

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

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Федорова В. А.

Саратов – 2023

Оглавление

Введение.....	6
1. Обзор литературы.....	15
1.1. Инфекционные болезни животных. Список Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ).....	15
1.2. Abortогенные инфекции животных. Общие сведения о возбудителях.....	18
1.3. Хламидиозы животных.....	20
1.3.1. Характеристика возбудителей хламидиоза животных	20
1.3.2. Возбудители орнитоза, хламидиозного аборта и энзоотического аборта овец (<i>Chlamydia psittaci</i> и <i>Chlamydia abortus</i>).....	21
1.3.3. Другие виды хламидий, ассоциируемые с инфекционными абортами животных.....	27
1.4. Роль условно–патогенных микроорганизмов в развитии abortогенных инфекций у животных.....	30
1.5. Молекулярно–генетические методы изучения возбудителей abortогенных инфекций хламидийной этиологии у сельскохозяйственных животных.....	32
1.5.1. Методы типирования возбудителей abortогенных инфекций хламидийной этиологии.....	35
1.5.2. Методы NGS в изучении возбудителей abortогенных инфекций..	40
1.5.3. Методы метагеномного анализа.....	48
2. Собственные исследования.....	53
2.1. Объекты, материалы и методы исследований.....	53
2.1.1. Микроорганизмы.....	53
2.1.2. Образцы патологического материала СХЖ.....	60
2.1.3. Метод определения чувствительности к противомикробным препаратам.....	60
2.1.4. Молекулярно–генетические методы.....	60

2.1.4.1. Выделение ДНК.....	60
2.1.4.2. Методы секвенирования второго и третьего поколения.....	61
2.1.4.3. Индикация патогенных микроорганизмов методом метагеномного анализа.....	61
2.1.5. Методы молекулярного типирования.....	61
2.1.5.1. Монолокусное типирование (<i>ompA</i> типирование).....	61
2.1.5.2. Мультилокусное сиквенс–типирование (MLST).....	62
2.1.6. Филогенетический анализ.....	62
2.1.7. Биоинформатические методы.....	62
2.1.8 Оборудование и реактивы.....	64
2.1.8.1. Оборудование.....	64
2.1.8.2. Реактивы и растворы.....	64
2.2. Результаты исследований и их обсуждение.....	66
2.2.1. Молекулярно–генетическая характеристика возбудителей инфекционных абортос на модели штаммов <i>C. psittaci</i> Rostinovo–70, BL–84 и АМК–16.....	66
2.2.1.1. Характеристика прочтений ДНК геномов, полученных при секвенировании штаммов <i>C. psittaci</i> Rostinovo–70, BL–84 и АМК–16 с использованием платформ NGS–2 и NGS–3.....	66
2.2.1.2. Биоинформатическая обработка первичных «сырых» прочтений ДНК геномов штаммов <i>C. psittaci</i> Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84, полученных с использованием платформ NGS–2 и NGS–3.....	68
2.2.1.3. Сборка геномов штаммов <i>C. psittaci</i> Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84 методом <i>de novo</i>	73
2.2.1.4. Филогенетический анализ штаммов <i>C. psittaci</i> Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84 на основе полногеномных последовательностей.....	75
2.2.1.5. Монолокусное типирование штаммов <i>C. psittaci</i> Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84 на основе полиморфизма гена <i>ompA</i>	77
2.2.1.6. MLST штаммов <i>C. psittaci</i> Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84.....	85

2.2.1.7. Сравнительное изучение молекулярно–генетических особенностей штаммов <i>C. psittaci</i> Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84 – возбудителей инфекционных абортос СХЖ	89
2.2.1.8. Выявление генов антибиотикорезистентности в геномах штаммов <i>C. psittaci</i> Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84.....	115
2.2.2.1. Индикация и молекулярно–генетическая характеристика потенциального возбудителя инфекции органов репродуктивной системы КРС с применением метагеномного анализа и платформ NGS–2 и NGS–3.....	117
2.2.2.2. Краткая характеристика необработанных прочтений ДНК из биоматериала КРС (образец № 1), полученных с применением NGS–3..	119
2.2.2.3. Метагеномный анализ данных, полученных в результате секвенирования ДНК образца № 1 на платформе NGS–3.....	120
2.2.2.4. Биоинформатическая обработка данных, полученных в результате секвенирования ДНК образца № 1 на платформе NGS–3.....	122
2.2.2.5. Краткая характеристика необработанных прочтений, полученных в результате секвенирования ДНК образца № 1 из биоматериала от КРС с инфекцией органов репродуктивной системы с применением платформы NGS–2.....	122
2.2.2.6. Метагеномный анализ данных, полученных в результате секвенирования ДНК образца № 2 с применением платформы NGS–2...	124
2.2.2.7. Биоинформатическая обработка данных, полученных при секвенировании ДНК образца № 2 на платформе NGS–2.....	125
2.2.2.8. Полногеномная сборка методом <i>de novo</i> ДНК образца № 2.....	127
2.2.2.9. Филогенетический анализ штамма <i>Entrobacter</i> Saratov_2019.....	128
2.2.2.10. MLST штамма <i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> Saratov_2019.....	130
2.2.2.11. Молекулярно–генетическая характеристика штамма <i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> Saratov_2019 – потенциального возбудителя абортосгенной инфекции КРС.....	134

2.2.2.12. Выявление генов резистентности в геномной последовательности штамма <i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i>	
Saratov_2019.....	139
Заключение.....	150
Выводы.....	158
Список сокращений и условных обозначений.....	160
Список литературы.....	161

Введение

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 таргетных генах, изучать эволюцию и распространенность патогенных микроорганизмов.

Степень разработанности темы. Как известно, к возбудителям ИБ, ассоциированным с развитием инфекционных абортос у СХЖ, относят обширный ряд бактериальных патогенов (А. А. Абдыкадырова, 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; The role of zoonotic..., 2017; Development and evaluation of..., 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 аборт у продуктивных животных. Не маловажную роль в развитии инфекционных абортов играют условно-патогенные микроорганизмы, в том числе, относящиеся к роду *Enterobacter spp.* (Weber R., Hospes R., Wehrend A., 2018). Очевидно, такое разнообразие возбудителей инфекционных абортов 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 абортами 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 аборт, 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 абортгенных 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 уrogenитального 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 BL-84 – возбудителей инфекционных аборт, 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 BL-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 уrogenитального 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, BL-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 РФФ № 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.

1. Обзор литературы

1.1. Инфекционные болезни животных. Список Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ)

Инфекционные болезни (ИБ) представляют собой обширную группу заболеваний, причиной которых является воздействие на организм животных и человека различных болезнетворных или условно–болезнетворных микроорганизмов: бактерий, грибов, вирусов, прионов, простейших, а также паразитов.

Вспышки ИБ наносят огромный ущерб экономике сельского хозяйства, приводя к падежу поголовья, снижению получаемых объемов продуктов животноводства (молока, мяса и т.д.) и препятствуют увеличению поголовья молодняка, что является ключевым фактором в развитии сферы животноводства во всем мире. Согласно отчетам Россельхознадзора об эпидемиологической ситуации (<https://fsvps.gov.ru/fsvps/iac/rf/reports.html>), на территории РФ ежегодно возникают вспышки различных ИБ животных, которые приводят к колоссальным экономическим потерям в секторе животноводства.

На сегодняшний день зарегистрировано свыше 600 видов патогенов продуктивных животных и около 400 видов возбудителей ИБ плотоядных домашних животных. Из них, по данным исследователей (Ветеринарно–санитарные аспекты предупреждения..., 2019), на территории РФ зарегистрировано около 30 различных зооантропонозов, в основном бактериальной этиологии. Многие инфекционные агенты активно эволюционируют, что сопровождается изменениями их геномной структуры, например, в результате преодоления некоторыми возбудителями межвидовых барьеров, адаптации к изменяющимся условиям внешней среды и другим причинам. Особую значимость это имеет для так называемых трансграничных болезней, способных распространяться на обширные территории (Ламан А.М., 2019; *Transboundary animal diseases...*, 2019).

Не менее важно, что, по данным МЭБ, Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединённых Наций (ФАО) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) примерно 75% ИБ животных обладают зоонозным потенциалом, т.е. способны передаваться от животных к человеку (Ветеринарно–санитарные аспекты предупреждения..., 2019). Согласно официальной статистике (<https://www.iaea.org/ru/bulletin/kak-yadernaya-nauka-pomogaet-borotsya-s-infekcionnymi-zabolevaniyami>), ежегодно ИБ зоонозного происхождения, в том числе, с высоким коэффициентом летальности (КЛ), регистрируются более чем у 2,5 млрд. человек. Среди наиболее известных зоонозов – болезнь, вызванная вирусом Эбола, прежнее название геморрагическая лихорадка Эбола (средний КЛ до 50%) (Вирус Эбола..., 2021); тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС) (Breithaupt H., 2003; Rogers D.J., Randolph S.E., 2003;); COVID–19 (A new coronavirus associated..., 2020; In silico infection..., 2022) и т.д.

Эпидемии и эпизоотии различных ИБ возникали еще на ранних этапах развития человечества с момента, когда люди начали коллективную жизнь и одомашнили первые виды животных.

Передача возбудителя ИБ от животного к человеку может осуществляться различными путями. Среди основных факторов можно выделить следующие: прямой контакт с заболевшими животными или нахождение в одном помещении с ними, заражение через инвентарь, используемый при уходе за животными, контакт с продуктами животноводства, используемыми в пищевой и перерабатывающей промышленности и инфицированными векторными насекомыми (клещи, комары и т.д.) или вертикально (внутриутробно) (Сергевнин В.И., 2012).

Очевидно, что в настоящее время, помимо самих животных, основной группой риска в животноводстве является персонал, по своему роду деятельности занятый обслуживанием продуктивных животных и сельскохозяйственной птицы (Ветеринарно–санитарные аспекты предупреждения..., 2019). Однако инфицированные продукты

животноводства могут быть причиной ИБ и у рядовых потребителей, приобретающих в розничных магазинах зараженную продукцию в виде мяса, яиц, масла, молока или соответствующих мясных или кисло–молочных изделий (Мезенцев С.В., Разумовская В.В., 2014).

Контроль над ИБ на межгосударственном уровне осуществляет неправительственная организация – Международное эпизоотическое бюро (МЭБ), переименованное в 2003 г. во Всемирную организацию здоровья животных (англ. World Organization for Animal Health, от франц. Organisation Mondiale de la Santé Animale, Office International des Epizooties – OIE), разработавшая международную классификацию заразных болезней животных. Первая классификация была представлена в 1964 г. и представляла собой деление на три списка под названиями – «А», «В» и «С». К первому списку (А) относили особо опасные инфекции, возникновение вспышек которых требовало международного оповещения, ко второму списку (В) относили опасные болезни, регистрируемые на национальном уровне, последний список (С) представлял собой прочие спорадические болезни, представляющие сугубо региональный интерес. Данная классификация просуществовала без каких–либо изменений 42 года, пока в 2005–2006 гг. список ИБ не был подвергнут значительным изменениям. В настоящее время для классификации используется единый список МЭБ (англ. OIE Listed diseases) из 117 нозологических единиц, объединенных в 13 групп, представляющих собой как болезни животных, так и болезни рыб, пчел, моллюсков и ракообразных. Согласно последней редакции (<https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/>), список МЭБ включает в себя: болезни животных многих видов – 21, болезни крупного рогатого скота (КРС) – 14, болезни мелкого рогатого скота (МРС) (овец и коз) – 12, болезни лошадей – 11, болезни свиней – 6, болезни птиц – 13, болезни кроликов – 2, болезни пчел – 1, болезни рыб – 10, болезни моллюсков – 7, болезни ракообразных – 10, болезни земноводных – 3, болезни, не вошедшие в определённые категории – 4.

1.2. Abortогенные инфекции животных. Общие сведения о возбудителях

Как известно, под абортom у животных понимают прерывание беременности с последующим изгнанием из матки незрелого или погибшего плода. На сегодняшний день выделяют немало причин возникновения абортов у СХЖ, которые условно разделяют на заразные и незаразные. Как правило, последние могут быть вызваны воздействием окружающей среды или условиями неправильного содержания. Алиментарные аборты связывают с несбалансированностью рациона, токсические аборты с отравлением кормами, климатические аборты возникают из-за высокой или, напротив, низкой температуры окружающей среды. Также аборты могут возникать из-за стрессов, травм или применения некоторых лекарственных препаратов. Однако наиболее частой причиной абортов СХЖ являются инфекционные агенты, при этом многие из них представляют серьезную угрозу и для здоровья человека. Важно отметить, что заразные инфекционные аборты могут быстро распространяться внутри поголовья, приводя к серьезным экономическим потерям, вызывая убытки в сфере животноводства, как в РФ, так и во всем мире. Поэтому в обширном списке ИБ животных различной этиологии инфекционные аборты занимают особое место.

В последние годы изучению вспышек абортов СХЖ уделяется большое внимание, поскольку это имеет важное значение для понимания источников инфекции, путей передачи, профилактики и борьбы с зоонозными и зооантропонозными заболеваниями.

По данным отчетов информационно-аналитического центра Россельхознадзора по эпизоотической ситуации в РФ (<https://fsvps.gov.ru/fsvps/iac/rf/reports.html>), за последние 10 лет (2010–2020 гг.), заболевания, вызываемые возбудителями abortогенных инфекций, регулярно входят в «Перечень нозологических единиц, вносящих основной вклад в заболеваемость и неблагополучие для разных видов животных и птиц» (<https://www.fsvps.gov.ru/fsvps/iac>).

Согласно классификации, предложенной Schweighardt H. *et al.* (Schweighardt H., 1991), причины возникновения инфекционных абортос СХЖ в зависимости от этиологических факторов ИБ можно условно разделить на три группы. Так, 1–я группа включает в себя такие патогены, как, например, *Campylobacter fetus subsp. venerealis* и *Tritrichomonas fetus*, которые имеют выраженный тропизм к урогенитальному тракту у КРС и МРС, соответственно, вызываемые этими возбудителями инфекции могут передаваться половым путем или во время искусственного осеменения. В эту же группу включены такие микроорганизмы как *Brucella abortus* (у КРС), реже – *Brucella melitensis* – эти возбудители могут попадать в организм животного пероральным путем и вызывать вспышки ИБ в зараженных популяциях животных. У стельных коров заболевание приводит к аборту один раз в жизни, а у нестельных животных инфекция протекает бессимптомно, и они могут оставаться инфицированными всю жизнь (Godfroid J., Nielsen K., Saegerman S., 2010).

Вторая группа возбудителей способна колонизировать урогенитальный тракт и приводить к хроническим инфекциям половых путей с последующим нарушением фертильности животных. Возбудителями этой группы считают: *Chlamydia spp.*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, *Leptospira spp.*, *Salmonella enterica Serotype Dublin* и *Neospora caninum*.

К 3–й группе принадлежат возбудители оппортунистических инфекций, которые, как считали первоначально, способны вызывать только спорадические случаи заболеваний. Согласно предложенной классификации (Schweighardt H., 1991), к ним относят *Trueperella pyogenes*, стрептококки, стафилококки, а также представителей порядка *Enterobacterales* (*Escherichia coli* и др). Микроорганизмы 3–й группы встречаются повсеместно и могут обнаруживаться в окружающей среде.

1.3. Хламидиозы животных

Важнейшую роль в возникновении вспышек инфекционных абортос СХЖ играют микроорганизмы, принадлежащие к роду *Chlamydia spp.* На сегодняшний день накоплено достаточно много знаний об этих патогенах, а также зарегистрировано множество случаев, свидетельствующих о причастности представителей этого рода к возникновению инфекционных абортос, как у животных, так и у людей (*Chlamydia psittaci* ST24..., 2021).

1.3.1. Характеристика возбудителей хламидиоза животных

Хотя хламидийная инфекция известна человечеству не одно тысячелетие, роль хламидий как возбудителей ряда важных болезней животных и человека даже в 21 веке является предметом интенсивных научных исследований (Knittler M.R., Sachse K., 2015). Следует отметить, что за последнее столетие взгляд на возбудителей хламидиоза неоднократно менялся – проводилась реклассификация их таксономического положения, т.е. положения микроорганизмов в соответствующих семействах, менялось их название, а также пересматривалась их принадлежность к группам сначала бактерий, затем вирусов и, спустя десятилетие, опять бактерий. Так, первоначально возбудитель хламидиоза был изолирован как бактериальный агент и отнесен к таксону *Chlamydozoa* (Prowazek S., 1907). Однако позже, возбудитель хламидиоза, вызвавший трахому у человека и выделенный в 1957–1958 гг., на какое-то время был принят за вирус из-за того, что получение «чистой культуры» этого патогена осуществлялось не на твердой питательной среде, применяемой для выращивания бактерий, а на куриных эмбрионах, прочно ассоциированных в то время с вирусными агентами (Studies on the etiology..., 1957; Further studies on..., 1958). К 1966 г. стало понятно, что хламидии не вирусы, а бактерии, так как они обладали как ДНК, так и РНК, имели цикл развития, сильно отличающийся от механизмов репликации вирусов, а также клеточную стенку, сходную с грамотрицательными бактериями, рибосомы, и оказались чувствительными к

антибиотикам, т.е. проявляли особенности, характерные для прокариот (Moulder J.W., 1966).

Дальнейшее изменение названий и таксономического положения хламидий было связано, в первую очередь, с получением новых данных об этом возбудителе, а, во-вторых, с развитием молекулярно-генетических технологий. Так, примерно до 90-х гг. 20 в. различали только два основных вида хламидий – *C. psittaci* и *C. trachomatis*, причем основным критерием для отнесения к указанным видам являлся источник выделения патогена – если хламидии были обнаружены у животных – их относили к *C. psittaci*, если у человека – к *C. trachomatis*. В 2009 г. семейство *Chlamydiaceae* включало в себя 1 род *Chlamydia* и уже 9 видов (все патогенные хламидии), а в 2019 г. количество бактерий, относящихся к роду *Chlamydia*, возросло до 17 видов: *C. trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia muridarum*, *C. psittaci*, *Chlamydia avium*, *Chlamydia gallinacean*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia felis*, *C. abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia serpentis*, *Chlamydia poikilothermis*, *Chlamydia sanzinia*, *Chlamydia corallus*, *Chlamydia caviae*, включая кандидатные виды *Chlamydia buteonis* и *Chlamydia ibidis* (*Chlamydia buteonis*, a new..., 2019).

C. serpentis, *C. poikilothermis*, *C. corallus* и *C. sanzinia* являются сравнительно недавно открытыми видами *Chlamydia*, поэтому на сегодняшний день пока мало информации относительно их патогенности и зоонозного потенциале (Phillips S., Quigley B.L., Timms P., 2019).

1.3.2. Возбудители орнитоза, хламидиозного аборта и энзоотического аборта овец (*Chlamydia psittaci* и *Chlamydia abortus*)

До недавнего времени среди всех известных видов хламидий наиболее значимыми в сфере животноводства считались *C. psittaci* и *C. abortus*, фигурирующие в списке МЭБ (<https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/>) и «Перечне заразных, в том числе особо опасных болезней животных» (<https://fsvps.gov.ru/fsvps/laws/251.html>), считающиеся

этиологическими факторами орнитоза и энзоотического аборта овец (ЭАО), соответственно.

Так, согласно Приказу Минсельхоза РФ от 19 декабря 2011 г. N 476 и Приказу Минсельхоза РФ от 25 сентября 2020 г. N 565 «О внесении изменений в перечень заразных, в том числе особо опасных, болезней животных», хламидиозы СХЖ включены в «Перечень заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)» (пункты № 67 «Хламидиозы» и № 68 «Хламидиоз – энзоотический аборт овец (ЭАО)»). В списке МЭБ ИБ хламидийной этиологии указаны в категориях болезней овец, коз и птиц, т.е. относятся к нотифицируемым инфекциям (www.oie.int). Первый из них – хламидиоз овец или ЭАО, связывают с заражением наиболее восприимчивых животных – домашних овец и коз, бактериями *C. abortus*. У ягнят и нестельных овец инфекция может оставаться латентной до зачатия. У овец или коз, подвергшихся инфицированию на поздних сроках беременности, клинические признаки ИБ могут не проявляться вплоть до следующей беременности (OIE Terrestrial Animal Health Code Chapter 14.4. <https://www.oie.int>). Вторую нозологию, так называемый «птичий хламидиоз» (англ. Avian chlamydiosis) (OIE Terrestrial Animal Health Code Chapter 10.1 <https://www.oie.int>), связывают с инфицированием птиц различными представителями *Chlamydia spp.* До недавнего времени *C. psittaci* считался единственным возбудителем болезни у птиц, которая первоначально получила название «пситтакоз», при этом термин «орнитоз» был введен позже для дифференциации болезни домашних и диких птиц от ИБ попугаевых. В настоящее время оба термина используются для обозначения одного и того же заболевания (Andersen A.A., Vanrompay D., 2000).

Как известно, *C. psittaci* наиболее часто ассоциируется с орнитозом — системным заболеванием птиц, животных и человека с острым, затяжным, хроническим или субклиническим течением. Заражение птиц происходит в основном аэрогенным путем за счет вдыхания аэрозолей из глазных или

носовых секретов, пыли из перьев и фекалий инфицированных особей, также возможна вертикальная передача возбудителя. У птиц развиваются в основном неспецифические, а иногда и фатальные кишечные или респираторные симптомы. Штаммы *C. psittaci* также могут инфицировать людей, заболевание характеризуется в основном неспецифическими симптомами, напоминающими грипп, но, в ряде случаев, развиваются тяжелые пневмонии, эндокардиты и энцефалиты. Основную группу лиц, подвергающихся повышенному риску заражения, составляют те, кто часто контактирует с домашней птицей и птицами-компаньонами.

Согласно литературным данным (Andersen A.A., Van Deusen R.A., 1988; Andersen A.A., 1991; Characterization of avian..., 1997; Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A., 1999), вид *C. psittaci* подразделяется на 9 сероваров, обозначенных буквами латинского алфавита от А до I. Серовар А считается эндемичным среди птиц и способным вызвать заболевания у людей. Серовар В впервые был изолирован от индеек и часто обнаруживается у голубей, а также являлся причиной инфекционных абортов у КРС. Изоляты серовара С были выделены от диких птиц (немецкой, болгарской и бельгийской утки, белого лебедя, калифорнийской индейки и куропатки). Серовар D был обнаружен у индеек, чаек, волнистых попугаев и людей.

Изоляты серовара Е, известные как Cal-10, MP или MN (этиологические агенты менингопневмонита), были выделены во время вспышки пневмонита у людей в конце 1920-х – начале 1930-х гг. Впоследствии штаммы MN были получены от птиц в разных странах мира, включая уток, голубей, страусов и нанду. Единственный вариант серовара F, VS225, был обнаружен у попугаев. В 2005 г. выявили новый генотип E/B, выделенный в Европе от уток, характеризующийся заменой аминокислот в вариабельном сегменте главного белка внешней мембраны хламидий MOMP (от англ. *Major Outer Membrane Protein*) (Sequencing of the *Chlamydophila...*, 2005).

Одна из известных вспышек орнитоза, охватившая большую часть Европы и США, датированная 1929–1930 гг., была ассоциирована с отрядом

Попугаеобразных, с которыми и связано название возбудителя от лат. *psittacus* — «попугай». Дальнейшее изучение инфекции показало, что микроорганизмы *C. psittaci* могут инфицировать не только попугаев, но и другие виды птиц. Так, в 1939 г. возбудитель орнитоза был изолирован от гоночных голубей на территории Южной Африки, а после и от калифорнийских гоночных голубей. С использованием серологических методов уже в 1942 г. было доказано, что орнитоз распространен у домашних уток, гусей и кур. В начале 1950-х гг. регистрировались случаи заражения людей, работающих в индустрии разведения индеек в США, при контакте с зараженной птицей (Meyer K.F., 1967). Также в этом временном промежутке регистрировались случаи возникновения орнитоза у людей на территории США, предположительно заразившихся от диких голубей и уток. В течение последующих десятилетий в США регулярно возникали вспышки, связанные с заражением *C. psittaci*, а в 1990-х гг. начали регистрировать случаи инфицирования на территории Европы (Pilot study of the occurrence..., 1994; Characterization of avian..., 1997; Comparative studies on..., 2006). В первое десятилетие 21-ого века орнитоз по-прежнему является актуальной проблемой в сфере птицеводства, т.к. вспышки заболевания регулярно возникают на территории различных стран, включая Европейские государства (Chlamydial infections in..., 2009) и Россию. Согласно данным Россельхознадзора (<https://fsvps.gov.ru/>), на территории РФ за последние 10 лет было официально зарегистрировано 674 вспышки орнитоза.

Сегодня известно приблизительно 465 видов домашних и диких птиц, которые могут быть подвержены заболеванию орнитозом, среди которых попугаеобразные и голуби заражаются чаще всего. Свободноживущие голуби, способные переносить различные виды хламидий, включая этиологический агент орнитоза, находятся в тесном контакте с людьми и СХЖ по всему миру (Kaleta E.F., Taday M.A., 2003).

В то же время неоднократно были получены доказательства взаимосвязи инфицирования штаммами *C. psittaci* различных животных и развития у последних инфекционных аборт. Так, в 1997 г. сообщалось о заболеваниях

репродуктивной системы овец, вызванных *C. psittaci*, причем на тот момент микроорганизмы данного вида уже были четко идентифицированы как основная причина инфекционных абортів MPC (Papp J.R., Shewen P.E., 1997). В 1998 г. в стаде молочных коров описаны случаи абортів вследствие инфицирования животных представителями *C. psittaci* (Isolation of an avian..., 1998). Впоследствии сообщения об идентификации *C. psittaci* в качестве этиологического фактора возникновения абортів у овец, коз и коров начали поступать из различных стран и регионов (Serosurvey of sheep and..., 2001; Doosti A., Arshi A., 2012; The role of zoonotic..., 2017). С 2017 г. на территории Австралии участились случаи абортів у лошадей, вызванных инфицированием *C. psittaci* (Polkinghorne A., Greub G., 2017). Случаи абортів у лошадей, приведших к потере репродуктивной функции после инфицирования штаммами *C. psittaci*, связывали с передачей возбудителя от попугаев к лошадям. Один из таких случаев оказался в центре внимания после того, так была задокументирована передача патогена от плаценты лошадей к человеку, вызвав пять случаев орнитоза через ранее неизвестные пути передачи этой инфекции (Multilocus sequence typing..., 2017). Далее данный возбудитель был идентифицирован как наиболее вероятная причина заболеваний репродуктивной системы лошадей в Венгрии (Szeredi L., Hotzel H., Sachse K., 2005), Швейцарии (Detection of *Chlamydia* species..., 2020, Borel N., 2020) и Германии (Polkinghorne A., Greub G., 2017). В Австралии также зарегистрированы случаи абортів у лошадей, приведших к потере репродуктивной функции из-за заражения *C. psittaci* от попугаев (*Chlamydia psittaci*: a suspected..., 2020; A 25-year retrospective study..., 2021). Не менее важными являются доказанные случаи обнаружения *C. psittaci* в образцах фекалий птиц из окружающей среды на 14 конезаводах, где неоднократно отмечались случаи абортів у жеребых кобыл, связанных с изолятами *C. psittaci*, относящихся клональной линии ST24 (Epidemiology of *Chlamydia*..., 2021).

ЭАО или хламидийный аборт овец чаще всего ассоциируется с внутриклеточными облигатными грамотрицательными бактериями вида *C. abortus*. Впервые заболевание было зарегистрировано и описано в 1936 г. в Шотландии при случае массового аборта овец, однако взаимосвязи данного случая с ЭОА выявить не удалось, а инфекционный аборт был принят за недостаток питания. В 1942 г. хламидии указанного вида были выделены в США от кошек с респираторным заболеванием, получившим название «кошачий пневмонит» (Baker J., 1942). В 1950 г. указанное инфекционное заболевание стали ассоциировать с возбудителем, относившимся к группе орнитоза–лимфогранулемы–трахомы. Изначально *C. abortus* классифицировали как *C. psittaci* серовар 1 (Isolation and characterisation..., 2002), и только в 1999 г. *C. psittaci* и *C. abortus* были признаны отдельными видами хламидий на основании различий в патогенности и результатов ДНК–гибридизации (Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A., 1999).

В настоящее время известно, что представители *C. abortus*, имеют глобальное распространение по всему миру, за исключением Новой Зеландии и Австралии, и являются одной из наиболее распространенных инфекционных причин инфекционных абортов животных и человека во всем мире.

Хламидии вида *C. abortus* преимущественно поражают плаценту домашнего скота, приводя к гибели плода, и ассоциированы в большей степени с болезнями овец и коз (основной этиологический фактор ЭАО МРС). У инфицированных овец могут полностью отсутствовать какие–либо клинические признаки, заболевание нередко проявляется в виде преждевременных родов, оканчивающихся мертворождением или появлением слабого потомства с низкой выживаемостью. Часто в приплоде овцы дают сочетание мертвых, слабых и даже здоровых ягнят. Животные могут выделять большое количество возбудителя в биоматериале абортированного плода, вагинальных выделениях, на шерсти ягнят и мертвых плодов, которые являются основными источниками передачи хламидийной инфекции интактным овцам (Nietfeld J.C., 2001; Longbottom D., Coulter L.J., 2003). Хотя

заболевание встречается в основном у овец и коз, возбудитель также может вызывать аборт у широкого круга других продуктивных, диких и домашних животных – свиней, лошадей, кроликов, морских свинок, коал, мышей, КРС. Также были доказаны случаи абортов у женщин, контактировавших с МРС, инфицированных возбудителем хламидиоза указанного вида (Nietfeld J.C., 2001; Longbottom D., Coulter L.J., 2003; Baud D., Regan L., Greub G., 2008; Waddlia, Parachlamydia and..., 2011; Schautteet K., Vanrompay D., 2011; Rodolakis A., Laroucau K., 2015; Borel N., Polkinghorne A., Pospischil A., 2018). Передача хламидиоза внутри популяции осуществляется половым, бытовым и вертикальными путями (Абдыкадырова А.А., 2011). Следует отметить, что за последнее десятилетие у различных видов диких птиц также были обнаружены хламидии вида *C. abortus* (New real-time PCR..., 2009). Ряд исследований подтверждает факт передачи патогена между птицами и домашними животными (Natural cross chlamydial..., 2010). На сегодняшний день известно, что *C. abortus* является зоонозным патогеном, который не только приводит к аборту или мертворождению у СХЖ, но может вызвать серьезную патологию и у беременных женщин, а, следовательно, представляет значительный потенциальный риск для здоровья тех, кто контактирует с овцами, особенно в период ягнения (Borel N., Polkinghorne A., Pospischil A., 2018).

1.3.3. Другие виды хламидий, ассоциируемые с инфекционными абортами животных

Важно, что и другие виды хламидий способны вызывать инфекционные аборты у животных. Так, представителей *C. trachomatis* и *C. pneumonia* первоначально считали преимущественно патогенными только для человека. В зависимости от генотипа, выявляемого на основе полиморфизма гена *ompA* (в ряде источников указан как *omp1*), хламидии данных видов способны поражать различные органы организма хозяина и, соответственно вызывать различные ИБ (трахому, урогенитальную хламидийную инфекцию, венерическую лимфогранулему, пневмонию, конъюнктивиты и т.д.) (Taylor–

Robinson D., 2017). Однако в последние годы, с развитием молекулярно–генетических технологий, появились неоднократные научные свидетельства возможности заражения животных геноварами *C. trachomatis*, выделенными из абортированных плодов коров или спермы быков (Immunologic status in cattle..., 1990; Can *Chlamydia trachomatis*..., 2008), хотя ранее представители данного вида считались специфичными только для человека.

К патогенным видам хламидий, имеющий зоонозный потенциал, обычно относят *C. felis* – патоген, преимущественно ассоциированный с болезнями кошек; *C. caviae*, первоначально обнаруженный у морских свинок; *C. suis*, вызывающий заболевания у свиней; *C. psittaci*, который ранее ассоциировали только с респираторными и репродуктивными болезнями птиц.

Следует отметить, что хламидии способны инфицировать целый ряд различных хозяев, т.е. относятся к полигостальным возбудителям ИБ. При этом отмечают определенное сходство патологических изменений и клинических проявлений, вызываемых такой разнообразной группой патогенных микроорганизмов. На сегодняшний день хламидии можно условно разделить на виды, способные заражать сельскохозяйственных, диких и домашних животных; виды, вызывающие заболевания у животных и обладающие зоонозным потенциалом, а также виды, патогенные для человека (Elwell C., Mirrashidi K., Engel J., 2016).

Таким образом, первоначальная гипотеза о наличии высокой специфичности между хозяином и хламидиями, которая рассматривалась как механизм адаптации, не нашла подтверждения. За последние годы было неоднократно продемонстрирована способность хламидий преодолевать межвидовые барьеры и инфицировать различные виды животных, в том числе, обеспечивая развитие инфекционных абортов. Так, *C. pecorum* чаще всего ассоциировали с возникновением полиартрита и конъюнктивита у сумчатых и СХЖ (Clinical, diagnostic and..., 2016; Detection of *Chlamydia pecorum*..., 2017; Understanding the health and..., 2018; Detection of *Chlamydiaceae* in..., 2019; *Chlamydia pecorum*–Induced..., 2021). Однако недавнее исследование Clune T.

et al. (Real–Time Fluorometric Isothermal..., 2021) с использованием молекулярно–генетических методов продемонстрировало причастность этого вида хламидий к случаям массовых аборт у овец в Австралии и Мексике (*Chlamydia pecorum* Ovine..., 2021; Real–Time Fluorometric Isothermal..., 2021; *Chlamydia pecorum* detection..., 2021; *Chlamydia pecorum*–Associated..., 2021; Genetic diversity of *Chlamydia*..., 2022). Хотя в настоящее время *C. pecorum* является известной причиной абортов у овец, клинические случаи подробно были описаны лишь недавно (*Chlamydia pecorum*: fetal..., 2016; *Chlamydia pecorum* detection..., 2021; *Chlamydia pecorum* Ovine..., 2021). Отмечены случаи менингоэнцефалитов, васкулитов и абортов, вызываемых *C. pecorum* у КРС (Meningoencephalitis, vasculitis, and..., 2021; *Chlamydia pecorum*–Associated..., 2021), сообщалось об изоляции *C. pecorum* от абортировавшей свиньи (Leonard C. A., Dewez F., Borel N., 2016). Кроме того, инфицирование *C. pecorum* существенно снижает скорость роста телят (до 48%) (Asymptomatic endemic *Chlamydia*..., 2012).

Отмечаются случаи смешанной инфекции *C. psittaci*, *C. pecorum*, *C. abortus* и *C. suis* у КРС (A Meta–Analysis of Bovine..., 2022), либо *C. pecorum* и *C. abortus* (The limitations of commercial..., 2019; Detection of *Chlamydiaceae* in..., 2019). Коинфекция *C. abortus* и *C. psittaci*, *C. psittaci* и *C. pecorum* показана для абортировавших МРС (овец и коз) и КРС (The role of zoonotic..., 2017).

Более того, следует отметить, что еще в 1989 г. на основе филогенетического анализа штаммы, ранее считавшиеся *C. abortus*, были реклассифицированы как представители *C. psittaci* и *C. pecorum*. Доказана их способность вызывать инфекционные аборты не только у животных, но и у людей (*Chlamydiaceae* Genomics Reveals..., 2015).

Показана ведущая роль штаммов *C. suis*, резистентных к антибиотикам тетрациклинового ряда, в развитии инфекционных абортов у свиней (Vommana S., Polkinghorne A., 2019). У абортировавших животных (свиней) помимо *C. suis* были выделены *C. abortus*, *C. pecorum* и *C. psittaci*. Хламидиозы у свиней связывают с различными патологиями, такими как конъюнктивит,

пневмония, перикардит, полиартрит, полисерозит, псевдомембранозный или некротизирующий энтерит, перинатальный синдром дисгалактии, выделения из влагалища, возврат течки, аборт, мумификация, рождение слабых поросят, повышенная перинатальная неонатальная смертность, плохое качество спермы, орхит, эпидидимит и уретрит у хряков (Schautteet K., Vanrompay D., 2011).

Таким образом, на основе официально зарегистрированных случаев заражения хламидиями различных видов животных, таких как КРС, МРС, лошадей, свиней, а также диких и домашних птиц, становится очевидным, что хламидии способны инфицировать и вызывать инфекционные аборты у широкого круга хозяев. При этом стоит отметить, что в официальных документах («Перечень заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)» (<https://fsvps.gov.ru/fsvps/laws/2964.html>) основной причиной возникновения инфекционных абортов у овец и коз обозначен только лишь вид *C. abortus*, хотя на сегодняшний день накоплено достаточно знаний о том, что другие виды хламидий, такие как *C. psittaci* и др., так же могут вызывать инфекционные аборты у СХЖ (The role of zoonotic..., 2017).

1.4. Роль условно–патогенных микроорганизмов в развитии абортотенных инфекций у животных

В последние годы стало появляться все больше научных доказательств, указывающих на то, что не менее важное место в развитии инфекционных абортов СХЖ занимают возбудители оппортунистических заболеваний, представители которых первоначально ассоциировались преимущественно с условно–патогенной флорой у людей.

Большинство возбудителей, относящихся к условно–патогенной флоре, известно достаточно давно. Так, в 1899 г. из желудочно–кишечного тракта человека были выделены микроорганизмы рода *Enterococcus*, которые стали первыми представителями бактерий, вошедших в группу под названием ESKAPE. Данная аббревиатура состоит из первых букв научных названий

шести высоковирулентных и устойчивых к антибиотикам бактериальных патогенов, таких как: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, а также *E. coli*. На сегодняшний день представители этой группы считаются главной причиной внутрибольничных инфекций во всем мире (Characteristics and determinants..., 2012). Группа патогенов, относящихся к ESKAPE, признана ВОЗ одной из приоритетных глобальных угроз здоровью человека, требующих активного исследования и разработки новых противомикробных препаратов против них (Economic burden of antibiotic..., 2019).

Следует отметить, что в настоящее время большинство исследований сосредоточено на изучении госпитальных штаммов, изолированных от человека. Так, в 2021 г. группа исследователей продемонстрировала взаимосвязь между инфекционными процессами, вызванными представителями ESKAPE и болезнями репродуктивной системы человека, включая инфекционные и легальные искусственные хирургические аборты (Healthcare associated infection..., 2021; Bacterial infection causes..., 2021). Однако, по мнению авторов (Bacterial infection causes..., 2021), несмотря на то, данные патогены хорошо изучены, включая генетическую обусловленность устойчивости к противомикробным препаратам, механизм абортов, вызываемых большинством бактериальных патогенов, на данный момент не известен и требует дальнейшего изучения.

Тем не менее, еще в 70–80 гг. прошлого века появилась информация о связи представителей этой группы с инфекционными процессами у СХЖ. Так, штаммы представителей *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.* были выделены у лошадей во время вспышек метритов и инфекционных абортов (Platt H., Atherton J.G., Orskov I., 1976; Gibson J.A., Eaves L.E., O'Sullivan B.M., 1982). С развитием методов молекулярной диагностики ИБ животных в последнее время стали появляться сообщения о новых случаях обнаружения неспецифических патогенов – представителей условно-патогенной флоры,

идентифицированных в качестве этиологического фактора инфекционного аборта животных. Так, в Китае был обнаружен один из подвидов *Enterobacter hormaechei* у пушных зверей, ассоциированный с инфекцией матки и инфекционным абортom у больного животного, хотя ранее считалось, что данный вид микроорганизмов способен вызывать только внутрибольничные инфекции у людей и не связан со случаями заболеваний животных (First report of *Enterobacter...*, 2020). Сообщалось об обнаружении *Enterobacter agglomerans* и ряда других условно-патогенных микроорганизмов (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и др.) более чем в половине (68,6%) образцов плаценты абортированных, мертворожденных и недоношенных жеребят в США (Etiology and pathology of..., 1993). Следует отметить, что в последнее время среди представителей *Enterobacter spp.* равно как других условно-патогенных микроорганизмов все чаще встречаются резистентные и мультирезистентные штаммы (Antibiotic resistance in..., 2022; Molecular epidemiology, risk..., 2022; Mammals' humoral immune..., 2022; Penicillin- and third-generation..., 2022; Significant difference in..., 2022). Это, со своей стороны, диктует необходимость детального изучения, а также контроля за появлением и распространением таких штаммов, в том числе, зоонозного происхождения, с целью поиска потенциальных резервуаров резистентных возбудителей абортотогенных инфекций.

Таким образом, на сегодняшний день информация о связи представителей семейства *Enterobacter* со случаями инфекционных абортов у животных является ограниченной и малоизученной, что, в свою очередь, сильно затрудняет диагностику в виду отсутствия разработанных диагностических ПЦР тест-систем или иных методов детекции, включая рекомендации при проведении соответствующих мероприятий.

1.5. Молекулярно–генетические методы изучения возбудителей абортотенных инфекций хламидийной этиологии у сельскохозяйственных животных

Выявление и молекулярно–генетическая характеристика возбудителей инфекционных абортов СХЖ представляет собой сложную задачу, как для ветеринарных врачей, так и диагностических лабораторий ветеринарного профиля. Еще около 30 лет назад при отправке в диагностические лаборатории биологического материала от больных животных только в ряде случаев (от 23% до 46%) было возможно определить причину возникновения аборта с выявлением конкретного инфекционного агента (Barr V.C., Anderson M. L., 1993). Контроль за распространением хламидийных инфекций, равно как и выявление возбудителя(лей) соответствующих ИБ до сих пор представляют большую сложность, в том числе, из–за, зачастую, хронического и латентного течения этих ИБ. Так, хламидиозы отличаются многообразием клинических проявлений у животных, а возбудители способны к длительной персистенции в организме чувствительного хозяина, что создает потенциальную опасность для сферы животноводства и птицеводства (Сероиммунологический мониторинг на хламидиоз..., 2021). В связи с этим для эффективной и точной диагностики этиологического агента ИБ животных необходимо применение широкого спектра диагностических методов с тщательным обследованием и взятием образцов биоматериала, как правило, жидкости и ткани абортивного материала, в том числе, постмортально. Тем не менее, это не всегда приводило к успешной идентификации этиологического агента, вызвавшего инфекционный аборт (Menziez P.I., 2011). На сегодняшний день разработан целый ряд мероприятий для индикации возбудителей инфекционных абортов животных. Для лабораторной диагностики соответствующих инфекций рекомендуется применять поэтапный подход к выявлению возбудителя, включающий в себя серологические, бактериологические и молекулярно–генетические исследования биоматериала от абортировавшего животного (Laboratory diagnosis of ruminant..., 2014). Микробиологические методы

исследования (бактериологический метод) направлены на выделение чистой культуры возбудителя и первоначально считались «золотым стандартом». Основным преимуществом данного подхода является возможность подтверждения наличия в биоматериале больного животного возбудителей ИБ с высокой степенью точности и достоверности, а также выявление уровня чувствительности обнаруженных микроорганизмов к антибиотикам диско–диффузионным методом (ДДТ) (Безбородова Н.А., Ким Н.А., 2018). Однако указанные методы имеют ряд существенных недостатков, связанных с трудностями выявления микроорганизмов, некультивируемых на искусственных рутинных питательных средах, к которым относятся все представители *Chlamydia spp.* Выделение этих микроорганизмов возможно только в случае использования специальных перевиваемых клеточных линиях или куриных эмбрионов, метод считается весьма трудоемким, требующим немало времени (до 8–14 суток) и наличия опыта у персонала. Более того, бактериологические методы не позволяют производить идентификацию хламидий до рода или вида. Это важно как с теоретической – при появлении новых или мутантных штаммов возбудителей, как это было в случае «Шведских» вариантов хламидий (Ripa T., Nilsson P., 2006; Unemo M.I., Clarke N., 2011), так и с практической точки зрения для обеспечения качественного контроля за возбудителями notiфицированных болезней животных, в том числе, вызывающих развитие инфекционных аборт, и решения практических задач эпидемиологического надзора, особенно, при появлении и распространении резистентных вариантов микроорганизмов. За последние десятилетия все более востребованными для целей лабораторной диагностики возбудителей ИБ животных становятся молекулярно–генетические методы индикации патогенных и оппортунистических микроорганизмов. Одним из таких методов, занявших главенствующее место в лабораторной диагностике ИБ животных, является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данный метод основан на амплификации таргетных участков малых концентраций нуклеиновых кислот (ДНК) в биологическом материале больных животных

при помощи ферментов в условиях *in vitro* (Молекулярно–биологические методы диагностики..., 2006). Данный метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью при индикации инфекционного агента, однако имеет свои ограничения, так как праймеры способны амплифицировать лишь таргетные участки ДНК, не позволяя изучать полную структуру генома. Другой важной проблемой в диагностике возбудителей ИБ, в том числе, хламидиозов животных и людей является относительно большое количество ложноотрицательных результатов (до 20%) при использовании ПЦР в тестировании образцов ДНК из клинического и патологического материала, что связывают со значительной вариабельностью генома возбудителя и, зачастую, относительно невысокой концентрацией генетического материала возбудителя в образце (Современные методы лабораторной..., 2008; Hoorfar J., Cook N., 2003; Вафин, Р. Р., 2009; Pedersen L., Herrmann B., Møller J.K., 2009).

1.5.1. Методы типирования возбудителей abortогенных инфекций хламидийной этиологии

Огромную теоретическую и практическую значимость в молекулярно–генетической характеристике и диагностике возбудителей ИБ, в частности, хламидийных инфекций представляет собой типирование изолятов, т.е. возможность выявлять сходство или различия между штаммами хламидий зоо– и зооантропонозной природы. Это важно как для решения вопросов локальной и глобальной эпизоотологии, так и с целью контроля за распространением патогенных штаммов.

На сегодняшний день разработано множество методов, позволяющих дифференцировать обнаруженные штаммы хламидий. Первые попытки типирования хламидий были предприняты на модели *C. trachomatis* еще во второй половине двадцатого века путем серотипирования хламидий. Данный метод был дорогим в реализации и достаточно трудоемким, однако его использование позволило впервые произвести серологическую классификацию выделяемых изолятов штаммов хламидий данного вида (Wang

S.P., Kuo C.C., Grayston J.T., 1973). Позже, в 1985 г., был разработан микроиммунофлуоресцентный анализ (микро-ИФ) с поливалентной мышинной антисывороткой, с помощью которого *in vitro* удалось определить основные 15 сероваров *C. trachomatis* (от А до К и L₁₋₃). Этот анализ с применением панели моноклональных антител (МКА) оказался значительно более специфичным и гораздо менее трудоемким по сравнению с предыдущим, поскольку он не требовал иммунизации мышей для типирования каждого изолята (*Immunotyping of Chlamydia trachomatis...*, 1985). На рубеже 90-х гг. использование монослоя культуры клеток позволило существенно упростить методику серотипирования *C. trachomatis* на основе белка внешней мембраны (МOMP) (Suchland R.J., Stamm W.E., 1991). Параллельно этому предпринимались попытки серотипирования и представителей других видов хламидий.

Первые попытки классификации штаммов *C. psittaci* на отдельные серовары имели сравнительно небольшой успех. Так, в 70-х гг. прошлого века использование антисыворотки в тесте нейтрализации нескольких изолятов, выделенных от КРС и овец, позволило обнаружить всего два серологических типа хламидий указанного вида (*Serotyping of Chlamydia...*, 1975). Позднее с использованием иммунофлуоресцентного анализа и панели специфических антисывороток удалось идентифицировать девять разных иммунотипов *C. psittaci*. Полученные данные продемонстрировали выраженную гетерогенность представителей данного вида хламидий. Применение панели серовароспецифических МКА при серотипировании *C. psittaci* оказалось не столь эффективным, как при типировании изолятов *C. trachomatis*, поскольку позволило разделить их только на четыре группы (Andersen A.A., Van Deusen R.A., 1988). Из-за своей облигатной внутриклеточной природы хламидии оказались невосприимчивыми к традиционным методам генетических манипуляций, применяемым в 80-90-х гг. прошлого века, и, как следствие, прогресс в понимании их биологии развивался медленнее по сравнению с другими бактериальными патогенами (Stephens R.S., 1992).

С развитием и внедрением в ветеринарную практику технологий ПЦР-диагностики появилась возможность детектировать амплифицированные последовательности ДНК таргетных генов *C. psittaci*. На сегодняшний день существует несколько маркеров, позволяющих идентифицировать хламидии указанного вида в клиническом материале.

Локус гена *ompA* был первым, на основе которого проводилось типирование штаммов *C. psittaci*. Данный ген кодирует МOMP, цистеинсодержащий поверхностный антиген белковой природы с м.м. 40 кДа, что составляет примерно 60% веса внешней мембраны. В четырех переменных доменах этой молекулы локализованы антигенные детерминанты, специфические для рода и вида хламидий (Epitope mapping with..., 1988). В 1997 г. было показано, что серотипы МOMP эквивалентны генотипам *ompA* (Characterization of avian..., 1997). Это привело к быстрой замене серотипирования штаммов *C. psittaci* генотипированием уже к концу 1990-х гг. До недавнего времени было известно девять генотипов (ранее серотипов) *C. psittaci*, которым изначально приписывалась определенная связь с хозяином. Так, считали, что генотип А встречается только у попугаев, В – у голубей, С – у уток и гусей, D – у индеек, E – у голубей, уток и других птиц, E/B – у уток, F – у попугаев, WC – у КРС и M56 – исключительно у грызунов. На практике казалось более правильным ссылаться на предрасположенность того или иного хозяина к конкретному генотипу *C. psittaci*, поскольку типирование потребовало учитывать довольно много исключений. Впоследствии у попугаев и диких птиц было идентифицировано еще шесть генотипов *ompA*, а именно: 1V, 6N, Mat116, R54, YP84 и CPX0308 (Genotyping of *Chlamydophila psittaci*..., 2008). Таким образом, на сегодняшний день у *C. psittaci* известно 9 генотипов, причем штаммы каждого из них являются патогенными для птиц, млекопитающих и человека, т.е. обладают способностью к зоонозной трансмиссии. За последние десятилетия генотипирование на основе гена *ompA* прочно вошло в диагностическую

практику и активно применяется в эпидемиологических исследованиях, не утратив своей актуальности.

Вторым методом типирования, так же прочно вошедшим в молекулярно–эпидемиологическую практику мониторинга распространения и изучения эволюционных процессов хламидий, является мультилокусное сиквенс–типирование (MLST), основанное на анализе последовательностей семи генов «домашнего хозяйства» (Rawre J., Juval D., 2017). Впервые данный подход был использован для оценки популяционной структуры *Neisseria meningitidis*, и, впоследствии, адаптирован для типирования и дискриминации хламидий. Метод MLST подходит для определения принадлежности изолятов к различным генетическим линиям, позволяет выявлять взаимосвязь с географической территорией, на которой был выделен изолят или впервые зафиксирована вспышка заболевания, вызванная тем или иным видом хламидий. Эти данные, в отличие от монолокусного *ompA*–типирования, имеют первостепенное значение при молекулярно–эпидемиологических исследованиях, позволяют определить принадлежность штаммов хламидий к конкретным клональным линиям, циркулирующим в нашей стране и за рубежом, оценить их эпидемическую значимость с точки зрения глобальной эпидемиологии. Также данный метод активно применяется в исследованиях, связанных с молекулярной эволюцией хламидий, поскольку по единичным или множественным нуклеотидным заменам в таргетных генах возможно выявить происхождение как отдельных штаммов, так и целых клональных групп (Detection of *Chlamydiaceae* in..., 2019).

На сегодняшний день для хламидий разработано три схемы MLST, каждая из которых применяется для конкретных целей и задач. Метод мультилокусного типирования высокого разрешения был предложен в Швеции сотрудниками университета Уппсала, получившим одноименное название «Uppsala MLST» (High–resolution genotyping..., 2007). В данной схеме типирования используется пять высоковариабельных областей генома хламидий для описания изменчивости внутри таксонов без задействования

генов «домашнего хозяйства». Этот метод нашел применение в эпидемиологических исследованиях инфекций, вызываемых хламидиями вида *C. trachomatis*. Вторым методом, получившим название «MLST (*C. trachomatis*)», так же был разработан для типирования представителей вида *C. trachomatis*, и активно используется в настоящее время для внутривидовой дискриминации хламидий (Predicting phenotype and..., 2009). Третий метод MLST (Chlamydiales) является универсальным для всех видов хламидий и базируется на полиморфизме семи генов «домашнего хозяйства», предназначенных для анализа эволюционных изменений у штаммов разных видов хламидий, включая *C. psittaci* (Multi locus sequence typing..., 2010). Данный метод основан на анализе сегментов семи генов «домашнего хозяйства», таких как: *enoA*, *fumC*, *gatA*, *gidA*, *hemN*, *hlfX* и *oppA*. В соответствии с общепринятыми принципами MLST, каждый из этих локусов демонстрирует схожий уровень изменчивости нуклеотидной последовательности и не расположен рядом с генами, кодирующими антигены внешней мембраны, секретируемые или гипотетические белки, чтобы исключить диверсифицирующий отбор, так как указанные локусы находятся на хромосоме достаточно далеко друг от друга (Knittler M.R., Sachse K., 2015). Предполагалось, что использование этой схемы типирования позволит выявить взаимосвязь между определенными аллельными вариантами указанных генов *C. psittaci* и разными видами хозяев. Однако, как оказалось, штаммы *C. psittaci* генотипа А, изолированные от млекопитающих, группировались со штаммами, выделенными от попугаев (Full genome sequences..., 2012), что еще раз указало на отсутствие генетических различий между изолятами, обнаруженными у птиц или млекопитающих.

Недавно был предложен альтернативный метод типирования, основанный на анализе восьми открытых рамок считывания, кодируемых криптической плазмидой размером 7,5 килобаз (кб), обнаруженной у некоторых штаммов хламидий (Rockey D.D., 2011). Однако метод не получил широкого распространения. С появлением технологии полногеномного

секвенирования был предложен метод, названный cgMLST (от англ. *core genome MLST*), основанный на выявлении комбинации молекулярных маркеров и позволяющий проводить типирование с большей разрешающей способностью (Unveiling the Multilocus..., 2018). На сегодняшний день все известные сиквенс-типы хламидий (Sequence Type, ST), изолированные от животных и людей, доступны в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org/chlamydiales/>).

Методы типирования хламидий с использованием МКА, полиморфизма гена *ompA* и филогенетические исследования на основе анализа фрагментов последовательностей рибосомной 16S и 23S рРНК позволяют выявлять различия между изолятами хламидий независимо от того, от какого именно хозяина они были выделены, сопутствующего заболевания или географического происхождения штаммов (Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A., 1999). Однако в случае, если последовательности генов рибосомной РНК и *ompA* оказываются высококонсервативными внутри одного вида, применение этих инструментов недостаточно для дифференциации штаммов. Разработанная в 90-х гг. методика ПЦР на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (AFLP) с последующей детекцией продукта в агарозном геле позволила различать бактериальные штаммы хламидий даже в случае минимальных различий в целевых генах (Boumedine K.S., Rodolakis A., 1998). Разработанный примерно в то же время анализ мультилокусного переменного количества тандемных повторов (*Multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis, MLVA*) стал альтернативой AFLP, впоследствии более популярным методом типирования различных патогенных возбудителей ИБ. Указанным методом были успешно типированы многие патогены, в том числе *Bacillus anthracis* (A tandem repeats database..., 2001), *Mycobacterium tuberculosis* (High resolution, on-line..., 2002) и *Yersinia pestis* (Tandem repeats analysis for..., 2004). С увеличением доступности полных последовательностей бактериальных геномов были разработаны новые инструменты на основе биоинформатических подходов, позволяющие

обнаруживать тандемные повторы внутри генома хламидий отдельных видов. Laroucau K. *et al.* (High resolution typing..., 2008) предприняли попытку применить данный метод для типирования хламидийных изолятов *C. abortus*, а позднее и штаммов *C. psittaci* (Genotyping of *Chlamydophila*..., 2009). Однако, в отличие от MLST или cgMLST, у возбудителей хламидийной инфекции данный метод не получил должного развития.

1.5.2. Методы NGS в изучении возбудителей abortогенных инфекций

Возможность изучения первичной структуры линейной макромолекулы ДНК впервые появилась в 1977 г., когда Фредерик Сэнгер предложил использование дидезоксирибонуклеотидов (ддНТФ) для процесса секвенирования ДНК (Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977). Последующее усовершенствование этой методики привело к появлению первых автоматических секвенаторов, а чуть позже Роджер Штаден продемонстрировал эффективность компьютерных программ, используемых для сборки последовательностей (McGeoch D.J., Davison A.J., 1986). Первое поколение секвенаторов могло генерировать последовательности максимум из примерно 1000 пар нуклеотидов (п.н.). Уже в 1995 г. с использованием метода Сэнгера удалось выполнить секвенирование всего генома непатогенного штамма *Haemophilus influenzae* (Whole-genome random sequencing..., 1995).

Следующим витком развития секвенирования стало появление платформ NGS, получивших название секвенаторов следующего поколения, известных сегодня как секвенаторы второго поколения. Пиросеквенатор от Life Sciences, произведенный в Германии в 2005 г., обеспечивал высокую производительность, позволяя секвенировать короткие (до 400–500 п.н.) последовательности ДНК. Примерно в то же время другие производители, такие как Illumina (США) и Thermo Fisher Scientific (США) с платформой IonTorrent так же предложили свои секвенаторы, основанные на различных подходах и технологиях, таких как использование мостовой ПЦР (Application and challenge..., 2022). Такие секвенаторы и их последующая быстрая

эволюция резко увеличили количество полностью секвенированных бактериальных геномов (Identification of genomic..., 2011). Если в 2007 г. было проведено секвенирование тысячи геномов, то к 2021 г. количество проектов секвенирования бактериальных геномов, депонированных и доступных в общедоступных базах данных, достигло 376 000 (Application and challenge..., 2022).

В 2011 г. появились новые секвенаторы, предлагающие технологии секвенирования одиночных молекул, способные секвенировать более 10 кб. Данные секвенаторы, разработанные в Великобритании компанией Oxford Nanopore Technologies (ONT), стали именоваться секвенаторами третьего поколения. Считываемые длинные последовательности имеют большие преимущества, в том числе, возможность устранить проблемы, связанные с повторяющимися последовательностями внутри геномов (Long reads: their..., 2018).

За последние 25 лет секвенирование генома и биоинформатический анализ сыграли решающую роль в интерпретации информации, закодированной в бактериальных геномах. Технологии высокопроизводительного секвенирования проложили путь к пониманию все более широкого круга биологических вопросов. На сегодняшний день наиболее точными молекулярными инструментами изучения патогенных микроорганизмов являются методы, основанные на секвенировании полногеномной ДНК возбудителей ИБ (Безбородова Н.А., Ким Н.А., 2018).

Применение NGS–секвенирования второго и третьего поколения произвели революцию в научной сфере и открыли новые перспективы в детальном изучении полногеномных последовательностей возбудителей ИБ, включая патогены, ответственные за развитие инфекционных абортов. Важно, что данные платформы позволяют производить метагеномный анализ биоматериала, полученного от больного животного, открывая тем самым уникальную возможность выявления полного спектра патогенов, присутствующих в тестируемом образце. Применение данных платформ

продемонстрировало успешные результаты в диагностике ИБ как животных, так и человека (Mongan A. E., Tuda J. S. B., Runtuwene L. R., 2020). Так, на сегодняшний день полногеномное секвенирование и последующий сравнительный геномный анализ стали стандартом при анализе биологических свойств, факторов вирулентности, эволюции и филогенетических взаимоотношений хламидийных микроорганизмов, а также общей молекулярно–генетической характеристики возбудителей (Bachmann N.L., Polkinghorne A., Timms P., 2014; Twenty years of research..., 2015).

В 1998 г. была опубликована расшифрованная последовательность генома *C. trachomatis* серовара D, впервые продемонстрировав, что геном хламидий является более компактным по сравнению со многими другими возбудителями ИБ. Хромосома *C. trachomatis* состоит из 1,042,512 п.н. и содержит 894 гена, кодирующих белок, включая гены биосинтеза пептидогликана. Анализ генома *C. trachomatis* показал, что у хламидий этого вида кодируется почти минимальный набор генов, необходимых для репликации, транскрипции и трансляции ДНК (без дублирования). При этом в геноме были обнаружены системы репарации и рекомбинации ДНК, указывая на то, что хламидии обладают значительной способностью к рекомбинации.

Впервые рекомбинация была обнаружена у трех штаммов *C. trachomatis* при анализе нуклеотидной последовательности гена *ompA*, кодирующего МOMP. Позже несколько исследований показали, что рекомбинации действительно распространены у представителей *Chlamydia spp.* Дополнительные доказательства рекомбинации гена *ompA* наблюдаются в геноме штамма *C. trachomatis* Ds/2923, который серовар–специфические МКА идентифицировали как штамм серовара D. Однако анализ остальной части хромосомы продемонстрировал большую гомологию указанного микроорганизма с хромосомой штамма серовара E. При этом было показано, что именно рекомбинация привела к возникновению гибридной последовательности гена *ompA*, определенной как D/E. Последующие исследования позволили выявить появление рекомбинаций у *C. trachomatis* в

точках, расположенных рядом с генами, играющими известную роль в вирулентности, включая полиморфные мембранные белки (PMP) и *tarP*. Впоследствии оказалось, что рекомбинации возможны и в других частях генома хламидий. В исследовании, проведенном Jeffrey В.М. *et al.* (Genomic and phenotypic..., 2013), секвенировали геномы рекомбинантных штаммов *C. trachomatis*, полученных *in vitro*. Всего было обнаружено 190 независимых рекомбинационных событий в 12 штаммах *C. trachomatis*, что указывает на возможность рекомбинации, по крайней мере, в одной трети хромосомы или даже более. Однако не было обнаружено каких-либо специфических областей, которые могли бы являться «горячими точками» для этих рекомбинационных событий *in vitro*. Это позволило предположить, что «горячие точки» рекомбинации, идентифицированные в других исследованиях, могут возникать из-за селективного давления *in vivo* для изменения конкретных генов.

Несмотря на важность видов *Chlamydia spp.* как патогенов для человека и животных, пока мало известно об эволюции штаммов возбудителей хламидиоза. Были предприняты попытки реконструировать филогению хламидий по генам 16S рибосомной РНК, гену *ompA* и методом MLST. Подробный филогенетический анализ, основанный на полногеномном секвенировании клинических изолятов *C. trachomatis*, позволил значительно улучшить разрешение филогении хламидий, в первую очередь, по сравнению с монолокусным типированием на основе полиморфизма гена *ompA* (Whole-genome analysis of..., 2012). Основным фактором, детерминирующим полиморфизм гена *ompA* в филогенетике, считают его вариабельность под прессингом изменяющихся условий окружающей среды или меняющихся хозяев для эффективного противостояния иммунной системе макроорганизма чувствительного млекопитающего – животных, птиц или человека. Напротив, схемы MLST, основанные на генах «домашнего хозяйства», которые находятся под низким селективным давлением, более точно отражают филогению генома. В то же время в схемах MLST используется небольшое

количество генов, обеспечивая лишь ограниченное разрешение, а это не всегда позволяет определить гомологию между близкородственными штаммами патогена. Сравнение геномов показало высокий консерватизм 560 генов, по сути являющихся общими для всех представителей *Chlamydia*, что составляет примерно половину генов, закодированных в геноме. Таким образом, применение полногеномных последовательностей штаммов хламидий позволяет существенно увеличить количество генов, которые будут использоваться в филогенетическом анализе, и получить более полные сведения для прояснения эволюционных связей возбудителей хламидиоза животных. Очевидно, что, по мере секвенирования большего количества штаммов *Chlamydia spp.*, дальнейший подробный филогенетический анализ будет иметь все большую значимость для понимания эволюции этого микроорганизма.

Хотя более ранние проекты секвенирования генома были сосредоточены исключительно на штаммах хламидий, патогенных для человека, более поздние исследования включали секвенирование штаммов хламидий, изолированных и от животных (Comparative analysis of..., 2013). Штаммы *C. psittaci* оказались в центре внимания, в первую очередь, ввиду серьезной угрозы для здоровья человека, которую представляют зоонозные инфекции диких животных. Анализ 20 геномов показал у *C. psittaci* историю частой смены хозяев, обусловленную высокой скоростью генетической рекомбинации. С применением сравнительного анализа геномов *C. psittaci* удалось доказать, что, аналогично штаммам *C. trachomatis*, рекомбинация играет такую же важную роль и для хламидий данного вида. Некоторые модели микроэволюции 20 различных штаммов *C. psittaci* перекликаются с недавно обнаруженными у *C. trachomatis*. Действительно, оба организма подвергаются в основном внутривидовой гомологичной рекомбинации в различных участках генома. Однако эффект рекомбинации оказался выше у *C. psittaci* по сравнению с *C. trachomatis*. Кроме того, среди штаммов *C. psittaci* наблюдался широкий диапазон вариабельности ДНК, полученной как из

внешних источников, так и из других штаммов этого вида хламидий (Comparative analysis of..., 2013).

Использование NGS-технологии позволило серьезно расширить представления о биологии хламидий. Так, в результате секвенирования генома штамма LPCoLN, изолированного от коалы, были получены убедительные доказательства передачи *S. pneumoniae* человеку от диких животных, первых естественных хозяев данного вида хламидий. Доказательства зоонозной передачи включали наличие нескольких генов в геномах штаммов *S. pneumoniae*, изолированных от человека, которые были трункированы или накопили вредные мутации, но не были повреждены и функционировали у штамма LPCoLN. Полученные данные явились основанием для предположения о потере функций отдельных генов как вероятного результата адаптации хламидий к организму человека (Comparison of koala..., 2010).

Хотя на сегодняшний день нет никаких доказательств заражения людей представителями *S. pecorum*, данный вид имеет широкий круг хозяев и может инфицировать несколько видов животных, вызывая широкий спектр заболеваний. Первоначально предполагалось, что внутри вида *S. pecorum* существует значительное разнообразие штаммов, основанное на ограниченном секвенировании генов и серологических исследованиях. Однако последующий анализ геномов четырех штаммов *S. pecorum* показал довольно ограниченное разнообразие между штаммами, единственное различие между которыми заключалось в количестве псевдогенов (Preliminary phylogenetic identification..., 2008).

При этом сравнительная геномика относительно представителей семейства *Chlamydiaceae* в настоящее время находится еще на ранней стадии, хотя проведенные к настоящему времени исследования уже выявили ряд характерных особенностей. С одной стороны, консервативная синтения, т.е. сохранение последовательности и порядка генов, в геноме уменьшенного размера признана отличительной чертой рода *Chlamydia* (G.S.A. Myers,

Crabtree J., Creasy H.H., 2012). Это следует рассматривать в контексте эволюционных ограничений, обусловленных облигатным внутриклеточным образом жизни, которые предполагают зависимость от субстратов хозяина и метаболических возможностей (Genome sequences of *Chlamydia*..., 2000). Степень консервативности иллюстрируется пангеномом семейства *Chlamydiaceae*, который включает примерно две трети всех хламидийных генов. Действительно, 736 CDS, кодирующих белков, являются общими для видов *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. pneumoniae* и *C. trachomatis*, при этом общее количество CDS у этих видов колеблется от 874 до 1097 (Voigt A., Schöfl G., Saluz H.P., 2012; Bachmann N.L., Polkinghorne A., Timms P., 2014).

Помимо изучения эволюции и филогенетических взаимоотношений хламидий, применение технологии NGS для секвенирования полного генома играет важную практическую роль. Единственной эффективной профилактикой заболеваемости хламидиозом у СХЖ является вакцинация с использованием аттенуированных живых или инактивированных цельно–клеточных вакцин ветеринарного назначения. При производстве вакцин используются штаммы зоонозного происхождения, ранее выделенные во время вспышек инфекционных аборт. Чтобы вирулентные «полевые» изоляты могли быть использованы при производстве вакцин, их длительно пассируют на куриных эмбрионах, чтобы они утратили свою вирулентность (Опыт усовершенствования инактивированной..., 2012). Однако применение таких вакцин требует тщательного генетического контроля. Так, единственная коммерческая вакцина против ЭАО, лицензированная и доступная в Великобритании, основанная на применении мутантного (рекомбинантного) штамма *C. abortus* 1B (Enzovax®, Intervet / Schering–Plough Animal Health, Великобритания; CEVAC Chlamydia®, CEVA Animal Health Ltd, Великобритания), вызвала массовые аборт и заболевание у овец через два года после вакцинации (Abortion storm induced..., 2018; The 1B vaccine strain..., 2020). Использование технологии NGS для секвенирования генома штамма *C. abortus* 1B позволило выявить изменения на генном уровне и определить, что

он принадлежал к вирулентному неаттенуированному штамму, вызывающему заболевания (Evidence of *Chlamydophila abortus*..., 2010; Genomic evidence that..., 2018).

Также известно, что хламидии проявляют устойчивость ко многим группам противомикробных препаратов. По состоянию на 2021 г. у хламидий выявлено более 10 участков генома, мутации в которых приводят к развитию устойчивости как минимум к 7 классам противомикробных препаратов, таких как фторхинолоны, макролиды, антибиотики группы рифамицина, фосфомицина, тетрациклина и аминогликозиды (An overview of genes..., 2021). Так, доказана устойчивость штамма *C. psittaci* 6BC к аминогликозидным антибиотикам, вызванная мутациями в генах 16S рРНК и *rpoB*, а также резистентность к макролидам из-за мутаций в генах 23S рРНК. По мнению авторов, применение NGS-технологий является необходимым инструментом для скрининга и выявления вариаций внутри геномов хламидий с целью определения устойчивости к антибиотикам. На основе полногеномных последовательностей и с применением современных инструментов биоинформатического анализа стало возможно выявлять все сайты мутаций, связанные с развитием устойчивости к противомикробным препаратам. При этом такие исследования имеют преимущества над традиционными инструментами генетических исследований для выявления и идентификации генов и мутаций, связанных с устойчивостью хламидий к антибиотикам, в связи с возможностью отслеживания всех изменений внутри генома (An overview of genes..., 2021).

Таким образом, анализ полногеномных последовательностей позволяет проводить максимально углубленное изучение возбудителей инфекционных аборт, таких как хламидии, создавая возможность изучения всех ключевых генетических особенностей инфекционного агента.

1.5.3. Методы метагеномного анализа

На основе методик NGS-секвенирования бурное развитие получил раздел молекулярной генетики, получивший название метагеномика. Данный

раздел посвящен изучению всего генетического материала (метагенома), который возможно обнаружить в исследуемом образце. Главной целью метагеномного анализа является получение всех геномов для последующего установления видового состава и метаболических взаимосвязей исследуемого сообщества (Алексеева А. Е., Бруснигина Н. Ф., 2014).

Для метагеномного секвенирования анализируется общая ДНК всех организмов в образце, а секвенирование производится без использования каких-либо целевых праймеров. Таким образом, исследуется вся генетическая информация в образце, и это позволяет обнаруживать все царства микроорганизмов, включая бактерии, грибы, вирусы и паразиты. При этом объектами изучения могут являться любые популяции микроорганизмов, обитающих как в естественной среде, так и в макроорганизме животного или человека (Metagenomic Analysis of..., 2018). Важнейшей особенностью метагеномного подхода является возможность обойти необходимость изоляции или культивирования микроорганизмов, в частности, не способных расти на питательных средах. Анализ нуклеиновых кислот производится напрямую, что позволяет получить наиболее точную информацию (Simon C., Daniel R., 2011). Основой анализа является определение таксономической принадлежности различных микроорганизмов, находящихся в образце, и их последующее сравнение с уже известными, ранее отсеквенированными последовательностями целых геномов и таргетных генов, например, гена 16S рРНК. Для этих целей разработано два подхода, один из которых основан на секвенировании фрагментов ДНК, кодирующих эволюционно консервативные гены, и второй, при котором производится секвенирование случайных фрагментов генома (Алексеева А. Е., Бруснигина Н. Ф., 2014).

Важно отметить, что применение метагеномного анализа позволяет отслеживать появление новых патогенов или патогенов, о циркуляции которых в исследуемом регионе ранее не было известно (Metagenomics for pathogen..., 2013). Поскольку метагеномное секвенирование обеспечивает

всестороннее обнаружение патогенов, оно становится все более популярным в диагностике ИБ.

Применение метагенома на основе данных NGS-секвенирования позволяет идентифицировать в клинических образцах от животных при диагностике инфекционных абортов присутствие целого спектра микроорганизмов, включая неспецифичных инфекционных агентов, таких как ESKAPE. Основным преимуществом данного метода в отличие от ПЦР диагностики, является возможность обнаруживать спектр всех микроорганизмов, выделанных от больного животного, с последующей классификацией и выяснением их точной видовой принадлежности на основе геномной структуры и не требует разработки обширной панели праймеров.

Также немалозначимым является тот факт, что многие представители условно–патогенной флоры, являющиеся возбудителями оппортунистических инфекций, обладают мультиантибиотикорезистентными свойствами, что может представлять большую угрозу не только для здоровья животных и человека, находящегося в тесном контакте с ними. Так, рядом исследований продемонстрирована резистентность представителей рода *Enterobacter* к целому ряду антибиотиков различных классов (Contribution of target..., 2016; Davin–Regli A., Lavigne P., Pagès J.M., 2019; Antimicrobial resistance situation..., 2020; Antimicrobial resistance pattern..., 2020). Применение молекулярно–генетических методов, в частности, NGS-секвенирования, позволяет успешно выявлять наличие генов, ответственных за развитие лекарственной устойчивости у патогенов, ассоциированных с ИБ (Phenotypic and genetic characteristics..., 2010; Influence of a 23S..., 2012), существенно упрощая процесс выявления новых резистентных штаммов.

Совсем недавно метагеномные подходы были использованы для успешного выявления причин абортов у КРС, связанных, по мнению авторов, с представителями условно–патогенной флоры (Amplicon sequencing of bacterial..., 2017). Именно с использованием метагеномного подхода были

обнаружены возбудители оппортунистических инфекций и штаммы *C. psittaci* во время аборт у лошадей (Metagenomic investigation of potential..., 2021).

Таким образом, вышеизложенное диктует необходимость расширенных исследований в области обнаружения новых микроорганизмов, связанных с возникновением инфекционных абортов и заболеваний репродуктивной системы животных. Применение NGS-технологий дает возможность с высокой точностью обнаруживать микроорганизмы, ранее не ассоциированные с инфекционными абортами животных. Также использование биоинформатических подходов, таких как сборка геномов *de novo*, позволяет детально охарактеризовать геномы патогенных микроорганизмов, включая детекцию генов устойчивости к лекарственным препаратам, что в свою очередь предоставляет возможность производить тщательный генетический контроль и надзор за распространением антибиотикорезистентных штаммов.

Таким образом, на сегодняшний день выделяют большую группу микроорганизмов, ответственных за развитие инфекционных абортов животных. Фенотипические свойства и особенности биологии большинства из них уже хорошо изучены и описаны в литературе, однако изучение геномной структуры стало доступно относительно недавно. С момента изобретения Фредериком Сенгером метода секвенирования нуклеиновых кислот прошло 45 лет. За это время, благодаря таргетному секвенированию, представление о геномной структуре многих инфекционных агентов существенно расширилось, были выполнены сложнейшие эксперименты по сборке геномов на основе этой технологии. Однако в большинстве своем из-за высокой дороговизны и сложности выполнения, такие эксперименты были строго лимитированными. Активное изучение бактериальных патогенов на основе полных геномов началось сравнительно недавно. С появлением NGS секвенирования второго поколения в 2005 г. стало возможным получение большого объема данных, а появившееся в 2014 г. секвенирование третьего поколения Oxford Nanopore позволило значительно расширить эти

возможности. Применение обеих технологий, как в диагностике, так и для детальной характеристики бактериальных или вирусных патогенов позволили не только удешевить такие исследования, но и значительно уменьшить трудозатраты и сложность их выполнения. На сегодняшний день детальная генетическая характеристика патогенных и условно–патогенных бактерий стала намного доступнее, что существенно расширяет возможности изучения как эволюционных связей между микроорганизмами, так и позволяя детально характеризовать их на генетическом уровне, выявляя антибиотикорезистентные свойства, факторы вирулентности и т. д.

Важно подчеркнуть, что, несмотря на широкое распространение NGS секвенирования во многих лабораториях за последние годы, количество депонированных полных геномов возбудителей abortогенных инфекций является относительно небольшим. По состоянию на 2015 г., когда доминирующей технологией являлось секвенирование второго поколения, полногеномные последовательности (WGS) 48 штаммов *C. psittaci* были депонированы в базе данных генома NCBI в различных состояниях сборки, а дополнительные 44 записи – доступны из архива чтения в виде «сырых» данных. Из них нуклеотидные последовательности были собраны для 17 различных штаммов *C. psittaci*. При этом было проведено не так много расширенных исследований WGS для представителей *C. psittaci*. Два сравнительных исследования геномов представителей семейства *Chlamydiaceae* включали типовой штамм 6BC (Voigt A., Schöfl G., Saluz H.P., 2012), и только в одном исследовании фактически сравнивали WGS отдельных штаммов *C. psittaci* (Knittler M.R., Sachse K., 2015). По состоянию на 2022 г. количество депонированных полногеномных последовательностей *C. psittaci* увеличилось до 25, что в три раза меньше, чем у *C. trachomatis* (n=88). Это диктует необходимость секвенирования новых изолятов для выявления уникальных особенностей представителей *C. psittaci*.

2. Собственные исследования

2.1. Объекты, материалы и методы исследований

2.1.1. Микроорганизмы

В работе использовали лиофилизированные взвеси штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84) из коллекции микроорганизмов Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности ФГБНУ (ФЦТРБ–ВНИВИ) (любезно предоставлены д.б.н. Евстифеевым В.В.). Указанные штаммы были выделены из патологического материала СХЖ (МРС) во время вспышек хламидиоза в хозяйствах: д. Ростиново Переславского района Ярославской области от овцы в 1970 г. (штамм *C. psittaci* Rostinovo–70), п. Бирюли Высокогорского района Республики Татарстан от козы в 2016 г. (штамм *C. psittaci* АМК–16) и п. Бирюли Высокогорского района Республики Татарстан на территории Зверосовхоза «Бирюли» от лисы в 1984 г. (штамм *C. psittaci* ВЛ–84).

Также в работе использовали штамм, идентифицированный нами как *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019, который был выделен из биоматериала (цервикально–вагинальная слизь) от КРС с клиническими признаками воспаления уrogenитального тракта и анамнестическими абортами (любезно предоставлен д.б.н. доцентом Ларионовой О.С., зав. кафедрой «Микробиология и биотехнология» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»). Полный перечень полногеномных последовательностей ДНК из базы данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Штаммы из базы данных NCBI GenBank, использованные в текущей диссертационной работе

№	Обозначение штамма	Источник	Источник выделения штамма	Страна	Год выделения	Номер доступа в NCBI или другой базе данных	Источник
1	<i>C. psittaci</i> Rostinovo-70	Коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань	Овца	Российская Федерация	1970	CP041038.1	Настоящее исследование
2	<i>C. psittaci</i> Rostinovo-70, плаزمида	NCBI GenBank		Российская Федерация	1970	CP041039.1	Настоящее исследование
3	<i>C. psittaci</i> АМК-16	Коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань	Коза	Российская Федерация	2016	CP047319.1	Настоящее исследование
4	<i>C. psittaci</i> АМК-16, плазмида	NCBI GenBank		Российская Федерация	2016	CP047320.1	Настоящее исследование
5	<i>C. psittaci</i> BL-84	Коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань	Лиса	Российская Федерация	1984	CP094377.1	Настоящее исследование

6	<i>C. psittaci</i> GR9	NCBI GenBank	Кряква	Германия	1960	CP003791.1	Full genome sequences.., 2012
7	<i>C. psittaci</i> Ful127	NCBI GenBank	Глупыш	Фарерские острова	2016	CP033059.1	<i>Chlamydia psittaci</i> in..., 2020
8	<i>C. psittaci</i> GIMC 2003:Cps25SM	NCBI GenBank	Человек	США	1964	CP024453.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP024453.1
9	<i>C. psittaci</i> GIMC 2004:CpsAP23	NCBI GenBank	Человек	Российская Федерация	1971	CP024455.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP024455.1
10	<i>C. psittaci</i> GIMC 2005:CpsCP1	NCBI GenBank	Человек	Российская Федерация	1971	CP024451.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP024451.1
11	<i>C. psittaci</i> Mat116	NCBI GenBank	Н/Д* (вспышка пситтакоза)	Япония	2001	CP002744.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP002744.1

12	<i>C. psittaci</i> RD1	NCBI GenBank	Н/Д	Н/Д	Н/Д	FQ482149.1	Genome sequence of..., 2011
13	<i>C. psittaci</i> VS225	NCBI GenBank	Длиннохвостый попугай	США	1991	CP003793.1	Full genome sequences.., 2012
14	<i>C. psittaci</i> WC	NCBI GenBank	КРС	Н/Д	Н/Д	CP003796.1	Full genome sequences.., 2012
15	<i>C. psittaci</i> WS/RT/E30	NCBI GenBank	Кряква	Германия	2001	CP003794.1	Full genome sequences.., 2012
16	<i>C. psittaci</i> 6BC	NCBI GenBank	Попугай	США	1930	CP002586.1	Genome sequences of 6BC and Cal10..., 2011
17	<i>C. psittaci</i> 6BC	NCBI GenBank	Американская коллекция типовых культур (ATCC:VR-125)	США	1929–1930	CP002549.1	Genome sequences of 6BC and Cal10..., 2011

18	<i>C. psittaci</i> C19/98	NCBI GenBank	Овца	Германия	1998	CP002804.1	Complete genome sequences.. ., 2011
19	<i>C. psittaci</i> 01DC11	NCBI GenBank	Свинья	Германия	2001	CP002805.1	Complete genome sequences.. ., 2011
20	<i>C. psittaci</i> 02DC15	NCBI GenBank	Теленок	Германия	2002	CP002806.1	Complete genome sequences.. ., 2011
21	<i>C. psittaci</i> 08DC60	NCBI GenBank	Человек	Германия	2008	CP002807.1	Complete genome sequences.. ., 2011
22	<i>C. psittaci</i> MN	NCBI GenBank	Человек	США	1934	CP003792.1	Full genome sequences.. ., 2012
23	<i>C. psittaci</i> M56	NCBI GenBank	Ондатра	США	1961	CP003795.1	Full genome sequences.. ., 2012
24	<i>C. psittaci</i> NJ1	NCBI GenBank	Индейка	США	1954	CP003798.1	Genome Sequence of <i>Chlamydia</i> . ., 2013

25	<i>C. psittaci</i> 01DC12	NCBI GenBank	Свинья	Германия	2012	HF545614.1	Full genome sequences.. ., 2012
26	<i>C. psittaci</i> Horse pl	NCBI GenBank	Лошадь	Австралия	2014	CP025423.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP025423.1
27	<i>C. psittaci</i> 8882_placenta	NCBI GenBank	Лошадь	Австралия	2016	CP092197.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP092197.1
28	<i>C. psittaci</i> 9945_foetus	NCBI GenBank	Лошадь	Австралия	2016	CP092199.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP092199.1
29	<i>C. psittaci</i> CP3	NCBI GenBank	Голубь	США	1957	CP003797.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP003797.1
30	<i>C. psittaci</i> 84–55	NCBI GenBank	Попугай	Германия	Н/Д	Н/Д	Vanrompay D., Ducatelle R.,

							Haesebrouck F., 1994
31	<i>E. hormaechei</i> <i>subsp.</i> <i>xiangfangensis</i> Saratov/2019	Цервикально– вагинальная слизь	КРС	Россия	2019	PRJNA73281 7	Настоящее исследова ние
32	<i>E. hormaechei</i> <i>subsp.</i> <i>xiangfangensis</i> NJGLYY90– CR	NCBI GenBank	Человек	Китай	Н/Д	CP061745.1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP061745.1

Примечание – "*" – Н/Д – нет данных, информация в базе данных отсутствует.

2.1.2. Образцы патологического материала сельскохозяйственных животных

Образцы (цервикально–вагинальная слизь) патологического материала КРС с клиническими признаками воспаления урогенитального тракта и анамнестическими абортами использовали для экстракции ДНК и последующего метагеномного исследования, выделения условно–патогенных микроорганизмов - потенциальных возбудителей инфекционных заболеваний органов репродуктивной системы СХЖ. Забор паталогического материала осуществляли согласно «Правилам организации проведения лабораторных исследований (испытаний) при осуществлении ветеринарного контроля (надзора)» от 10 ноября 2017 года N80. Отбор вагинальной слизи осуществляли с помощью зонда (пипетка для искусственного осеменения) с последующим переносом в стерильную пробирку. Хранение осуществилось при температуре минус 70 °С.

2.1.3. Метод определения чувствительности к противомикробным препаратам

Определение чувствительности к антимикробным препаратам штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019 выполняли методом ДДТ определения чувствительности бактерий к антибиотикам согласно МУК 4.2.1890–04.

2.1.4. Молекулярно–генетические методы

2.1.4.1. Выделение ДНК

Выделение ДНК из инаktivированных взвесей штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84, *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019, а также образцов биоматериала КРС с анамнестическими инфекционными абортами, производили с использованием коммерческого набора для выделения ДНК DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия), согласно протоколу фирмы–производителя.

2.1.4.2. Методы секвенирования второго и третьего поколения

Секвенирование коротких прочтений методом NGS–2 выполняли на платформе Illumina с использованием NGS–секвенатора второго поколения Illumina HiSeq 2500 system (Illumina Inc., США), на базе компании ООО «Геноаналитика» (Москва, Россия). Концентрацию экстрагированной ДНК для последующих этапов подготовки библиотек измеряли с использованием спектрофотометрического метода. Подготовку библиотек ДНК штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84) и *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019 для секвенирования методом NGS–3 производили с использованием набора Kit SQK–LSK109 (Oxford Nanopore, Великобритания) согласно рекомендациям и протоколам, доступным на сайте производителя (<https://nanoporetech.com/community>). Секвенирование длинных прочтений на платформе Oxford Nanopore выполняли с использованием нанопорового NGS–секвенатора третьего поколения MinION (Oxford Nanopore, Великобритания).

2.1.4.3. Индикация патогенных микроорганизмов методом метагеномного анализа

Метагеномный анализ массива данных и таксономическую классификацию прочтений (ридов), полученных в ходе секвенирования с обеих платформ, выполняли с использованием сервера MG–RUST (<https://www.mg-rast.org/>).

2.1.5. Методы молекулярного типирования

2.1.5.1. Монолокусное типирование (*ompA* типирование)

Монолокусное генотипирование и филогенетический анализ штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84 выполняли согласно рекомендациям Geens T. *et al.* (Sequencing of the *Chlamydophila...*, 2005). Для этого использовали последовательности гена *ompA*, кодирующего МOMP указанных штаммов (локусы FI836_02955, GR632_02940 и MRE55_02975, соответственно), а также

референтные последовательности того же гена штаммов *C. psittaci* генотипов А-Е, ранее депонированных в NCBI GenBank (см. Таблица 1).

2.1.5.2. Мультилокусное сиквенс–типирование (MLST)

MLST штаммов *C. psittaci* производили на основе выравнивания сцепленных нуклеотидных последовательностей семи генов «домашнего хозяйства» (*gatA*, *oppA*, *hfiX*, *gitA*, *enoA*, *hemN* и *fumC*) по схеме MLST (Chlamydiales), предложенной Pannekoek Y. *et al.* (Multi locus sequence typing..., 2008), Herrmann B. *et al.* (Global Multilocus Sequence Type..., 2015) и Miyoshi–Akiyama T. *et al.* (Multilocus sequence typing (MLST)..., 2013).

MLST контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019 производили на основе семи генов «домашнего хозяйства» (*dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*) с использованием алгоритмов детекции генов, размещенных на серверах PubMLST (<https://pubmlst.org>).

2.1.6. Филогенетический анализ

Построение филогенетических деревьев для штаммов *C. psittaci* и контигов *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019 выполняли с использованием программного обеспечения MEGA–7 методом максимального правдоподобия и REALPHY 1.13 (<https://realphy.unibas.ch/realphy/>) с последующей визуализацией и использованием онлайн утилиты Phylogenetic tree (newick) viewer (<http://et toolkit.org/treeview/>), а также на базе онлайн серверов Type (Strain) Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de/>).

2.1.7. Биоинформатические методы

Оценку и контроль качества ридов исследуемых штаммов на платформе Illumina выполняли с использованием программного обеспечения FastQC (Wingett S., 2018).

Для процесса фильтрации, обрезки и удаления последовательностей адаптеров в массиве «сырых» данных на платформе NGS–2 использовали

автоматизированный скрипт AfterQC (<https://github.com/OpenGene/AfterQC>) согласно рекомендациям (AfterQC: automatic filtering..., 2018). Для фильтрации длинных чтений по качеству, полученных на платформе Oxford Nanopore, использовали скрипт Filtrlong (<https://github.com/rrwick/Filtrlong>) с параметрами фильтра `—min_length 1000 —keep_percent 90`.

Триммирование и поиск последовательностей адаптеров в длинных прочтениях, полученных методом NGS–3, выполняли с использованием скрипта Porechop согласно рекомендованным параметрам (<https://github.com/rrwick/Porechop>). Выравнивание коротких прочтений с платформы NGS–2 и фильтрацию от контаминирующих последовательностей ДНК хозяина на основе референсных геномов производили с использованием программного обеспечения Bowtie2 v. 2.3.5.1 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>).\$

Определение таксономической принадлежности коротких прочтений на платформе NGS–2 производили с использованием программного обеспечения Kraken (<https://ccb.jhu.edu/software/kraken/>). Гибридную сборку геномов штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16, BL–84 и *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019 осуществляли методом *de novo* с использованием ассемблера Unicycler согласно рекомендациям (<https://github.com/rrwick/Unicycler>).

Выявление генов антибиотикорезистентности в составе последовательностей ДНК штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16, BL–84 и *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov/2019 производили с применением предиктивного анализа контигов в Resistance Gene Identifier на базе сервера The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/home>).

Выравнивание и детальное сравнение полногеномных последовательностей хромосом и плазмид исследуемых штаммов относительно референтных вариантов проводили на серверах PubMLST (<https://pubmlst.org/>) и BV-BRC (<https://www.bv-brc.org>), с использованием программного обеспечения Genome Comparator, Proteome Comparison и Mauve (<https://darlinglab.org/mauve/mauve.html>).

2.1.8. Оборудование и реактивы

2.1.8.1 Оборудование

Для выполнения работ использовали следующий перечень оборудования:

1. Нанопоровый NGS-секвенатор Oxford Nanopore MinION (Oxford Nanopore, Великобритания).
2. Проточная ячейка для секвенатора R9.4.1FLO-MIN106 (Oxford Nanopore, Великобритания).
3. Аналитические весы Explorer Pro EP114C (Ohaus, США).
4. Дозаторы пипеточные с переменным объемом (Eppendorf, Германия).
5. Амплификатор BioRad MyCycler (BioRad, США).
6. Микроцентрифуга-вортекс MicroSpin FV-2400 (BioSan, Латвия).
7. Твердотельный термостат TDB-120/A53 (BioSan, Латвия).
8. Спектрофотометр SmartSpec Plus, (BioRad, США).
9. Магнитный сепаратор для 1,5 мл пробирок (Eppendorf, Германия).
10. Компьютер на базе процессора Intel Core i7 под управлением операционной системы Linux Ubuntu 18.0 LTS.

2.1.8.2. Реактивы и растворы

В работе использовали следующие реактивы:

1. Коммерческий набор для выделения ДНК – DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия).

2. Коммерческий набор для подготовки библиотек к секвенированию на платформе Oxford Nanopore Ligation – Sequencing Kit SQK–LSK109 (Oxford Nanopore, Великобритания).
3. Набор для восстановления концов ДНК и последующего лигирования адаптеров NEBNext (Oxford Nanopore, Великобритания).
4. Набор для очистки образцов ДНК на магнитных шариках – AMPure XP (Oxford Nanopore, Великобритания).
5. Для элюирования ДНК – Nuclease–free water (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2. Результаты исследования и их обсуждение

2.2.1. Молекулярно–генетическая характеристика возбудителей инфекционных абортот на модели штаммов

***C. psittaci* Rostinovo–70, BL–84 и AMK–16**

2.2.1.1. Характеристика прочтений ДНК геномов, полученных при секвенировании штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, BL–84 и AMK–16 с использованием платформ NGS–2 и NGS–3

В нашем исследовании, для изучения возбудителей инфекционных абортот СХЖ были выбраны 3 модельных коллекционных штамма вида *C. psittaci* (Rostinovo–70, BL–84 и AMK–16), выделенные ранее на территории РФ во время вспышек инфекционных абортот от разных животных сельскохозяйственного назначения (коза, лиса и овца, соответственно). Период изоляции штаммов охватывает 46 лет, с 1970 по 2016 гг., что, в контексте ретроспективного исследования, было направлено на выявление возможных микроэволюционных изменений в нуклеотидных последовательностях геномов данных штаммов и позволило бы отследить их филогенетические взаимосвязи с другими представителями этого вида.

Для детальной молекулярной–генетической характеристики изучаемых штаммов нами было произведено секвенирование индивидуальной изолированной ДНК указанных микроорганизмов с использованием платформ NGS–2 и NGS–3.

В результате секвенирования ДНК данных штаммов на платформе NGS–2 были получены одноконцевые прочтения с покрытием 100x. Основные показатели ридов по результатам секвенирования представлены в таблице 2.

Согласно полученным данным (Таблица 2), количество полученных прочтений на указанной платформе соответствовало заявленному покрытию

100x для штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВL–84 при подготовке библиотек к секвенированию, при размере геномов представителей *C. psittaci* в пределах 1,172 Мб (Voigt A., Schöfl G., Saluz H.P., 2012).

Таблица 2 – Краткая характеристика и основные показатели прочтений, полученные для штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВL–84 на платформе NGS–2

Основные статистические показатели прочтений	Штамм <i>C. psittaci</i>		
	Rostinovo–70	АМК–16	ВL–84
Общее количество ридов	7,493,423	6,884,924	2,701,608
Длина ридов (п.н.)	250	250	101
GC %	42	42	41

Следующим этапом исследования являлось секвенирование штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, АМК–16 и ВL–84) с применением платформы NGS–3. В результате 48–и часового цикла секвенирования геномов указанных штаммов было получено 1,2 Гб для штамма Rostinovo–70, 2,4 Гб для штамма АМК–16 и 5,7 Гб для штамма ВL–84, соответственно. Количество ошибочных прочтений при секвенировании составило не более 100 тысяч ридов, что является низким показателем относительно общего числа прочтений. Общая длина коротких и длинных последовательностей, полученных при секвенировании многократно превышала размер хромосом хламидийных штаммов, представленных в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), что свидетельствовало о высоком покрытии (>100x) и позволило перейти к следующему этапу исследования.

2.2.1.2. Биоинформатическая обработка первичных «сырых» прочтений ДНК геномов штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84, полученных с использованием платформ NGS–2 и NGS–3

Следующим этапом настоящей работы являлась биоинформатическая обработка данных, полученных в результате секвенирования штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84) на платформах NGS–2 и NGS–3, с целью подготовки «сырых» ридов к последующей полногеномной сборке методом *de novo*. Обработка массива данных включала в себя оценку качества ридов, удаление последовательностей с низким качеством чтения, триммирование адаптеров и очистку ридов от контаминирующей ДНК куриных эмбрионов, которые были использованы для культивирования штаммов хламидий.

Как известно, оценка качества данных секвенирования, идентификация и устранение низкокачественных данных последовательности имеет решающее значение для результатов последующей сборки методом *de novo* (SQUAT: a Sequencing..., 2019). Другим необходимым этапом предварительной обработки данных является обрезка адаптеров. Это связано с тем, что часть адаптеров во время секвенирования может содержаться в выходных прочтениях, лигируясь с 3' конца на этапе подготовки библиотек (AfterQC: automatic filtering..., 2018; Wingett S., Andrews S., 2018).

Первым этапом биоинформатической обработки данных являлась оценка качества полученных прочтений на платформе NGS–2. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Для оценки качества прочтений секвенатора, как правило, используется показатель Phred Quality Scores (Q), (Base–calling of automated..., 1998). Как показано на графиках выше (Рисунок 1), анализ ридов с использованием программного обеспечения FastQC выявил падение качества $Q < 20$ в пределах длин 245–250 п.н. для штамма AMK–16 (Рисунок 1Б) и, в большей степени, для

штамма Rostinovo–70 (220–250 п.н.) (Рисунок 1А). При этом качество прочтений для штамма BL–84 (Рисунок 1С) составляло $Q>30$ и не требовало фильтрации ридов по качеству. По мере выполнения цикла секвенирования, качество прочтений может снижаться, что является характерным для NGS платформ, в связи с чем следующим этапом работы была фильтрация ридов для штамма Rostinovo–70.

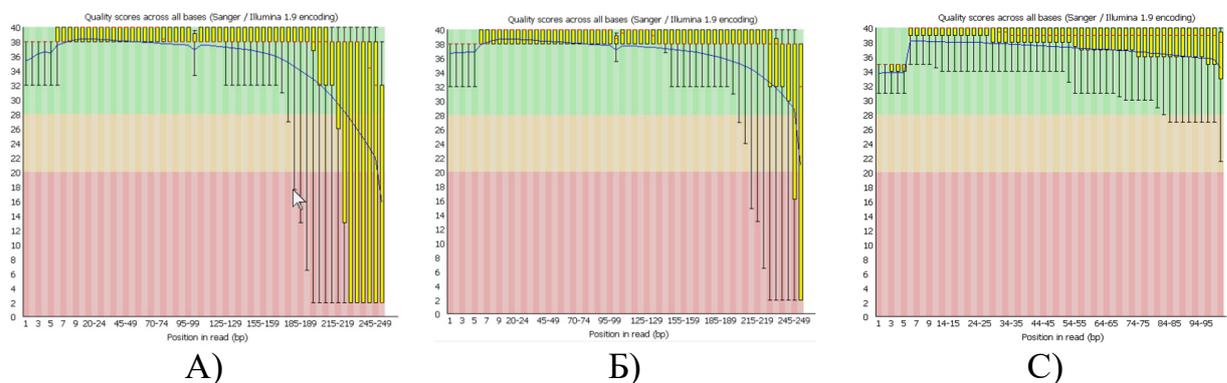


Рисунок 1 – Оценка качества «сырых» прочтений, полученных на платформе NGS–2 для штаммов *C. psittaci*: А) Rostinovo–70; Б) AMK–16; С) BL–84

После оценки качества данных прочтений с платформы NGS–2, нами были выполнены процедуры по удалению прочтений с низким качеством ($Q<20$) для штамма *C. psittaci* Rostinovo–70 путем поиска наилучшего перекрытия последовательностей на основе автоматического обнаружения с использованием скрипта AfterQC. Результат повторной оценки качества после удаления последовательностей с низким качеством для штамма *C. psittaci* Rostinovo–70 представлен на рисунке 2.

Как показано на рисунке 2, обработка с использованием алгоритма фильтрации последовательностей с платформы NGS–2 позволила успешно удалить прочтения в массиве «сырых» данных с качеством $Q<20$ для ДНК штамма *C. psittaci* Rostinovo–70.

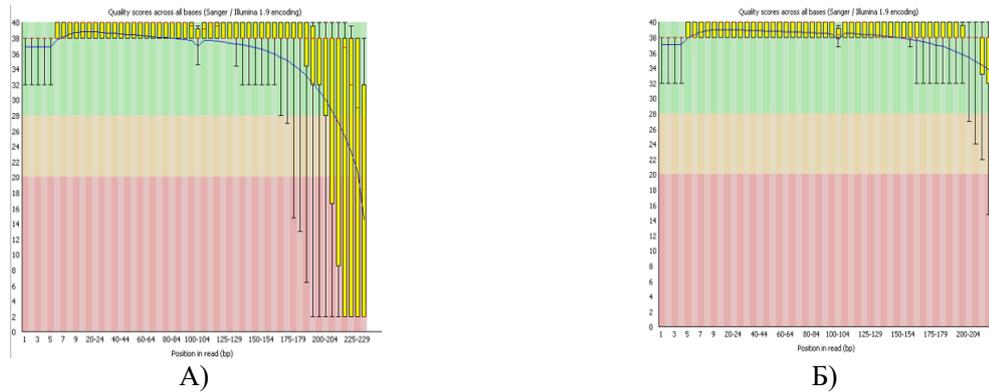


Рисунок 2 – Сравнительная оценка качества «сырых» прочтений штамма *C. psittaci* Rostinovo–70 на платформе NGS–2: А) до обработки скриптом; Б) после обработки автоматизированным скриптом AfterQC

В целом, количество прочтений высокого качества ($Q > 30$) составило более 92%. Фильтрация ридов для штаммов *C. psittaci* AMK–16 и BL–84 не производилась ввиду небольшого количества прочтений с оценкой $Q > 20$. Также на этапе фильтрации было произведено удаление последовательностей адаптеров для всех трех штаммов, что, в свою очередь, позволило перейти к следующему этапу биоинформатической обработки массива данных.

Поскольку чистые культуры штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84) были получены путем выращивания на куриных эмбрионах как рекомендовано при выращивании возбудителей хламидиоза *in vitro* (*Chlamydia psittaci*: new..., 2014), следующим этапом биоинформатической обработки «сырых» прочтений с платформы NGS–2 явилось картирование ридов на референтные последовательности геномов штаммов *C. psittaci*, ранее депонированных в базу данных NCBI GenBank, с целью удаления контаминирующий ДНК куриного эмбриона. Для выявления прочтений, ассоциированных с ДНК куриного эмбриона, «сырые» последовательности каждого из штаммов были проанализированы с применением программного обеспечения Kraken (Wood D.E., Salzberg S.L., 2014), служащего для присвоения

таксономических меток коротким последовательностям ДНК в составе «сырых» прочтений. Для проведения сборки *de novo* были отобраны прочтения, относящиеся к таксону *Chlamydiae* (Номер доступа Taxonomy ID: 204428) и его дочерним таксонам, доступным в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

Результат анализа исходных ридов для трех указанных штаммов *C. psittaci* с использованием программного обеспечения (ПО) Kraken представлен на рисунке 3.

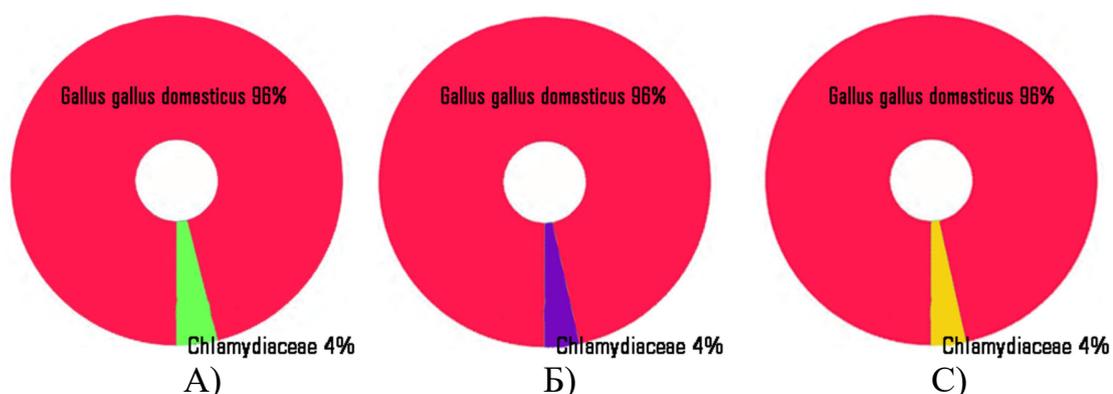


Рисунок 3 – Классификация ридов, полученных на платформе NGS-2, с использованием программного обеспечения Kraken для штаммов *C. psittaci*: А) АМК-16; Б) Rostinovo-70; В) BL-84

Как показано на рисунке 3, для каждого из указанных штаммов удалось идентифицировать 96% прочтений как ДНК *Gallus gallus domesticus*. При этом 4% прочтений от общего массива данных имели таксономическую принадлежность к семейству *Chlamydiaceae*.

Ввиду относительно небольшого количества специфической ДНК в общем массиве данных, нами была проведена фильтрация данных от контаминирующей ДНК куриного эмбриона с использованием программного обеспечения Bowtie 2 (Langmead B., Salzberg S.L., 2012). С этой целью для дальнейшего картирования ридов нами были выбраны последовательности полных геномов и плазмид

штаммов *C. psittaci*, ранее изолированных от больных хламидиозом животных и птиц, последовательности которых были доступны в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). В результате фильтрации для штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84) были удалены контаминирующие последовательности куриного эмбриона. В дальнейшем обработанные последовательности указанных штаммов использовались для гибридной сборки методом *de novo*.

На следующем этапе работы нами была произведена биоинформатическая обработка данных NGS–3 с целью удаления адаптеров и последовательностей с низким качеством.

Как известно, при секвенировании длинных последовательностей на платформе NGS–3, лигирование адаптеров производится на концах считывания. Однако в некоторых случаях адаптер может быть интегрирован внутри длинных прочтений, что может привести к разделению рида, так как он идентифицируется как химерная последовательность (<https://github.com/rrwick/Filtlong>).

В результате обработки длинных последовательностей штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84) скрипом Filtlong, из исходного массива данных были удалены более 100,000 идентифицированных последовательностей адаптеров, используемых при подготовке библиотек NGS–3.

Финальным этапом биоинформатической обработки массива данных с платформы NGS–3 являлось удаление коротких прочтений, не прошедших оценку качества согласно установленному параметру скрипта «--keep_percent 90», а также фильтрация прочтений для удаления контаминирующей ДНК куриного эмбриона с использованием программного обеспечения Kraken. В результате фильтрации было удалено 10% прочтений, а также, согласно рекомендациям (<https://github.com/rrwick/Filtlong>), удалены все прочтения длиной менее 2000 п.н. Полученные очищенные прочтения с платформ NGS–2

и NGS-3 были использованы на следующем этапе геномной сборки штаммов хламидий возбудителей инфекционных абортот животных методом *de novo*.

2.2.1.3. Сборка геномов штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84 методом *de novo*

На сегодняшний день секвенирование коротких последовательностей бактериальных геномов с использованием платформ NGS-2 является рутинной технологией секвенирования для получения данных о первичной структуре ДНК (Whole-genome sequencing for..., 2013). Однако в большинстве случаев для секвенирования используются короткие фрагменты ДНК (менее 500 п.н.), которые не превышают по размеру многие повторяющиеся элементы в бактериальных геномах (ISfinder: the reference..., 2006). Ограничения, связанные с длиной прочтения фрагментов молекул ДНК на платформе NGS-2, существенно затрудняют сборку полногеномной последовательности, особенно, если в геноме присутствуют повторяющиеся области (Repetitive elements may..., 2011; Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R., 2016). Более того, использование коротких прочтений NGS-2 для сборки методом *de novo* не позволяет собрать непрерывную последовательность генома исследуемого микроорганизма из-за фрагментации генома на десятки смежных последовательностей (контигов), вследствие которого могут быть «пробелы» (гэпы) в цепи ДНК. Длинные прочтения с платформ NGS-3 имеют гораздо более высокий процент ошибок при прочтении, чем NGS-2 (5–15% против <1%), однако их достаточно для завершения сборки бактериального генома с приемлемой точностью (Nonhybrid, finished microbial..., 2013; Canu: scalable and..., 2017; Unicycler: Resolving bacterial..., 2017).

С целью получения полногеномных последовательностей штаммов *C. psittaci* (Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84), нами была произведена гибридная сборка

методом *de novo*, основанная на данных с платформ NGS–2 и NGS–3. Отфильтрованные ранее прочтения с обеих платформ были собраны с использованием ассемблера Unicycler v0.4.9 с настройками по умолчанию («консервативный режим сборки»). Результаты сборки представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика гибридной сборки штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84

Основные характеристики	Штамм <i>C. psittaci</i>		
	Rostinovo–70	АМК–16	ВЛ–84
Количество контигов	2	2	1
контиг (≥ 5000 , п.н.)	2	2	1
Контиг (≥ 10000 , п.н.)	1	1	1
Контиг (≥ 25000 , п.н.)	1	1	1
Контиг (≥ 50000 , п.н.)	1	1	1
N50	1,152,559	1,152,497	1,152,244
GC %	39,08	39,12	39,12

Как показано в таблице 3, в результате гибридной сборки ассемблер сгенерировал по 2 контига, замкнутых в кольцо, для штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70 и АМК–16, и один контиг для штамма ВЛ–84. Контиги наибольшего размера ($>1,150,000$ п.н.) были ассоциированы с последовательностью хромосомы каждого из штаммов хламидий. Размер полученных контигов согласовался с размером полного генома представителей *C. psittaci*, представленных в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Контиги меньшего размера ($>7,000$ п.н.) были идентифицированы как криптические плазмиды в виде экстрахромосомных репликонов, сгенерированные в сборках для штаммов Rostinovo–70 и АМК–16. Полученные последовательности были депонированы в базу данных NCBI

GenBank (Номер доступа GenBank: CP047320.1, CP047319.1 – АМК–16; CP041038.1, CP041039.1 – Rostinovo–70; CP094377.1 – BL–84). Характеристика расшифрованных последовательностей ДНК представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Размер контигов, сгенерированных ассемблером в ходе сборки *de novo* геномной ДНК штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84

Штамм <i>C. psittaci</i>	Результат сборки, контиг №	Присвоенное имя и номер доступа в NCBI GenBank	Размер контига, п.н.
Rostinovo–70	1	хромосома, полный геном (CP041038.1)	1,152559
	2	плаزمиды, полная последовательность (CP041039.1)	7,553
АМК–16	1	хромосома, полный геном (CP047319.1)	1,152497
	2	плазмиды рАМК, полная последовательность (CP047320.1)	7,552
BL–84	1	хромосома, полный геном (CP094377.1)	1,152244

2.2.1.4. Филогенетический анализ штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84 на основе полногеномных последовательностей

Для детальной молекулярно–генетической характеристики штаммов и выявления таксономического положения относительно других представителей *C. psittaci* было построено филогенетическое дерево, основанное на полногеномных последовательностях хромосом штаммов Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84. Для филогенетического анализа были выбраны штаммы *C. psittaci*, имеющие статус «complete assembly level» – т.е. собранные до полной хромосомы и доступные в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Результаты филогенетического анализа штаммов Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84 с полногеномными последовательностями 25 штаммов *C. psittaci* представлены на рисунке 4.

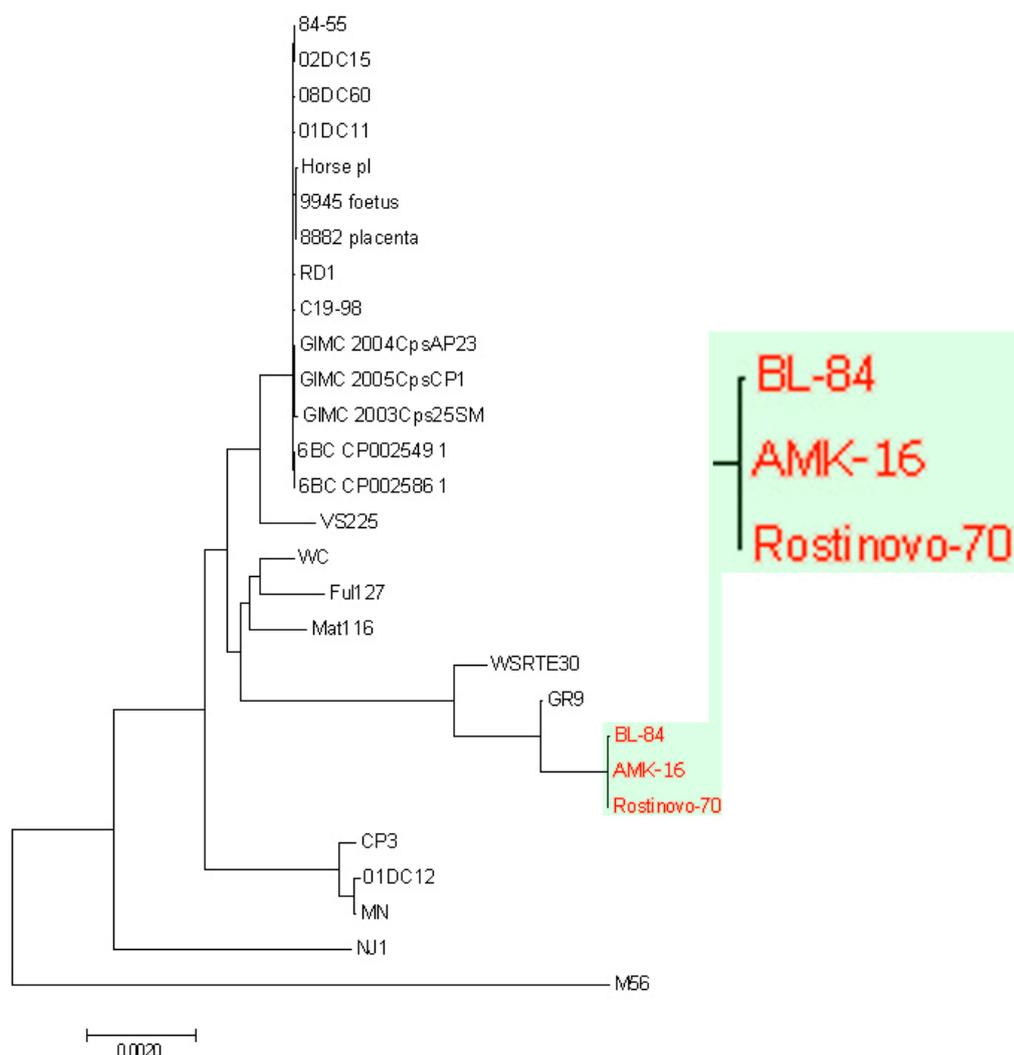


Рисунок 4 – Филогенетический анализ на основе полногеномных нуклеотидных последовательностей хромосом штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16, BL–84 и штаммов *C. psittaci*, доступных в базе NCBI GenBank (n=25)

Согласно данным филогенетического анализа (Рисунок 4), штаммы *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84 образовали единую ветвь, что

свидетельствовало о высокой гомологии геномного состава данных микроорганизмов. Также стоит отметить некоторую дискриминацию между исследуемыми штаммами, что продемонстрировано наличием отдельной ветви у штамма BL-84 относительно Rostinovo-70 и AMK-16. При этом указанные штаммы находились в одной кладе со штаммом *C. psittaci* GR9, выделенным в 1960 г. на территории Германии от дикой утки (Full genome sequences..., 2012), и штаммом *C. psittaci* WS/RT/E30, выделенным в 2001 г. от кряквы (относящейся к семейству утиных) на территории той же страны (Full genome sequences..., 2012). Это позволило сделать заключение о возможном эволюционном происхождении исследуемых штаммов и *C. psittaci* GR9 от одного анцестора. Важно, что штамм *C. psittaci* 6BC, являющийся референтным для представителей *C. psittaci* (Genome sequences of 6BC and Cal10..., 2011), формировал отдельный кластер из 14 гомологичных штаммов, филогенетически удаленных от ветвей Rostinovo-70, AMK-16, BL-84 и GR9. При этом остальные штаммы образовывали еще 3 отдельных ветви, каждая из которых была представлена от 1 до 3-х штаммов хламидий. Наиболее удаленные ветви образовывали штаммы NJ1, выделенный в 1954 г. от индейки, и M56, выделенный в 1961 г. от ондатры, что могло свидетельствовать об их филогенетической дивергенции относительно самого обширного кластера с референтным штаммом 6BC.

Таким образом, основываясь на полученных результатах филогенетического анализа, дальнейшая характеристика штаммов Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84 выполнялась путем сравнения указанных нуклеотидных последовательностей с хромосомой *C. psittaci* GR9 в качестве референтного.

2.2.1.5. Моноклусное типирование штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84 на основе полиморфизма гена *ompA*

Согласно задаче 2, целью данного этапа настоящего исследования являлось моноклусное генотипирование штаммов *C. psittaci* (Rostinovo-70, AMK-16 и

BL–84) на основе последовательности гена *ompA*, кодирующего МOMP штаммов *C. psittaci*.

Последовательности гена *ompA* штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84, аннотированные с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP), расположены в следующих участках полногеномных последовательностей указанных штаммов с номерами локусов (locus tag):

1. *C. psittaci* Rostinovo–70 – локус FI836_02955;
2. *C. psittaci* АМК–16 – локус GR632_02940;
3. *C. psittaci* BL–84 – локус MRE55_02975.

В результате сравнения нуклеотидных последовательностей гена *ompA* указанных штаммов хламидий относительно референтного штамма *C. psittaci* GR9 NCBI Genbank: CP003791.1) с ранее определенным генотипом «С», были выявлены 2 идентичные однонуклеотидные замены (SNP) в позициях 488 (G → A, G488A) и 984 (G → C, G984C) (Рисунок 5).

Гомология последовательностей гена *ompA* между штаммами *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16, BL–84 и референтным штаммом GR9 на основе выравнивания с использованием алгоритма поиска «Средство поиска основного локального выравнивания» (от англ. *B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) составила 99,79%.

С целью определения типа замены нуклеотидов в кодирующем регионе, олигонуклеотидные последовательности гена *ompA* штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84) и референтного штамма *C. psittaci* GR9 были транслированы в аминокислотную последовательность с рамкой считывания 1 (Рисунок 6).

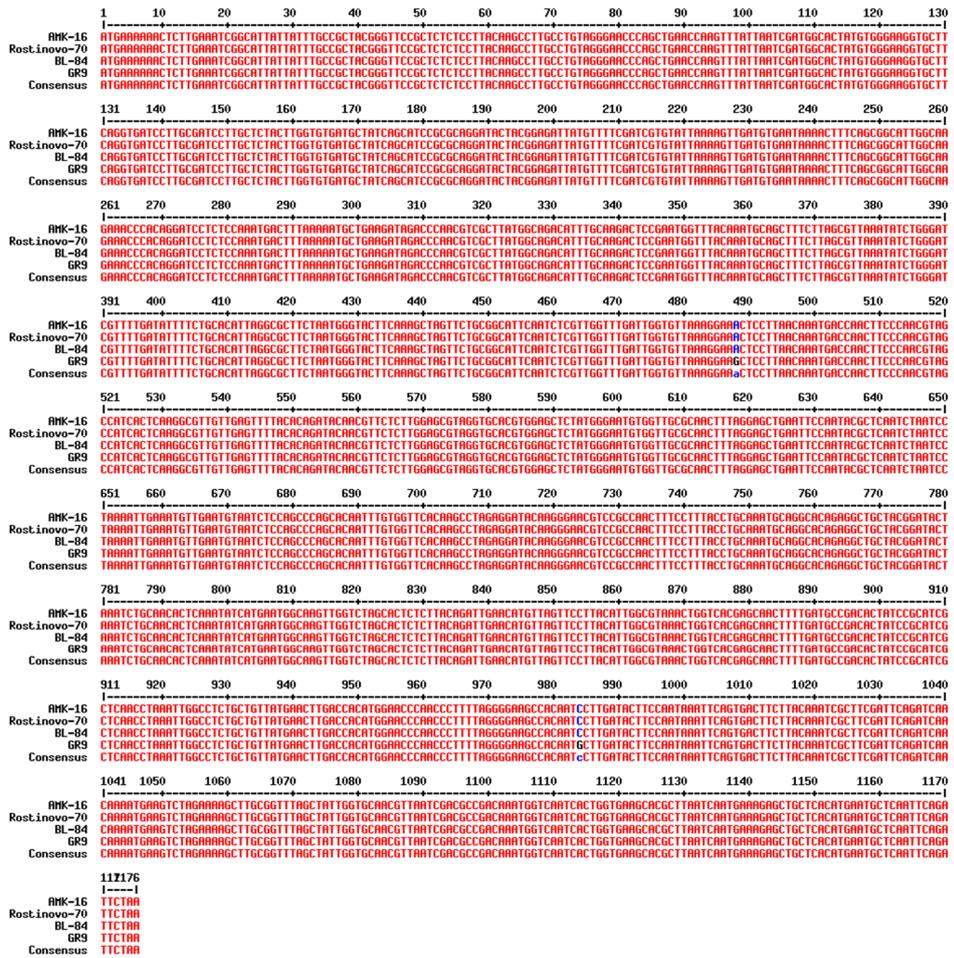


Рисунок 5 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *ompA* штаммов *C. psittaci* (Rostino-70, AMK-16 и BL-84) с референтной последовательностью того же гена *ompA* штамма *C. psittaci* GR9

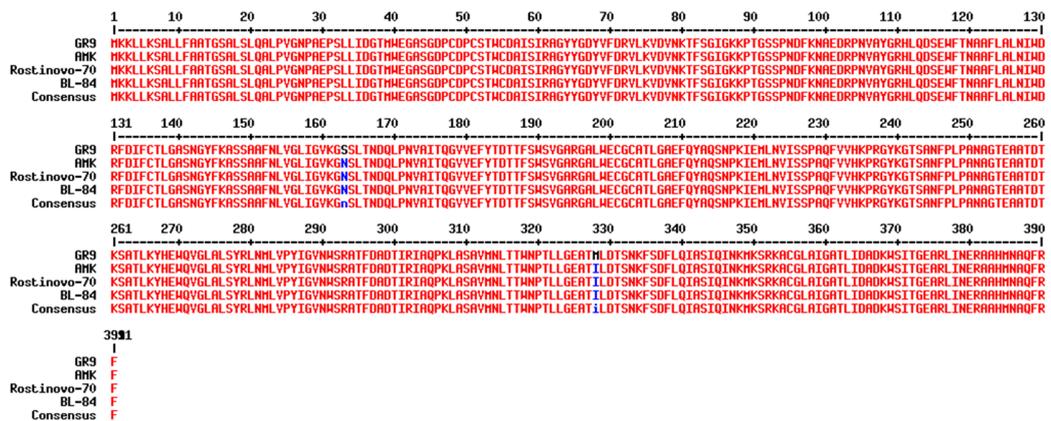


Рисунок 6 – Выравнивание аминокислотных последовательностей гена *ompA* штаммов *C. psittaci* (Rostino-70, AMK-16 и BL-84) с референтной последовательностью того же гена *ompA* штамма *C. psittaci* GR9

Выравнивание аминокислотных последовательностей гена *ompA* штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84) подтвердило наличие в обоих случаях двух несинонимичных замен, приводящих к изменению в указанных штаммах хламидий аминокислот относительно референтного штамма в виде: N (Asn, аспарагин) → S (Ser, серин) в позиции 163 (N163S) и I (Ile, изолейцин) → M (Met, метионин) в позиции 328 (I328M).

При этом нуклеотидная и аминокислотная последовательности гена *ompA* изучаемых штаммов на основе анализа BLAST оказались на 100% идентичны аналогичным последовательности штамма *C. abortus* CG1 (№ доступа в NCBI GenBank: EU531729) и *C. psittaci* HB1043 (№ доступа в NCBI GenBank: JN411078.1) с гомологией 99,91%, последний из которых выделен ранее в 2012 г. на территории Китая от больных хламидиозом свиней (Рисунок 7).

Важно отметить, что на сегодняшний день в литературных данных отсутствуют сведения о принадлежности штамма *C. psittaci* HB1043 к какому-либо из известных генотипов.

Результаты, полученные при построении филогенетического дерева с использованием последовательностей гена *ompA* штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84) с известными генотипами других репрезентативных штаммов *C. psittaci* из базы NCBI GenBank, представлены на рисунке 8.

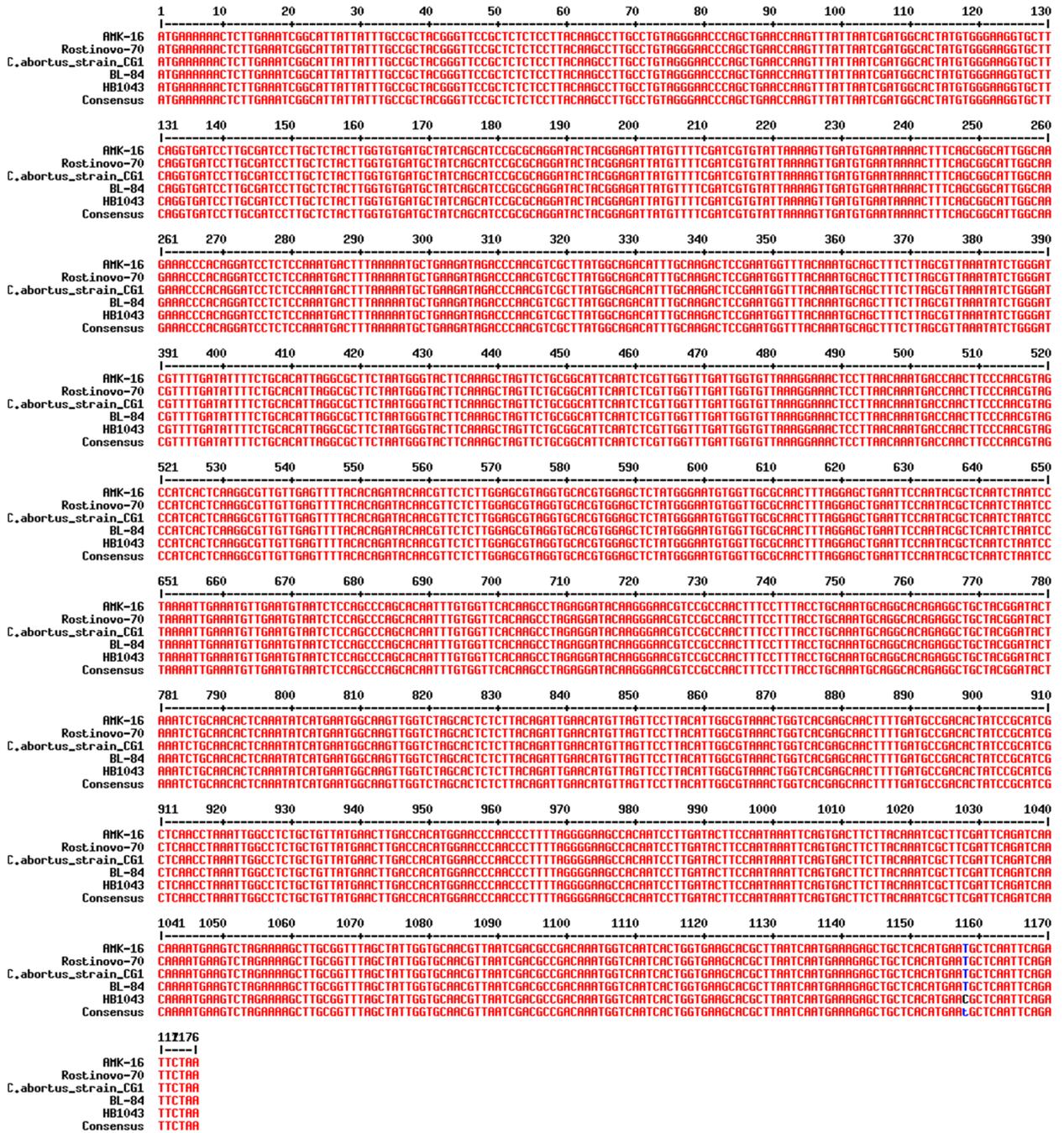


Рисунок 7 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *ompA* штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84) с последовательностями того же гена *ompA* штаммов *C. abortus* CG1 и *C. psittaci* HB1043, выделенных от СХЖ

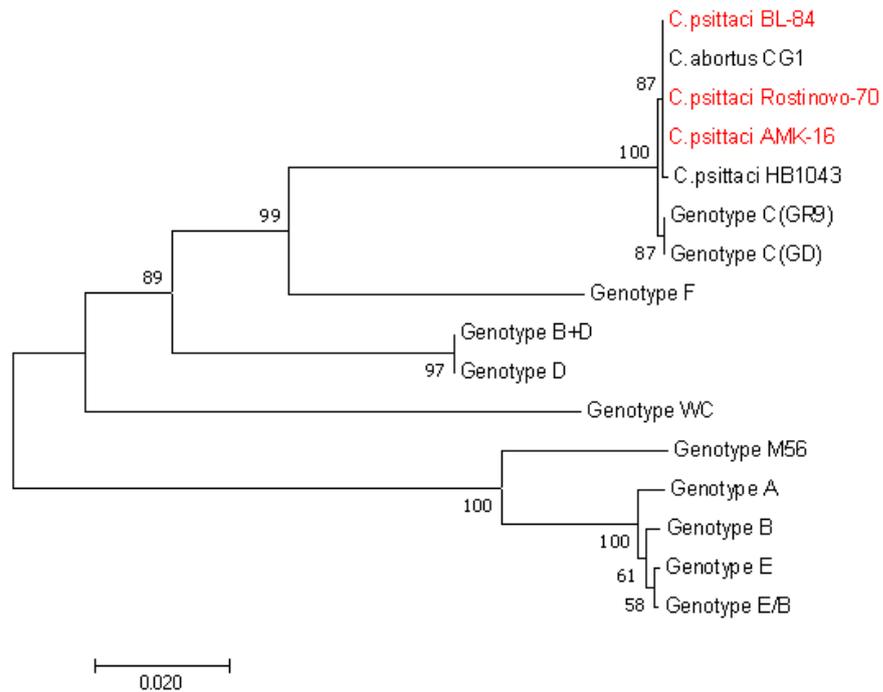


Рисунок 8 – Филогенетический анализ последовательностей гена *ompA* штаммов *C. psittaci* (Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84, выделены красным цветом) с референтными последовательностями генов *ompA* представителей *C. psittaci* (известных генотипов A-F) и *C. abortus*, доступными в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), выполненный методом Neighborhood joining tree (метод «присоединения соседей») со значением бутстрэпа 100

Как показано на рисунке 8, согласно данным филогенетического анализа, штаммы *C. psittaci* (Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84) находились в одной кладе с представителем другого вида *C. abortus* CG1. Наличие SNP в гене *ompA* штамма *C. psittaci* HB1043 четко продемонстрировано различием длины ветви относительно клады, сформированной последовательностями аналогичного гена штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, AMK-16, BL-84, а также *C. abortus* CG1. При этом, нуклеотидные последовательности генов *ompA* референтных штаммов *C. psittaci* GR9 и GD продемонстрировали дискриминацию относительно последовательностей *ompA* исследуемых штаммов, разделив их на две независимых ветви. Полученные данные несколько отличаются от результатов

филогенетического анализа штаммов хламидий на основе полных геномов. Как известно, первоначально филогенетический анализ на основе генов *ompA* использовался для реконструкции эволюции видов *Chlamydiaceae*, однако в настоящее время считается, что филогенетическая реконструкция на основе полных геномов дает более точную картину взаимоотношений внутри популяции. В тоже время оценка эволюционных взаимоотношений на основе одного локуса учитывает эволюционные сигналы, возникающие в небольшой части генома, хотя и не может отразить полную изменчивость внутри вида, к которому относится возбудитель ИБ (Standardized phylogenetic and..., 2020). Таким образом, филогенетический анализ на основе геномов наиболее полно отражает филогенетическую взаимосвязь близкородственных организмов, а сравнение отдельных локусов – более точно проследить микроэволюцию внутри вида.

С целью изучения гомологии гена *ompA* исследуемых штаммов Rostinovo–70, АМК–16, ВЛ–84 с представителями вида *C. abortus*, нами было сконструировано филогенетическое дерево на основе последовательностей генов *ompA* штаммов *C. abortus*, доступных в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Критерием отбора штаммов *C. abortus* для филогенетического анализа являлось наличие полностью отсеквенированной последовательности гена *ompA* (длина CDS >1000п.н.). Результат филогенетического анализа представлен на рисунке 9.

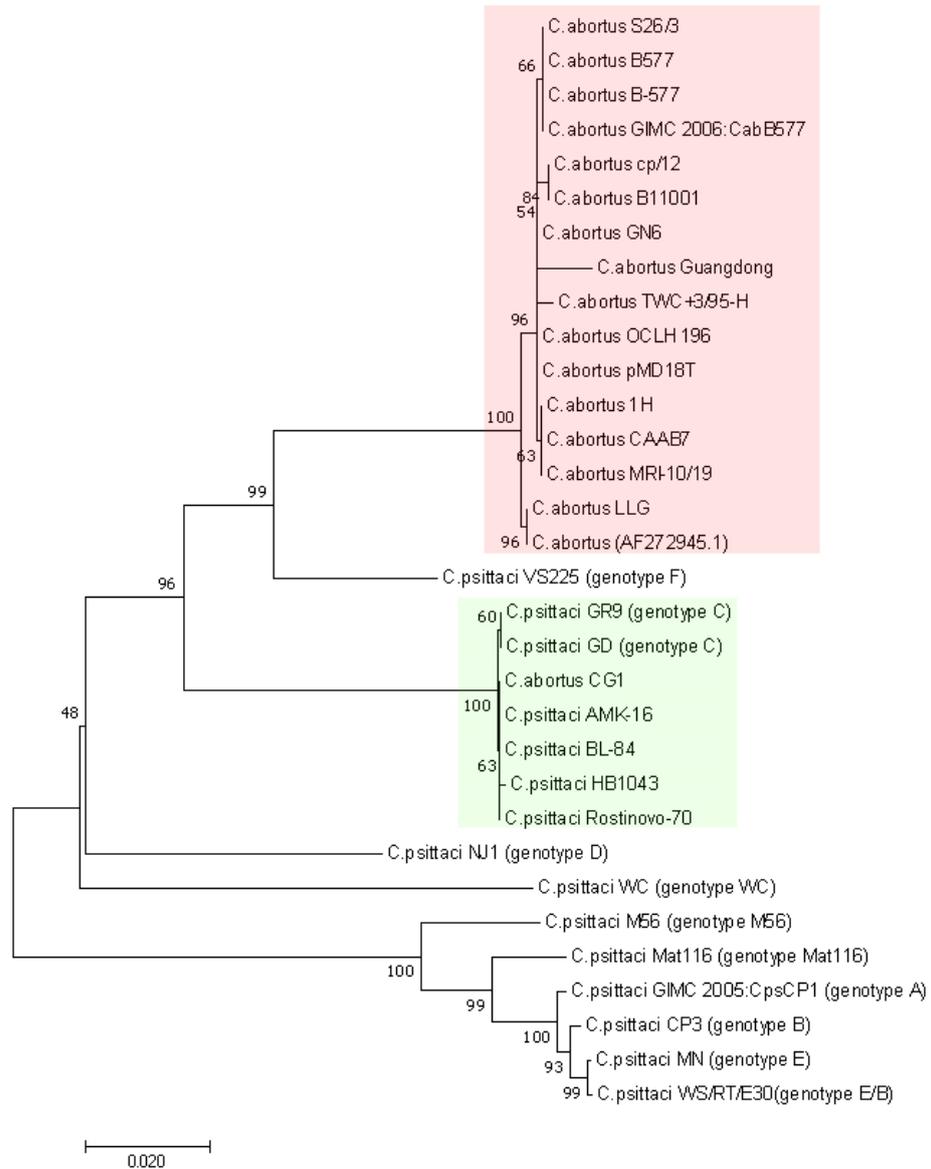


Рисунок 9 – Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *ompA* штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84) и референтных последовательностей генов *ompA* представителей *C. psittaci* (известных генотипов А–F) и *C. abortus*, доступных в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), выполненный методом Neighborhood joining tree (метод «присоединения соседей») со значением бутстрапа 100

Согласно результатам филогенетического анализа (Рисунок 9), последовательности генов *ompA* штаммов *C. abortus* формировали отдельную кладу, что указывало на их четкую дискриминацию относительно аналогичных

последовательностей штаммов *C. psittaci* (выделены зеленым цветом). При этом последовательность гена *ompA* штамма GC1 не кластеризовалась с последовательностями других представителей *C. abortus*.

Таким образом, полученные данные свидетельствовали об обнаружении нового, ранее не зарегистрированного генотипа, у представителей *C. psittaci* на основании двух не синонимичных замен в составе кодирующего региона. Обнаруженный генотип у штаммов Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84 был обозначен нами как генотип «G». Также стоит отметить, что проведенный филогенетический анализ позволил уточнить таксономическую принадлежность штамма CG1 к виду *C. psittaci* (№ доступа в NCBI GenBank: EU531729), а не к виду *C. abortus*, как было ранее представлено при депонировании Ling Y. *et al.* (2008).

2.2.1.6. MLST штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84

Как известно, метод MLST обладает высокой степенью дискриминации и используется для типирования большинства бактериальных штаммов, включая возбудителей хламидиоза животных и человека. В сочетании с другими методами типирования, MLST позволяет производить наиболее точную дискриминацию и хламидийных штаммов, а также используется как один из современных молекулярных инструментов для внутривидовой дифференциации и классификации микроорганизмов на этапах диагностики ИБ животных и человека, в том числе, для эпизоотологического контроля за распространением патогенов (High-resolution multilocus sequence..., 2021). Поэтому следующим этапом молекулярно-генетической характеристики штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84 явилось MLST микроорганизмов на основе семи генов «домашнего хозяйства». Для этого полученные в ходе сборки последовательности штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84 были загружены и проанализированы с использованием схемы типирования MLST

Chlamydiales на сервере базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org>). В результате сопоставления и выравнивания последовательностей хромосом указанных штаммов с референтными последовательностями из базы данных PubMLST, были идентифицированы последовательности семи генов «домашнего хозяйства» и определены аллельные профили для каждого из исследуемых микроорганизмов (Таблица 5).

Основываясь на комбинации аллельных профилей, представленных в таблице 5, нами установлена принадлежность всех трех исследуемых штаммов к одному сиквенс-типу ST28. Полученные последовательности семи генов «домашнего хозяйства» были депонированы в базу данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>) (Таблица 6).

На следующем этапе после определения принадлежности штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84 к ST28, нами было сконструировано минимальное остовное дерево с использованием алгоритма GrapeTree (Рисунок 10) с целью выявления филогенетических взаимоотношений штаммов *C. psittaci* на основе выбранных молекулярных маркеров.

Таблица 5 – Результаты идентификации аллельных профилей генов «домашнего хозяйства» в полногеномных последовательностях штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84

Ген «домашнего хозяйства»	Аллель	Длина, п.н.	Штамм <i>C. psittaci</i>					
			Rostinovo–70		АМК–16		ВЛ–84	
			Позиция в хромосоме					
			(начало)	(конец)	(начало)	(конец)	(начало)	(конец)
<i>gatA</i>	12	425	955,777	956,201	955,715	956,139	955,500	955,924
<i>oppA</i>	13	483	75,621	76,103	75,617	76,099	75,608	76,090
<i>hflX</i>	11	438	904,564	905,001	904,539	904,976	904,294	904,731
<i>gidA</i>	13	474	748,118	748,591	748,093	748,566	747,922	748,395
<i>enoA</i>	13	381	564,937	565,317	564,912	748,566	564,762	565,142
<i>hemN</i>	9	432	457,161	457,592	457,141	748,566	457,004	457,435
<i>fumC</i>	12	465	311,802	312,266	311,782	312,246	311,671	312,135

Таблица 6 – Номера доступа штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84 в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>)

Номер доступа в PubMLST	Штамм <i>C. psittaci</i>
4451	AMK–16
4452	Rostinovo–70
4721	BL–84

На следующем этапе после определения принадлежности штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84 к ST28, нами было сконструировано минимальное остовное дерево с использованием алгоритма GrapeTree (Рисунок 10) с целью выявления филогенетических взаимоотношений штаммов *C. psittaci* на основе выбранных молекулярных маркеров.

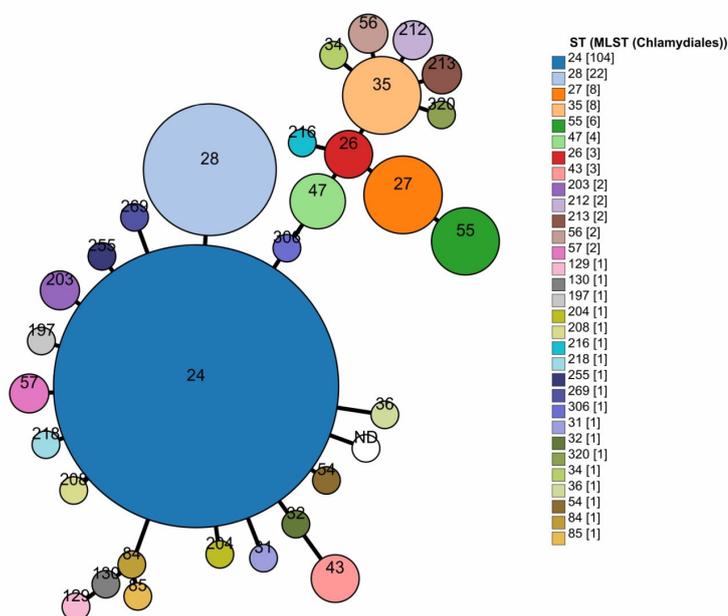


Рисунок 10 – Минимальное остовное дерево, сконструированное с применением алгоритма GrapeTree на основе конкатенированных нуклеотидных последовательностей 7 генов «домашнего хозяйства» (*gatA*, *oppA*, *hfiX*, *gitA*, *enoA*, *hemN* и *fumC*) из базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>), содержащей все идентифицированные у представителей *C. psittaci* сиквенс–типы (STs)

Согласно проведенному анализу (Рисунок 10), штаммы *C. psittaci* Rostinovo-70, АМК-16 и ВЛ-84 были включены в кластер штаммов ST28, содержащий 22 изолята (Таблица 7), в том числе референтный штамм GR9. Как видно на рисунке 10, кластер ST28 занимает второе место по количеству входящих в него штаммов и эволюционно происходит от самого обширного кластера ST24, состоящего из 104 штаммов хламидий вида *C. psittaci*.

Таблица 7 – Штаммы *C. psittaci*, относящиеся к кластеру ST28, представленные в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>)

№	ID PubMLST*	Штамм	Страна	Год изоляции	Хозяин	Вид
1	81	GR9(GD)	Н/Д	Н/Д	птица	утка
2	82	humaan E	Н/Д	Н/Д	человек	Н/Д
3	83	18_290800	Н/Д	Н/Д	птица	утка
4	84	3_20901	Н/Д	Н/Д	птица	утка
5	85	4_20901	Н/Д	Н/Д	птица	утка
6	86	5_20901	Н/Д	Н/Д	птица	утка
7	87	2_290300	Н/Д	Н/Д	птица	утка
8	144	94-2306	Н/Д	Н/Д	птица	утка
9	145	05-4325	Н/Д	Н/Д	птица	утка
10	146	05-4461	Н/Д	Н/Д	птица	утка
11	147	06-881	Н/Д	Н/Д	птица	утка
12	148	06-1683	Н/Д	Н/Д	человек	Н/Д
13	149	07-1391	Н/Д	Н/Д	птица	Н/Д
14	151	08-2626 L4	Н/Д	Н/Д	птица	утка
15	152	10-1398/28	Н/Д	Н/Д	птица	ибис
16	198	GR9	Н/Д	Н/Д	птица	кряква
17	203	WS/RT/E30	Н/Д	Н/Д	птица	кряква
18	838	06-1638	Франция	Н/Д	человек	Н/Д
19	878	08-2626 L3	Н/Д	Н/Д	птица	утка
20	4451	АМК	Россия	1970	млекопитающее	коза
21	4452	Rostinovo-70	Россия	2017	млекопитающее	овца
22	4721	ВЛ-84	Россия	1984	млекопитающее	лиса

Примечание – "*" – Идентификационный номер PubMLST (<https://pubmlst.org/>)

К моменту нашего исследования, в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>) было представлено 190 изолятов вида *C. psittaci* с 31 известными сиквенс-типами. Из них ST28 был определен у 22-х штаммов *C. psittaci* от общего числа всех депонированных в базу данных. Как продемонстрировано в таблице 7, штаммы, принадлежавшие к ST28, ранее были изолированы только от птиц, и лишь два изолята (06-1638 и human E) выделены от человека. Таким образом, в нашем исследовании впервые обнаружены изоляты *C. psittaci* (Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84), входящие в кластер ST28 и ассоциированные с ИБ СХЖ.

2.2.1.7. Сравнительное изучение молекулярно-генетических особенностей штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84 – возбудителей инфекционных абортос СХЖ

С целью детального изучения уникальных особенностей геномов штаммов *C. psittaci* Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84, изолированных из биоматериала СХЖ с инфекционными абортос хламидийной этиологии, нами был проведен сравнительный анализ полногеномных последовательностей указанных микроорганизмов методом выравнивания последовательностей ДНК хромосом относительно референтного штамма *C. psittaci* GR9 зоонозного происхождения. Установленное нами филогенетическое родство между исследуемыми штаммами *C. psittaci* Rostinovo-70, AMK-16, BL-84 и референтным штаммом *C. psittaci* GR9 (см. Рисунок 4) позволило провести дальнейшее детальное сравнение молекулярно-генетических особенностей указанных штаммов. Для выявления гомологичных и вариабельных CDS относительно референтного штамма, нами был произведен сравнительный анализ хромосом с использованием алгоритма BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и метода «наилучшего совпадения при двунаправленном сравнении» (Best Bidirectional Hits – BBH). Метод BBH заключается в сравнении всех белковых последовательностей,

закодированных в хромосоме одного штамма, со всеми белками, закодированными в геноме другого штамма, а затем процедура повторяется в обратном направлении (Tatusov R. L., Koonin E.V., Lipman D.J., 1997). Результат сравнительного анализа хромосом на сервере BV-BRC (<https://www.bv-brc.org/>) с использованием указанного алгоритма, представлен на рисунке 11.

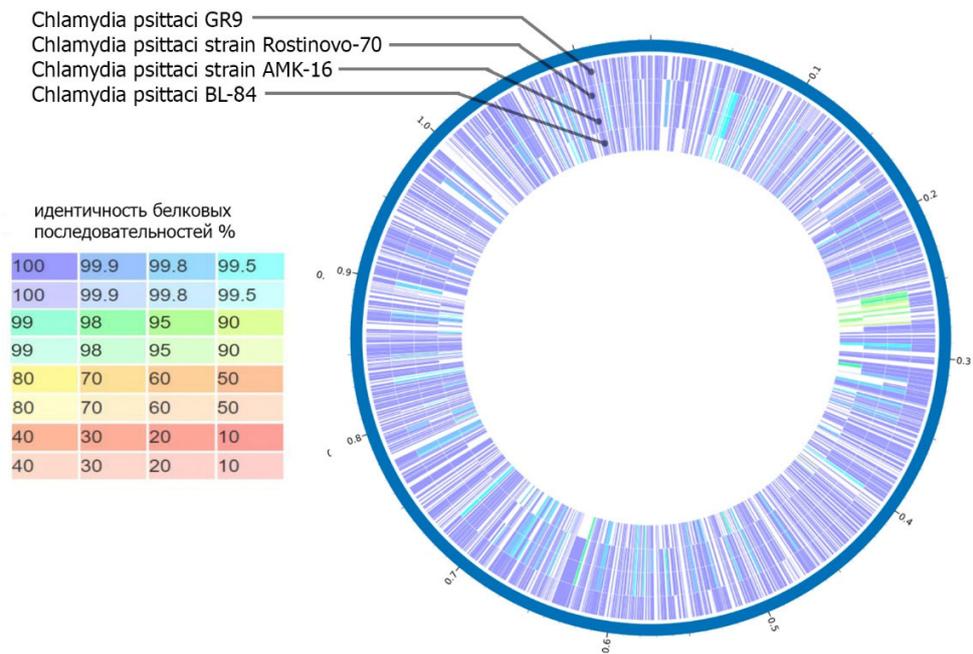


Рисунок 11 – Визуализация сравнения CDS, входящих в состав хромосом штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84 относительно референтного штамма GR9. Идентичность CDS определяется по колориметрической шкале, где фиолетовый/синий цвета соответствуют более высокому проценту идентичности, чем регионы, окрашенные в оранжевый/красный. Белые участки представляют собой межгенное пространство в последовательности хромосомы соответствующего штамма

Согласно полученной циркулярной карте сравнения штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84 с референтным штаммом GR9, хромосомы исследуемых штаммов имели как гомологичные (уровень гомологии от 99,5% до 100%), так и переменные (90%–95% идентичности) CDS. Один из регионов,

расположенный в регионе 250 кб – 280 кб хромосом изучаемых штаммов, продемонстрировал наибольшее отличие от референтного штамма. Наличие переменных CDS согласовывалось с ранее полученными данными филогенетического анализа (см. Рисунок 4), продемонстрировавшего дискриминацию между этими штаммами.

С целью дальнейшего детального сравнения указанных штаммов, нами проведено попарное выравнивание хромосом относительно референтного штамма GR9 с использованием Genome Comparator, входящего в набор аналитических инструментов базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org>). В отличие от аннотации PGAP, база данных PubMLST использует генетические локусы, часть из которых объединены в функциональные группы (схемы), где каждому кодирующему региону присваивается конкретный аллельный профиль на основе наличия SNP (Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M. C.J., 2018). Результат сравнительного выравнивания хромосом штаммов Rostinovo–70, AMK–16, BL–84 относительно референтного штамма GR9 с использованием Genome Comparator представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результат попарного сравнения геномов штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16, BL–84 с референтным штаммом GR9*

Число идентичных локусов для штаммов Rostinovo–70, AMK–16, BL–84, GR9	Число переменных локусов в штаммах Rostinovo–70, AMK–16, BL–84 относительно референтного штамма GR9	Число переменных локусов в штамме AMK-16 относительно GR9	Число переменных локусов в штамме BL–84 относительно GR9	Число переменных локусов в штамме Rostinovo–70 относительно GR9
433	178	85	178	85

Примечание – "*" – данные получены с применением программного обеспечения Genome Comparator, доступного на базе серверов PubMLST (<https://pubmlst.org>).

Анализ хромосом трех исследуемых штаммов с использованием Genome Comporator относительно референтного штамма GR9, позволил идентифицировать 611 локусов с гомологией в пределах от 90% до 100% идентичности. В таблице 9 представлены переменные локусы, идентифицированные в хромосомах штаммов Rostinovo-70, AMK-16 и BL-84 при сравнении с референтным штаммом GR9.

Как продемонстрировано в таблице 9 локусы, идентифицированные в составе хромосом штаммов Rostinovo-70, AMK-16, BL-84 и GR9, были разделены на 7 различных групп генов, экспрессирующих продукты, с помощью которых хламидии реализует ту или иную биологическую функцию. Выявление данных локусов проводили с применением соответствующих функциональных схем, доступных в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org>). В первую функциональную группу входили локусы, экспрессирующие продукты, связанные с клеточной оболочкой микроорганизма, и включали в себя различные мембранные белки, липопротеины, порины, пептидогликаны, а также субстанции, участвующие в метаболизме жирных кислот и фосфолипидов. В данной группе было идентифицировано 52 локуса, 37 из которых оказались консервативными и 15 переменными относительно референтного штамма, при этом 3 локуса отсутствовали в штамме GR9. Вторая функциональная группа включала в себя локусы, ассоциированные с процессами сигнальной трансдукции и механизмами деления клетки. В данной группе 9 локусов были идентифицированы как переменные, 16 оказались идентичными во всех штаммах, включая референтный. Более того, в изучаемых штаммах было обнаружено, по меньшей мере, 2 локуса относительно референтного варианта GR9. Третья группа, ассоциированная с промежуточным метаболизмом, включала 127 локусов, из которых 25 являлись переменными, из которых 1 локус не был обнаружен в референтном штамме. В данную группу объединены

локусы, ответственные за различные биохимические процессы, протекающие в клетке патогена, включая биосинтез аминокислот, кофакторов и нуклеотидов, а также углеводный обмен. Четвертая группа была представлена только одним варибельным локусом CHLAM0046 (*hctB*), обнаруженным у штамма VL-84 и участвующим в кодировании ДНК-связывающего белка, который, по литературным данным (Mosaic structure of intragenic..., 2010), опосредует уплотнение хроматина у хламидий. Пятая группа локусов, ассоциированная с обработкой генетической информации, являлась наиболее обширной среди всех идентифицированных групп. В составе данной группы было выявлено 195 локусов, участвующих в таких процессах как: посттрансляционная модификация, репликация, репарация, рекомбинация, транскрипция и трансляция. В отличие от референтного штамма, по меньшей мере, 68 локусов данной группы у трех изучаемых штаммов обладали отличными от референтного аллельными профилями, при этом 11 локусов данной группы отсутствовали в референтном штамме. Более того, удалось выявить новые, ранее отсутствующие в базе данных PubMLST варианты аллельных профилей, преимущественно в штамме *C. psittaci* VL-84. Шестая группа локусов ассоциирована с различными ферментами, консервативными и специфическими белками. В данной группе из 50 локусов только 13 оказались варибельными, 3 из которых отсутствовали в референтном штамме GR9. Последняя, седьмая группа локусов, включала транспортные белки и белки, ассоциированные с патогенностью, в том числе полипептиды системы секреции III типа. В этой группе было идентифицировано 9 варибельных локусов, один из которых (CHLAM0576) отсутствовал в референтном штамме.

Таблица 9 – Вариабельные локусы в хромосомах штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84, выявленные при сравнении с хромосомой штамма *C. psittaci* GR9, распределенные по функциональным группам (схемам) и представленные в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org>)

I. Локусы, экспрессирующие продукты, ассоциированные с клеточной оболочкой у хламидий					
Локус	Продукт	AMK–16	BL–84	Rostinovo–70	GR9
		Аллель*			
CHLAM0104	Эноил-ацил-носитель протеинредуктазы	14	Нов(1)	14	14
CHLAM0124	Биотинкарбоксилаза	35	Нов(1)	35	35
CHLAM0136	предсказанная лизофосфолипазная эстераза	51	Нов(1)	51	51
CHLAM0241	Omp85 аналог	34	34	34	51
CHLAM0265	AcCoA Карбоксилаза/трансфераза альфа	38	38	38	X
CHLAM0270	трансгликолаза/транспептидаза	84	Нов(1)	84	84
CHLAM0444	9kDa–липопротеины, богатые цистеином	14	14	14	16
CHLAM0451	Фосфатидат-цитидилитрансфераза	52	Нов(1)	52	52
CHLAM0453	Глицерин-3-Р-ацилтрансфераза	46	Нов(1)	46	46
CHLAM0681	Главный белок внешней мембраны	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	56
CHLAM0682	PBP2–трансгликолаза/транспептидаза	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	X
CHLAM0757	Мурамоил-пентапептид трансфераза	51	Нов(1)	51	51
CHLAM0807	Глицерин-3-Р-ацилтрансфераза	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	X
CHLAM0826	CDP–диацилглицерол-серин-О-фосфатидилтрансфераза	37	Нов(1)	37	37

CHLAM0831	UDP-N- Ацетиленолпирурилглюкозамин редуктаза	58	Нов(1)	58	62
II. Локусы, экспрессирующие продукты, ассоциированные с клеточными процессами					
CHLAM0218	SurE-подобная кислая фосфатаза	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	37
CHLAM0664	аденилатциклазоподобный белок	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	X
CHLAM0683	Белок с TPR-мотивом	40	Нов(1)	40	40
CHLAM0698	Белок окисления тиофена/фурана	31	Нов(1)	31	31
CHLAM0703	GTPase/GTP-связывающий белок	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	X
CHLAM0726	стержневидный белок	18	Нов(1)	18	18
CHLAM0760	Белок клеточного делени FtsW	19	Нов(1)	19	19
CHLAM0808	Осевой филаментный белок	31	Нов(1)	31	31
CHLAM0820	Белок клеточного делени FtsY	29	Нов(1)	29	29
III. Локусы, экспрессирующие продукты, ассоциированные с промежуточным метаболизмом					
CHLAM0014	субъединица II цитохромоксидазы	17	Нов(1)	17	17
CHLAM0078	Метилентетрагидрофолатдегидрогеназа	49	Нов(1)	49	49
CHLAM0087	4-альфа-глюканотрансфераза	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	31
CHLAM0099	Тиоредоксинредуктаза	27	Нов(1)	27	27
CHLAM0183	СТР Синтетаза	Нов(1)	74	74	74
CHLAM0188	Тимидилаткиназа	48	Нов(1)	48	48
CHLAM0205	Фруктоза-6-Р-фосфотрансфераза	43	Нов(1)	43	43
CHLAM0247	Дигидролипоамидацетилтрансфераза	31	Нов(1)	31	31
CHLAM0281	NADH (убихинон) редуктаза 5	19	Нов(1)	19	19
CHLAM0295	Фосфоманномутаза	72	Нов(1)	72	72
CHLAM0307	Субъединица В АТФ-синтазы	16	16	16	30

CHLAM0313	Трансальдолаза	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	27
CHLAM0331	Транскетолаза	70	Нов(1)	70	70
CHLAM0340	(пируват) Оксоизовалератдегидрогеназа Альфа / Бета	47	Нов(1)	47	47
CHLAM0366	Фосфошикимат-1- карбоксивинилтрансфераза	66	Нов(1)	66	66
CHLAM0382	фосфо-2-дегидро-3- дезоксигептонатаьдолаза	61	Нов(1)	61	61
CHLAM0390	Аспаратаминотрансфераза	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	22
CHLAM0435	Сульфитредуктаза	67	Нов(1)	67	67
CHLAM0452	СМР киназа	58	Нов(1)	58	58
CHLAM0613	Дигидроптероатсинтаза	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	63
CHLAM0719	Жгутиковый белок М-кольца	57	Нов(1)	57	X
CHLAM0798	Гликогенсинтаза	21	Нов(1)	21	21
CHLAM0822	Сукцинил-КоА-синтетаза, альфа	56	56	56	62
CHLAM0844	цитозиндезаминаза	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	42
CHLAM0866	1,4-альфа-глюкановый разветвляющий фермент	50	Нов(1)	50	50
IV. Локусы, экспрессирующие продукты, ассоциированные с фактором хроматина эукариотического типа					
CHLAM0046	Гистоноподобный белок 2	80	Нов(1)	80	80
V. Локусы, экспрессирующие продукты, ассоциированные с обработкой генетической информации					
CHLAM0003	Glu-tРНК Gln-амидотрансфераза (субъединица А)	30	Нов(1)	30	30

CHLAM0004	Glu-тРНК Gln-амидотрансфераза (субъединица В)	101	Нов(1)	101	101
CHLAM0023	Фактор высвобождения пептидной цепи (RF-1)	36	Нов(1)	36	36
CHLAM0028	50S рибосомный белок L19	15	Нов(1)	15	15
CHLAM0029	Рибонуклеаза III	68	68	68	19
CHLAM0033	Экзодезоксирибонуклеаза V, альфа	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	87
CHLAM0075	ДНК Pol III (бета-цепь)	26	Нов(1)	26	26
CHLAM0086	50S рибосомный белок L28	10;31	10;31	10;31	10
CHLAM0096	Фактор инициации-2	64	Нов(1)	64	64
CHLAM0113	Clp протеаза АТФаза	48	Нов(1)	48	48
CHLAM0133	предсказанная рРНК-метилаза	62	Нов(1)	62	62
CHLAM0146	DNA лигаза	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	X
CHLAM0176	Дисульфидная связь Оксидоредуктаза	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	X
CHLAM0189	Субъединица А ДНК-гиразы	Нов(1)	41	41	41
CHLAM0190	Субъединица ДНК-гиразы В	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	52
CHLAM0193	тРНК Рибозилтрансфераза	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	X
CHLAM0197	О-сиалогликопротеин эндопептидаза	23	Нов(1)	23	23
CHLAM0250	Фактор инициации репликации	18	Нов(1)	18	18
CHLAM0275	Фактор инициации репликации	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	15
CHLAM0298	белок репарации ДНК	31	Нов(1)	31	31
CHLAM0314	РНК-полимераза бета'	84	Нов(1)	84	80
CHLAM0315	РНК-полимераза бета	62	Нов(1)	62	62
CHLAM0317	50S рибосомный белок L10	24	Нов(1)	24	24
CHLAM0318	50S рибосомный белок L1	37	Нов(1)	37	37
CHLAM0319	50S рибосомный белок L11	13	Нов(1)	13	13

CHLAM0320	Белок терминации транскрипции	30	Нов(1)	30	30
CHLAM0322	Прокариотический фактор элонгации Tu	37	Нов(1)	37	37
CHLAM0329	Экзодоксирибонуклеаза VII	53	Нов(1)	53	53
CHLAM0341	Белок теплового шока J	23	Нов(1)	23	23
CHLAM0344	Lon АТФ-зависимая протеаза	27	Нов(1)	27	27
CHLAM0394	НТН Транскрипционный репрессор	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	65
CHLAM0395	HSP-70 Кофактор	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	23
CHLAM0396	HSP-70	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	20
CHLAM0397	Семейство рибонуклеаз	105	Нов(1)	105	41
CHLAM0403	pPHK-метилаза (семейство SpoU)	55	Нов(1)	55	55
CHLAM0410	PolyA полимераза	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	X
CHLAM0439	30S рибосомный белок S12	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	11
CHLAM0447	ssDNA экзонуклеаза	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	X
CHLAM0459	Фактор высвобождения пептидной цепи 2	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	X
CHLAM0463	Псевдоуридилатсинтаза I	59	Нов(1)	59	59
CHLAM0493	ДНК-полимераза I	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	99
CHLAM0514	50S рибосомный белок L6	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	5
CHLAM0516	50S рибосомный белок L5	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	7
CHLAM0522	30S рибосомный белок S3	6	Нов(1)	6	6
CHLAM0523	50S рибосомный белок L22	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	13
CHLAM0524	30S рибосомный белок S19	3	Нов(1)	3	3
CHLAM0528	50S рибосомный белок L3	18	Нов(1)	18	18
CHLAM0545	ДНК Pol III Альфа	62	Нов(1)	62	62
CHLAM0574	Аминопептидаза P	60	60	60	64

CHLAM0575	Исправление несоответствия ДНК	59	59	59	X
CHLAM0586	Экзинуклеаза ABC Субъединица B	46	46	46	43
CHLAM0617	30S рибосомный белок S20	34	34	34	38
CHLAM0677	Фактор высвобождения рибосом	21	Нов(1)	21	21
CHLAM0679	Коэффициент элонгации TS	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	57
CHLAM0680	30S рибосомный белок S2	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	X
CHLAM0697	Эндонуклеаза III	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	X
CHLAM0705	Протеаза АТФаза	35	35	35	37
CHLAM0708	SWF/SNF семейство геликаз	Нов(1)	63	63	63
CHLAM0742	pPHK Метилтрансфер	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	72
CHLAM0748	Связь транскрипции и восстановления	62	62	62	X
	тPHK				
CHLAM0766	изопентенилпирофосфаттрансфераза	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	66
CHLAM0778	Примосомный белок N'	31	31	31	51
CHLAM0791	Эксинуклеаза ABC, субъединица C	70	Нов(1)	70	76
CHLAM0794	ДНК Праймаза	72	Нов(1)	72	72
CHLAM0806	Семейство инсулиназ/протеаза III	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	X
	Цинк-металлопротеаза (семейство инсулиназ)				
CHLAM0824		93	Нов(1)	93	93
CHLAM0833	Иницирующий фактор 3	11	Нов(1)	11	11
CHLAM0841	АТФ-зависимая протеаза цинка	31	Нов(1)	31	31
VI. Локусы, экспрессирующие продукты, ассоциированные с различными ферментами/консервативными и специфическими белками					
CHLAM0035	Биотин-протеинлигаза	60	Нов(1)	60	60
CHLAM0148	Моноксигеназа	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	82
CHLAM0149	возможная гидролаза	42	42	42	X

CHLAM0217	АТФаза суперсемейства PP-петли	59	59	59	19
CHLAM0287	АТФаза суперсемейства PP-петли	33	33	33	39
CHLAM0385	Nit семейство гидролаз	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	7
CHLAM0386	предсказанная металлозависимая гидролаза	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	X
CHLAM0422	возможный металлофермент	40	Нов(1)	40	40
CHLAM0423	Белок домена CBS	47	Нов(1)	47	47
CHLAM0426	Fe-S-оксидоредуктаза	58	58	58	60
CHLAM0461	фосфогидролаза	58	Нов(1)	58	58
CHLAM0583	Паралог плазмиды CHLTR	18	Нов(1)	18	18
CHLAM0840	PP-loop superfamily ATPase	41	41	41	X
VII. Локусы, экспрессирующие продукты, ассоциированные с патогенезом/системой секреции III типа					
CHLAM0090	ответ на низкий уровень Ca ²⁺ D	24	Нов(1)	24	24
CHLAM0274	Гипотетический белок	8	Нов(1)	8	8
CHLAM0284	Суперсемейство фосфолипаз D	56	Нов(1)	56	56
CHLAM0564	Белок транслокации T Yop из группы белков внешней мембраны (от англ. <i>Yersinia</i> outer membrane proteins)	23	23	23	28
CHLAM0576	Белок H система ответа на низкий уровень Ca ²⁺	Нов(1)	Нов(2)	Нов(1)	X
CHLAM0578	Гипотетический белок	50	50	50	63
CHLAM0579	Гипотетический белок	62	Нов(1)	62	62
CHLAM0674	вероятный транслокационный белок C из группы белков внешней мембраны Yops/белок основного пути секреции	56	Нов(1)	56	56
CHLAM0849	Гипотетический белок	9	9	9	42

VIII. Локусы, идентифицированные в хромосоме и не ассоциированные с функциональными группами					
CHLAM0387	Гипотетический белок	77	77	77	72
CHLAM0701	Белковая транслоказа	58	Нов(1)	58	58
CHLAM0749	Аланил-тРНК-синтетаза	44	44	44	Нов(1)
CHLAM0805	Гипотетический белок	26	Нов(1)	26	26
CHLAM0936	Полиморфный белок внешней мембраны	Нов(1)	Нов(2)	Нов(3)	X
CHLAM0943	олиморфный белок внешней мембраны	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	17
ВАСТ000003	30S рибосомный белок S3	1727	Нов(1)	1727	1727
ВАСТ000012	30S рибосомный белок S12	37552	37552	37552	1636
ВАСТ000016	30S рибосомный белок S16	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	2040
ВАСТ000019	30S рибосомный белок S19	1361	Нов(1)	1361	1361
ВАСТ000020	30S рибосомный белок S20	1506	1506	1506	1954
ВАСТ000030	50S рибосомный белок L1	2995	Нов(1)	2995	2995
ВАСТ000032	50S рибосомный белок L3	1821	Нов(1)	1821	1821
ВАСТ000034	50S рибосомный белок L5	38154	38154	38154	1657
ВАСТ000035	50S рибосомный белок L6	41915	41915	41915	1701
ВАСТ000039	50S рибосомный белок L10	2107	80978	2107	2107
ВАСТ000040	50S рибосомный белок L11	1666	Нов(1)	1666	1666
ВАСТ000048	50S рибосомный белок L19	1641	Нов(1)	1641	1641
ВАСТ000051	50S рибосомный белок L22	31118	31118	31118	1559
CHLAM0129	ABC Транспортёр аминокислот	45	Нов(1)	45	45
CHLAM0130	ABC Транспортёр аминокислот АТФаза	56	Нов(1)	56	56
CHLAM0202	Олигопептидная транспортная АТФаза	44	Нов(1)	44	44

CHLAM0204	Дикарбоксилатный транслокатор	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	34
CHLAM0216	Транспортер аминокислот	Нов(1)	Нов(2)	27	38
CHLAM0374	Аргинин/Орнитин Антипортер	31	Нов(1)	31	31
CHLAM0381	Аргинин-связывающий белок	57	Нов(1)	57	57
CHLAM0409	Пермеаза аминокислот	Нов(1)	23	23	23
CHLAM0415	Белок связывающий растворенные вещества	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	X
CHLAM0554	Аминокислотный (разветвленный) транспортер	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	65
CHLAM0684	ABC Транспортер	34	Нов(1)	34	34
CHLAM0689	Транспортная ABC АТФаза	34	Нов(1)	34	34
CHLAM0690	Транспортная ABC АТФаза	75	75	75	74
CHLAM0692	Фосфатная пермеаза	76	Нов(1)	76	76
CHLAM0735	D-Ala/Gly пермеаза	80	Нов(1)	80	80
CHLAM0817	Тирозин Транспортер	67	Нов(1)	67	67
CHLAM0818	Тирозин Транспортер	47	Нов(1)	47	47
CHLAM0819	Транспортер пермеазы	Нов(1)	Нов(1)	Нов(1)	9
CHLAM0854	ABC Пермеаза-транспортер слитый с ферментом биосинтеза пиримидина	80	Нов(1)	80	80

Примечание – "*" – синим цветом обозначены локусы, имеющие одинаковый аллельный профиль, розовым цветом – локусы, отличные в одном из штаммов, оранжевым цветом – аллельные профили, уникальные для одного из сравниваемых штаммов; X – отсутствующие локусы в хромосоме.

Также помимо вышеуказанных семи групп, были идентифицированы локусы, которые не входили в функциональные группы, и были ассоциированы с различными функциями, включая кодирование белковых субъединиц бактериальных рибосом (локусы с префиксом ВАСТ00001–65), или являлись АТФ–связывающими кассетными транспортерами, играющими важную роль в жизнеспособности клеток, вирулентности и патогенности микроорганизма. Сравнение аллельных профилей трех изучаемых штаммов показало их существенные отличия от аналогичных параметров референтного штамма. В целом, количество новых локусов, аллельный профиль которых не был идентифицирован в базе данных, составило 143 для штамма BL–84, 50 локусов для штамма АМК–16 и 45 локусов для штамма Rostinovo–70, соответственно.

Важно отметить, что наибольшую вариабельность относительно референтного штамма GR9 продемонстрировал штамм BL–84. Изменения последовательностей, кодирующих белковые биомолекулы, затрагивали практически большинство жизненно важных аспектов указанного штамма, начиная от формирования клеточной оболочки и заканчивая биохимическими процессами, происходящими внутри клетки, т.е. носили конститутивный характер. Такая выраженная вариабельность большинства локусов относительно референтного штамма вероятнее всего связана с процессами адаптации штамма BL–84 к макроорганизму хозяина (лиса). Изолированные от МРС штаммы АМК–16 и Rostinovo–70 обладали гораздо меньшим количеством вариабельных локусов, однако тоже имели отличия от референтного штамма, что позволяет сделать заключение об эволюционных процессах у хламидий, обуславливающие высокую адаптивную способность возбудителя хламидиоза к различным видам СХЖ.

Следующим этапом изучения молекулярно–генетических особенностей штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и BL–84 являлось детальное изучение

участка генома, расположенного в пределах 250 кб – 280 кб, обнаруженного при сравнении хромосом указанных штаммов относительно референтного штамма с использованием ВВН.

Как было продемонстрировано на рисунке 11, указанный участок хромосом штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, BL–84 и AMK–16, в рамках данной работы, обозначенный нами как варибельный регион (ВР), имел процент идентичности относительно *C. psittaci* GR9 в пределах 90–95%. Для детального сравнительного анализа указанного региона с целью определения точной локализации в хромосоме исследуемых штаммов нами было произведено выравнивание с применением алгоритма Mauve (<https://darlinglab.org/mauve/mauve.html>). Результат выравнивания представлен на рисунке 12.

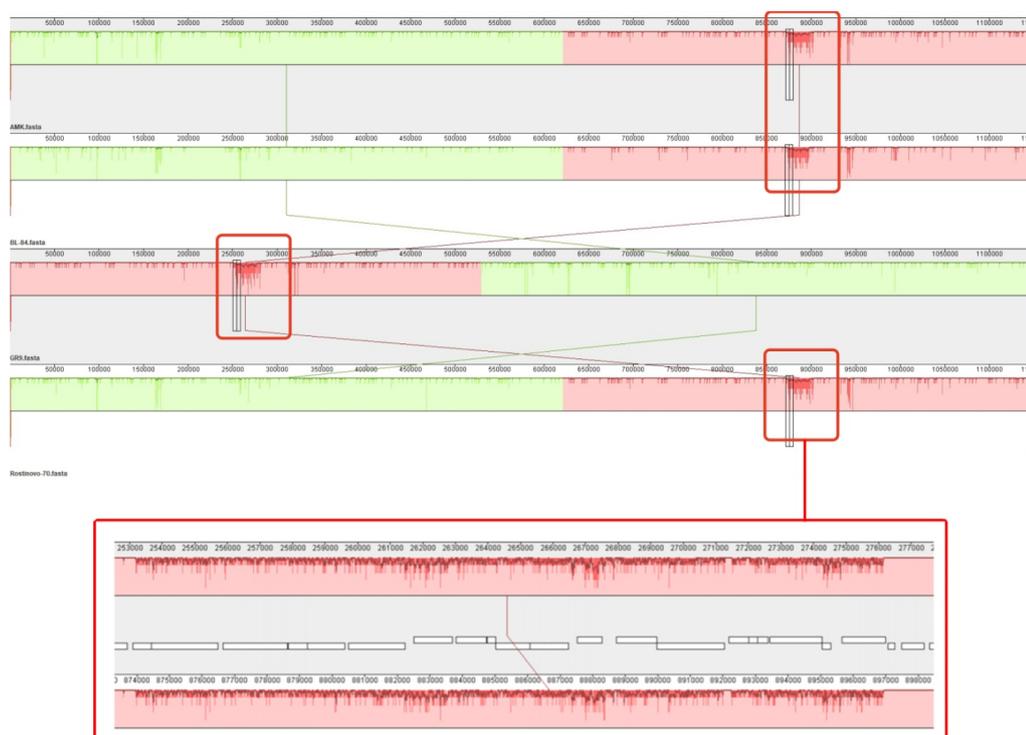


Рисунок 12 – Визуализация региона ВР хромосомы у штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, AMK–16 и BL–84 относительно референтного штамма *C. psittaci* GR9 с использованием алгоритма выравнивания Progressive Mauve (<https://darlinglab.org/mauve/mauve.html>)

Выравнивание с использованием Progressive Mauve позволило точно определить количество CDS, входящих в состав ВР, а также выявить его точное положение в хромосоме и общий размер. Согласно полученным данным, ВР имел размер 23,100 п.н. (включая последовательности CDS и межгенное пространство) и располагался в пределах 253 кб – 276 кб от начала точки репликации штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84. Краткая характеристика CDS входящих в указанный регион в сравнении с референтным штаммом приведена в таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика 20 CDS, входящих в состав региона ВР хромосомы штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84, выявленных при выравнивании алгоритмом Progressive Mauve

№	Штамм	Локус ID	Псевдоген	Продукт
1	GR9	B598_0269	–	белок семейства ДНК–3–метиладенингликозилазы
	ВЛ–84	MRE55_03975	+	
	Rostinovo–70	FI836_03950	+	
	АМК–16	GR632_03930	+	
2	GR9	B598_0270	–	белок семейства экзорибонуклеаз <i>vacB</i> и RNase II 3'–5'
	ВЛ–84	MRE55_03980	+	
	Rostinovo–70	FI836_03955	–	
	АМК–16	GR632_03935	–	
3	GR9	B598_0271	–	белок-шаперон DnaK
	ВЛ–84	MRE55_03985	+	
	Rostinovo–70	FI836_03960	–	
	АМК–16	GR632_03940	–	
4	GR9	B598_0272	–	семейство белков <i>grpE</i> фактор обмена нуклеотидов <i>GrpE GrpE</i>
	ВЛ–84	MRE55_03990	–	
	Rostinovo–70	FI836_03965	–	
	АМК–16	GR632_03945	–	
5	GR9	B598_0273	–	индуцируемый репрессор транскрипции <i>HrcA</i>
	ВЛ–84	MRE55_03995	–	
	Rostinovo–70	FI836_03970	–	
	АМК–16	GR632_03950	–	
6	GR9	B598_0274	–	пролил-тРНК синтетаза Пролин-тРНК-лигаза
	ВЛ–84	MRE55_04000	+	
	Rostinovo–70	FI836_03975	–	

	AMK-16	GR632 03955	–	
7	GR9	B598 0275	–	Гипотетический белок
	BL-84	MRE55 04005	–	
	Rostinovo-70	FI836 03980	–	
	AMK-16	GR632 03960	–	
8	GR9	B598 0276	–	putative lipoprotein
	BL-84	MRE55 04010	–	Гипотетический белок
	Rostinovo-70	FI836 03985	–	
	AMK-16	GR632 03965	–	
9	GR9	B598 0277	–	Гипотетический белок
	BL-84	MRE55 04015	–	DUF167 белок-содержащий домен
	Rostinovo-70	FI836 03990	–	Гипотетический белок
	AMK-16	GR632 03970	–	
10	GR9	B598 0278	–	субстрат-связывающий белок семейства ABC-транспортеров
	BL-84	MRE55 04020	–	
	Rostinovo-70	FI836 03995	–	
	AMK-16	GR632 03975	–	
11	GR9	B598 0279	–	LL- диаминопимел аминотрансфераза
	BL-84	MRE55 04025	–	
	Rostinovo-70	FI836 04000	–	
	AMK-16	GR632 03980	–	
12	GR9	B598 0280	–	Гипотетический белок
	BL-84	MRE55 04030	–	
	Rostinovo-70	FI836 04005	–	
	AMK-16	GR632 03985	–	
13	GR9	B598 0281	–	Гипотетический белок DUF1207 белок-содержащий домен
	BL-84	MRE55 04035	+	
	Rostinovo-70	FI836 04010	–	
	AMK-16	GR632 03990	–	
14	GR9	B598 0282	–	Гипотетический белок Семейство белков LOG
	BL-84	MRE55 04040	–	
	Rostinovo-70	FI836 04015	–	
	AMK-16	GR632 03995	–	
15	GR9	B598 0283	–	Гипотетический белок Семейство белков MYG1
	BL-84	MRE55 04045	+	
	Rostinovo-70	FI836 04020	+	Гипотетический белок
	AMK-16	GR632 04000	+	
16	GR9	B598 0285	–	доменный белок HIT
	BL-84	MRE55_04050	–	Нуклеотидсвязывающий белок гистидиновой триады Семейство белков MYG1
	Rostinovo-70	FI836 04025	–	
	AMK-16	GR632 04005	–	

17	GR9	B598_0286	–	Гипотетический белок
	BL–84	MRE55_04055	+	HEAT белок, содержащий повторный домен
	Rostinovo–70	FI836_04030	–	Нуклеотидсвязывающий белок гистидиновой триады
	AMK–16	GR632_04010	–	НIT белок, содержащий домен
18	GR9	B598_0287	–	Гипотетический белок
	BL–84	MRE55_04060	–	
	Rostinovo–70	FI836_04035	–	HEAT белок, содержащий повторный домен
	AMK–16	GR632_04015	–	
19	GR9	B598_0288	–	растворенный белок семейства симпортеров
	BL–84	MRE55_04065	–	
	Rostinovo–70	FI836_04040	–	Гипотетический белок
	AMK–16	GR632_04020	–	
20	GR9	B598_0289	–	предполагаемый белок внутренней мембраны
	BL–84	MRE55_04070	+	Гипотетический белок
	Rostinovo–70	FI836_04045	–	натрий: растворенный белок семейства симпортеров
	AMK–16	GR632_04025	–	

Примечание – "*" – Данные получен на основе аннотации PGAP; "–" – CDS не является псевдогеном; "+" – CDS является псевдогеном.

Как видно из таблицы 10, в целом 12 из 20 CDS (60%) оказались псевдогенами, либо утратившими способность кодировать белки, либо кодирующие укороченные белки, за счет наличия стоп-кодонов в соответствующей нуклеотидной последовательности. При этом наибольшее количество псевдогенов в указанном регионе хромосомы было идентифицировано у штамма *C. psittaci* BL–84 – 8 из 20 (40%), против 2 из 20 (10%) у штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70 и *C. psittaci* AMK–16. Поскольку указанные CDS имели более низкий процент гомологии в отношении референтного штамма (95% по результатам BLASTP), нами был проведен анализ каждого CDS с целью поиска гомологичных последовательностей в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Результаты сравнения 20 CDS с последовательностями из NCBI GenBank представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Характеристика кодирующих регионов, входящих в ВР хромосом штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84*

№	Гомология с другими видами <i>C. psittaci</i> из NCBI GenBank	Процент идентичности, %	Источник изоляции референтных штаммов
1	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	97,91	попугай
	<i>C. abortus</i> LLG	97,91	коза
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	97,73	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	97,73	як
	<i>C. abortus</i> strain 1H	97,73	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	97,73	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	97,73	овца
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	97,73	Н/Д*
2	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	99,17	попугай
	<i>C. abortus</i> LLG	99,12	коза
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	99,02	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain GN6	98,98	як
	<i>C. abortus</i> strain 1H	98,98	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	98,98	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	98,93	овца
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	98,93	овца
3	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	99,39	попугай
	<i>C. abortus</i> strain GN6	99,29	як
	<i>C. abortus</i> LLG	99,29	коза
	<i>C. abortus</i> strain 1H	99,29	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	99,29	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	99,24	овца
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	98,43	кряква
	<i>C. psittaci</i> NJ1	95,35	индейка
4	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	98,96	попугай
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	98,96	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	98,78	овца

	<i>C. abortus</i> strain GN6	98,78	як
	<i>C. abortus</i> LLG	98,78	коза
	<i>C. abortus</i> strain 1H	98,78	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	98,78	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	98,78	овца
5	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	99,91	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	98,54	попугай
	<i>C. abortus</i> LLG	98,36	коза
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	98,28	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain 1H	98,28	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	98,19	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	98,19	як
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	98,19	овца
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	98,16	кряква
6	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	99,94	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	98,73	попугай
	<i>C. abortus</i> LLG	98,73	коза
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	98,56	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	98,56	овца
	<i>C. abortus</i> strain 1H	98,50	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain GN6	98,50	як
	<i>C. abortus</i> CAAB7	98,50	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	96,43	кряква
7	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	97,16	попугай
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	97,16	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	97,16	як
	<i>C. abortus</i> strain 1H	97,16	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	97,16	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	97,16	овца
	<i>C. abortus</i> LLG	96,83	коза
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	96,41	Н/Д**
8	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	99,68	попугай
	<i>C. abortus</i> strain GN6	99,68	як
	<i>C. abortus</i> strain 1H	99,68	Н/Д**

	<i>C. abortus</i> CAAB7	99,68	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	99,58	овца
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	97,16	овца
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	96,99	кряква
	<i>C. abortus</i> LLG	96,99	коза
9	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	98,97	попугай
	<i>C. abortus</i> strain GN6	98,63	як
	<i>C. abortus</i> LLG genome	98,63	коза
	<i>C. abortus</i> strain 1H	98,63	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	98,63	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	98,28	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	98,28	овца
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	98,28	овца
10	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	99,52	попугай
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	99,43	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	99,43	як
	<i>C. abortus</i> strain 1H	99,43	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	99,43	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> LLG genome	99,33	коза
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	98,85	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	97,03	кряква
11	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	99,33	попугай
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	99,33	овца
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	99,33	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	99,25	як
	<i>C. abortus</i> LLG genome	99,25	коза
	<i>C. abortus</i> strain 1H	99,25	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	99,25	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	99,16	Н/Д**
12	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	98,04	попугай

	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	97,65	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	97,65	як
	<i>C. abortus</i> LLG	97,65	коза
	<i>C. abortus</i> strain 1H	97,65	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	97,65	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	97,65	овца
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	97,39	Н/Д**
13	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	98,95	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> LLG	98,95	коза
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	98,87	попугай
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	98,71	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	98,71	як
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	98,71	овца
	<i>C. abortus</i> strain 1H	98,55	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	98,55	Н/Д**
14	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	98,99	попугай
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	98,99	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	98,94	як
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	98,94	овца
	<i>C. abortus</i> strain 1H	98,90	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	98,90	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> LLG	98,80	коза
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	97,22	кряква
15	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	100	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> LLG	100	коза
	<i>C. psittaci</i> Mat116	100	волнистый попугай
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	99,45	попугай
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	99,45	кряква
	<i>C. psittaci</i> strain Ful127	99,45	глупыш
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	99,45	овца
16	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	99,20	попугай

	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	99,08	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> LLG	98,74	коза
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	98,62	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	98,62	як
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	98,62	овца
	<i>C. abortus</i> strain 1H	98,51	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	98,51	Н/Д**
17	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	99,10	кряква
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	97,00	попугай
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	97,00	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	97,00	овца
	<i>C. abortus</i> LLG	97,00	коза
	<i>C. abortus</i> strain 1H	97,00	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	97,00	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	97,00	овца
18	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100,00	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	98,95	попугай
	<i>C. abortus</i> LLG	98,82	коза
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	98,76	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	98,76	як
	<i>C. abortus</i> strain S26/3	98,70	овца
	<i>C. abortus</i> strain 1H	98,64	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> CAAB7	98,64	Н/Д**
19	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	100	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	99,62	кряква
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	96,97	Н/Д**
	<i>C. abortus</i> strain 84/2334	96,59	попугай
	<i>C. abortus</i> LLG	96,59	коза
	<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	95,47	овца
	<i>C. abortus</i> strain GN6	95,47	як
	<i>C. abortus</i> strain 1H	95,47	Н/Д**
20	<i>C. abortus</i> strain 15–70d24	99,62	чирок–свистунок
	<i>C. abortus</i> strain 15–49d3	99,32	кряква
	<i>C. abortus</i> strain 15–58d44	96,92	Н/Д**

<i>C. abortus</i> strain 84/2334	96,85	попугай
<i>C. abortus</i> LLG	96,55	коза
<i>C. abortus</i> strain GIMC 2006:CabB577	96,40	овца
<i>C. abortus</i> strain S26/3	96,40	овца
<i>C. abortus</i> strain GN6	96,32	як
<i>C. abortus</i> strain 1H	96,25	Н/Д**

Примечание – "*" – данные получены с использованием алгоритма поиска идентичности BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); "**" – Н/Д– нет данных

По результатам сравнения нуклеотидных последовательностей 20 CDS было выявлено, что ВР демонстрировал высокую гомологию (в диапазоне 95–100%) с представителями *C. abortus*, изолированными от других СХЖ и диких птиц в разных странах мира. Появление таких CDS в составе хромосом штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84 предположительно указывает на гомологичную рекомбинацию, произошедшую в процессе горизонтального переноса генов от одного вида хламидий к другому. Ранее уже фиксировались процессы внутривидового обмена ДНК у других представителей *Chlamydiaceae*. Согласно литературным данным, это происходит достаточно часто (Martí H., Suchland R.J., Rockey D.D., 2022). Так, исследования геномов штаммов, после культивирования *in vitro* продемонстрировали гомологичные рекомбинации между хламидиями видов *C. trachomatis*, *C. muridarum* и *C. suis* (Martí H., Suchland R.J., Rockey D.D., 2022).

Финальным этапом изучения молекулярно–генетических особенностей штаммов *C. psittaci* являлось сравнение крипточеских плазмид, обнаруженных у штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70 и АМК–16. Наличие крипточеской плазмиды являлось характерным отличием указанных штаммов от *C. psittaci* ВЛ–84 и «дикого» штамма *C. psittaci* GR9, что так же свидетельствовало об эволюционных

изменениях изучаемых штаммов. Выравнивание последовательностей плазмид с использованием алгоритма Progressive Mauve (<https://darlinglab.org/mauve/mauve.html>) представлено на рисунке 13.

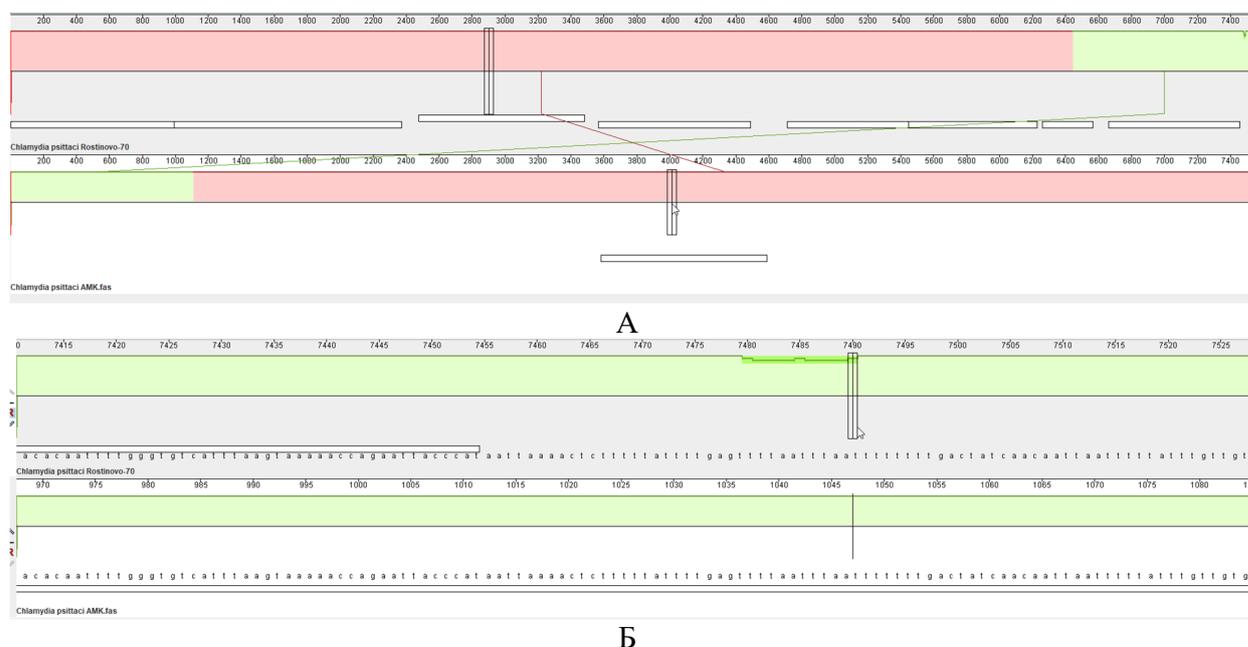


Рисунок 13 – Выравнивание криптоических плазмид штаммов *C. psittaci* AMK–16 и Rostinovo–70: локализация инсерции (вставки) олигонуклеотида Т в позиции 7490 у штамма Rostinovo–70 (А) относительно криптоической плазмиды AMK–16 (Б)

При сравнительном выравнивании плазмид штаммов *C. psittaci* AMK–16 и Rostinovo–70, в штамме AMK–16 обнаружено выпадение тимина в позиции 7490, расположенного в межгенном пространстве (Рисунок 13). Других отличий, как в нуклеотидных последовательностях кодирующих регионов, так и в межгенных областях двух указанных штаммов не было. Плазмиды были идентифицированы у многих видов и штаммов хламидий, которые заражают различные виды животных (хозяев), однако являются высококонсервативными и кодируют 8 предполагаемых открытых рамок считывания (ORF), обозначенных как pORF1–8. Часть плазмидных белков оказывают минимальное влияние на экспрессию

других генов, однако играют существенную роль при заражении животных (Zhong G., 2017).

Таким образом, детальный молекулярно–генетический анализ хромосом и плазмид штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84 позволил выявить уникальные генетические особенности, заключающиеся в наличии варибельных локусов относительно референтного штамма, наличии плазмид у АМК–16 и Rostinovo–70, а также уникального региона гомологичной рекомбинации с представителями вида *C. abortus* в составе хромосом. Изучение уникальных генетических особенностей возбудителей инфекционных болезней животных играет важную роль с точки зрения диагностических мероприятий во время вспышек инфекционных заболеваний. Отслеживание изменений в геноме патогенных микроорганизмов, в частности при выявлении новых или мутантных штаммов возбудителей, способствует определению новых генетических маркеров для диагностики, а также совершенствованию существующих подходов к конструированию вакцин нового поколения, пригодных для применения в практической ветеринарии.

2.2.1.8. Выявление генов антибиотикорезистентности в геномах штаммов *C. psittaci* Rostinovo–70, АМК–16 и ВЛ–84

На сегодняшний день применение антибиотиков при лечении ИБ животных является одним из самых распространенных методов терапии в ветеринарной медицине. За последние шестьдесят лет для борьбы с хламидийными патогенами (*C. abortus*, *C. psittaci* и *C. pecorum*) наибольшую эффективность продемонстрировали тетрациклины (Ungemach F.R., Müller–Bahrtd D., Abraham G., 2006), макролиды (ингибиторы синтеза белка), хинолоны и рифампины (ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот) (Kohlhoff S.A., Hammerschlag M.R., 2015). Однако в последние годы все чаще регистрируются случаи возникновения фенотипической устойчивости к антибиотикам и неэффективности лечения

хламидийной инфекции. Согласно литературным источникам (Horizontal transfer of tetracycline..., 2009; Resistance to a novel..., 2012; Genomic and phenotypic..., 2013; Sandoz K.M., Rockey D.D., 2010), представители разных видов хламидий обладают способностью приобретать резистентность к антибиотикам в связи с различными генетическими событиями, например, таких как мутации, рекомбинации и др., также имеются сообщения об обнаружении у хламидий мультиантибиотикорезистентных штаммов (The animal Chlamydiae: Recent..., 2016). На сегодняшний день предложены различные протоколы для тестирования хламидий на устойчивость к антибиотикам, однако не существует единого общепринятого стандартизированного теста, разработанного для этих целей (Evaluating the Antibiotic..., 2018).

Таким образом, особую важность представляло изучение наличия или отсутствия генов резистентности к противомикробным препаратам у исследуемых штаммов *C. psittaci* AMK-16, Rostinovo-70 и BL-84, вызвавших вспышки инфекционных аборт у СХЖ.

Анализ нуклеотидных последовательностей хромосом и плазмид штаммов *C. psittaci* AMK-16, Rostinovo-70 и BL-84 на серверах базы данных CARD (<https://card.mcmaster.ca/>), позволяющей проводить сравнение геномных последовательностей изучаемых штаммов с последовательностями известных генов устойчивости к антибиотикам (включая SNPs) (CARD 2020: antibiotic..., 2020), показал отсутствие генов резистентности в указанных штаммах. Это может свидетельствовать об отсутствии генетически детерминированной резистентности исследуемых штаммов к известным противомикробным препаратам, обозначенным в базе данных CARD.

Таким образом, можно заключить о сохранении чувствительности данных штаммов к широкому классу лекарственных препаратов ветеринарного

применения и перспективы дальнейшего использования в практической ветеринарии.

2.2.2.1. Индикация и молекулярно–генетическая характеристика потенциального возбудителя инфекции органов репродуктивной системы КРС с применением метагеномного анализа и платформ NGS–2 и NGS–3

Как известно, в настоящее время к числу потенциальных возбудителей инфекционных абортос СХЖ относят целый спектр патогенов, способных, в ряде случаев, вызывать ИБ со сходными клиническими проявлениями в виде воспаления уrogenитального тракта, повышения температуры тела, незначительного угнетения, уменьшения аппетита, абортов, и др. При этом, помимо микроорганизмов, относящихся к III – IV группе патогенности (СП), этиологическим фактором воспалительных процессов репродуктивной системы животных могут выступать и возбудители оппортунистических заболеваний. Так, недавно сообщалось о способности представителей семейства *Enterobacteriales* – *E. coli*, *Enterobacter cloacae* и др., вызывать инфекционные аборты у МРС, КРС и лошадей (Abortion in small ruminants..., 2012; First report of *Enterobacter*..., 2020; Weber R., Hospes R., Wehrend A., 2018). Однако индикация и идентификация последних серологическими и бактериологическими методами зачастую может быть затруднена ввиду сложности прогнозирования наличия в биоматериале больного животного конкретных возбудителей оппортунистических заболеваний и, соответственно, подбора специальных селективных сред. Другой проблемой может являться снижение способности у ряда бактериальных патогенов или отдельных штаммов микроорганизмов вплоть до отсутствия пролиферации на рутинных питательных средах в условиях *in vitro* (Безбородова Н.А., Ким Н.А., 2018; Лаптев Г.Ю., Новикова Н.А., Ильина Л.А., 2014; Ряпосова М.В., Белоусов А.И., Беспмятных Е.Н. 2013). Поэтому для детекции и последующей идентификации таких агентов необходимы

специальные перевиваемые клеточные линии или культивирование на куриных эмбрионах (Бобина Е.А., Корниенко Е.И., Горковенко Н.Е., 2018). Альтернативным методом индикации является NGS-секвенирование биоматериала от больного животного с последующим метагеномным анализом и обнаружением ДНК возбудителя – потенциального этиологического фактора ИБ (Алексеева А. Е., Бруснигина Н. Ф., 2014).

Использование данного подхода для анализа «сырых» данных, полученных в результате секвенирования, позволяет определять весь спектр инфекционных агентов, представленных в анализируемом образце биоматериала. Большим преимуществом данного метода является также возможность идентификации всех генов, включая гены резистентности, детерминирующие устойчивость возбудителя ИБ к антибиотикам и другим лекарственным препаратам. Появление и быстрое распространение в мире резистентных, в том числе, мультирезистентных штаммов микроорганизмов считается одной из актуальных проблем в сельском хозяйстве, что связывают, в том числе, с бесконтрольным применением кормовых антибиотиков (Забровская А.В., 2013). Очевидно, что контроль за распространением антибиотикорезистентных штаммов диктует необходимость установления точного спектра генов, ответственных за развитие бактериальной резистентности.

Также, немаловажным фактором в диагностике инфекционных заболеваний животных является точная идентификация патогена, вовлеченного в развитие инфекционного процесса. Применение платформ секвенирования NGS второго и третьего поколения (NGS-2 и NGS-3, соответственно) позволяет производить расшифровку и сборку нуклеотидных последовательностей бактериальных патогенов до контигов и полных геномов, что, в свою очередь, открывает возможности для детального изучения их геномной структуры, включающего определение точного таксономического положения, а также

является полезным инструментом как средство мониторинга мутаций, приводящих к лекарственной устойчивости (Henson J., Tischler G., Ning Z., 2012).

Целью настоящего раздела явилось применение платформ NGS–2 и NGS–3 для индикации и идентификации потенциального возбудителя инфекционной болезни КРС с воспалением органов репродуктивной системы и анамнестическими абортами с последующей краткой молекулярно–генетической характеристикой геномной последовательности и таргетных генов, включая гены резистентности к противомикробным препаратам.

2.2.2.2. Краткая характеристика необработанных прочтений ДНК из биоматериала КРС (образец № 1), полученных с применением NGS–3

В соответствии с задачей 3 настоящего исследования, проводили секвенирование тотальной ДНК из биоматериала (вагинально–цервикальная слизь), полученного от КРС с клиническими проявлениями воспаления органов репродуктивной системы и анамнестическими абортами (обозначен нами как образец № 1), с использованием платформы NGS–3. Результаты секвенирования образца № 1 представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Краткая характеристика и показатели прочтений ДНК, изолированной из биоматериала КРС (образец № 1), полученных на платформе NGS–3

Основные характеристики прочтений (ридов) ДНК	Значения размера прочтений и их количество
Общий размер, п.н.	1,526,561,299
Количество последовательностей в ридах	1,056,043
Средняя длина последовательности в ридах, п.н.	1,446 ± 1,944

Полученные прочтения с применением платформы NGS–3 имели оптимальную длину ридов для генерации набора контигов с покрытием >100x при последующей сборке генома методом *de novo*.

2.2.2.3. Метагеномный анализ данных, полученных в результате секвенирования ДНК образца № 1 на платформе NGS–3

С целью индикации и последующей идентификации потенциального возбудителя ИБ в биоматериале от КРС, согласно задаче 3 настоящего исследования, следующим этапом было проведение метагеномного анализа «сырых» прочтений ДНК образца № 1, полученных с применением платформы NGS–3. В результате анализа прочтений удалось идентифицировать таксономическую принадлежность для каждого рида, включающую в себя домен, тип, класс и отряд (Рисунок 14).

Согласно диаграммам распределения таксономических рангов внутри прочтений NGS–3 (Рисунок 14), доминирующее число ридов (более 96,%) было отнесено к домену бактерий. Наличие последовательностей, принадлежащих к доменам вирусов и архей, в массиве данных, составило примерно 0,5% от всех ридов, что позволило исключить их из дальнейшего анализа. Также стоит отметить, что среди прочтений были идентифицированы риды, отнесенные к порядку *Chlamydiales*, включающему бактерий из класса *Chlamydia*. Однако из-за низкого процентного содержания указанных последовательностей в общем массиве данных при последующей биоинформатической обработке получить подтверждение наличия данных патогенов в образце № 1 не удалось.

Большая часть прочтений (около 70%) была идентифицирована и отнесена к классу гамма–протеобактерий и порядку *Enterobacterales*, который включает в себя ряд патогенных и условно–патогенных микроорганизмов (сальмонеллы, кишечная палочка и др.) (Janda J.M., Abbott S.L., 2021).

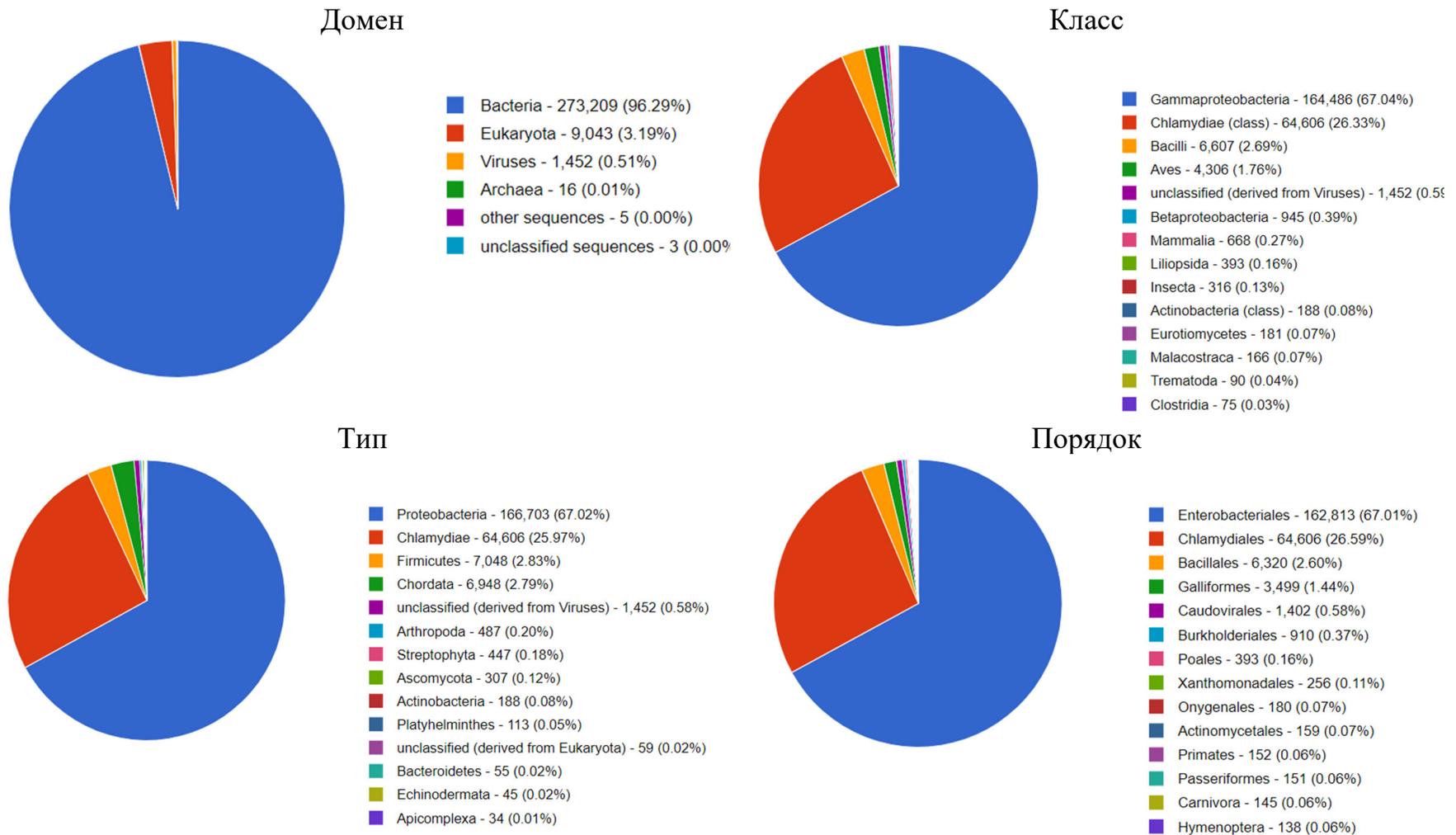


Рисунок 14 – Иерархическая классификация распределения таксономических рангов в прочтениях ДНК образца № 1, полученных на платформе NGS-3

2.2.2.4. Биоинформатическая обработка данных, полученных в результате секвенирования ДНК образца № 1 на платформе NGS–3

Для последующего анализа прочтений, полученных в результате применения платформы NGS–3, нами была произведена биоинформатическая обработка массива данных для образца № 1. С этой целью были удалены последовательности адаптеров, входящих в состав прочтений и произведена фильтрация ридов по качеству с использованием скрипта *Filtlong* согласно рекомендациям по установке минимальных порогов качества (<https://github.com/rrwick/Filtlong/tree/main/scripts>). Минимальный порог отсечения ридов составил 1000 п.н. (параметр «*–min_length*»). В результате фильтрации с применением автоматизированной оценки качества прочтений из общего массива данных образца № 1 было удалено 10% ридов как несоответствующих заданным параметрам оценки качества.

2.2.2.5. Краткая характеристика необработанных прочтений, полученных в результате секвенирования ДНК образца № 1 из биоматериала от КРС с инфекцией органов репродуктивной системы с применением платформы NGS–2

На предыдущем этапе секвенирования биоматериала от КРС с анамнестическими абортами на платформе NGS–3 методом метагеномного анализа были получены данные о содержании в образце № 1 последовательностей ДНК микроорганизмов, принадлежащих к порядку *Enterobacteriales* (см. Рисунок 14). Однако полученных данных оказалось недостаточно для определения видовой принадлежности и уточнения таксономической принадлежности потенциального возбудителя ИБ у КРС, так как данный порядок включает в себя множество микроорганизмов, относящихся к патогенной или условно–патогенной флоре. С целью дальнейшей идентификации и выявления таксономического положения возбудителя,

обнаруженного в биоматериале от КРС, на наш взгляд, наиболее оптимальным было использование платформы NGS–2. На сегодняшний день платформа NGS–2 является наиболее производительной и позволяет секвенировать миллионы фрагментов ДНК одновременно. Отличительной особенностью платформы NGS–2 считается направленность на получение нуклеотидных последовательностей целых геномов организмов (Современные методы секвенирования..., 2014).

Для повышения качества сборки методом *de novo* и последующей гибридной сборки геномной ДНК возбудителя ИБ КРС предварительно проводили накопление и выделение чистой культуры патогена на селективной среде Эндо (ГОСТ 32064–2013) с учетом полученных методом NGS–3 данных о принадлежности потенциального этиологического агента к порядку *Enterobacteriales*. Полученная культура штамма, обозначенная нами как «Saratov_2019» (образец № 2) и использованная для секвенирования на платформе NGS–2, была идентифицирована с помощью классических микробиологических методов как *E. cloacae*, что соотносилось с данными, полученными с применением платформы NGS–3 (см. Рисунок 14). Согласно литературным данным (*Enterobacter hormaechei subsp. oharae...*, 2005), комплекс *E. cloacae* в настоящее время включает в себя 6 видов микроорганизмов. Для уточнения видовой принадлежности выделенной культуры Saratov_2019 нами было произведено секвенирование изолированной бактериальной ДНК с использованием платформы NGS–2. В результате секвенирования были получены одноконцевые риды. Краткая характеристика полученных данных представлена в таблице 13.

При этом количество полученных данных при секвенировании ДНК образца № 2 на платформе NGS–2 (Таблица 13) согласовывалось с покрытием генома (более 100х) при подготовке геномной библиотеки.

Таблица 13 – Краткая характеристика и основные статистические показатели прочтений ДНК образца № 2, полученных с применением платформы NGS–2

Основные статистические показатели прочтений ДНК (ридов)	Значения размера прочтений и их количества
Общий размер ридов, п.н.	2,664,159,500
Количество последовательностей в ридах	10,656,638
Средняя длина последовательности в ридах, п.н.	250 ± 0

2.2.2.6. Метагеномный анализ данных, полученных в результате секвенирования ДНК образца № 2 с применением платформы NGS–2

Для выявления контаминации и сопоставления данных, полученных с применением платформы NGS–3, «сырые» данные после прочтения ДНК образца № 2 на платформе NGS–2 так же были проанализированы с использованием сервиса метагеномного анализа.

В результате большинство коротких прочтений (более 90 %) ДНК образца № 2, полученных после секвенирования на платформе NGS–2, было идентифицировано и отнесено к порядку *Enterobacterales*, что согласовывалось с результатами секвенирования длинных прочтений NGS–3. Также удалось идентифицировать таксономическую принадлежность коротких ридов образца № 2 к роду *Enterobacter* (Рисунок 15).

Таким образом, применение платформы NGS–2 позволило подтвердить принадлежность ДНК образца № 2 к роду *Enterobacter*.

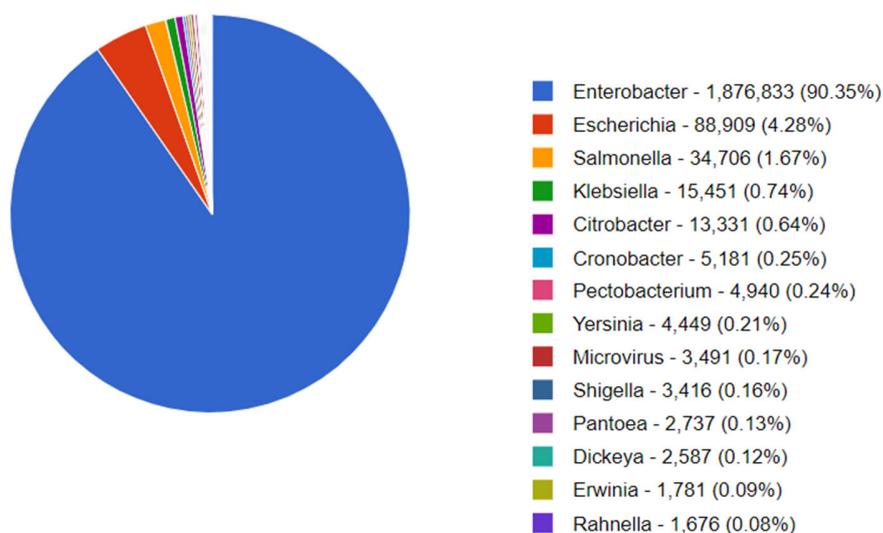


Рисунок 15 – Иерархическая классификация распределения таксономических рангов в «сырых» ридах образца № 2, полученных на платформе NGS–2

2.2.2.7. Биоинформатическая обработка данных, полученных при секвенировании ДНК образца № 2 на платформе NGS–2

Для более детальной молекулярно–генетической характеристики потенциального возбудителя инфекционного аборта, обнаруженного в биоматериале от КРС, необходимо было произвести сборку генома методом *de novo*. В связи с этим следующим этапом работы являлась биоинформатическая обработка «сырых» прочтений ДНК образца № 2 с платформ NGS–2 и NGS–3. Результаты оценки качества прочтений FastQC указанного генетического материала после применения платформы NGS–2 представлены на рисунке 16.

Согласно полученным данным оценки качества (Рисунок 16), часть ридов с наиболее низкой оценкой (<20) имела длину прочтения 249–250 п.н. Поэтому нами была произведена процедура удаления части прочтений и триммирование адаптеров с использованием автоматического скрипта AfterQC. Результат повторной оценки качества после удаления из массива данных последовательностей с низким качеством представлен на рисунке 17.

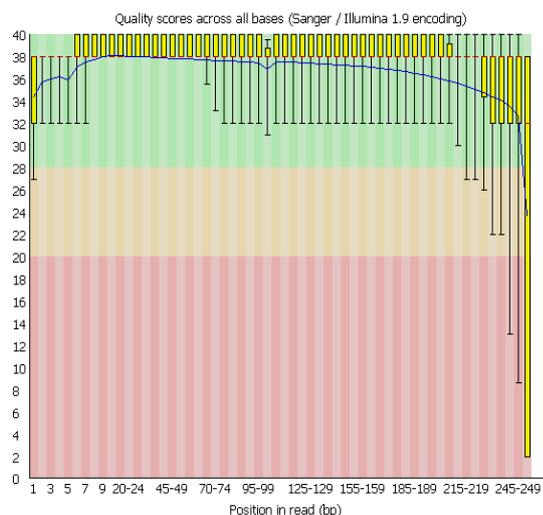


Рисунок 16 – Оценка качества прочтений ДНК образца № 2, полученных на платформе NGS–2

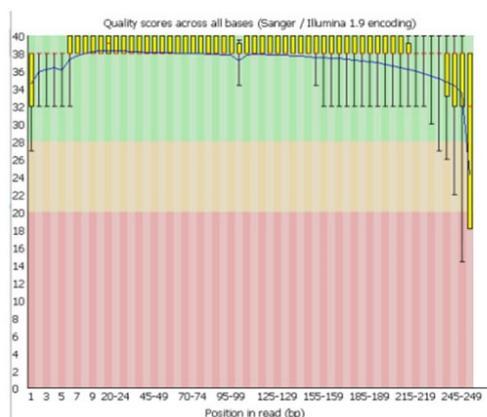


Рисунок 17 – Результат повторной оценки качества прочтений ридов, полученных в результате секвенирования ДНК образца № 2 на платформе NGS–2, после фильтрации AfterQC

Как показано на рисунке 17, после фильтрации данных, большая часть прочтений размером 249–250 п.н. с низким и качеством была успешно удалена из общего массива данных. Удаление адаптеров и последовательностей с низким качеством из данных NGS–2 являлось последним этапом подготовки, так как метагеномный анализ не выявил значительной контаминации в составе прочтений.

2.2.2.8. Полногеномная сборка методом *de novo* ДНК образца № 2

Согласно задаче 4, для определения видовой принадлежности и последующей молекулярно–генетической характеристики штамма *Enterobacter* *Saratov_2019* – потенциального возбудителя ИБ КРС, следующим этапом настоящего исследования являлась полногеномная сборка данного микроорганизма.

Для улучшения качества сборки штамма *Saratov_2019* была использована гибридная сборка методом *de novo*, основанная на данных NGS–2 и NGS–3. Нами было сгенерировано 3 сборки с различным количеством контигов и общей длиной нуклеотидной последовательности от 3 до 4,7 Мб п.н. Результаты сборок ассемблера представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Характеристика сборок штамма *Saratov_2019* с использованием различных параметров ассемблера

№	Параметры ассемблера Unicycler	Кол-во контигов	Общая длина сборки, п.н.	Максимальная длина контига, п.н.
1	--mode normal	150	4,700,545	54,6789
2	--mode conservative	78	4,637,924	50,7577
3	Только данные NGS–2	17	3,185,469	53,8917

Первая сборка производилась с использованием параметра «--mode normal» («по умолчанию»), что позволило сгенерировать 150 контигов. Из–за высокой фрагментации полученной сборки, нами была произведена повторная сборка с использованием параметра «--mode conservative» («консервативный режим»). Данный параметр не позволял произвести полную сборку геномной ДНК штамма *Saratov_2019* до кольцевой хромосомы, но при этом существенно снижался низкий риск неправильной сборки. Тем не менее, в результате использования «консервативного режима» удалось сократить количество контигов с 150 до 78,

что существенно увеличило покрытие генома. Стоит отметить, что 11 контигов с номерами 68–78 были исключены из последующего анализа и депонирования в NCBI GenBank, так как имели размер менее 200 п.н.

Третья сборка была осуществлена с использованием данных секвенирования ДНК образца № 2 на платформе NGS–2. В результате было получено 17 контигов, однако длина суммарной последовательности оказалась на 1,452,455 п.н. меньше по сравнению с таковой, сгенерированной в результате 2–й сборки «в консервативном режиме». Считается, что при сборке генома методом *de novo* наиболее предпочтительной сборкой является та, в которой содержится наименьшее число контигов. Однако, не менее важным параметром является длина полученных контигов. Согласно рекомендациям (Романенков К.В., 2017), при сравнении двух различных сборок предпочтительнее выбирать тот вариант, в котором длина последовательностей является наибольшей. Таким образом, для последующего анализа и аннотирования нами была выбрана 2–я сборка штамма *Saratov_2019* ввиду оптимального числа контигов и длины сборки, соответствующей референтным штаммам.

2.2.2.9. Филогенетический анализ штамма *Enterobacter Saratov_2019*

Сборка и аннотирование генома штамма *Enterobacter Saratov_2019* позволила перейти к следующему этапу исследования – определению таксономического положения возбудителя ИБ КРС относительно гомологичных штаммов с использованием филогенетического анализа.

База данных TYGS содержит коллекцию из 14,706 микробных геномов и позволяет определить принадлежность новых штаммов к определенному виду путем сравнения с референтными последовательностями микроорганизмов (Meier–Kolthoff J.P., Göker M., 2019). Для выявления видовой принадлежности, контиги штамма *Enterobacter Saratov_2019* были загружены в указанную базу данных с целью сравнения с геномами представителей комплекса *E. cloacae*.

Результат филогенетического анализа полученной сборки штамма *Enterobacter* Saratov_2019 представлен на рисунке 18.

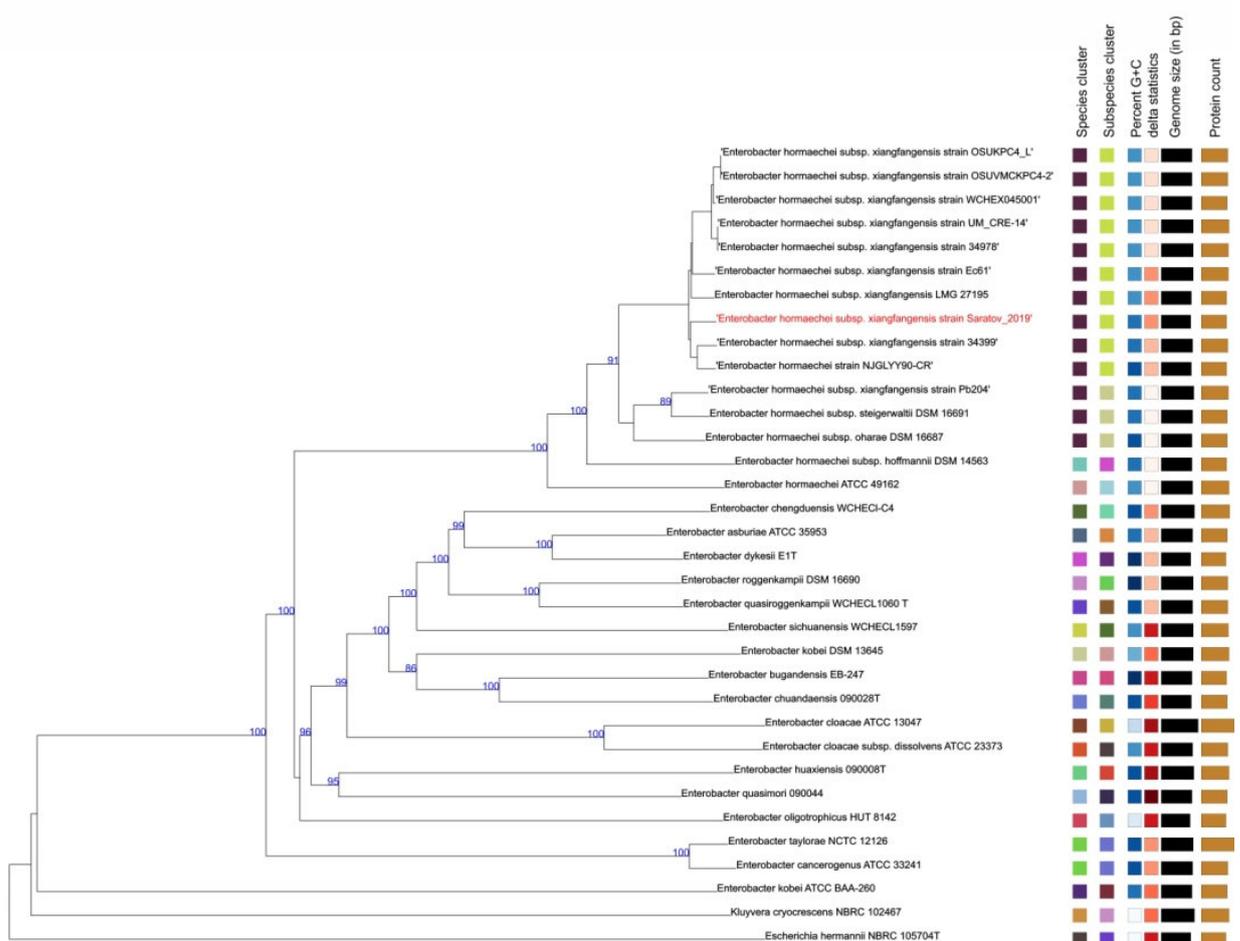


Рисунок 18 – Филогенетический анализ контигов штамма *Enterobacter* Saratov_2019 с использованием референтных последовательностей микроорганизмов из базы данных TYGS. В графе Species и subspecies cluster представлена гомология для штаммов, входящих в единую кладу (гомологичные штаммы обозначены одинаковым цветом). Percent G+C визуализирует различия гуанин–цитозинового состава полногеномных последовательностей штаммов, представленных в филогенетическом дереве. Delta statistics отображает дистанцию между таксонами. Genome size (в п.н.) показывает различия в размере генома штаммов, использованных в филогенетическом анализе. Protein count – указывает на количество кодирующих регионов в составе полногеномной последовательности штаммов

Согласно полученным данным (Рисунок 18), с использованием метода Genome BLAST Distance Phylogeny, было продемонстрировано, что штамм Saratov_2019 имел самую высокую степень гомологии (93,5%, CI 91,6–95,0) и формировал филогенетический кластер с эталонными штаммами *E. hormaechei subsp. xiangfangensis*, но не с представителями других видов *Enterobacter spp.* Это позволило сделать заключение о принадлежности возбудителя ИБ КРС к виду *E. hormaechei* подвиду *subsp. xiangfangensis*. Дальнейшее сравнение штамма Saratov_2019 производилось со штаммами *E. hormaechei* NJGLYY90–CR и 34399, выбранными в качестве референтных для сравнительного анализа.

2.2.2.10. MLST штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019

Согласно задаче 4 настоящего исследования, следующим этапом характеристики штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 – возбудителя ИБ КРС явилось MLST на основе последовательностей семи генов «домашнего хозяйства». Исследование проводили согласно рекомендациям Miyoshi–Akiyama T. *et al.* (2013).

В результате анализа индивидуальных последовательностей указанных генов на сервере базы данных PubMLST для штамма Saratov_2019 были идентифицированы аллельные профили для семи локусов: *dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *purG*, *rplB* и *rpoB*. Комбинация аллельных профилей изучаемого штамма представлена в таблице 15.

Полученные данные о комбинации аллельных профилей позволили перейти к следующему этапу, которым являлось определение сиквенс–типа штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019. В результате сравнения комбинации локусов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 было обнаружено, что выявленная последовательность является новой и ранее не была депонирована в базу данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>).

Таблица 15 – Аллельные профили локусов семи генов «домашнего хозяйства», идентифицированных в полногеномной сборке штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019

Ген	Аллель	Длина	Номера контигов, в которых обнаружена последовательность гена «домашнего хозяйства»	Стартовая позиция	Конечная позиция	ST
<i>dnaA</i>	46	442	21	16,649	17,090	1416
<i>fusA</i>	21	646	4	224,217	224,862	
<i>gyrB</i>	19	434	21	20,325	20,758	
<i>leuS</i>	44	578	1	352,730	353,307	
<i>pyrG</i>	13	259	13	133,310	133,568	
<i>rplB</i>	4	607	32	21,752	22,358	
<i>rpoB</i>	6	545	29	4,470	5,014	

Соответствующий аллельный профиль состоял из уникальной комбинации ранее известных аллельных профилей семи генов «домашнего хозяйства», таких как *dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* и *rpoB* (<https://pubmlst.org>).

Таким образом, на основе новой комбинации локусов была установлена принадлежность штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 к сиквенс–типу ST1416, успешно присвоенному при депонировании в базу данных PubMLST (Номер доступа в базе PubMLST: id –1416).

Филогенетический анализ на основе объединенных последовательностей семи генов «домашнего хозяйства» выявил наибольшую гомологию нового аллельного профиля ST1416 с ранее депонированным профилем ST1348 (Рисунок 19).



Рисунок 19 – Филогенетическое дерево на основе объединенных последовательностей семи генов «домашнего хозяйства» (*dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* и *rpoB*) штаммов *E. hormaechei* (<https://pubmlst.org>). Штамм Saratov_2019 ST1416 обозначен зеленой точкой. Дерево было построено методом максимального правдоподобия в программе MEGA 7.0. Значения бутстрэпа = 100

Более подробный анализ аллельных профилей продемонстрировал, что от трех до четырех из семи аллелей штамма Saratov_2019 были идентичны таковым филогенетически близкого эталонного штамма *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* с ST1348, доступного в базе данных PubMLST (Таблица 16).

Как показано в таблице 16, идентичные аллели были следующими: *fusA*, *leuS* и *rplB* в штамме LMG27195, имеющем сиквенс-тип ST544; *leuS*, *rplB* и *rpoB* в штамме 34399, относящемся к ST114; *fusA*, *gyrB* и *leuS* в штаммах 34978, OSUKPC4_L, OSUVMCKPC4-2, UM_CRE-14 и WCHEX045001, обладающих сиквенс-типом ST171; *fusA*, *leuS*, *rplB* и *rpoB* в штаммах Ec61 и NJGLYY90-CR ST418, сиквенс-тип которых соответствовал ST451.

Таблица 16 – Сравнение аллельных профилей локусов семи генов «домашнего хозяйства», идентифицированных в полногеномной сборке *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 ST1416, и референтных штаммов *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* на основе филогенетического анализа

Штамм	ST	Номера аллельных профилей						
		<i>dnaA</i>	<i>fusA</i>	<i>gyrB</i>	<i>leuS</i>	<i>pyrG</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> strain Saratov 2019	1416	46	21	19	44	13 ^a	4	6
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> *	1348	46	21	19	44	45	4	6
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> LMG27195	544	10	21	9	44	45	4	33
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> strain 34399	114	53	35	20	44	45	4	6
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> strain 34978	171	49	21	19	44	45	12	32
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> strain OSUKPC4_L	171	49	21	19	44	45	12	32
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> strain OSUVMCKPC4-2	171	49	21	19	44	45	12	32
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> strain UM CRE-14	171	49	21	19	44	45	12	32
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> strain WCHEx045001	171	49	21	19	44	45	12	32
<i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> strain Ec61	451	146	21	148	44	99	4	6
<i>E. hormaechei</i> strain NJGLYY90-CR	418	53	35	154	44	45	4	6
<i>E. hormaechei</i> strain 1801 ^c	78	8	9	6	9	9	6	8

Примечание – "*" – Информация о названии штамма отсутствует в базе данных PubMLST; "a" – Разные аллели гена по сравнению с таковыми у штамма Saratov_2019 выделены красным цветом.

Тем не менее, штамм *E. hormaechei* ST1348 имел идентичный MLST профиль по шести аллелям и отличался от Saratov_2019 одним SNP в последовательности

гена *pyrG*. У штамма Saratov_2019 и эталонных штаммов *E. hormaechei* ST78, которые, вместе с ST171, также были идентифицированы как мультирезистентные штаммы, идентичных аллелей обнаружено не было. На филогенетическом дереве (Рисунок 19) ST78 образовал отдельную ветвь от других сиквенс-типов. И ST1416, и ST171 были обнаружены в одной и той же ветви, но при этом в тесно связанных кладах, что означает, что штаммы указанных сиквенс-типов могли иметь одного общего предка.

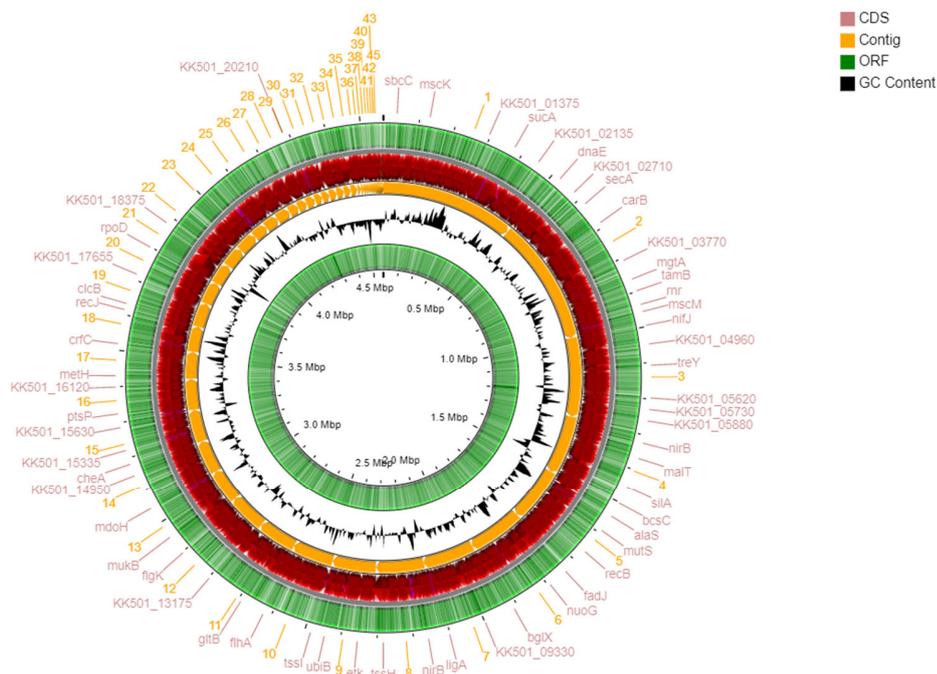
2.2.2.11. Молекулярно-генетическая характеристика штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 – потенциального возбудителя абортотрофной инфекции КРС

На следующем этапе диссертационного исследования проводили детальную молекулярно-генетическую характеристику штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 на основе собранных контигов.

После депонирования последовательностей штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 в базу данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA732817>) (Номер доступа: BioProject PRJNA732817), была произведена автоматическая аннотация контигов на основе NCBI PGAP. Результат аннотации контигов представлен на рисунке 20.

Как показано на рисунке 20, в результате аннотации были идентифицированы CDS, открытые рамки считывания и определен GC-состав каждого участка для каждого из 62 контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019. Подробный результат аннотации представлен в таблице 17.

Accession: PRJNA732817



Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis strain Saratov_2019

Рисунок 20 – Графическая визуализация аннотации контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis Saratov_2019* с использованием PGAP. Круговая диаграмма (зеленый цвет) отображает количество обнаруженных открытых рамок считывания. Красная диаграмма демонстрирует количество кодирующих регионов в составе контигов. Внутренняя диаграмма (желтый цвет) представляет количество контигов. Диаграмма (черный цвет) отображает распределение GC-состава для контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis Saratov_2019*

Таблица 17 – Краткая характеристика штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis Saratov_2019* на основе аннотации контигов с использованием PGAP

Общее количество генов	Общее количество CDS	Общее количество ORF	Общее количество псевдогенов	Псевдогены со сдвигом рамки считывания
4,405	4,239	22,979	77	33

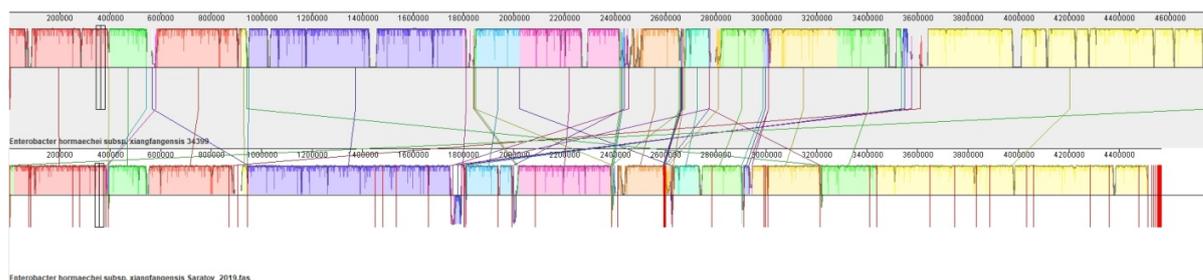
На следующем этапе исследования проводили выравнивание контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis Saratov_2019* с референтными геномами *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* (NJGLYY90-CR и 34399), продемонстрировавшими наибольшую гомологию при филогенетическом

анализе (см. Рисунок 18). При выравнивании контигов штамма Saratov–2019 с референтными штаммами (Рисунок 21) было обнаружено, по меньшей мере, 44,820 SNP относительно штамма *E. hormaechei* NJGLYY90–CR и 46,507 SNP при сравнении со штаммом *E. hormaechei subs xiangfangensis* 34399. Анализ ортологических групп выявил 3843 гена в составе хромосомы штамма Saratov–2019, имеющих идентичность свыше 80% относительно генов референтных штаммов NJGLYY90–CR и 34399.

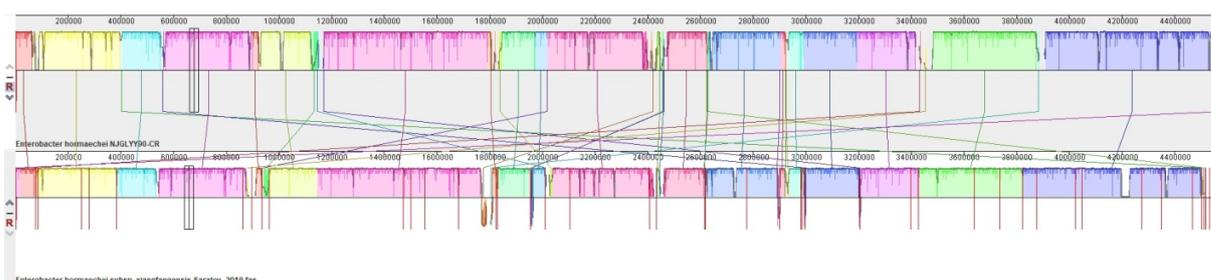
Собранные контиги были успешно выровнены на референтные геномы и имели наибольшее покрытие относительно референтного штамма NJGLYY90–CR, выделенного от человека на территории Китая. При этом в процессе сравнения сборки штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 17 контигов не были выровнены на последовательность хромосомы указанного референтного штамма. Данные контиги дополнительно анализировали с использованием сервера BLAST. Результат анализа контигов представлен в таблице 18.

Как показано в таблице 18, большая часть контигов имела высокий процент гомологии (от 91 до 100%) со штаммами представителей семейства *Enterobacterales* и видом *E. hormaechei*, в частности. Полученные данные позволили заключить о наличии значительного количества гомологичных участков ДНК внутри вида *E. hormaechei*.

Следует отметить, что в составе собранных контигов были идентифицированы два контига (№ 42 и № 44) с параметрами «=circular_true». Данный параметр присваивается ассемблером для последовательностей, замкнутых в кольцо, характеризующихся как внехромосомные репликоны.



А)



Б)

Рисунок 21 – Визуализация выравнивания контигов штамма Saratov_2019 на хромосомы референтных штаммов с использованием алгоритма progressive Mauve: а) выравнивание контигов на хромосому штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* 34399; б) выравнивание контигов на хромосому штамма *E. hormaechei* NJGLYY90–CR

Таблица 18 – Результат анализа контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019, отфильтрованных алгоритмом Mauve в процессе выравнивания на референтный штамм *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* NJGLYY90–CR, с использованием BLAST

№ контига	Гомологичная последовательность в NCBI GenBank	% гомологии
36	<i>E. coli</i> strain AMSCJX03	99,22
38	<i>Enterobacter kobei</i> STW0522–62	96,43
41	<i>E. cloacae</i> strain GGT036	91,81
42	<i>E. hormaechei</i> strain NJGLYY90–CR plasmid pECL–90–4	98,84
43	<i>E. hormaechei</i> strain E70	97,22
44	<i>Enterobacteria</i> phage phiX174	100
46	<i>Enterobacter roggkampii</i> strain ECY546	98,94
50	<i>E. hormaechei subsp. hoffmannii</i> strain DSM 14563	96,46
52	<i>E. cloacae</i> strain E3442	100
53	<i>E. hormaechei</i> strain CAV1176	96,87
55	<i>E. hormaechei</i> strain EGYMCRVIM	99,48

56	<i>E. hormaechei</i> strain Y2152 plasmid pIH12-2152	99,48
57	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> strain WCHEX045001	99,26
59	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> strain Ec61	100
61	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> strain WCHEX045001	100
62	<i>E. hormaechei</i> strain E70	100
63	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> strain WCHEX045001	99,72

Более детальное изучение последовательности контига № 42 с использованием анализа BLAST позволило выявить высокий процент гомологии (98.84%) относительно плазмидного репликона pECL-90-4, ранее обнаруженного у референтного штамма *E. hormaechei* NJGLYY90-CR (Номер доступа: CP061745.1). Основное отличие плазмидных репликонов у штаммов Saratov_2019 и NJGLYY90-CR заключалось в наличии 77 SNP и расположении кодирующих регионов (Рисунок 22).

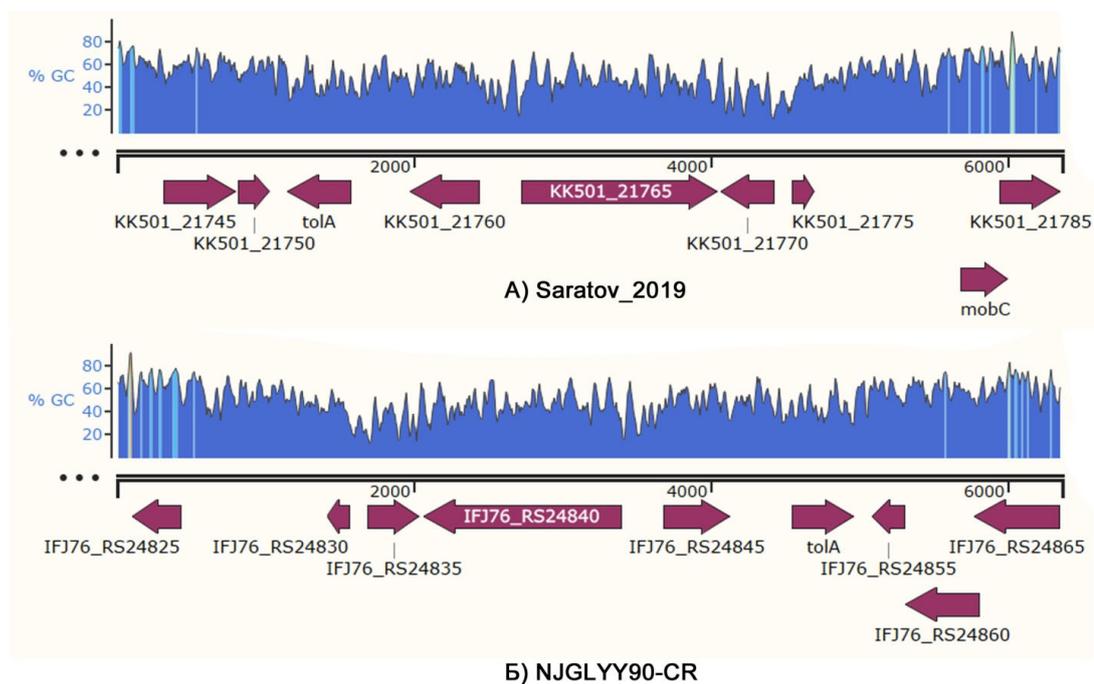


Рисунок 22 – Карта CDS регионов в плазмидном репликоне штаммов *E. hormaechei*: А) Saratov_2019; Б) NJGLYY90-CR. Диаграмма демонстрирует GC % в последовательности плазмид. Стрелки визуализируют расположение и размер CDS плазмид с указанием аннотированных locus_tag

Как продемонстрировано на рисунке 22, плазмиды штаммов Saratov_2019 и референтного NJGLYY90–CR имели одинаковое количество CDS (n=9), однако выравнивание последовательностей продемонстрировало, что размер CDS и их расположение в плазмидах существенно различалось. GC–состав, в зависимости от региона плазмиды, также демонстрировал различия в последовательности ДНК обоих штаммов.

Контиг № 44, проанализированный с использованием сервера BLAST, продемонстрировал 100% гомологию с последовательностью бактериофага phiX174, ранее обнаруженного у представителей *E. coli*, и также обладал структурой ДНК, замкнутой в кольцо (Fiers W., Sinsheimer R.L., 1962). В связи с этим, последовательность контига № 44 была определена как контаминирующая и была исключена из дальнейшего анализа.

2.2.2.12. Выявление генов резистентности в геномной последовательности штамма

E. hormaechei subsp. xiangfangensis Saratov_2019

На сегодняшний день, согласно литературным источникам (Capturing the resistome..., 2019; Tsang K., Speicher D., McArthur A., 2019), представители комплекса *E. cloacae*, включающие вид *E. hormaechei*, проявляют мультиантибиотикорезистентные свойства. По литературным данным (Whole-genome sequence analysis..., 2020), в хромосомах представителей данного вида микроорганизма был обнаружен целый ряд генов, определяющих устойчивость к различным классам противомикробных препаратов.

С целью определения чувствительности к антимикробным препаратам, нами был проведен прогностический анализ контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis Saratov_2019* на наличие генов, отвечающих за проявление антибиотикорезистентных свойств, с применением инструмента Resistance Gene Identifier (RGI), входящего в базу данных CARD (<https://card.mcmaster.ca>).

Результаты анализа контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 – возбудителя ИБ, представлены в таблице 19.

Согласно результатам анализа (Таблица 19), в контигах штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 нами было выявлено 13 генов резистентности. Исключением являлся ген *acrR*, не выявленный алгоритмами RGI в базе данных CARD. Согласно литературным источникам (Grkovic S., Brown M.H., Skurray R.A., 2001), ген *acrR* входит в комплекс мультилекарственных эффлюксных систем AcrAB, обеспечивающих устойчивость к различным противомикробным препаратам.

Поскольку все указанные гены, предсказанные в базе данных CARD, имели процент гомологии в значениях от 61,05% до 99,48%, следующим этапом исследования явилась идентификация локусов в составе последовательности штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 относительно референтных последовательностей, обнаруженных в указанной базе данных. С этой целью было произведено выравнивание нуклеотидных последовательностей генов, обнаруженных в штамме *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019, на референтные последовательности генов резистентности, идентифицированных в базе данных CARD. Результат сравнения представлен в таблице 20.

При выравнивании контигов штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 на референтные последовательности генов из базы данных CARD, удалось идентифицировать 11 последовательностей и определить идентификатор локуса в аннотированной последовательности (*locus_tag*). В составе последовательности всех идентифицированных генов антибиотикорезистентности штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 отсутствовали стоп-кодоны, характерные для псевдогенов, ассоциированных с кодированием укороченных белков.

Таблица 19 – Результат анализа штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 на наличие генов антибиотикорезистентности с использованием базы данных CARD

№	Гены резистентности	Семейство гена	Класс препарата, к которым развивается устойчивость (по данным CARD)	Механизм резистентности	% идентичности соответствующего региона
1	<i>E. coli ampH</i> бета-лактамаза	<i>ampC</i> -тип бета-лактамаза	цефалоспорины, пенамы	инактивация антибиотиков	86,23
2	<i>emrR</i>	Основное вспомогательное суперсемейство	фторхинолоны	эффлюксный насос	94,86
3	<i>rsmA</i>	Транспортеры семейства RND	фторхинолоны, диаминопиримидины, фениколы	эффлюксный насос	85,25
4	<i>adeF</i>	Транспортеры семейства RND	фторхинолоны, тетрациклины	эффлюксный насос	61,05
5	<i>oqxA</i>	Транспортеры семейства RND	фторхинолоны, глицилциклины, тетрациклины, диаминопиримидины, нитрофураны	эффлюксный насос	92, 58
6	<i>K. pneumoniae kpnE</i>	Основное вспомогательное суперсемейство (MFS)	макролиды, аминогликозиды, цефалоспорины, тетрациклины, пептидный ряд антибиотиков, рифамицины	эффлюксный насос	83,33
7	<i>K. pneumoniae kpnF</i>	Основное вспомогательное суперсемейство (MFS)	макролиды, аминогликозиды, цефалоспорины, тетрациклины, пептидный	эффлюксный насос	88,07

			ряд антибиотиков, рифамицины		
8	<i>baeR</i>	Помпа резистентности – узлообразования клеточного деления (RND) для оттока антибиотков	аминогликозиды, аминокумарины	эффлюксный насос	95,4
9	<i>acrD</i>	Транспортеры семейства (Резистентность- узлообразования -делние)	аминогликозиды	эффлюксный насос	91,67
10	<i>msbA</i>	АТФ–связывающие кассетные транспортер	нитроимидазолы	эффлюксный насос	94,85
11	<i>acrR</i>	репрессор транскрипции AcrA/B комплекса	тетрациклины, фениколы, пенамы, рифамицины, глицилциклины, цефалоспорины, фторхинолоны	модификация сайта–мишени, эффлюксный насос	Не обнаружен CARD
12	<i>fosA2</i>	фосфомицин тиолтрансфераза	фосфомицины	инактивация антибиотиков	96,45
13	<i>E. coli uhpT</i> с подтвержденной мутацией, сообщающей резистентность к фосфомицину	<i>uhpT</i>	фосфомицины	модификация сайта–мишени	94,17

Финальным этапом исследования являлось сравнение данных, полученных молекулярно–генетическими методами, с результатами определения чувствительности к противомикробным препаратам методом ДДТ. Согласно полученным результатам, у штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 обнаружена фенотипическая резистентность к ряду противомикробных препаратов (Таблица 21).

В результате сопоставления данных, полученных методом ДДТ, и результатов прогностического анализа CARD генома штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019, удалось установить, что штамм демонстрировал резистентность к 8–и из 12–и использованных противомикробных препаратов. По меньшей мере, 9 генов (*ampH*, *oqxV*, *mdtJ*, *baeR*, *acrD*, *msbA*, *acrR*, *fosA*, *uhpT*), идентифицированных в составе хромосомы, участвовало в механизмах, вызывающих бактериальную резистентность исследуемого штамма. Также штамм Saratov_2019 проявлял резистентность к препарату класса линкозамидов («Линкомицин») несмотря на то, что прогностический метод поиска RGI в базе данных CARD (<https://card.mcmaster.ca/home>) не выявил наличие генов, ответственных за развитие резистентности к данному классу антибиотиков. Согласно базе данных (<https://card.mcmaster.ca/home>), на сегодняшний день известно, по меньшей мере, 38 генов, ассоциированных с механизмами развития резистентности к линкозамидам у бактериальных штаммов. Отсутствие гомологичных генов в составе последовательности штамма Saratov_2019 может объясняться тем, что последовательность штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019, собранная с использованием метода *de novo*, оказалась не полной. В связи с этим, не исключается возможность наличия этих генов в непрочитанных участках генома.

Таблица 20 – Выявление генов, детерминирующих резистентность к антибиотикам, в штамме *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 относительно референтных последовательностей, доступных в базе данных CARD

№	Ген из базы данных CARD	Ген, идентифицированный в <i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> Saratov_2019	Продукт	Контиг в составе сборки	Идентификатор локуса (locus_tag) в аннотированных последовательностях контигов штамма <i>E. hormaechei subsp. xiangfangensis</i> Saratov 2019 *
1	<i>E. coli ampH</i> бета-лактамаза	<i>ampH</i>	D-аланил-D-аланин-карбоксипептидаза/эндопептидаза <i>AmpH</i>	1	KK501_00085
2	<i>emrR</i>	<i>emrR</i>	Множественный переносчик оттока лекарств <i>EmrAB</i> репрессор транскрипции <i>EmrR</i>	5	KK501_07150
3	<i>rsmA</i>	<i>rsmA</i>	16S rRNA (аденин(1518)–N(6)/аденин(1519)–N(6))–диметилтрансфераза RsmA	2	KK501_03125
4	<i>adeF</i>	<i>oqxB</i>	Множественный переносчик RND пермеазы - субъединицы <i>OqxB</i>	7	KK501_09445
5	<i>oqxA</i>	<i>oqxB</i>	Множественный переносчик RND пермеазы - субъединицы <i>OqxB</i>	7	KK501_09445
6	<i>K. pneumoniae kpnF</i>	<i>mdtJ</i>	Множественный транспортер SMR оттока лекарств/спермидина -	19	KK501_17290

			субъединицы <i>MdtJ</i>		
7	<i>K. pneumoniae</i> <i>kpnE</i>	<i>mdtJ</i>	Множественный транспортер SMR оттока лекарств/спермидина - субъединицы <i>MdtJ</i>	19	KK501_17290
8	<i>baeR</i>	<i>baeR</i>	Двухкомпонентный регулятор отклика системы <i>BaeR</i>	21	KK501_18050
9	<i>acrD</i>	<i>acrD</i>	Множественный переносчик RND пермеазы <i>AcrD</i>	7	KK501_09635
10	<i>msbA</i>	<i>msbA</i>	Липид А АВС транспортер АТФ- связывающий белок/пермеазы <i>MsbA</i>	13	KK501_13920
11	<i>fosA2</i>	<i>fosA</i>	<i>FosA/FosA2</i> семейство резистентности к фосфомицину и глутатионтрансфераза	2	KK501_03840
12	<i>E. coli uhpT</i> с подтвержденной мутацией, сообщающей резистентность к фосфомицину	<i>uhpT</i>	Гексоза-6-фосфат: фосфатный антипортер	22	KK501_18665
13	<i>acrR</i>	<i>acrR</i>	Транскрипционный транспортер множественного оттока лекарств репрессор <i>AcrR</i>	1	KK501_00590

Примечание – «*» – депонировано в базу данных NCBI GenBank (Номер доступа: JAHFZP000000000).

Таблица 21 – Результаты изучения чувствительности штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 к противомикробным препаратам методом ДДТ*

№	Ген	Устойчивость к противомикробным препаратам на основе данных CARD	Используемый препарат в ДДТ	Класс препарата	Резистентен (Р) / Чувствителен (Ч)
1	<i>ampH</i>	Цефалоспорины	Цефтриаксон	Цефалоспорины 3-его поколения	Р
2	<i>emrR</i>	Фторхинолоны	Байтрил	Фторхинолоны 3-его поколения	Ч
3	<i>rsmA</i>	Диаминопиримидины, Фениколы, Фторхинолоны			
4	<i>oqxV</i>	Тетрациклин, Глицилциклин, Нитрофуран, Фторхинолон, Диаминопиримидин	Нитокс	Тетрациклины	Р
5	<i>mdtJ</i>	Пептидные Антибиотики, Цефалоспорин, Макролиды, Рифамицин, Тетрациклин, Аминогликозиды	Азитромицин	Макролиды	Р
6	<i>baeR</i>	Аминокумарины, Аминогликозиды	Канамицин	Аминогликозиды 1 поколения	Р
7	<i>acrD</i>	Аминогликозиды			
8	<i>msbA</i>	Нитроимидазол	Метронидазол	Метронидазолы	Р
9	<i>acrR</i>	Тетрациклин, Феникол, Рифамицин, Глицилциклин, Цефалоспорин, Фторхинолон	Нитроксолин	Оксихинолины	Р
10	<i>fosA</i>	Фосфомицин	Фосфомицин	Производные фосфоновой кислоты	Р
11	<i>uhpT</i>	Фосфомицин			

12	X	Линкозамиды	Линкомицин	Линкозамиды	Р
13	X	–	Меропинем	Синтетический антибиотик из класса карбапенемов	Ч
14	X	–	Кобактан	Цефалоспорины 4-го поколения	Ч
15	X	–	Синулокс	Пенициллины	Ч

Примечание – "*" – Определение чувствительности к антимикробным препаратам выполнено согласно МУК

4.2.1890–04; "Ч" – штамм чувствителен; "Р" – штамм резистентен; Количество повторов тестов ДДТ (n=6); "X" –

Не обнаружен в составе сборки.

Важно отметить, что в плазмиде не удалось обнаружить известные гены резистентности, так же, как и в плазмиде референтного штамма NJGLYY90–CR. Как известно, у представителей семейства *Enterobacteriaceae* плазмиды играют важнейшую роль в развитии антибиотикорезистентных свойств (Carattoli A., 2009). Одним из наиболее важных механизмов является опосредованная плазмидами продукция β -лактамаз расширенного спектра действия, которые могут гидролизовать β -лактамы (First report of CTX–M..., 2013). Отсутствие генов устойчивости к β -лактамазам у штамма Saratov_2019 коррелировало с повышенной чувствительностью этого микроорганизма к карбапенемам и β -лактамным антибиотикам, включая ингибиторы β -лактамазы. Это подтверждается литературными источниками, указывающими на то, что подавляющее большинство представителей семейства *Enterobacteriaceae* остаются чувствительными к карбапенемам (Paterson D.L., 2006).

Нами установлено, что исследуемый штамм продемонстрировал чувствительность к цефалоспорином (препарат «Кобактан») и пенициллинового класса антибиотиков (препарат «Синулокс»). Как известно, представители *Enterobacter spp.* обладают природной устойчивостью к ампициллину, амоксициллину, амоксициллин–клавуланату, цефалоспорином первого поколения и цефокситину из-за продукции бета-лактамазы *ampC*. Среди клинических изолятов распространена устойчивость к цефалоспорином третьего поколения, уреидо- и карбоксипенициллинам. Цефалоспорины четвертого поколения сохраняют свою активность в отношении представителей этого вида. В настоящее время, примерно 31% инфекций, вызываемых представителями рода *Enterobacter spp.*, связаны со штаммами, не чувствительными к цефалоспорином третьего поколения (Bouza E., Cercenado E., 2002; Paterson D.L., 2006). Чувствительность к пенициллину (препарат «Синулокс») так же обусловлена

отсутствием генетических детерминант в последовательности хромосомы штамма Saratov_2019.

Таким образом, обнаруженный штамм в биоматериале от КРС демонстрировал множественную лекарственную устойчивость, типичную для представителей рода *Enterobacter spp.*, в частности, характерную для госпитальных штаммов. При этом сохранение чувствительности штамма *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* Saratov_2019 – потенциального возбудителя ИБ КРС, к ряду антибиотиков открывает перспективы дальнейшего использования данных препаратов в сельском хозяйстве для лечения инфекционных болезней животных, вызванных соответствующим видом микроорганизмов.

Заключение

Инфекционные болезни домашнего скота представляют собой серьезную угрозу здоровью и благополучию животных во всем мире. Эффективная борьба с ИБ СХЖ имеет решающее значение, как для сельскохозяйственного сектора, так и для обеспечения национальных и международных запасов продовольствия. Особое место занимают зооантропонозные инфекции, которые прямо или косвенно передаются от животных к человеку и представляют опасность для здоровья людей, в первую очередь, занятых в секторе животноводства, а также потребителей животноводческой продукции (Tomley F. M., Shirley M.W., 2009).

Целью настоящей работы было применение методов молекулярно-генетического анализа для изучения возбудителей абортотенных инфекций СХЖ на модели трех коллекционных штаммов хламидий вида *C. psittaci* (Rostinovo-70, BL-84 и АМК-16), выделенных на территории РФ во время вспышек инфекционных абортов у СХЖ, включая пушных зверей, и потенциального возбудителя ИБ вида *E. hormaechei subsp. xiangfangensis*, обнаруженного в биоматериале КРС с анамнестическими абортами и воспалением репродуктивных органов.

Для решения первой поставленной задачи нами проводилось изучение молекулярно-генетических характеристик возбудителей инфекционных абортов СХЖ хламидийной природы на модели трех указанных коллекционных штаммов, выделенных в разные годы от овцы (Rostinovo-70), лисицы со зверофермы (BL-84) и козы (АМК-16). В каждом случае была зарегистрирована вспышка хламидийной инфекции с инфекционными абортами. На сегодняшний день три указанных штамма были депонированы в коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», что дало возможность провести ретроспективный анализ, охватывающий период в 46 лет. Анализ полногеномных последовательностей позволил определить эволюционные взаимосвязи внутри

вида *C. psittaci*, а подробная молекулярно–генетическая характеристика - изучить уникальные геномные особенности и впервые выявить циркуляцию конкретной клональной линии на территории РФ.

В результате исследования нами было установлено, что в качестве потенциального анцестора может выступать штамм *C. psittaci* GR9, выделенный от утки на территории Германии в 1960 г. и продемонстрировавший высокую гомологию с геномами исследуемых штаммов, а также обладающий, по данным MLST, аналогичным сиквенс–типом. Дикие виды птиц играют важную роль в качестве резервуаров этой болезни (Natural cross chlamydial..., 2010) и способны передавать возбудитель на значительные расстояния. Важно отметить факт того, что штамм GR9 был изолирован в Германии на 10 лет раньше, чем штамм *C. psittaci* Rostinovo–70, что может указывать на факт возможного заноса данного штамма на территорию РФ. При этом была продемонстрирована значительная филогенетическая дивергенция относительно штамма *C. psittaci* 6BC, выделенного от попугая в 1930 г. и являющегося референтным штаммом для всех представителей *C. psittaci* (Genome sequences of 6BC and Cal10..., 2011). Данный факт может свидетельствовать о геномной эволюции среди представителей этого вида хламидий.

Для изучения генотипов и клональных линий возбудителей хламидийной инфекции циркулирующих на территории РФ, нами были применен метод монолокусного типирования на основе гена *ompA* и схема мультилокусного генотипирования на основе семи генов «домашнего хозяйства» MLST (Chlamydiales) (Multi locus sequence typing..., 2008). Как было показано ранее, ген *ompA*, кодирующий MOMP, характеризуется очень высоким уровнем полиморфизма – до 30% (Stothard D.R., Boguslawski G., Jones R.B., 1998). При генотипировании исследуемых штаммов на основе последовательности гена *ompA*, среди 10–и известных на сегодняшний день геноваров *C. psittaci*,

филогенетически наиболее близким к исследуемым штаммам также являлся штамм *C. psittaci* GR9, с ранее определенным генотипом «С». Однако в составе нуклеотидной последовательности гена *ompA* штаммов Rostinovo–70, BL–84 и АМК–16, присутствовали уникальные несинонимичные SNP, не встречавшиеся ранее в последовательностях всех известных в настоящее время генотипов (А–F), включая генотип «С». Обнаруженный полиморфизм гена *ompA* позволил предположить принадлежность изучаемых нами штаммов *C. psittaci* к новому генотипу, обозначенному как генотип «G». Обнаруженные изменения указанного локуса у исследуемых штаммов Rostinovo–70, BL–84 и АМК–16 свидетельствовал о продолжающемся процессе микроэволюционных изменений у хламидийных штаммов. Однако, разрешающей способности монолокусного типирования недостаточно для выяснения генетической структуры популяции штаммов, циркулирующих на территории РФ. Для оценки разнообразия и выявления доминирующей клональной линии штаммов *C. psittaci* на территории РФ нами был использован MLST (Chlamydiales), в основе которого лежит анализ полиморфизма «семи генов домашнего хозяйства», расположенных в хромосоме (Multi locus sequence typing..., 2008). Согласно полученным результатам, все три штамма *C. psittaci* (Rostinovo–70, BL–84 и АМК–16) имели сиквенс–тип ST28, произошедший от ST24, включающего в себя наибольшее количество изолятов *C. psittaci*. На сегодняшний день в мировой базе данных PubMLST депонировано, по меньшей мере, 19 изолятов *C. psittaci* с аналогичным ST, выделенных от птиц и человека. Однако, по состоянию на 2022 г., не было обнаружено ни одного штамма с ST28, изолированного от СХЖ животных, несмотря на то, что кластер ST28 является вторым по величине после ST24. Таким образом, в нашем исследовании мы впервые продемонстрировали ассоциацию ST28 со случаем возникновения инфекционных абортов у СХЖ, включая пушных зверей, на территории РФ.

Детальная характеристика геномной последовательности ДНК штаммов *C. psittaci* (Rostinovo–70, BL–84 и АМК–16) позволила выявить наличие рекомбинационных событий в участке 253 кб – 276 кб хромосомы у трех исследуемых штаммов. Регион гомологичной рекомбинации включал 20 CDS, отличающихся высокой гомологией (от 96% до 100%) с хромосомами представителями вида *C. abortus*. Согласно литературным данным (Genomic and phenotypic..., 2013; Comparative analysis of..., 2013; Marti H., Suchland R.J., Rockey D.D., 2022), рекомбинационные события у представителей *Chlamydia spp.* регистрировались и ранее. Интересно отметить, что наиболее частые рекомбинационные события, связанные с обменом генетического материала, наблюдаются у представителей *C. psittaci* и *C. abortus* (Comparative analysis of..., 2013). Таким образом, полученные нами данные согласуются с наблюдениями других исследователей, однако из 20 CDS, выявленная в штаммах *C. psittaci* в ходе этой работы, является уникальным рекомбинационным событием, не описанным ранее.

Не маловажным является и тот факт, что в исследуемых штаммах *C. psittaci* не было обнаружено генов устойчивости к противомикробным препаратам. Применение антибиотиков в сельском хозяйстве в последнее десятилетие достигло широких масштабов, что может влиять на появление новых резистентных форм патогенов (A review of current..., 2022). Хламидии так же, как и другие бактерии, способны проявлять резистентность (Horizontal transfer of tetracycline..., 2009; Resistance to a novel..., 2012; Genomic and phenotypic..., 2013), что может сильно осложнить терапевтические мероприятия при ликвидации заболевания. Использование базы данных CARD с алгоритмом RGI для предиктивного поиска генов устойчивости к противомикробным препаратам не выявило последовательностей генов резистентности в хромосомах и плаزمиде изучаемых штаммов *C. psittaci*. Полученные данные позволяют сделать

предположение о сохранении потенциальной чувствительности к антибиотикам хламидий – возбудителей ИБ СХЖ, относящихся к клональной линии ST28 и циркулирующих на территории РФ.

Согласно второй задаче настоящего исследования, нами был проведен метагеномный анализ ДНК из биоматериала (вагинально–цервикальной слизи), полученного от КРС с воспалением репродуктивных органов и анамнестическими абортами с целью выявления потенциального возбудителя ИБ. Применение метагеномного анализа на платформе NGS–3 продиктовано возможностью данного метода выявлять полный спектр микроорганизмов, содержащихся в исследуемом образце, а также использования полученных данных для более углубленного анализа, в частности, для сборки генома методом *de novo*.

В результате метагеномного анализа исследуемого ДНК из биоматериала от КРС, полученной на платформе NGS–3, большая часть «сырых» прочтений (67%) была идентифицирована и отнесена к роду *Enterobacter*. Указанные данные были использованы для выполнения третьей задачи настоящего исследования, включающей секвенирование на платформе NGS–2 с последующей сборкой генома и детальной молекулярно–генетической характеристикой патогена, идентифицированного на предыдущем этапе исследования.

Типирование штамма Saratov_2019 на основе семи генов «домашнего хозяйства» позволило определить его принадлежность к новому сиквенс–типу ST1416 (депонирован в базу данных PubMLST под номером: id1416). Согласно результатам филогенетического анализа на основе полногеномных последовательностей, штамм Saratov_2019 имел наибольшую гомологию со штаммом *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* NJGLYY90–CR, изолированным от человека на территории Китая и депонированным в NCBI GenBank в 2020 г. (год

изоляции не указан). На сегодняшний день представители рода *Enterobacter spp.*, входящие в группу патогенов ESKAPE, рассматриваются преимущественно как госпитальные штаммы, представляющие серьезную угрозу для здоровья людей. При этом наиболее важным аспектом стоит отметить тот факт, что данные микроорганизмы зачастую обладают множественной лекарственной устойчивостью (High prevalence of colistin..., 2022).

Для выявления потенциальной генетически обусловленной резистентности к противомикробным препаратам, нами был проведен анализ контигов штамма Saratov_2019 на наличие генов, детерминирующих развитие устойчивости к различным классам препаратов, включающих в себя фторхинолоновый ряд антибиотиков 3 поколения, тетрациклиновый ряд антибиотиков, макролиды, аминогликозидные антибиотики I поколения, метронидазолы, оксихинолиновый ряд антибиотиков, производные фосфоновой кислоты, линкозамиды, синтетические антибиотики класса карбапенемов, цефалоспориновые антибиотики 4-го поколения и пенициллиновый ряд антибиотиков. В результате анализа последовательности хромосомы и плазмиды штамма Saratov_19 было выявлено, по меньшей мере, 13 генов, отвечающих за развитие устойчивости к противомикробным препаратам различных классов. В дополнение к молекулярно-генетическим исследованиям, параллельно были проведены исследования фенотипической устойчивости к противомикробным препаратам с использованием диско-диффузионного метода. Полученные результаты подтвердили наличие у штамма фенотипической резистентности к 8-и разным классам противомикробных препаратов, применяемых в ветеринарной медицине. По данным литературы (Isolation, identification and..., 2017; Study on the biological..., 2017; First report of *Enterobacter*..., 2020), на сегодняшний день имеется лишь ограниченная информация о штаммах со множественной устойчивостью к противомикробным препаратам, изолированных от СХЖ или

диких животных. Фактически, только несколько штаммов *E. hormaechei*, недавно идентифицированных с использованием молекулярно–генетических методов, ассоциировали с возникновением воспалительного процесса репродуктивной системы у лисицы, диареи у поросят и респираторных заболеваний у телят в Китае, что подчеркивает важность дальнейшего изучения роли условно–патогенных микроорганизмов в развитии инфекционных процессов у животных. Также, наряду со множественной резистентностью, штамм Saratov_2019 проявил чувствительность к препаратам класса карбапенемов, цефалоспоринов 4–ого поколения и пенициллиновому ряду антибиотиков, что позволяет предположить их эффективность и перспективы дальнейшего использования при лечебных ветеринарных мероприятиях.

Важно отметить, что на сегодняшний день, основной акцент в борьбе с антибиотикорезистентными штаммами, в первую очередь, сосредоточен в сфере здравоохранения и медицины, связанной со здоровьем человека. Однако, появление штаммов со множественной лекарственной устойчивостью в животноводстве указывает на важную роль домашнего скота в возникновении и распространении устойчивости к противомикробным препаратам и подчеркивает необходимость точной идентификации видов, подвидов и спектров устойчивости к антибиотикам для резистентных патогенов, выделенных от СХЖ, в рамках глобальной стратегии по снижению риска возникновения, распространения и потенциальной передачи мульти антибиотикорезистентных штаммов как внутри поголовья, так и обслуживающему персоналу.

Таким образом, применение платформ NGS и биоинформатических подходов, используемых в данной работе для обработки нуклеотидных последовательностей ДНК, включающих полногеномную сборку методом *de novo*, позволили детально охарактеризовать геномные особенности возбудителей инфекционных абортос СХЖ – на модели трех коллекционных штаммов *S.*

psittaci, а так же представителя рода *Enterobacter*, впервые изолированного из биоматериала КРС с анамнестическими абортами на территории РФ.

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 мутантных штаммов возбудителей. Данные исследования играют важную роль в определении новых генетических маркеров для диагностики и 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.

Практические предложения

Предлагается дальнейшее детальное изучение коллекционных штаммов и полевых изолятов возбудителей ИБ СХЖ, в частности, являющихся этиологическими факторами инфекционных аборт, включая обладающих множественной лекарственной устойчивостью, с использованием молекулярного типирования, современных NGS платформ и биоинформатических инструментов с целью точной идентификации видов, подвидов и спектров устойчивости к антибиотикам, в том числе в рамках глобальной стратегии по снижению риска возникновения, распространения и передачи мультиантибиотикорезистентных штаммов как внутри поголовья, так и обслуживающему персоналу.

Выводы

1. Впервые получены полногеномные последовательности трех штаммов *C. 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 *C. psittaci* Rostinovo-70, АМК-16 и ВЛ-84 – возбудителей инфекционных аборт СХЖ, к ST28, ранее не ассоциированному с ИБ СХЖ, и новому генотипу «G», ранее не идентифицированному у представителей *C. 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 сокращений и условных обозначений

ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБ	– инфекционные болезни
КЛ	– коэффициент летальности
КРС	– крупный рогатый скот
МРС	– мелкий рогатый скот
МЭБ	– Международное Эпизоотическое Бюро
п.н.	– пар нуклеотидов
ПО	– программное обеспечение
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СХЖ	– сельскохозяйственные животные
ТОРС	– тяжелый острый респираторный синдром
ФАО	– Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединённых Наций
ВВН	– метод «наилучшего совпадения при двунаправленном сравнении»
BLAST	– средство поиска основного локального выравнивания
CARD	– Комплексная база данных по устойчивости к антибиотикам
CDS	– кодирующая последовательность
МOMP	– главный белок внешней мембраны
MLST	– мультилокусное секвенс–типирование
NCBI	– Национальный центр биотехнологической информации
NGS	– секвенирование нового поколения
ORF	– открытые рамки считывания
PGAP	– конвейер аннотации прокариотического генома
RGI	– идентификатор гена резистентности
SNP	– однонуклеотидный полиморфизм

Список литературы

1. Абдыкадырова, А. А. К вопросу об эпидемиологии и факторах риска хламидийной инфекции (в том числе зоонозной) / А. А. Абдыкадырова, Д. Д. Рисалиев // Медицина Кыргызстана. – 2011. – № 7. – С. 1–6.
2. Алексеева, А. Е. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного квенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями / А. Е. Алексеева, Н. Ф. Бруснигина // Журнал Медиаль. – 2014. – Т. 2, № 12. – С. 1–23.
3. Безбородова, Н. А. Сравнение лабораторных методов диагностики инфекций, вызываемых патогенными и условно–патогенными микроорганизмами / Н. А. Безбородова, Н. А. Ким // Эффективное животноводство. – 2018. – №2 (141). – С. 1–4.
4. Бобина, Е. А. Биологические системы для культивирования вирусов / Е. А. Бобина, Е. И. Корниенко, Н. Е. Горковенко // Стратегии и тренды развития науки в современных условиях. – 2018. – Т. 1, №1 (4). – С. 4–7.
5. Вафин, Р. Р. Индикация и идентификация *Chlamydia psittaci* с помощью полимеразной цепной реакции: Специальность 03.00.07 «Микробиология», 16.00.03 Ветеринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология: автореферат диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Вафин Рамиль Ришадович; Казанская государственная академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2003. – 3–5 с. – Место защиты: Казанская государственная академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана.
6. Вафин, Р. Р. Молекулярно–генетический анализ хламидий: Специальность 03.00.07 «Микробиология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Вафин Рамиль Ришадович; Казанская государственная академии ветеринарной медицины им.

Н.Э. Баумана. – Казань, 2009. – 4–8 с. — Место защиты: Казанская государственная академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана.

7. Ветеринарно–санитарные аспекты предупреждения рисков возникновения инфекционных заболеваний / С. В. Шабунин, Л. П. Бессонова, П. А. Паршин [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2019. – № 1. – С. 34–37.

8. Вирус Эбола (Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus): фатальные адаптационные мутации / И. В. Должикова, Д. Н. Щербинин, Д. Ю. Логунов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2021. – № 1. – С. 1–6

9. Забровская, А. В. Чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных животных и из продукции животноводства / А. В. Забровская // Farm Animals. – 2013. – № 1. – С. 78–83.

10. Клинико–эпизоотологическое проявление хламидийного аборта у коз / Ф. М. Хусаинов, В. В. Евстифеев, Г. И. Хусаинова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2018. – № 3 – С. 41–44.

11. Ламан, А. М. Трансграничные болезни списка МЭБ и современное представление о зоонозах / А. М. Ламан // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2019. – № 3. – С. 1–8.

12. Лаптев, Г. Ю. Исследование вагинальной слизи высокопродуктивных коров в послеотельный период посредством ПЦР в реальном времени/ Г. Ю. Лаптев, Н. А. Новикова, Л. А. Ильина // Сельскохозяйственные животные. – 2014. – № 3. – С. 10–12.

13. Мезенцев, С. В. Распространение сальмонелл в продукции животноводства / С. В. Мезенцев, В. В. Разумовская // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. – № 7(117). – С. 118–122.

14. Молекулярно–биологические методы диагностики внутриутробных инфекций крупного рогатого скота / О. Г. Петрова, Е. Ю. Белоусова, Е. В.

Печура [и др.] // Аграрная наука Евро–Северо–Востока. – 2006. – № 8.– С. 176–177.

15. Опыт усовершенствования инактивированной эмульсионной вакцины против хламидиоза рогатого скота / В. В. Евстифеев, Ф. М. Хусаинов, Л. А. Барбарова [и др.] // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени им. Н.Э. Баумана. – 2012. – № 3. – С. 1–3.

16. Романенков, К. В. Метод оценки качества сборки генома на основе частот k–меров / К. В. Романенков // Препринты ИПМ им. М. В. Келдыша. – 2017. – № 11. – С. – 24.

17. Ряпосова, М. В. Опыт усовершенствования методов лабораторной диагностики при оценке состояния здоровья высокопродуктивных коров / М. В. Ряпосова, А. И. Белоусов, Е. Н. Беспмятных // Сборник научных трудов Всероссийского научно–исследовательского института овцеводства и козоводства. – 2013. – Т.3, № 6. – С. 223–235.

18. Сергевнин, В. И. Механизмы передачи возбудителей и эколого–эпидемиологическая классификация инфекционных и паразитарных болезней человека (точка зрения) / В. И. Сергевнин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. – № 2(63) – С. 4–9.

19. Сероиммунологический мониторинг на хламидиоз неблагополучных свиноводческих хозяйств приволжского федерального округа / В. В. Евстифеев, Ф. М. Хусаинов, Г. И. Хусаинова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2021. – № 2. – С. 1–7.

20. Современные методы секвенирования ДНК (обзор) / Я. М. Краснов, Н. П. Гусева, Н. А. Шарапова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – № 2. – С. 1–3.

21. Современные методы лабораторной диагностики хламидиозов / С. С. Афанасьев, Ю. В. Несвижский, В. А. Метельская [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 4. – С. 111–117.
22. A 25–year retrospective study of *Chlamydia psittaci* in association with equine reproductive loss in Australia / R. Akter, F. M. Sansom, C. M. El–Hage [et al.] // Journal of Medical Microbiology. – 2021. – V. 70. – N. 2. – P.1–8.
23. A Meta–Analysis of Bovine *Chlamydia* Prevalence in Cattle in China from 1989 to 2020 / Q. Wang, T. Tian, N. Q. Yao [et al.] // Vector Borne and Zoonotic Diseases. – 2022. – V. 22, N. 2. – P. 76–92.
24. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China / F. Wu, S. Zhao, B. Yu [et al.] // Nature. – 2020. – V. 579, N. 7798. – P. 265–269.
25. A Review of Current Bacterial Resistance to Antibiotics in Food Animals / C. Xu, L. Kong, H. Gao [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2022. – V. 13. – P. 822689.
26. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* / P. Le Flèche, Y. Hauck, L. Onteniente [et al.] // BMC microbiology. – 2001. – V. 1. – P. 2.
27. Abortion in small ruminants in the Netherlands between 2006 and 2011 / R. van den Brom, K. Lievaart–Peterson, S. Luttikholt [et al.] // Tijdschrift Voor Diergeneeskunde. – 2012. – V. 137, N. 7. – P. 450–457.
28. Abortion storm induced by the live *C. abortus* vaccine 1B strain in a vaccinated sheep flock, mimicking a natural wild–type infection / K. Laroucau, R. Aaziz, F. Vorimore [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2018. – V. 225. – P. 31–33.
29. AfterQC: automatic filtering, trimming, error removing and quality control for fastq data / S. Chen, T. Huang, Y. Zhou [et al.] // BMC bioinformatics. – 2017. – V. 18, N. 3. – P. 80.

30. Amplicon sequencing of bacterial microbiota in abortion material from cattle / S. Vidal, K. Kegler, H. Posthaus [et al.] // *Veterinary Research*. – 2017. – V. 48, N. 1. – P. 64.
31. An epizootic of *Chlamydia psittaci* equine reproductive loss associated with suspected spillover from native Australian parrots / C. Jenkins, M. Jelocnik, M. L. Micallef [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2018. – V. 7, N. 1. – P. 88.
32. An overview of genes and mutations associated with Chlamydiae species' resistance to antibiotics / I. Benamri, M. Azzouzi, K. Sanak [et al.] // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2021. – V. 20, N. 1. – P. 59.
33. Andersen, A. A. Avian chlamydiosis / A. A. Andersen, D. Vanrompay // *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. – 2000. – V. 19, N. 2. – P. 396–404.
34. Andersen, A. A. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to four *Chlamydia psittaci* isolates / A. A. Andersen, R. A. Van Deusen // *Infection and Immunity*. – 1988. – V. 56, N. 8. – P. 2075–2079.
35. Andersen, A. A. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test / A. A. Andersen // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1991. – V. 29, N. 4. – P. 707–711.
36. Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis / O. Ayobami, S. Brinkwirth, T. Eckmanns [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2022. – V. 11, N. 1. – P. 443–451.
37. Antimicrobial resistance pattern in domestic animal – wildlife – environmental niche via the food chain to humans with a Bangladesh perspective; a systematic review / S. A. Khan, M. A. Imtiaz, M. A. Sayeed [et al.] // *BMC veterinary research*. – 2020. – V. 16, N. 1. – P. 302.

38. Antimicrobial resistance situation in animal health of Bangladesh / M. Al Amin, M. N. Hoque, A. Z. Siddiki [et al.] // *Veterinary World*. – 2020. – V. 13, N. 12. – P. 2713–2727.
39. Application and Challenge of 3rd Generation Sequencing for Clinical Bacterial Studies / M. B. Khedher, K. Ghedira, J. M. Rolain [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23, N. 3. – P. 1395.
40. Asymptomatic endemic *Chlamydia pecorum* infections reduce growth rates in calves by up to 48 percent / A. Poudel, T. H. Elsasser, K. S. Rahman [et al.] // *PloS One*. – 2012. – V. 7, N. 9. – P. e44961.
41. Bachmann, N. L. Chlamydia genomics: providing novel insights into chlamydial biology / N. L. Bachmann, A. Polkinghorne, P. Timms // *Trends in Microbiology*. – 2014. – V. 22, N. 8. – P. 464–472.
42. Bacterial infection causes of pregnancy loss and premature birth in the women in ukraine / A. G. Salmanov, O. M. Ishchak, Y. M. Shostak [et al.] // *Wiadomosci Lekarskie*. – 2021. – V. 74, N. 6. – P. 1355–1359.
43. Baker, J. A. A Virus Obtained from a Pneumonia of Cats and Its Possible Relation to the Cause of Atypical Pneumonia in Man / J. A. Baker // *Science*. – 1942. – V. 96, N. 2499. – P. 475–476.
44. Barr, B. C. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss / B. C. Barr, M. L. Anderson // *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. – 1993. – V. 9, N. 2. – P. 343–368.
45. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment / B. Ewing, L. Hillier, M. C. Wendl [et al.] // *Genome Research*. – 1998. – V. 8, N. 3. – P. 175–185.
46. Baud, D. Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes / D. Baud, L. Regan, G. Greub // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2008. – V. 21, N. 1. – P. 70–76.

47. Bommana, S. Mini Review: Antimicrobial Control of Chlamydial Infections in Animals: Current Practices and Issues / S. Bommana, A. Polkinghorne // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 113.
48. Borel, N. A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge for Pathologists? / N. Borel, A. Polkinghorne, A. Pospischil // *Veterinary Pathology*. – 2018. – V. 55, N. 3. – P. 374–390.
49. Boumedine, K. S. AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies / K. S. Boumedine, A. Rodolakis // *Research in Microbiology*. – 1998. – V. 149, N. 10. – P. 735–744.
50. Bouza, E. *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications / E. Bouza, E. Cercenado // *Seminars in Respiratory Infections*. – 2002. – V. 17, N. 3. – P. 215–230.
51. Breithaupt, H. Fierce creatures. Zoonoses, diseases that jump from animals to humans, are a growing health problem around the world. Understanding their causes and their effects on humans have therefore become an important topic for global public health / H. Breithaupt // *EMBO reports*. – 2003. – V. 4, N. 10. – P. 921–924.
52. Can *Chlamydia trachomatis* human biovars cause abortion in cattle? An immunohistochemical study on a new host–pathogen relationship / A. Ozbek, E. Ozbek, Y. Kalkan [et al.] // *Mikrobiyoloji Bulteni*. – 2008. – V. 42, N. 4. – P. 599–605.
53. Canu: scalable and accurate long–read assembly via adaptive k–mer weighting and repeat separation / S. Koren, B. P. Walenz, K. Berlin [et al.] // *Genome Research*. – 2017. – V. 27, N. 5. – P. 722–736.
54. Capturing the resistome: a targeted capture method to reveal antibiotic resistance determinants in metagenomes / A. K. Guitor, A. R. Raphenya, J. Klunk [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2019. – V. 64, N. 1. – P. e01324–19.

55. Carattoli, A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae* / A. Carattoli // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2009. – V. 53, N. 6. – P. 2227–2238.
56. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database / B. P. Alcock, A. R. Raphenya, T. T. Y. Lau [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2020. – V. 48. – P. D517–D525.
57. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EURO-BACT International Cohort Study / A. Tabah, D. Koulenti, K. Laupland [et al.] // Intensive Care Medicine. – 2012. – V. 38, N. 12. – P. 1930–1945.
58. Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies / D. Vanrompay, P. Butaye, C. Sayada [et al.] // Research in Microbiology. – 1997. – V. 148, N. 4. – P. 327–333.
59. *Chlamydia buteonis*, a new *Chlamydia* species isolated from a red-shouldered hawk / K. Laroucau, F. Vorimore, R. Aaziz [et al.] // Systematic and Applied Microbiology. – 2019. – V. 42, N. 5. – P. 125997.
60. *Chlamydia pecorum* detection in aborted and stillborn lambs from Western Australia / T. Clune, S. Besier, S. Hair [et al.] // Veterinary Research. – 2021. – V. 52, N. 1. – P. 84.
61. *Chlamydia pecorum* Ovine Abortion: Associations between Maternal Infection and Perinatal Mortality / C. Jenkins, M. Jelocnik, E. Onizawa [et al.] // Pathogens. – 2021. – V. 10, N. 11. – P. 1367.
62. *Chlamydia pecorum*: fetal and placental lesions in sporadic caprine abortion / F. Giannitti, M. Anderson, M. Miller [et al.] // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2016. – V. 28, N. 2. – P. 184–189.
63. *Chlamydia pecorum*-Associated Sporadic Ovine Abortion / T. Westermann, C. Jenkins, E. Onizawa [et al.] // Veterinary Pathology. – 2021. – V. 58, N. 1. – P. 114–122.

64. *Chlamydia pecorum*–Induced Arthritis in Experimentally and Naturally Infected Sheep / N. Ostfeld, M. M. Islam, M. Jelocnik [et al.] // *Veterinary Pathology*. – 2021. – V. 58, N. 2. – P. 346–360.
65. *Chlamydia psittaci* in fulmars on the Faroe Islands: a causative link to South American psittacines eight decades after a severe epidemic / H. Wang, J.K. Jensen, A. Olsson [et al.] // *Microbes Infect.* – 2020, N. 22(8) – P. 356–359
66. *Chlamydia psittaci* ST24: Clonal Strains of One Health Importance Dominate in Australian Horse, Bird and Human Infections / S. I. Anstey, V. Kasimov, C. Jenkins [et al.] // *Pathogens*. – 2021. – V. 10, N. 8. – P. 1015.
67. *Chlamydia psittaci*: a suspected cause of reproductive loss in three Victorian horses / R. Akter, A. W. Stent, F. M. Sansom [et al.] // *Australian Veterinary Journal*. – 2020. – V. 98, N. 11. – P. 570–573.
68. *Chlamydia psittaci*: new insights into genomic diversity, clinical pathology, host–pathogen interaction and anti–bacterial immunity / M. R. Knittler, A. Berndt, S. Böcker [et al.] // *International journal of medical microbiology*. – 2014. – V. 304, N. 7. – P. 877–893.
69. *Chlamydiaceae* Genomics Reveals Interspecies Admixture and the Recent Evolution of *Chlamydia abortus* Infecting Lower Mammalian Species and Humans / S. J. Joseph, H. Marti, X. Didelot [et al.] // *Genome Biology and Evolution*. – 2015. – V. 7, N. 11. – P. 3070–3084.
70. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France / K. Laroucau, B. de Barbeyrac, F. Vorimore [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2009. – V. 135, N. 1–2. – P. 82–89.
71. Clinical, diagnostic and pathologic features of presumptive cases of *Chlamydia pecorum*–associated arthritis in Australian sheep flocks / E. Walker, C. Moore, P. Shearer [et al.] // *BMC veterinary research*. – 2016. – V. 12, N. 1. – P. 193.

72. Comparative analysis of *Chlamydia psittaci* genomes reveals the recent emergence of a pathogenic lineage with a broad host range / T. D. Read, S. J. Joseph, X. Didelot [et al.] // *mBio*. – 2013. – V. 4, N. 2. – P. e00604–12.
73. Comparative studies on detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* in meat turkey flocks using cell culture, ELISA, and PCR / R. Sting, E. Lerke, H. Hotzel [et al.] // *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. – 2006. – V. 113, N. 2. – P. 50–54.
74. Comparison of koala LPCoLN and human strains of *Chlamydia pneumoniae* highlights extended genetic diversity in the species / C. M. Mitchell, K. M. Hovis, P. M. Bavoil [et al.] // *BMC genomics*. – 2010. – V. 11. – P. 442.
75. Complete genome sequences of four mammalian isolates of *Chlamydophila psittaci* / G. Schöfl, A. Voigt, K. Litsche [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – V. 193, N. 16. – P. 4258.
76. Contribution of target alteration, protection and efflux pump in achieving high ciprofloxacin resistance in *Enterobacteriaceae* / R. P. Chakrabarty, M. Sultana, S. Shehreen [et al.] // *AMB Express*. – 2016. – V. 6, N. 1. – P. 126.
77. Davin–Regli, A. *Enterobacter spp.*: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance / A. Davin–Regli, J. P. Lavigne, J. M. Pagès // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2019. – V. 32, N. 4. – P. e00002–19.
78. Detection of *Chlamydia pecorum* in joints trimmed from ovine carcasses with arthritis at an abattoir in southern Australia / J. Lloyd, R. Yang, A. Kessell [et al.] // *Small Ruminant Research*. – 2017. – V. 150. – P. 80–86.
79. Detection of *Chlamydia* species in 2 cases of equine abortion in Switzerland: a retrospective study from 2000 to 2018 / S. Baumann, C. Gurtner, H. Marti [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2020. – V. 32, N. 4. – P. 542–548.

80. Detection of *Chlamydiaceae* in ocular swabs from Australian pre-export feedlot sheep / M. Jelocnik, M. Laurence, F. R. Murdoch [et al.] // Australian Veterinary Journal. – 2019. – V. 97, N. 10. – P. 401–403.
81. Development and evaluation of rapid novel isothermal amplification assays for important veterinary pathogens: *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pecorum* / M. Jelocnik, M. M. Islam, D. Madden [et al.] // PeerJ. – 2017. – V. 5. – P. e3799.
82. Doosti, A. Molecular Study for Detection of *Chlamydia psittaci* caused Abortion in Iranian Cattle / A. Doosti, A. Arshi // Journal of Pure and Applied Microbiology. – 2012. – V. 6. – P. 1133–1138.
83. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review / X. Zhen, C. S. Lundborg, X. Sun [et al.] // Antimicrobial Resistance and Infection Control. – 2019. – V. 8. – P. 137.
84. Elwell, C. *Chlamydia* cell biology and pathogenesis / C. Elwell, K. Mirrashidi, J. Engel // Nature Reviews Microbiology. – 2016. – V. 14, N. 6. – P. 385–400.
85. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance / H. Hoffmann, S. Stindl, W. Ludwig [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – V. 43, N. 7. – P. 3297–3303.
86. Epidemiology of *Chlamydia psittaci* infections in pregnant Thoroughbred mares and foals / S. Anstey, D. Lizárraga, S. Nyari [et al.] // Veterinary Journal. – 2021. – V. 273. – P. 105683.
87. Epitope mapping with solid-phase peptides: identification of type-, subspecies-, species- and genus-reactive antibody binding domains on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* / J. W. Conlan, Clarke, I. N Clarke, M. E Ward // Molecular microbiology. – 1988. – V. 2, N. 5. P. 1–2.

88. Etiology and pathology of equine placentitis / C. B. Hong, J. M. Donahue, R. C. Giles [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 1993. – V. 5, N. 1. – P. 56–63.
89. Evaluating the Antibiotic Susceptibility of *Chlamydia* – New Approaches for in Vitro Assays / H. Marti, N. Borel, D. Dean, [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1414.
90. Everett, K. D. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms / K. D. Everett, R. M. Bush, A. A. Andersen // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1999. – V. 49, Pt 2. – P. 415–440.
91. Evidence of *Chlamydophila abortus* vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion / N. Wheelhouse, K. Aitchison, K. Laroucau [et al.] // *Vaccine*. – 2010. – V. 28, N. 35. – P. 5657–5663.
92. Fiers, W. The structure of the DNA of bacteriophage phi-X174. III. Ultracentrifugal evidence for a ring structure / W. Fiers, R. L. Sinsheimer // *Journal of Molecular Biology*. – 1962. – V. 5. – P. 424–434.
93. First report of CTX-M producing *Escherichia coli*, including the new ST2526, isolated from beef cattle and sheep in Portugal / S. Ramos, G. Igrejas, N. Silva [et al.] // *Food Control*. – 2013. – V. 31, N. 1. – P. 208–210.
94. First report of *Enterobacter hormaechei* with respiratory disease in calves / Z. Wang, L. Duan, F. Liu [et al.] // *BMC veterinary research*. – 2020. – V. 16, N. 1. – P. 1.
95. Full genome sequences of all nine *Chlamydia psittaci* genotype reference strains / S. Van Lent, J. R. Piet, D. Beeckman [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2012. – V. 194, N. 24. – P. 6930–6931.

96. Further studies on the isolation of the trachoma virus / F. F. Tang, Y. T. Huang, H. L. Chang, [et al.] // *Acta Virologica*. – 1958. – V. 2, N. 3. – P. 164–170.
97. Genetic diversity of *Chlamydia pecorum* detected in sheep flocks from Mexico / M. M. Limón–González, R. Hernández–Castro, F. Martínez–Hernández [et al.] // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2022. – V. 53, N. 2. – P. 605–613.
98. Genome Sequence of *Chlamydia psittaci* Strain 01DC12 Originating from Swine / H. M. B. Seth–Smith, M. Sait, K. Sachse [et al.] // *Genome Announcements*. – 2013. – V. 1, N. 1. – P. e00078–12.
99. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39 / T. D. Read, R. C. Brunham, C. Shen [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2000. V. 28, № 6. – P. 1397–1406.
100. Genome sequence of the zoonotic pathogen *Chlamydophila psittaci* / H. M. B. Seth–Smith, S. R. Harris, R. Rance [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – V. 193, N. 5. – P. 1282–1283.
101. Genome sequences of the zoonotic pathogens *Chlamydia psittaci* 6BC and Cal10 / V. Grinblat–Huse, E. F. Drabek, H. H. Creasy [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – V. 193, N. 15. – P. 4039–4040.
102. Genomic and phenotypic characterization of in vitro–generated *Chlamydia trachomatis* recombinants / B. M. Jeffrey, R. J. Suchland, S. G. Eriksen [et al.] // *BMC microbiology*. – 2013. – V. 13. – P. 142.
103. Genomic evidence that the live *Chlamydia abortus* vaccine strain 1B is not attenuated and has the potential to cause disease / D. Longbottom, M. Sait, M. Livingstone [et al.] // *Vaccine*. – 2018. – V. 36, N. 25. – P. 3593–3598.
104. Genotyping of *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis / K. Laroucau, F. Vorimore, C. Bertin [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2009. – V. 137, N. 3–4. – P. 335–344.

105. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes / K. Sachse, K. Laroucau, H. Hotzel [et al.] // BMC microbiology. – 2008. – V. 8. – P. 63.
106. Gibson, J. A. Equine abortion associated with *Enterobacter agglomerans* / J. A. Gibson, L. E. Eaves, B. M. O’Sullivan // Equine Veterinary Journal. – 1982. – V. 14, N. 2. – P. 122–125.
107. Global Multilocus Sequence Type Analysis of *Chlamydia trachomatis* Strains from 16 Countries / B. Herrmann, J. Isaksson, M. Ryberg [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2015. – V. 53, N. 7. – P. 2172–2179.
108. Godfroid, J. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife / J. Godfroid, K. Nielsen, C. Saegerman // Croat Med J. – 2010. – V. 51, N. 4. – P. 296–305.
109. Goodwin, S. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies / S. Goodwin, J. D. McPherson, W. R. McCombie // Nature Reviews Genetics. – 2016. – V. 17, N. 6. – P. 333–351.
110. Grkovic, S. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria / S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray // Seminars in Cell & Developmental Biology. – 2001. – V. 12, N. 3. – P. 225–237.
111. Healthcare associated infection after legal induced abortions in ukraine: results a multicenter study / A. G. Salmanov, S. M. Baksheev, D. V. Kuflovskyi [et al.] // Wiadomosci Lekarskie. – 2021. – V. 74, N. 7. – P. 1559–1565.
112. Henson, J. Next-generation sequencing and large genome assemblies / J. Henson, G. Tischler, Z. Ning // Pharmacogenomics. – 2012. – V. 13, N. 8. – P. 901–915.
113. High prevalence of colistin resistance and *mcr-9/10* genes in *Enterobacter spp.* in a tertiary hospital over a decade / W. Liao, Y. Cui, J. Quan [et al.] // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2022. – V. 59, N. 5. – P. 106573.

114. High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA) / K. Laroucau, S. Thierry, F. Vorimore [et al.] // Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. – 2008. – V. 8, N. 2. – P. 171–181.
115. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing / P. Le Flèche, M. Fabre, F. Denoëud [et al.] // BMC microbiology. – 2002. – V. 2. – P. 37.
116. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis / M. Klint, H. H. Fuxelius, R. R. Goldkuhl [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2007. – V. 45, N. 5. – P. 1410–1414.
117. High-resolution multilocus sequence typing for *Chlamydia trachomatis*: improved results for clinical samples with low amounts of *C. trachomatis* DNA / S. Pilo, G. Zizelski Valenci, M. Rubinstein [et al.] // BMC microbiology. – 2021. – V. 21, N. 1. – P. 28.
118. Hoorfar, J. Critical aspects of standardization of PCR / J. Hoorfar, N. Cook // Methods in Molecular Biology. – 2003. – V. 216. – P. 51–64.
119. Horizontal transfer of tetracycline resistance among *Chlamydia spp.* in vitro / R. J. Suchland, K. M. Sandoz, B. M. Jeffrey [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2009. – V. 53, N. 11. – P. 4604–4611.
120. Identification of genomic indels and structural variations using split reads / Z. D. Zhang, J. Du, H. Lam [et al.] // BMC Genomics. – 2011. – V. 12(375) – P.1–12.
121. Immunologic status in cattle naturally infected with the microorganisms *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* / W. Deptula, J. Ruczkowska, J. Szenfeld [et al.] // Veterinarni Medicina. – 1990. – V. 35, N. 2. – P. 73–80.
122. Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies / S. P. Wang, C. C. Kuo, R. C. Barnes [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 1985. – V. 152, N. 4. – P. 791–800.

123. In Silico Infection Analysis (iSFA) Identified Coronavirus Infection and Potential Transmission Risk in Mammals / Y. Zou, C. Xiaojian, Y. Bing [et al.] // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2022. – V. 9. – P. 1–11.
124. Influence of a 23S ribosomal RNA mutation in *Helicobacter pylori* strains on the in vitro synergistic effect of clarithromycin and amoxicillin / T. Sakinc, B. Baars, N. Wüppenhorst [et al.] // *BMC research notes*. – 2012. – V. 5. – P. 603.
125. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences / P. Siguier, J. Perochon, L. Lestrade [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – V. 34. – P. D32–36.
126. Isolation and characterisation of local strains of *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) from Tunisia / A. Rekiki, K. Sidi-Boumedine, A. Souriau [et al.] // *Veterinary Research*. – 2002. – V. 33, N. 2. – P. 215–222.
127. Isolation of an avian serovar of *Chlamydia psittaci* from a case of bovine abortion / H. U. Cox, P. G. Hoyt, R. P. Poston [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 1998. – V. 10, N. 3. – P. 280–282.
128. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Enterobacter hormaechei* from foxes / W. Shan-Shan, S. Yun-Jia, C. Xing-Yang [et al.] // *Chin. Vet. Sci.* – 2017. – V. 47. – P. 768–772.
129. Janda, J. M. The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: ‘*Enterobacterales*’): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes / J. M. Janda, S. L. Abbott // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2021. – V. 34, N. 2. – P. e00174–20.
130. Jolley, K. A. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications / K. A. Jolley, J. E. Bray, M. C. J. Maiden // *Wellcome Open Research*. – 2018. – V. 3. – P. 124.

131. Kaleta, E. F. Avian host range of *Chlamydophila spp.* based on isolation, antigen detection and serology / E. F. Kaleta, E. M. A. Taday // *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* – 2003. – V. 32, N. 5. – P. 435–461.
132. Knittler, M. R. *Chlamydia psittaci*: update on an underestimated zoonotic agent / M. R. Knittler, K. Sachse // *Pathogens and Disease.* – 2015. – V. 73, N. 1. – P. 1–15.
133. Kohlhoff, S. A. Treatment of Chlamydial infections: 2014 update / S. A. Kohlhoff, M. R. Hammerschlag // *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* – 2015. – V. 16, N. 2. – P. 205–212.
134. Kulski, J. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications / J. K. Kulski ed. – Croatia: InTech, 2016. – P. 3–60.
135. Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe / N. Borel, C. F. Frey, B. Gottstein [et al.] // *Veterinary Journal.* – 2014. – V. 200, N. 2. – P. 218–229.
136. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // *Nature Methods.* – 2012. – V. 9, N. 4. – P. 357–359.
137. Leonard, C. A. Penicillin G-Induced Chlamydial Stress Response in a Porcine Strain of *Chlamydia pecorum* / C. A. Leonard, F. Dewez, N. Borel // *International Journal of Microbiology.* – 2016. – V. 2016. – P. 3832917.
138. Long reads: their purpose and place / M. O. Pollard, D. Gurdasani, A. J. Mentzer [et al.] // *Human Molecular Genetics.* – 2018. – V. 27, N. R2. – P. R234–R241.
139. Longbottom, D. Animal chlamydioses and zoonotic implications / D. Longbottom, L. J. Coulter // *Journal of Comparative Pathology.* – 2003. – V. 128, N. 4. – P. 217–244.
140. Mammals’ humoral immune proteins and peptides targeting the bacterial envelope: from natural protection to therapeutic applications against multidrug-resistant Gram-negatives / M. Escobar-Salom, G. Torrens, E. Jordana-Lluch [et al.] // *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* – 2022. – V. 97, N. 3. – P. 1005–1037.

141. Marti, H. The Impact of Lateral Gene Transfer in *Chlamydia* / H. Marti, R. J. Suchland, D. D. Rokey // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – V. 12. – P. 861899.
142. McGeoch, D. J. Alphaherpesviruses possess a gene homologous to the protein kinase gene family of eukaryotes and retroviruses / D. J. McGeoch, A. J. Davison // *Nucleic Acids Research*. – 1986. – V. 14, N. 4. – P. 1765–1777.
143. Meier–Kolthoff, J. P. TYGS is an automated high–throughput platform for state–of–the–art genome–based taxonomy / J. P. Meier–Kolthoff, M. Göker // *Nature Communications*. – 2019. – V. 10, N. 1. – P. 2182.
144. Meningoencephalitis, Vasculitis, and Abortions Caused by *Chlamydia pecorum* in a Herd of Cattle / J. D. Struthers, A. Lim, S. Ferguson [et al.] // *Veterinary Pathology*. – 2021. – V. 58, N. 3. – P. 549–557.
145. Menzies, P. I. Control of important causes of infectious abortion in sheep and goats / P. I. Menzies // *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. – 2011. – V. 27, N. 1. – P. 81–93.
146. Metagenomic Analysis of Bacteria, Fungi, Bacteriophages, and Helminths in the Gut of Giant Pandas / S. Yang, X. Gao, J. Meng [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1717.
147. Metagenomic investigation of potential abortigenic pathogens in foetal tissues from Australian horses / R. Akter, C. M. El–Hage, F. M. Sansom [et al.] // *BMC genomics*. – 2021. – V. 22, N. 1. – P. 713.
148. Metagenomics for pathogen detection in public health / R. R. Miller, V. Montoya, J. L. Gardy [et al.] // *Genome Medicine*. – 2013. – V. 5, N. 9. – P. 81.
149. Myers, G. S. A. *Intracellular Pathogens I: Chlamydiales* / G. S. A. Myers, J. Crabtree, H. H. Creasy. – United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2012. – P. 27–50. – ISBN 9781119737681.

150. Meyer, K. F. The host spectrum of psittacosis–lymphogranuloma venereum (PL) agents / K. F. Meyer // *American Journal of Ophthalmology*. – 1967. – V. 63, N. 5. – P. Suppl:1225–1246.
151. Molecular Epidemiology, Risk Factors and Clinical Outcomes of Carbapenem–Nonsusceptible *Enterobacter cloacae* Complex Infections in a Taiwan University Hospital / C. J. Chen, P. L. Lu, S. H. Jian [et al.] // *Pathogens*. – 2022. – V. 11, N. 2. – P. 151.
152. Mosaic structure of intragenic repetitive elements in histone H1–like protein Hc2 varies within serovars of *Chlamydia trachomatis* / M. Klint, M. Thollesson, E. Bongcam–Rudloff [et al.] // *BMC microbiology*. – 2010. – V. 10. – P. 81.
153. Mongan, A. E. Portable sequencer in the fight against infectious disease / A. E. Mongan, J. S. B. Tuda, L. R. Runtuwene // *Journal of Human Genetics*. – 2020. – V. 65, N. 1. – P. 35–40.
154. Moulder, J. W. The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses / J. W. Moulder // *Annual Review of Microbiology*. – 1966. – V. 20. – P. 107–130.
155. Multi locus sequence typing of *Chlamydia* reveals an association between *Chlamydia psittaci* genotypes and host species // Y. Pannekoek, V. D. Dickx, D. S. A. Beeckman [et al.] // *PloS one*. – 2010. – V. 5. – P. 1–5.
156. Multi locus sequence typing of *Chlamydiales*: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis* / Y. Pannekoek, G. Morelli, B. Kusecek [et al.] // *BMC microbiology*. – 2008. – V. 8. – P. 42.
157. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae* / T. Miyoshi–Akiyama, K. Hayakawa, N. Ohmagari [et al.] // *PloS One*. – 2013. – V. 8, N. 6. – P. e66358.
158. Multilocus sequence typing identifies an avian–like *Chlamydia psittaci* strain involved in equine placentitis and associated with subsequent human psittacosis / M.

Jelocnik, J. Branley, J. Heller [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2017. – V. 6, N. 2. – P. e7.

159. Natural cross chlamydial infection between livestock and free-living bird species / J. A. Lemus, J. A. Fargallo, P. Vergara [et al.] // *PloS One*. – 2010. – V. 5, N. 10. – P. e13512.

160. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples / A. Pantchev, R. Sting, R. Bauerfeind [et al.] // *Vet J*. – 2009. – V. 181, N. 2. – P. 145–150.

161. Nietfeld, J. C. Chlamydial infections in small ruminants / J. C. Nietfeld // *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. – 2001. – V. 17, N. 2. – P. 301–314.

162. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data / C. S. Chin, D. H. Alexander, P. Marks [et al.] // *Nature Methods*. – 2013. – V. 10, N. 6. – P. 563–569.

163. Papp, J. R. *Chlamydia psittaci* infection in sheep: a paradigm for human reproductive tract infection / J. R. Papp, P. E. Shewen // *Journal of Reproductive Immunology*. – 1997. – V. 34, N. 3. – P. 185–202.

164. Paterson, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae* / D. L. Paterson // *The American Journal of Medicine*. – 2006. – V. 119, N. 6. – P. S20–28.

165. Pedersen, L. N. Typing *Chlamydia trachomatis*: from egg yolk to nanotechnology / L. N. Pedersen, B. Herrmann, J. K. Møller // *FEMS immunology and medical microbiology*. – 2009. – V. 55, N. 2. – P. 120–130.

166. Penicillin- and third-generation cephalosporin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* meningitis: Case report and literature review / K. Ishikawa, T. Matsuo, T. Suzuki [et al.] // *Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2022. – V. 28, N. 5. – P. 663–668.

167. Phenotypic and genetic characteristics of macrolide and lincosamide resistant *Ureaplasma urealyticum* isolated in Guangzhou, China / C. Lu, T. Lu Ye, G. Xing Zhu [et al.] // *Current Microbiology*. – 2010. – V. 61, N. 1. – P. 44–49.
168. Phillips, S. Seventy Years of Chlamydia Vaccine Research – Limitations of the Past and Directions for the Future / S. Phillips, B. L. Quigley, P. Timms // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 70.
169. Pilot study of the occurrence of *Chlamydia psittaci* infections in commercial turkey flocks in Niedersachsen) / M. Ryll, K. H. Hinz, U. Neumann, K. P. Behr // *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. – 1994. – V. 101, N. 4. – P. 163–165.
170. Platt, H. *Klebsiella* and *Enterobacter* organisms isolated from horses / H. Platt, J. G. Atherton, I. Orskov // *The Journal of Hygiene*. – 1976. – V. 77, N. 3. – P. 401–408.
171. Polkinghorne, A. A new equine and zoonotic threat emerges from an old avian pathogen, *Chlamydia psittaci* / A. Polkinghorne, G. Greub // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2017. – V. 23, N. 10. – P. 693–694.
172. Predicting phenotype and emerging strains among *Chlamydia trachomatis* infections / D. Dean, W. J. Bruno, R. Wan [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2009. – V. 15, N. 9. – P. 1385–1394.
173. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydophila pecorum* strains / K. Y. Mohamad, S. M. Roche, G. Myers [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. – 2008. – V. 8, N. 6. – P. 764–771.
174. Prowazek, S. Chlamydozoa. I. Zusammenfassende Uebersicht / S. Prowazek // *Arch. Protistenk.* – 1907. – V. 22. – P. 248–298.
175. Rawre, J. Molecular typing of *Chlamydia trachomatis*: An overview / J. Rawre, D. Juyal, B. Dhawan // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2017. – V. 35, N. 1. – P. 17–26.

176. Real–Time Fluorometric Isothermal LAMP Assay for Detection of *Chlamydia pecorum* in Rapidly Processed Ovine Abortion Samples: A Veterinary Practitioner’s Perspective / T. Clune, S. Anstey, V. Kasimov [et al.] // *Pathogens*. – 2021. – V. 10, N. 9. – P. 1157.
177. Repetitive elements may comprise over two–thirds of the human genome / A. P. J. de Koning, W. Gu, T. A. Castoe [et al.] // *PLoS genetics*. – 2011. – V. 7, N. 12. – P. e1002384.
178. Resistance to a novel antichlamydial compound is mediated through mutations in *Chlamydia trachomatis secY* / K. M. Sandoz, S. G. Eriksen, B. M. Jeffrey [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2012. – V. 56, N. 8. – P. 4296–4302.
179. Ripa, T. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests / T. Ripa, P. Nilsson // *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles*. – 2006. – V. 11, N. 11. – P. E061109.2.
180. Rodolakis, A. *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats / A. Rodolakis, K. Laroucau // *Veterinary Microbiology*. – 2015. – V. 181, N. 1–2. – P. 107–118.
181. Rogers, D. J. Studying the global distribution of infectious diseases using GIS and RS / D. J. Rogers, S. E. Randolph // *Nature Reviews Microbiology*. – 2003. – V. 1, N. 3. – P. 231–237.
182. Rockey, D. D. Unraveling the basic biology and clinical significance of the chlamydial plasmid/ D. D. Rockey // *J. Exp. Med.* – 2011. – V. 208(11). – P. 2159–2162.
183. Sandoz, K. M. Antibiotic resistance in Chlamydiae / K. M. Sandoz, D. D. Rockey // *Future Microbiology*. – 2010. – V. 5, N. 9. – P. 1427–1442.

184. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1977. – V. 74, N. 12. – P. 5463–5467.
185. Schautteet, K. *Chlamydiaceae* infections in pig / K. Schautteet, D. Vanrompay // Veterinary Research. – 2011. – V. 42. – P. 29.
186. Schweighardt, H. Spezifische Abortursachen bei Rind und Schaf unter besonderer Berücksichtigung der mikrobiellen Erreger (Protozoen, Bakterien, Pilze) / H. Schweighardt. // Wien Tierärztl Mschr. – 1991. – V.78. – P.2–6.
187. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method / T. Geens, A. Desplanques, M. Van Loock [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – V. 43, N. 5. – P. 2456–2461.
188. Serosurvey of sheep and goats to *Chlamydia psittaci* in Slovakia during the years 1996–2000 / M. Trávníček, D. Kováčová, P. Zubrický [et al.] // Veterinarni Medicina. – 2001. – V. 46. – P. 281–285.
189. Serotyping of *Chlamydia*: isolates of bovine origin / J. Schachter, J. Banks, N. Sugg [et al.] // Infection and Immunity. – 1975. – V. 11, N. 5. – P. 904–907.
190. Significant Difference in Antimicrobial Resistance of Bacteria in Septic Revision between Total Knee Arthroplasty and Total Hip Arthroplasty / S. Stevoska, F. Himmelbauer, J. Stiftinger [et al.] // Antibiotics. – 2022. – V. 11, N. 2. – P. 249.
191. Simon, C. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends / C. Simon, R. Daniel // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – V. 77, N. 4. – P. 1153–1161.
192. SQUAT: a Sequencing Quality Assessment Tool for data quality assessments of genome assemblies / L. A. Yang, Y. J. Chang, S. H. Chen [et al.] // BMC genomics. – 2019. – V. 19, N. 9. – P. 238.

193. Standardized phylogenetic and molecular evolutionary analysis applied to species across the microbial tree of life / M. Shakya, S. A. Ahmed, K. W. Davenport [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10, N. 1. – P. 1723.
194. Stephens, R. S. Challenge of *Chlamydia* research / R. S. Stephens // *Infectious Agents and Disease*. – 1992. – V. 1, N. 6. – P. 279–293.
195. Stothard, D. R. Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants / D. R. Stothard, G. Boguslawski, R. B. Jones // *Infection and Immunity*. – 1998. – V. 66, N. 8. – P. 3618–3625.
196. Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo / F. F. Tang, H. L. Chang, Y. T. Huang [et al.] // *Chinese Medical Journal*. – 1957. – V. 75, N. 6. – P. 429–447.
197. Study on the biological characteristics of *Enterobacter hormaechei* / L. Lu–Yao, I. Liu, M. J. Teng [et al.] // *Sci Vet Med*. – 2017. – V. 36. – P. 1–6.
198. Suchland, R. J. Simplified microtiter cell culture method for rapid immunotyping of *Chlamydia trachomatis* / R. J. Suchland, W. E. Stamm // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1991. – V. 29, N. 7. – P. 1333–1338.
199. Szeredi, L. Detection of *Chlamydophila (Chlamydia) abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin–biotin method / L. Szeredi, A. Bacsadi // *Journal of Comparative Pathology*. – 2002. – V. 127, N. 4. – P. 257–263.
200. Szeredi, L. High prevalence of chlamydial (*Chlamydophila psittaci*) infection in fetal membranes of aborted equine fetuses / L. Szeredi, H. Hotzel, K. Sachse // *Veterinary Research Communications*. – 2005. – V. 29. – P. 37–49.
201. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* / C. Pourcel, F. André–Mazeaud, H. Neubauer [et al.] // *BMC microbiology*. – 2004. – V. 4. – P. 22.

202. Tatusov, R. L. A genomic perspective on protein families / R. L. Tatusov, E. V. Koonin, D. J. Lipman // *Science*. – 1997. – V. 278, N. 5338. – P. 631–637
203. Taylor–Robinson, D. The discovery of *Chlamydia trachomatis* / D. Taylor–Robinson // *Sexually Transmitted Infections*. – 2017. – V. 93, N. 1. – P. 10.
204. The 1B vaccine strain of *Chlamydia abortus* produces placental pathology indistinguishable from a wild type infection / S. G. Caspe, M. Livingstone, D. Frew [et al.] // *PloS One*. – 2020. – V. 15, N. 11. – P. e0242526.
205. The animal Chlamydiae: Recent developments and new insights / N. Borel, G. Entrican, A. Di Francesco [et al.] // *Eighth Meeting of the European Society for Chlamydia Research*. – 2016. – V. 8. – P. 41–42.
206. The limitations of commercial serological assays for detection of chlamydial infections in Australian livestock / S. Bommana, M. Jelocnik, N. Borel [et al.] // *Journal of Medical Microbiology*. – 2019. – V. 68, N. 4. – P. 627–632.
207. The role of zoonotic chlamydial agents in ruminants abortion / S. Barati, N. Moori–Bakhtiari, M. G. Najafabadi [et al.] // *Iranian Journal of Microbiology*. – 2017. – V. 9, N. 5. – P. 288–294.
208. Tomley, F. M. Livestock infectious diseases and zoonoses / F. M. Tomley, M. W. Shirley // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2009. – V. 364, N. 1530. – P. 2637–2642.
209. Transboundary animal diseases as re–emerging threats – Impact on one health / F. Torres–Velez, K. A. Havas, K. Spiegel, C. Brown // *Seminars in Diagnostic Pathology*. – 2019. – V. 36, N. 3. – P. 193–196.
210. Tsang, K. Pathogen Taxonomy Updates at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database: Implications for Molecular Epidemiology / K. Tsang, D. Speicher, A. McArthur // *Preprints*. – 2019. – URL: <https://www.preprints.org/manuscript/201907.0222/v1>.

211. Twenty years of research into *Chlamydia*-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae* / A. Taylor–Brown, L. Vaughan, G. Greub [et al.] // *Pathogens and Disease*. – 2015. – V. 73, N. 1. – P. 1–15.
212. Understanding the health and production impacts of endemic *Chlamydia pecorum* infections in lambs / E. Walker, M. Jelocnik, S. Bommana [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2018. – V. 217. – P. 90–96.
213. Unemo, M. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* / M. Unemo, I. N. Clarke // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2011. – V. 24, N. 1. – P. 62–69.
214. Ungemach, F. R. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine / F. R. Ungemach, D. Müller–Bahrtdt, G. Abraham // *International journal of medical microbiology*. – 2006. – V. 296(41). – P. 33–38.
215. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads / R. R. Wick, L. M. Judd, C. L. Gorrie, K. E. Holt // *PLoS computational biology*. – 2017. – V. 13, N. 6. – P. e1005595.
216. Unveiling the Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes and Core Genome Phylogenies for Genotyping *Chlamydia trachomatis* / L. H. Patiño, M. Camargo, M. Muñoz [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1854.
217. Vanrompay, D. Pathogenicity for turkeys of *Chlamydia psittaci* strains belonging to the avian serovars A, B and D / D. Vanrompay, R. Ducatelle, F. Haesebrouck // *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* – 1994. – V. 23, N. 2. – P. 247–262.
218. Voigt, A. The *Chlamydia psittaci* genome: a comparative analysis of intracellular pathogens / A. Voigt, G. Schöfl, H. P. Saluz // *PloS One*. – 2012. – V. 7, N. 4. – P. e35097.

219. Waddlia, Parachlamydia and Chlamydiaceae in bovine abortion / S. Blumer, G. Greub, A. Waldvogel [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2011. – V. 152, N. 3–4. – P. 385–393.
220. Wang, S. P. A simplified method for immunological typing of trachoma–inclusion conjunctivitis–lymphogranuloma venereum organisms / S. P. Wang, C. C. Kuo, J. T. Grayston // *Infection and Immunity*. – 1973. – V. 7, N. 3. – P. 356–360.
221. Weber, R. Causes of abortion in horses – overview of the literature and own evaluations / R. Weber, R. Hospes, A. Wehrend // *Tierärztliche Praxis Ausgabe G, Grosstiere Nutztiere*. – 2018. – V. 46, N. 1. – P. 35–42.
222. Whole–genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing / S. R. Harris, I. N. Clarke, H. M. B. Seth–Smith [et al.] // *Nature Genetics*. – 2012. – V. 44, N. 4. – P. 413–419.
223. Whole–genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd / R. D. Fleischmann, M. D. Adams, O. White [et al.] // *Science*. – 1995. – V. 269, N. 5223. – P. 496–512.
224. Whole-genome sequence analysis of multidrug-resistant *Enterobacter hormaechei* isolated from imported retail shrimp / N. Indugu, L. Sharma, C. R. Jackson, [et al.] // *Microbiology Resource Announcements*. – 2020. – V. 9, N. 50. – P. e01103-20.
225. Whole–genome sequencing for analysis of an outbreak of meticillin–resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study / S. R. Harris, E. J. P. Cartwright, M. E. Török [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2013. – V. 13, N. 2. – P. 130–136.
226. Wingett, S. W. FastQ Screen: A tool for multi–genome mapping and quality control / S. W. Wingett, S. Andrews // *F1000Research*. – 2018. – V. 7. – P. 1338.

227. Wood, D. E. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments / D. E. Wood, S. L. Salzberg // *Genome Biology*. – 2014. – V. 15, N. 3. – P. R46.
228. Zhong, G. Chlamydial Plasmid-Dependent Pathogenicity / G. Zhong // *Trends in microbiology*. – 2017. – V. 25, N. 2. – P. 141–152.