе встречаются отдельные сообщения о взаимосвязи представителей *Enterobacter spp.* с ИБ животных, в том числе с инфекцией репродуктивной системы (Isolation, identification and..., 2017).

Вышеизложенное послужило основанием для выбора темы, формулировки цели и задач настоящего исследования.

Целью работы явилось изучение возбудителей абортотенных инфекций СХЖ с использованием молекулярно-генетических методов на модели коллекционных штаммов *C. psittaci* и образцов ДНК из биоматериала крупного рогатого скота (КРС) с клиническими признаками воспаления урогенитального тракта и анамнестическими абортами, с последующим выявлением и характеристикой спектра генов резистентности с применением платформ NGS-2 и NGS-3.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести полногеномное секвенирование коллекционных штаммов *C. psittaci*, изолированных от животных с хламидийными инфекционными абортами, выделенных на территории РФ, с использованием платформ NGS-2 и NGS-3 и последующей сборкой геномов методом *de novo*.
2. Изучить молекулярно-генетические характеристики возбудителей ИБ СХЖ на модели коллекционных штаммов *C. psittaci* с выявлением их уникальных особенностей, включая основные таргетные участки исследуемых геномов. Депонировать расшифрованные последовательности хромосом и плазмид в мировые базы данных.
3. Выполнить метагеномный анализ биоматериала КРС с анамнестическими инфекционными абортами для определения потенциального возбудителя ИБ с последующей полногеномной сборкой ДНК обнаруженного штамма.
4. Провести детальное молекулярно-генетическое исследование потенциального возбудителя ИБ, выделенного из биоматериала КРС с анамнестическими инфекционными абортами, включая спектр генов антибиотикорезистентности.

Научная новизна. Впервые с применением платформ NGS-2 и NGS-3 и последующей сборкой полногеномных последовательностей методом *de novo* получены данные о детальных молекулярно-генетических характеристиках коллекционных штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, АМК-16 и ВЛ-84 – возбудителей инфекционных абортотенных, изолированных во время вспышек хламидиоза у СХЖ на территории РФ. Приоритетными являются данные о выявлении у представителей *C. psittaci* нового генотипа «G». Впервые продемонстрирована принадлежность штаммов, изолированных от СХЖ и пушных зверей, к сиквенс-типу ST28. В ходе работы в хромосомах исследуемых штаммов *C. psittaci* (Rostinovo-70, АМК-16 и ВЛ-84) выявлен уникальный участок из 20 кодирующих последовательностей (CDS), указывающий на потенциальную гомологичную рекомбинацию с представителями *C. abortus*.

Новыми являются данные, полученные в результате метагеномного анализа, об обнаружении в биоматериале КРС с ИБ органов репродуктивной системы ДНК представителя рода *Enterobacter*. Впервые с применением платформ NGS-2 и NGS-3 произведено секвенирование, сборка методом *de novo* и изучение молекулярно-генетических характеристик геномной последовательности потенциального возбудителя ИБ КРС – штамма *Enterobacter hormaechei subsp.*

xiangfangensis Saratov_2019. Важным с точки зрения диагностики ИБ животных является обнаружение в биоматериале КРС с признаками воспаления урогенитального тракта и анамнестическими абортами указанного штамма, несущего не менее 9 генов, ассоциированных с проявлением фенотипической резистентности к 8 различным классам противомикробных препаратов, применяемых в ветеринарной практике.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты работы вносят значимый вклад в фундаментальные исследования возбудителей, вызывающих ИБ репродуктивной системы СХЖ, и обладают перспективой их практического использования в экспериментальной биологии, ветеринарии и сельском хозяйстве.

Полученные данные о ключевых молекулярно-генетических характеристиках расшифрованных геномов трех коллекционных штаммов *C. psittaci* - Rostinovo-70, АМК-16 и ВЛ-84, изолированных во время вспышек хламидиоза от животных с инфекционными абортами в разных хозяйствах РФ, дополняют имеющиеся сведения об особенностях возбудителей, ассоциированных с ИБ репродуктивной системы СХЖ. Результаты моно- и мультилокусного типирования на основе полиморфизма гена *ompA* и 7 генов «домашнего хозяйства» (*gatA*, *oppA*, *hfiX*, *gitA*, *enoA*, *hemN* и *fumC*) об обнаружении принадлежности циркулирующих на территории РФ штаммов *C. psittaci* к новому генотипу «G» и сиквенс-типу 28 (ST28) расширяют современные научные представления о молекулярной эволюции хламидий. Указанные данные являются важными для совершенствования методов диагностики, дифференциации и типирования изолятов *C. psittaci*, а также молекулярной эпидемиологии возбудителей ИБ СХЖ. Приоритетные данные об уникальных особенностях указанных штаммов, в том числе, сведения об отсутствии в хромосомах генов резистентности и наличии участка гомологичной рекомбинации с представителями *C. abortus*, могут быть использованы при поиске новых диагностических молекулярных маркеров и конструировании эффективных профилактических препаратов нового поколения.

Данные, полученные с применением платформ NGS-2 и NGS-3, о детекции в биоматериале КРС с анамнестическими абортами ДНК штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019 расширяют спектр потенциальных возбудителей инфекционного аборта СХЖ. Установленная принадлежность данного патогена к новому сиквенс-типу ST1416 является важной с точки зрения молекулярной эпидемиологии при мониторинге появления на территории РФ новых клональных линий возбудителей ИБ СХЖ. Выявление у указанного штамма генетически детерминированной множественной фенотипической лекарственной резистентности является перспективным для совершенствования контроля за появлением и распространением антибиотикорезистентных штаммов в секторе животноводства на территории РФ. Оригинальные расшифрованные нуклеотидные последовательности полных геномов штаммов *C. psittaci* (Rostinovo-70, ВЛ-84 и АМК-16) и контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 депонированы в мировые базы данных (NCBI

GenBank, PubMLST) (Номера доступа: CP047320.1, CP041038.1, CP041039.1, CP047319.1, CP094377, PRJNA732817).

Методология и методы исследования. При выполнении диссертационной работы использованы современные высокопроизводительные методы полногеномного секвенирования на основе платформ NGS-2 и NGS-3. Методологической основой для обработки данных послужили современные доступные молекулярно-генетические и биоинформационные методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оптимальным условием сборки полных геномов ИБ СХЖ на модели коллекционных штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, BL-84 и АМК-16 методом *de novo*, явилось комбинирование платформ NGS-2 и NGS-3 с последующей биоинформатической обработкой данных секвенирования.
2. Указанные возбудители ИБ, выделенные от СХЖ, включая пушных зверей, обладали ST28, ранее идентифицированным только у дикой и сельскохозяйственной птицы и больных хламидиозом людей, а также генотипом «G», новым для представителей *C. psittaci*, и участком гомологичной рекомбинации с хламидиями вида *C. abortus*.
3. Метагеномный анализ прочтений, полученных на платформе NGS-3 при секвенировании биоматериала от КРС с анамнестическими инфекционными абортами, показал доминирование в исследуемом образце бактериальной ДНК, принадлежащей к роду *Enterobacter*.
4. В биоматериале, изолированном от КРС с анамнестическими инфекционными абортами, выявлен генетический материал потенциального возбудителя ИБ СХЖ - штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019, в составе хромосомы которого обнаружено 9 генов, ответственных за развитие устойчивости к противомикробным препаратам различных классов и фенотипической резистентности, по крайней мере, к 8 противомикробным препаратам.

Работа выполнена в лаборатории «Молекулярной биологии и нанобиотехнологий» Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии».

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных молекулярно-генетических методов исследования, доступного биоинформатического программного обеспечения для обработки данных NGS, полученных с платформ второго и третьего поколения, а также депонированием расшифрованных нуклеотидных последовательностей в мировые базы данных NCBI и PubMLST. Исследование выполнено в рамках НИР ГЗ ПФНИ ГАН 160. Темы № 0615-2017-0001, № 0615-2019-0004; FGNM-2021-0003, при частичной поддержке грантов РФФИ № 17-16-01099 и РФФИ-Аспиранты № 19-316-90024.

Результаты диссертационной работы были представлены на: VIII Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Принципы организации и функционирования живых систем» (Звенигород, 2018), 44-ом конгрессе FEBS «From molecules to living systems» (Краков, 2019), Научно-практической конференции «Генетика, селекция и биотехнология животных: на пути к совершенству» с международным участием, приуроченной к 80-летию института ВНИИГРЖ (Пушкино, 2020), IX Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика 21 века – от исследования геномов к генетическим технологиям» (Звенигород, 2021), Международной научно-практической конференции «Фундаментальные научные исследования и их прикладные аспекты в биотехнологиях и сельском хозяйстве» (в рамках заседания Всероссийского координационного совета по зернофуражным культурам) FSRAABA 2021 (Тюмень, 2021), Ежегодной Всероссийской научной школе-семинаре «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2021» (Саратов, 2021), FEMS Conference on Microbiology (Белград, 2022).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 1 статья из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и 3 – в изданиях из международных баз данных.

Личный вклад соискателя состоит в получении первичных данных, обработке и анализе результатов, написании текста и подготовке публикаций, участии в конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, объекты, материалы и методы исследований, результаты исследований, заключение, выводы, список литературы, включающий 228 источников, из них 207 иностранных и 21 отечественных авторов. Работа изложена на 188 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 22 рисунками и 21 таблицей.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

В работе использовали генетический материал штаммов: *C. psittaci* (Rostinovo-70, АМК-16 и ВЛ-84), выделенных в животноводческих хозяйствах на территории РФ из патологического материала СХЖ с инфекционными абортами хламидийной этиологии: в 1970 г. - от овцы (штамм Rostinovo-70), в 2016 г. - от козы (штамм АМК-16) и в 1984 г. на звероферме от лисы (штамм ВЛ-84). Штамм *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 изолирован на территории Саратовской области из биоматериала (цервикально-вагинальная слизь) от КРС с клиническими признаками воспаления урогенитального тракта и анамнестическими абортами. Выделение ДНК производили с применением коммерческого набора для выделения ДНК DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия), согласно протоколу фирмы-производителя. Секвенирование NGS-2 и NGS-3 выполняли на платформах Illumina HiSeq 2500 system (Illumina Inc., США) и MinION (Oxford Nanopore, Великобритания), соответственно. Для метагеномного анализа использовали сервер MG-RUST (<https://www.mg-rast.org/>). Гибридную сборку методом *de novo* осуществляли с использованием ассемблера Unicycler (<https://github.com/rrwick/Unicycler>).

Филогенетический анализ и построение филогенетических деревьев производили на базе онлайн серверов Type (Strain) Genome Server (<https://tygs.dsmz.de>), MEGA-7 и REALPHY 1.13 (<https://realphy.unibas.ch/realphy/>) с последующей визуализацией с помощью Phylogenetic tree (newick) viewer (<http://etetoolkit.org/treeview/>). Монолокусное генотипирование на основе полиморфизма гена *ompA*, кодирующего основной белок внешней мембраны (MOMP) штаммов *C. psittaci*, выполняли согласно рекомендациям T. Geens *et al.* (Sequencing of the *Chlamydophila...*, 2005), мультилокусное MLST-типирование – в соответствии со схемами Chlamydiales (для хламидий) и *Enterobacter cloacae* (для штамма *E. hormaechei* Saratov_2019), представленными в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>). Выравнивание и детальное сравнение полногеномных последовательностей хромосом исследуемых штаммов относительно референтных штаммов проводили на серверах: PubMLST с использованием программного обеспечения Genome Comparator (<https://pubmlst.org/>), утилиты Proteome Comparison и BV-BRC (<https://www.bv-brc.org>). Выявление и выравнивание генов резистентности в нуклеотидных последовательностях исследуемых штаммов осуществляли на базе сервера CARD (<https://card.mcmaster.ca>) и алгоритма progressive Mauve (<https://darlinglab.org/>), соответственно. Определение чувствительности штамма к антимикробным препаратам (фенотипическую резистентность) выполняли с применением диско-диффузионного теста (ДДТ) согласно МУК 4.2.1890-04.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетическая характеристика возбудителей инфекционных аборт на модели штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, BL-84 и АМК-16

В результате полногеномного секвенирования коллекционных штаммов *C. psittaci* (Rostinovo-70, BL-84, АМК-16) был получен массив первичных «сырых» данных в пределах от 1,2 до 5,7 Гб на платформе NGS-3 и от 2 до 7 Мб на платформе NGS-2. Сборка методом *de novo* позволила получить полные последовательности хромосом и плазмид указанных штаммов, депонированных нами в мировую базу данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Номера доступа: CP047320.1, CP041038.1, CP041039.1, CP047319.1, CP094377, PRJNA732817). Размер сгенерированных контигов составил: 1,152559 п.н. для штамма Rostinovo-70, 1,152244 п.н. для штамма BL-84 и 1,152497 п.н. для штамма АМК-16. Плазмиды размером 7,553 п.н. и 7,552 п.н. были обнаружены только в штаммах Rostinovo-70 и АМК-16, соответственно.

Филогенетический анализ полногеномных последовательностей хромосом указанных штаммов, а также всех геномов *C. psittaci*, доступных на момент исследования в мировой базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), продемонстрировал высокую гомологию между Rostinovo-70, BL-84 и АМК-16 (Рисунок 1).

При этом штаммы *C. psittaci* Rostinovo-70, BL-84 и АМК-16 находились в одной ветви со штаммами *C. psittaci*, выделенными на территории Германии от диких уток: GR9 (1960 г.) и WSRTE30 (2001 г.), что позволило сделать заключение о возможном эволюционном происхождении указанных штаммов от единого предка. Поскольку штамм GR9 был изолирован в Германии на 10 лет раньше, чем Rostinovo-70, это могло указывать на факт возможного заноса данного штамма на

территорию РФ при миграции птиц. Основываясь на полученных данных, штамм GR9, как наиболее филогенетически близкий, был выбран нами для дальнейших исследований в качестве референтного.

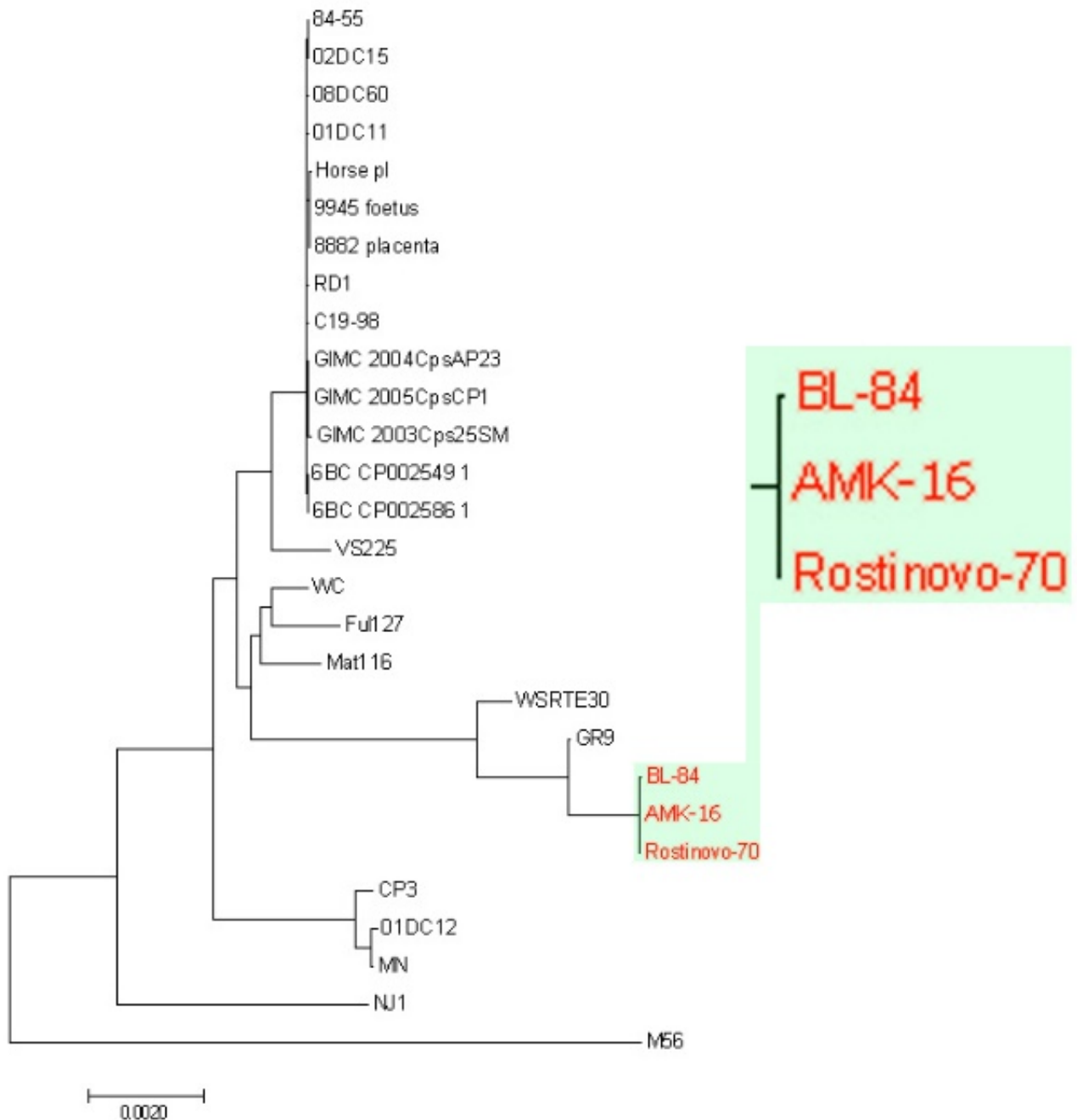


Рисунок 1 - Филогенетический анализ полных геномов штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, BL-84 и AMK-16 и штаммов *C. psittaci*, доступных в базе NCBI GenBank (n=25)

Моноклусное типирование продемонстрировало наличие в последовательности гена *ompA* двух уникальных несинонимичных SNP в позициях 488 (G→A) и 984 (G→C) относительно референтного штамма *C. psittaci* GR9 с ранее определенным генотипом «С». Указанные замены привели к изменению аминокислот в виде: N (Asn, аспарагин) → S (Ser, серин) в позиции 163 (N163S) и I (Ile, изолейцин) → M (Met, метионин) в позиции 328 (I328M). Филогенетический

анализ указанных последовательностей продемонстрировал четкую дискриминацию штаммов Rostinovo-70, BL-84 и АМК-16 от репрезентативных последовательностей *C. abortus* и всех 10 известных на сегодняшний день генотипов *C. psittaci*, включая генотип «С», представленный референтным штаммом GR9 и штаммом GD, изолированным из утиного яйца в Германии (1960 г.) и обладающим тем же генотипом С (Рисунок 2).

На основе полученных данных был сделан вывод об обнаружении у представителей *C. psittaci* нового, ранее не зарегистрированного генотипа, обозначенного нами как генотип «G». Важно отметить, что нуклеотидная и аминокислотная последовательности гена *ompA* изучаемых штаммов оказались на 100% идентичными последовательностям того же гена штамма *C. abortus* CG1 (Номер доступа в NCBI GenBank: EU531729), депонированному Ling Y. *et al.* в 2008 году. Основываясь на данных генотипирования, наше исследование позволило уточнить таксономическую принадлежность штамма CG1 к виду *C. psittaci*, а не к виду *C. abortus*.

Мультилокусное MLST типирование с применением комбинации аллельных профилей семи генов «домашнего хозяйства» позволило определить принадлежность штаммов Rostinovo-70, АМК-16 и BL-84 к сиквенс-типу ST28. Сконструированное минимально остовное дерево с использованием молекулярных MLST маркеров продемонстрировало эволюционные взаимоотношения штаммов, обладающих указанным ST28 и всех других ранее известных ST *C. psittaci* (Рисунок 3), доступных в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>). На основе полученных данных был сделан вывод об обнаружении у представителей *C. psittaci* нового, ранее не зарегистрированного генотипа,

Мультилокусное MLST типирование с применением комбинации аллельных профилей семи генов «домашнего хозяйства» позволило определить принадлежность штаммов Rostinovo-70, АМК-16 и BL-84 к сиквенс-типу ST28. Сконструированное минимально остовное дерево с использованием молекулярных MLST маркеров продемонстрировало эволюционные взаимоотношения штаммов, обладающих указанным ST28 и всех других ранее известных ST *C. psittaci* (Рисунок 3), доступных в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>).

На основе полученных данных был сделан вывод об обнаружении у представителей *C. psittaci* нового, ранее не зарегистрированного генотипа,

Мультилокусное MLST типирование с применением комбинации аллельных профилей семи генов «домашнего хозяйства» позволило определить принадлежность штаммов Rostinovo-70, АМК-16 и BL-84 к сиквенс-типу ST28. Сконструированное минимально остовное дерево с использованием молекулярных MLST маркеров продемонстрировало эволюционные взаимоотношения штаммов, обладающих указанным ST28 и всех других ранее известных ST *C. psittaci* (Рисунок 3), доступных в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>).

Согласно полученным результатам, кластер ST28 занимал второе место по количеству входящих в него штаммов (n=22) и эволюционно произошел от самого обширного кластера ST24 (n=104).

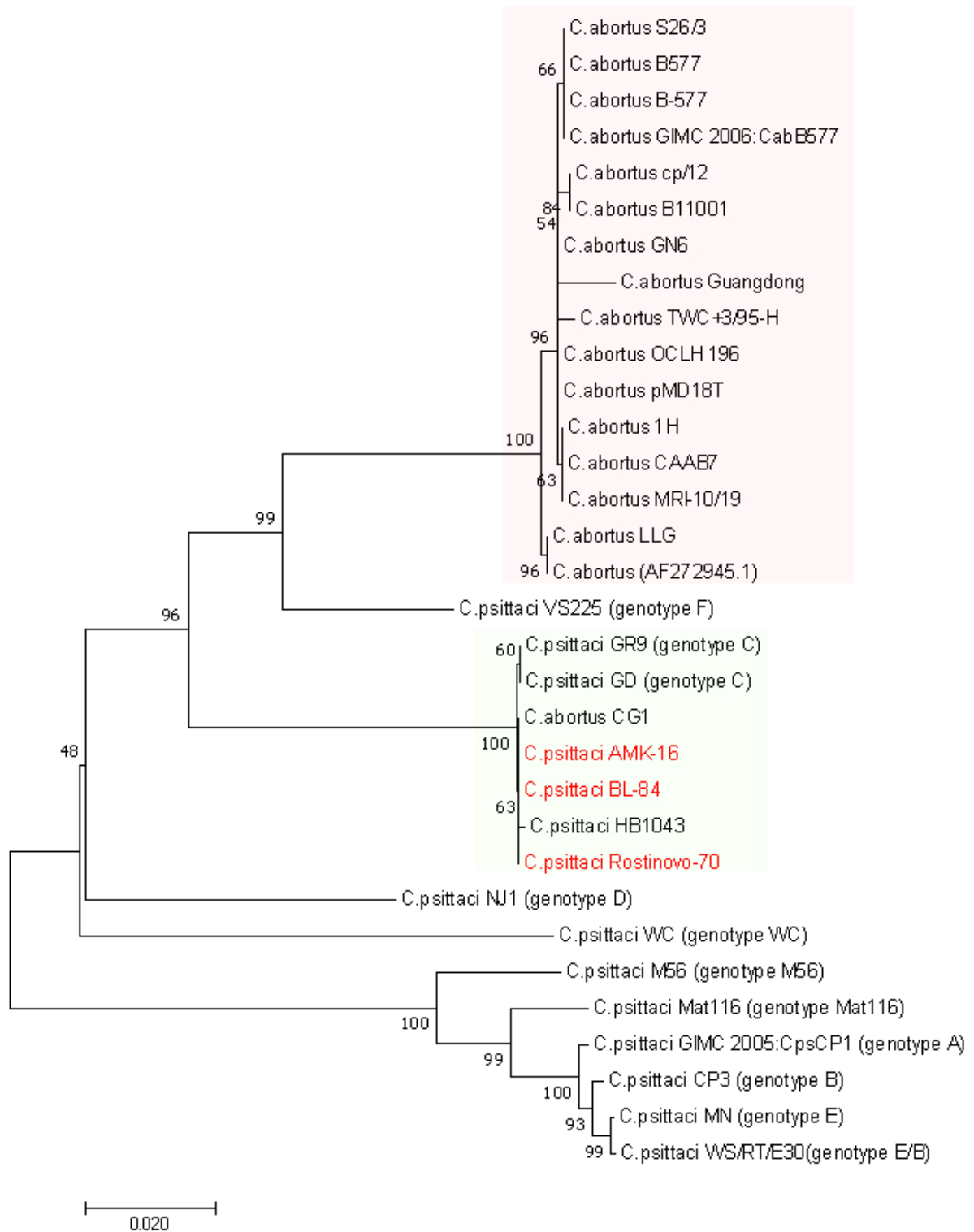


Рисунок 2 – Филогенетический анализ последовательностей гена *ompA* штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84 и референтных последовательностей того же гена *ompA* представителей *C. psittaci* всех известных генотипов (A-F) и *C. abortus*, доступных в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), выполненный методом Neighborhood joining tree (метод «присоединения соседей») со значением бутстрэпа 100

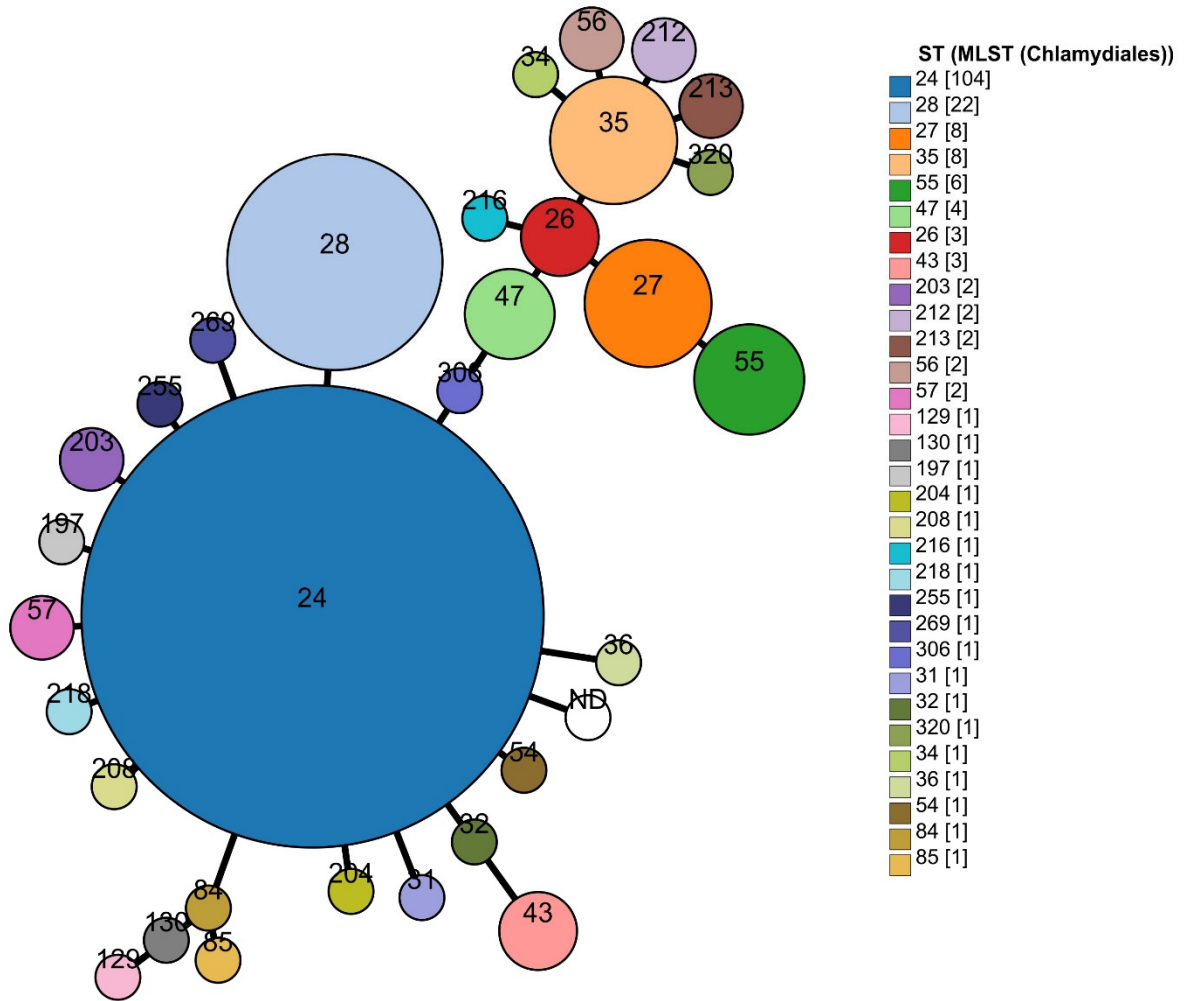


Рисунок 3 – Минимальное остовное дерево, сконструированное на основе последовательностей 7 генов «домашнего хозяйства» (*gata*, *oppA*, *hfiX*, *gitA*, *enoA*, *hemN* и *fumC*) и отражающее эволюционную взаимосвязь сиквенс-типов (STs), идентифицированных у представителей *C. psittaci*, доступных в международной базе PubMLST (<https://pubmlst.org>)

Важно отметить, что штаммы *C. psittaci*, относящиеся к ST28, ранее были изолированы преимущественно от птиц, а два изолята (06-1638 и human E) выделены от человека. Таким образом, в этом исследовании мы впервые обнаружили принадлежность штаммов *C. psittaci* – возбудителей хламидиоза СХЖ, к указанному кластеру.

Сравнительный анализ хромосом изучаемых штаммов с референтным штаммом GR9 выявил наличие 178 переменных локусов, из которых 85 были обнаружены в Rostinovo-70 и АМК-16, изолированных от мелкого рогатого скота (МРС), а 178 - идентифицированы в штамме VL-84. В связи с тем, что штамм VL-84 был выделен от пушных зверей (лисица), наибольшая переменность генома указанного штамма может объясняться процессами адаптации возбудителя ИБ к указанному макроорганизму хозяина – другому виду СХЖ. Одной из отличительных особенностей исследуемых штаммов явилось наличие уникального переменного

региона (ВР), расположенного в пределах 253 kb - 276 kb от начала точки репликации (Рисунок 4).

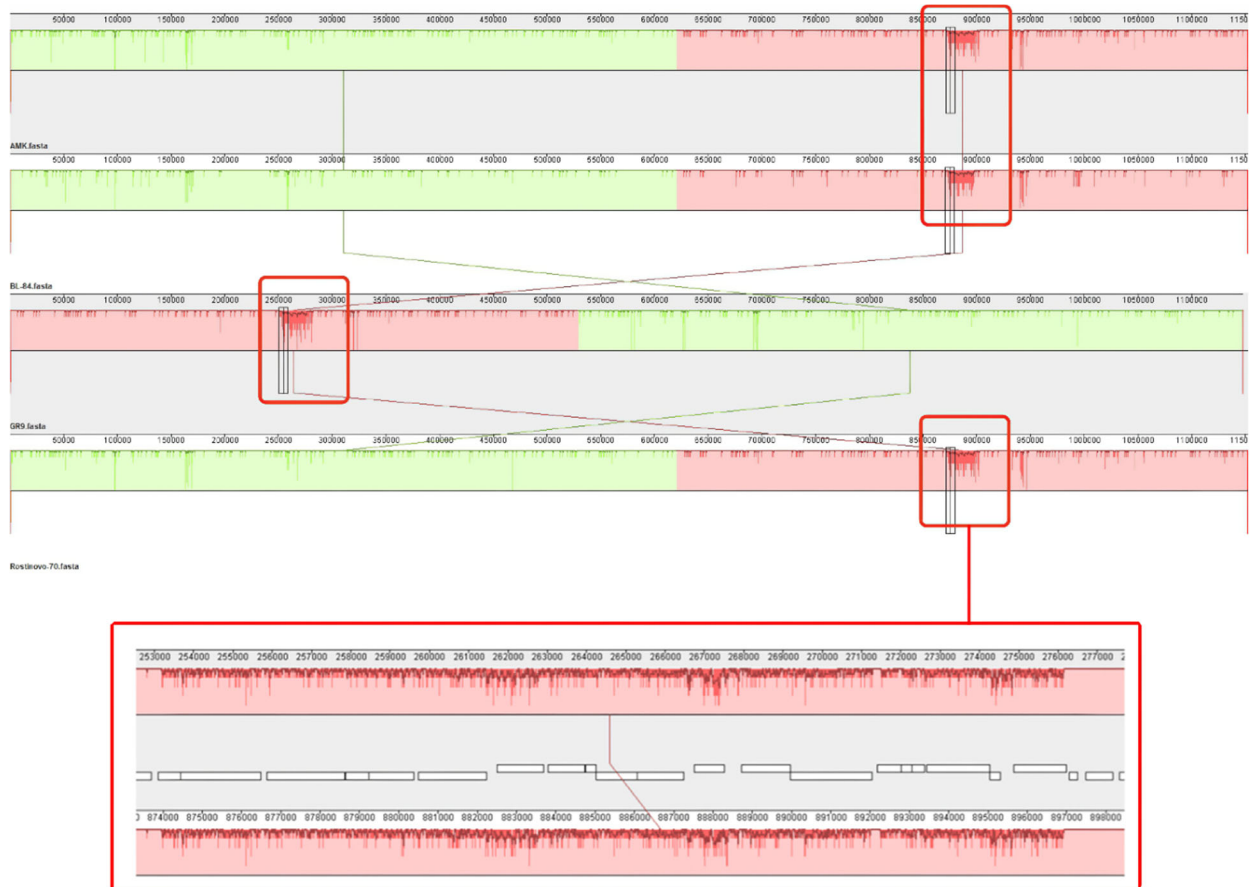


Рисунок 4 – Визуализация ВР хромосом штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84 относительно референтного штамма *C. psittaci* GR9

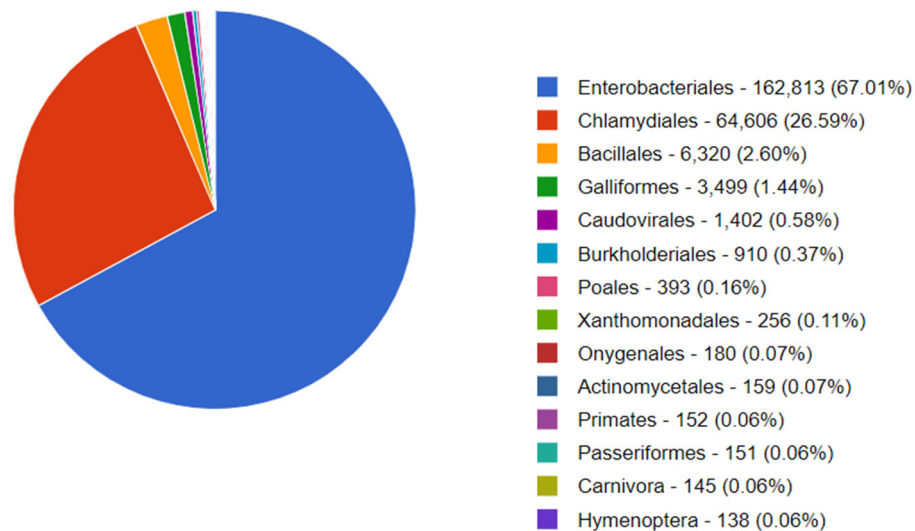
В указанном ВР обнаружено 20 CDS, часть из которых оказалась представлена псевдогенами: 8 из 20 (40%) у штамма BL-84, по 2 из 20 (10%) у штаммов Rostinovo-70 и AMK-16, соответственно. Сравнительный анализ BLAST показал, что все 20 CDS обладали большей гомологией (от 95 до 100%) с аналогичными генами представителей вида *C. abortus*, чем с известными вариантами *C. psittaci* (92%), что могло быть связано с гомологичной рекомбинацией, способность к которой была ранее показана на моделях других видов хламидий: *C. psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* и *Chlamydia suis* (Read T.D., 2013, Marti H., 2022). Анализ хромосом и плазмид штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84 показал отсутствие известных генов резистентности в указанных геномах.

Индикация и молекулярно-генетическая характеристика потенциального возбудителя инфекции органов репродуктивной системы крупного рогатого скота с применением метагеномного анализа и платформ NGS-2 и NGS-3

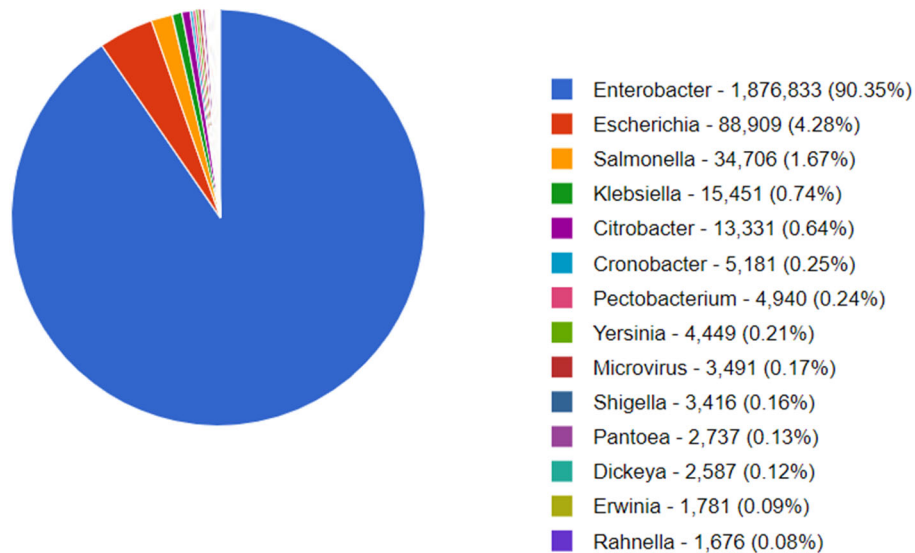
Метагеномный анализ тотальной ДНК биоматериала и выделенной чистой культуры от КРС с клиническими проявлениями воспаления органов репродуктивной системы и анамнестическими абортами на платформах NGS-3 и

NGS-2 в обоих случаях продемонстрировал принадлежность доминирующего количества ДНК к порядку *Enterobacteriales* (Рисунок 5А) роду *Enterobacter* (Рисунок 5Б), соответственно.

Полученные прочтения с обеих платформ, использованные для сборки генома изолированного штамма *Enterobacter* (обозначенного нами как *Saratov_2019*) методом *de novo*, позволили сгенерировать 67 контигов общей длиной 4,637924 п.н. (контиги депонированы нами в NCBI GenBank. Номер доступа: JAHFZP000000000.1). Филогенетический анализ контигов продемонстрировал точную таксономическую принадлежность штамма *Saratov_2019* к виду *E. hormaechei* подвиду *subsp. xiangfangensis* (Рисунок 6), входящему в комплекс *E. cloacae* (Hoffmann H., 2005).



А



Б

Рисунок 5 – Иерархическая классификация распределения таксономических рангов прочтений при метагеномном анализе тотальной ДНК, изолированной из биоматериала КРС. Анализ прочтений с платформы: А - NGS-3; Б - NGS-2

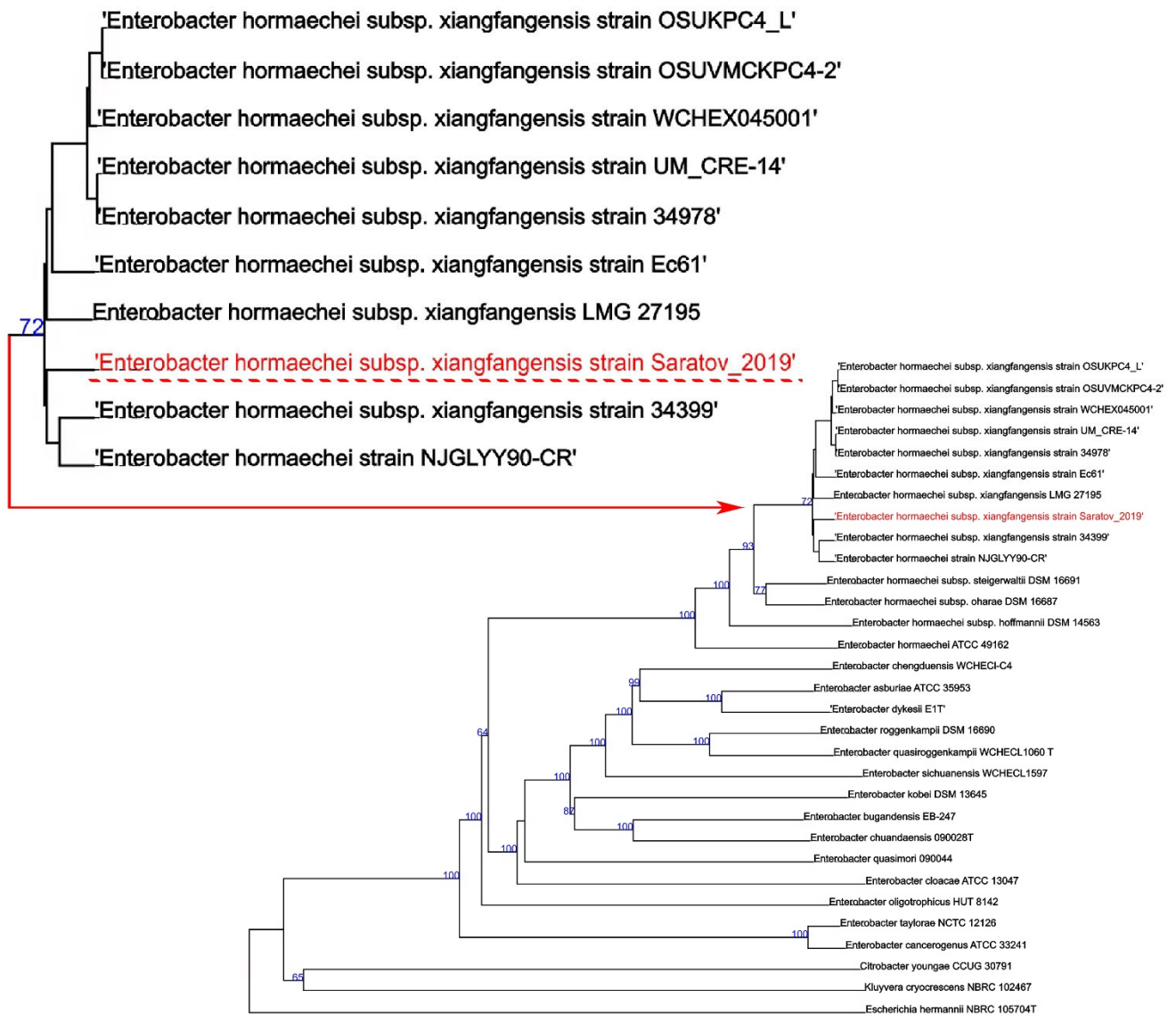


Рисунок 6 – Филогенетический анализ штамма Saratov_2019 – потенциального возбудителя инфекционного аборта КРС, с использованием референтных последовательностей микроорганизмов из базы данных Type (Strain) Genome Server (<https://tygs.dsmz.de>)

MLST-типирование штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 выявило его принадлежность к новому, ранее неидентифицированному сиквенс-типу ST1416. Конфигурация соответствующих аллельных профилей нами депонирована в международную базу данных PubMLST (Номер доступа ST1416).

Согласно литературным источникам (Guiton A.K., 2019; Tsang K., 2019), среди представителей комплекса *E. cloacae*, встречаются мультиантибиотикорезистентные варианты. Исследование хромосомы штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 с использованием базы данных CARD указывало на наличие в геноме гомологов 13-и генов, ассоциированных с генетически детерминированной резистентностью к противомикробным препаратам, из которых при выравнивании удалось подтвердить только 11 (Таблица 1). При этом в ДДТ штамм Saratov_2019 продемонстрировал наличие фенотипической резистентности к 8-и из 12-и классов

антибиотиков, что свидетельствовало о наличии у данного штамма множественной лекарственной устойчивости (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительные результаты изучения генетической и фенотипической резистентности штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019

№	Идентификация генетической детерминированности и ассоциированной с ней фенотипической резистентности, выявленных с применением				
	CARD		ДДТ		
	Ген	Резистентность к классу*	Препарат	Класс препарата	Реакция***
1	<i>ampH</i>	Ц****	Цефтриаксон	Ц (3-е поколение)	Р
2	<i>emrR</i>	Ф	Байтрил	Ф (3-е поколение)	Ч
3	<i>rsmA</i>	Д, Фн, Ф			
4	<i>oqxB</i>	Т, Г, НТ, Ф, Д	Нитокс	Т	Р
5	<i>mdtJ</i>	Па, Ц, Мк, Риф, Т, Амг	Азитромицин	Мк	Р
6	<i>baeR</i>	Амк, Амг	Канамицин	Амг (1-е поколение)	Р
7	<i>acrD</i>	Амг			
8	<i>msbA</i>	Им	Метронидазол	Им	Р
9	<i>acrR</i>	Т, Фн, Риф, Г, Ц, Ф	Нитроксолин	Окси	Р
10	<i>fosA</i>	Фос	Фосфомицин	Фос	Р
11	<i>uhpT</i>	Фос			
12	X**	Л	Линкомицин	Л	Р
13	X	-	Меропинем	К	Ч
14	X	-	Кобактан	Ц (4-е поколение)	Ч
15	X	-	Синулокс	П	Ч

Примечание – "*" – предиктивный анализ с использованием CARD (<https://card.mcmaster.ca>); "***" - ген не обнаружен в составе контигов; "****" - Резистентен (Р), Чувствителен (Ч); "*****" - Ц – Цефалоспорины, Ф – Фторхинолоны, Д – Диаминопиримидины, Фн – Фениколы, Т – Тетрациклины, Г – Глицилциклин, НТ – Нитрофураны, Па - Пептидные антибиотики, Мк – Макролиды, Риф – Рифамицины, Амг – Аминогликозиды, Амк – Аминокумарины, Им – Имидазолы, Фос – Фосфоны (производные фосфоновой кислоты), Л – Линкозамиды, Мет – Метронидазол, Окси – Оксихинолины, К – Карбапенемы, П – Пенициллины.

Важно отметить, что присутствие 9 из 11 обнаруженных генов коррелировало с результатами ДДТ (Таблица 1). Штамм Saratov_2019 проявлял резистентность к

препарату класса линкозамидов несмотря на то, что гены, обеспечивающие резистентность к данному классу препаратов, не были идентифицированы в составе сборки. Это может объясняться тем, что последовательность штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019, собранная с использованием метода *de novo*, оказалась не полной.

Заключение

Применение платформ NGS и биоинформатических подходов для обработки нуклеотидных последовательностей ДНК, включающих полногеномную сборку методом *de novo*, используемых в данной работе, позволили детально охарактеризовать геномные особенности возбудителей инфекционных абортос СХЖ – на модели трех коллекционных штаммов *S. psittaci*, а так же представителя рода *Enterobacter*, впервые изолированного на территории РФ из биоматериала КРС с анамнестическими абортами.

Практические предложения

Предлагается дальнейшее детальное изучение коллекционных штаммов и полевых изолятов возбудителей ИБ СХЖ, в частности, являющихся этиологическими факторами инфекционных абортос, с использованием молекулярного типирования, современных NGS платформ и биоинформатических инструментов с целью уточнения спектра и видовой принадлежности конкретных патогенных или условно-патогенных микроорганизмов.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В перспективе исследования будут направлены на выявление и детальную характеристику новых изолятов возбудителей ИБ животных с целью отслеживания изменений в геноме патогенных микроорганизмов, в частности при выявлении новых или мутантных штаммов возбудителей. Данные исследования играют важную роль в определении новых генетических маркеров для диагностики, совершенствования существующих подходов к конструированию ветеринарных вакцин нового поколения, пригодных для применения в практической ветеринарии, а также контроля за распространением антибиотикорезистентных штаммов на территории РФ.

Выводы

1. Впервые получены полногеномные последовательности трех штаммов *S. psittaci*, выделенных на территории РФ от СХЖ с инфекционными абортами, включая пушных зверей. Расшифрованные с использованием NGS платформ 2 и 3 поколения полногеномные последовательности хромосом и плазмид указанных штаммов депонированы в мировую базу данных NCBI GenBank (Номера доступа: CP041038.1, CP041039.1, CP047320.1, CP047319.1, CP094377.1) и PubMLST (ID: 4451, 4452, 4721).
2. Установлена принадлежность штаммов *S. psittaci* Rostinovo-70, АМК-16 и ВЛ-84 – возбудителей инфекционных абортос СХЖ, к ST28, ранее не ассоциированному с ИБ СХЖ, и новому генотипу «G», ранее не идентифицированному у представителей *S. psittaci*. В геномах указанных

штаммов обнаружен участок гомологичной рекомбинации с представителями вида *C. abortus*.

3. С применением метагеномного анализа в биоматериале от КРС идентифицировано доминирующее количество ДНК представителя рода *Enterobacter* - потенциального возбудителя ИБ органов репродуктивной системы СХЖ.
4. Секвенирование генома потенциального возбудителя инфекции органов репродуктивной системы КРС – штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019, произведено на базе NGS платформ 2 и 3 поколения с последующей сборкой методом *de novo* и депонированием контигов в базу данных NCBI GenBank (Номер доступа: JAHFZP000000000.1).
5. В штамме *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 выявлено 11 генов резистентности, наличие 9 из которых коррелировало с фенотипической резистентностью к 8 классам противомикробных препаратов. Установлена принадлежность данного штамма к новому сиквенс-типу ST1416. Конфигурация соответствующих аллельных профилей депонирована в международную базу данных PubMLST (Номер доступа ST1416).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России

1. Зайцев С.С. Выявление возбудителя инфекционного аборта у крупного рогатого скота методом секвенирования третьего поколения (Оксфорд Нанопор) / С. С. Зайцев, М. А. Хижнякова, В. А. Федорова // Ветеринария. – 2021. – № 2. – С. 20–26.

В изданиях из международных баз данных

2. Data of *de novo* genome assembly of the *Chlamydia psittaci* strain isolated from the livestock in Volga Region, Russian Federation / V. A. Feodorova, S. S. Zaitsev, M. A. Khizhnyakova, Y. V. Saltykov, V. V. Evstifeev, F. M. Khusainov, S. I. Yakovlev, O. S. Larionova, V. L. Motin // Data in Brief. – 2020. – V. 29. – P. 105190. (Web of Science, Scopus)
3. Zaitsev, S.S. First Case Report of Detection of Multidrug-Resistant *Enterobacter hormaechei* in Clinical Sample from an Aborted Ruminant / S. S. Zaitsev, M. A. Khizhnyakova, V. A. Feodorova // Microorganisms. – 2022. – V. 10, N.5. – P. 1036. (Web of Science, Scopus)
4. Study of antimicrobial resistance for the causative agent of the bovine reproductive system infection by the NGS method / S. S. Zaytsev, M. A. Khizhnyakova, E. S. Krasnikova, O. S. Larionova, V. A. Feodorova // BIO Web of Conferences. – 2021. – V.36. – P. 06029. (Web of Science)

Работы, опубликованные в прочих изданиях

5. Результаты пилотного секвенирования штамма хламидий зоонозного происхождения на платформе Illumina HiSeq 2500 / С. С. Зайцев, Ю. В. Салтыков, С. И. Яковлев, В. В. Евстифеев, О. С. Ларионова, В. А. Федорова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. Спецвыпуск. – 2019. – Т. 37. – С. 27.

6. The molecular characteristics of *Chlamydia psittaci* strain from cattle isolated in the Southeastern European Region of Russia (Volga Region) / V. A. Feodorova, S. S. Zaitsev, Y. V. Saltykov, V. V. Evstifeev, F. M. Khusainov, S. I. Yakovlev, O. S. Larionova, O. V. Ulyanova, V. L. Motin // FEBS Open Bio. – 2019. – V.9, S.1. – P. 97.
7. Зайцев, С. С. Метагеномный анализ в диагностике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных – возможности современной биоинформатики / С. С. Зайцев, М. А. Хижнякова, В. А. Федорова // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине 2020: сборник статей Всероссийской школы–семинара. – Саратов: Изд–во Саратовский источник, 2020. – С. 9–11.
8. Гибридная сборка генома методом *de novo* возбудителя хламидиоза сельскохозяйственных животных / С. С. Зайцев, М. А. Хижнякова, С. И. Яковлев, В. В. Евстифеев, В. А. Федорова // «Генетика, селекция и биотехнология животных: на пути к совершенству»: материалы научно–практической конференции с международным участием. – Пушкин: ВНИИГРЖ, 2020. – С. 107.
9. Краткая геномная характеристика возбудителя инфекционного аборта пушных животных / С. С. Зайцев, М. А. Хижнякова, В. В. Евстифеев, Ф. М. Хусаинов, Р. Х. Равилов, Д. Д. Морозова, В. А. Федорова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. Спецвыпуск. – 2021. – Т. 39(1-2). – С. 27.