



Влияние инновационного антибактериального препарата класса тиадiazинонов на факторы вирулентности бактерий филума *Pseudomonadota*, хронически инфицирующих больных муковисцидозом

Воронина О.Л.^{1✉}, Королева Е.А.¹, Кунда М.С.¹, Рыжова Н.Н.¹, Аксенова Е.И.¹, Капотина Л.Н.¹, Нелюбина С.А.¹, Лазарева А.В.², Зигангирова Н.А.¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

²Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Инфекции нижних дыхательных путей бактериями филума *Pseudomonadota*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp. критичны в отношении качества и продолжительности жизни больных муковисцидозом (МВ). При хронизации инфекции эрадикация бактерий существующими антибактериальными препаратами практически невозможна. Для исследования препаратов альтернативного действия необходимы испытания, проведённые на бактериях, выделенных от пациентов с МВ и охарактеризованных с помощью геномных подходов.

Целями нашего исследования были сравнительный анализ факторов вирулентности 6 изолятов бактерий филума *Pseudomonadota* и проверка эффективности инновационного препарата фтортиазинон (ФТ) в подавлении патогенности бактерий *in vitro*.

Материалы и методы. Изоляты *A. ruhlandii* ST36, *A. xylosoxidans* ST555, *B. cepacia* ST2140, *B. gladioli* ST2141, *P. aeruginosa* ST859 и ST198 исследовали с помощью полногеномного секвенирования и биоинформационного анализа для поиска детерминант резистентности и вирулентности. ФТ испытали по действию на бактерии в экспериментах *in vitro* по цитотоксичности на клетках HeLa, подвижности и формированию биоплёнок.

Результаты. Геномные исследования подтвердили арсенал детерминант резистентности, особенно систем эффлюкса бактерий, полученных от пациентов с МВ, и разнообразие факторов вирулентности, среди которых мы выделили факторы в категориях: подвижность, сигналы систем quorum-sensing, системы секреции, экзотоксины как наиболее существенные для адаптации бактерий к условиям нижних дыхательных путей. Испытания ФТ *in vitro* показали его эффективность в подавлении цитотоксичности (в 2,6–4,0 раза), подвижности (в 2,0–3,6 раза) и процесса формирования биоплёнок (в 2,0–7,7 раза).

Заключение. Впервые показано эффективное действие инновационного антибактериального препарата ФТ на бактерии филума *Pseudomonadota*, выделенные от хронически инфицированных пациентов с МВ, с описанным потенциалом факторов вирулентности.

Ключевые слова: факторы адгезии микроорганизмов, *Pseudomonadota*, муковисцидоз, полногеномное секвенирование, факторы вирулентности, фтортиазинон, антивирулентность

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 59 от 08.09.2023).

Благодарность. Авторы признательны Е.М. Бурмистрову за содействие в выделении *P. aeruginosa* из мокроты пациентов с МВ.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Воронина О.Л., Королева Е.А., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Капотина Л.Н., Нелюбина С.А., Лазарева А.В., Зигангирова Н.А. Влияние инновационного антибактериального препарата класса тиадiazинонов на факторы вирулентности бактерий филума *Pseudomonadota*, хронически инфицирующих больных муковисцидозом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):173–183.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-499>

EDN: <https://www.elibrary.ru/pmwtsz>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-499>

The influence of an innovative antibacterial drug of the thiadiazinone class on the virulence factors of bacteria of the phylum *Pseudomonadota*, which chronically infect patients with cystic fibrosis

Olga L. Voronina¹✉, Ekaterina A. Koroleva¹, Marina S. Kunda¹, Natalia N. Ryzhova¹, Ekaterina I. Aksenova¹, Lidia N. Kapotina¹, Stanislava A. Nelyubina¹, Anna V. Lazareva², Nailya A. Zigangirova¹

¹N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

²National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Infections of the lower respiratory tract by bacteria of the *Pseudomonadota* phylum: *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp. are critical to the quality and life expectancy of patients with cystic fibrosis (CF). When the infection is chronic, eradication of bacteria with existing antibacterial drugs is practically impossible. To explore alternative drugs, trials are needed on bacteria isolated from CF patients and characterized using genomic approaches.

The objective of our study was a comparative analysis of virulence factors of 6 isolates of bacteria of the *Pseudomonadota* phylum and testing the efficacy of the innovative drug Fluorothiazinone (FT) in suppressing the pathogenicity of bacteria *in vitro*.

Materials and methods. Isolates of *A. ruhlandii* ST36, *A. xylosoxidans* ST555, *B. cepacia* ST2140, *B. gladioli* ST2141, *P. aeruginosa* ST859 and ST198 were examined using whole-genome sequencing and bioinformatics analysis to search for resistance and virulence determinants. The FT drug was tested for its effect on bacteria in *in vitro* experiments on cytotoxicity on HeLa cells, motility and biofilm formation.

Results. Genomic studies have confirmed the arsenal of resistance determinants, especially the efflux systems of bacteria isolated from patients with CF, and the diversity of virulence factors, among which we identified factors in the categories of motility, signals of quorum-sensing systems, secretion systems, exotoxins, as the most essential for the adaptation of bacteria to conditions of the lower respiratory tract. *In vitro* tests of the FT drug showed its effectiveness in suppressing cytotoxicity (2.6–4.0 times), motility (2.0–3.6 times) and the process of biofilm formation (2.0–7.7 times).

Conclusion. For the first time, the effectiveness of the innovative antibacterial drug Fluorothiazinone has been shown against bacteria of the *Pseudomonadota* phylum, isolated from chronically infected patients with CF, with the described potential of virulence factors.

Keywords: *microbial adhesion factors, Pseudomonadota, Cystic Fibrosis, WGS, virulence, Fluorothiazinone, anti-virulence*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients or their legal representatives. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (protocol No. 59, September 8, 2023).

Acknowledgement. The authors are grateful to E.M. Burmistrov for assistance in the isolation of *P. aeruginosa* from sputum of CF patients.

Funding source. The study was carried out with the financial support of the State assignment of N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Voronina O.L., Koroleva E.A., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Kapotina L.N., Nelyubina S.A., Lazareva A.V., Zigangirova N.A. The influence of an innovative antibacterial drug of the thiadiazinone class on the virulence factors of bacteria of the phylum *Pseudomonadota*, which chronically infect patients with cystic fibrosis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):173–183.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-499>
EDN: <https://www.elibrary.ru/pmwtsz>

Введение

Муковисцидоз (МВ) — одно из наиболее распространённых аутосомно-рецессивных заболеваний, при котором мутации в гене трансмембранного регулятора хлорного канала обуславливают

нарушения мукоцилиарного клиренса и развитие хронической колонизации респираторного тракта бактериями филума *Pseudomonadota*. Микроорганизмы этого филума — *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp. — характери-

зуются высокой природной резистентностью к антимикробным препаратам. Несмотря на применение агрессивной антибиотикотерапии, у пациентов с МВ с возрастом наблюдаются прогрессирующее снижение функции лёгких и ранняя смертность. По данным последнего издания российского регистра больных МВ, доля пациентов, хронически инфицированных перечисленными бактериями, составляет 33,6% для *P. aeruginosa*, 7,6% для *Achromobacter* spp. и 5,5% для *Burkholderia* spp. [1].

Проникая при аспирации в нижние дыхательные пути, бактерии перемещаются по поверхности эпителиоцитов, используя флагеллу и пили/фимбри; эти же структуры служат адгезинами при прикреплении к клеткам для начала формирования биоплёнок [2]. Далее возможны несколько путей миграции бактерий указанных родов: транслокация через межклеточные контакты и трансэпителиальная миграция [3]. В последнем случае сначала осуществляется инвазия посредством систем секреции 3-го и 6-го типов (Т3SS, Т6SS). Бактерии, вышедшие из эпителиоцитов, затем преодолевают базальную мембрану и достигают клеток соединительной ткани. На этом пути их защищают экзотоксины, воздействующие на коллаген и препятствующие его противомикробной активности [4]. *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp. и *Burkholderia* spp. могут осуществлять инвазию в макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки, таким образом имея возможность быть защищёнными от внешних воздействий в 4 типах эукариотических клеток. Бактерии не только выживают внутри клеток, но и могут нарушать их нормальное функционирование, приводя к пироптозу/апоптозу или некрозу [5]. Смерть клеток, выход бактерий, их дальнейшее размножение вызывают воспалительный ответ, повреждающий ткани лёгкого [3]. Все перечисленные этапы жизненного цикла патогенных микроорганизмов координируют сигналы системы Quorum-Sensing (QS) [6]. Механизмы выживания помогают этим бактериям конкурировать друг с другом и с другими представителями микробиома лёгких, поэтому микробное разнообразие при таких инфекциях становится минимальным [7].

Для эрадикации столь успешных патогенов требуются новые подходы, один из которых был использован при разработке инновационного антибактериального препарата класса тиадиазинов (фтортиазинов, ФТ) в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Эффекторы Т3SS [8], а также, предположительно, высококонсервативные АТФазы аппарата флагелл и Т3SS стали мишенью для воздействия ФТ, подавляющего патогенность бактерий, но не убивающего их [8, 9], что обеспечивает отсутствие развития устойчивости к такому препарату. Эффективность ФТ *in vitro* и на моделях животных показана в отношении ряда грамотрицательных бактерий: *Salmonella enterica*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter*

baumannii и *Klebsiella pneumoniae* [10]. Препарат ингибировал облигатный внутриклеточный патоген *Chlamydia trachomatis* [11], доказывая возможность проникновения ФТ в эукариотические клетки.

Ранее при изучении изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из мокроты и трахеального аспирата больных МВ, мы показали, что условия тестирования цитотоксичности, подобранные для культур, выделенных при внутрибольничных инфекциях [9], были оптимальны только для изолятов генотипов ST235 и ST313 [12], характерных для нозокомиальных *P. aeruginosa*, относящихся к EхoU-линии, получившей название по эффектору Т3SS [13]. Остальные изоляты отличались медленным ростом *in vitro* в силу изменения физиологии клетки при хронической инфекции лёгких. Адаптация условий экспериментов к особенностям *Pseudomonadota* пациентов с МВ была одной из задач исследования.

Учитывая разнообразие факторов вирулентности бактерий, используемых при адаптации и персистенции в респираторном тракте пациентов с МВ, мы изучили геномные характеристики изолятов, выбранных для оценки действия ФТ, и сравнили факторы в категориях: подвижность, сигналы систем QS, системы секреции, экзотоксины у выбранных представителей *P. aeruginosa*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp.

Целями нашего исследования стали сравнительный анализ факторов вирулентности 6 изолятов бактерий филума *Pseudomonadota*, инфицировавших нижние дыхательные пути пациентов с МВ, и проверка эффективности инновационного препарата ФТ в подавлении патогенности бактерий *in vitro*.

Материалы и методы

Материалы

Из мокроты хронически инфицированных пациентов с МВ выделили 6 культур бактерий филума *Pseudomonadota* (табл. 1). Исследование проводилось на условиях получения добровольного информированного согласия пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 59 от 08.09.2023).

ФТ — инновационный антибактериальный препарат класса тиадиазинов $C_{19}H_{17}F_2N_3O_4S$: N-(2,4-дифторфенил)-4(3-этокси-4-гидроксibenзил)-5-оксо-5,6-дигидро-4Н-[1,3,4]-тиадиазин-2-карбоксамид¹. Из субстанции готовили стоковый раствор ФТ с концентрацией 5,0 мМ в 0,3 М CH_3COONa , pH $7,0 \pm 0,2$.

¹ Клинические исследования: РКИ № 389 от 03.08.2018 (завершено); РКИ 169 от 14.03.2022 (продолжается). Заявление на регистрацию в МЗ РФ (входящий № 4253550 от 30.05.2023). Статус на рассмотрении.

Таблица 1. Изоляты филума *Pseudomonadota*, использованные в исследовании**Table 1.** Isolates of the *Pseudomonadota* phylum used in the study

Вид Specie	Изолят Isolate	Assembly accession Accession number	Сиквенс-тип Sequence type	Размер генома, Mb Genome size, Mb	Гены Genes	Рамки, кодирующие белки Protein-coding
<i>P. aeruginosa</i>	GIMC5045:PA33P25	JAVMRC000000000	ST859	6,4	5973	5841
<i>P. aeruginosa</i>	GIMC5047:PA33P30	JAVMRD000000000	ST198	6,4	6023	5842
<i>B. cepacia</i>	SCCH90:Bcn202840	JAQOTY000000000	ST2140	8,4	7704	7512
<i>B. gladioli</i>	SCCH61:Bgd92-3601	JAQOTZ000000000	ST2141	8,2	9105	8385
<i>A. ruhlandii</i>	SCCH137:Ach2231057	JAQZZN000000000	ST36	6,3	5884	5679
<i>A. xylosoxidans</i>	SCCH131:Ach223717	JAPZVF000000000	ST555	6,4	5912	5806

Цитотоксичность изучали на клетках карциномы шейки матки HeLa (ATCC CCL2, 22603).

Культивирование бактерий

Бактерии выращивали 18 ч при 37°C в бульоне LB до концентрации 10⁹ микробных клеток/мл (оптическая плотность при λ = 600 нм).

Геномный анализ

Для выделения ДНК из изолятов использовали протокол [14], дополнив этап очистки от полисахаридов с помощью СТАВ (cetyltrimethylammonium bromide).

Библиотеки ДНК готовили по протоколам «Nextera DNA Flex Library Prep» («Illumina») и «KAPA HyperPlus Kit» («Roche»). Секвенирование выполняли на приборе «NextSeq 500/550» («Illumina»), используя картридж «Mid Output 300 cycles».

Геномы собирали с помощью «CLC Genomic Workbench v. 21.0.1» («Qiagen») и «SPAdes v. 3.13.0»². Для аннотации применяли Rapid Annotations Subsystems Technology (RAST) [15] и NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [16]. Результаты депонировали в GenBank (биопроект PRJNA561493) под номерами, указанными в табл. 1.

Геномы анализировали с помощью ресурсов BV-BRC³ [17]. Факторы вирулентности исследовали с помощью VFDB⁴ [18] и BlastKOALA⁵ [19]. Поиск плазмид осуществляли с помощью PlasmidFinder 2.1⁶. Для выявления детерминант резистентности использовали CARD⁷ [20], BV-BRC [17] и BlastKOALA [19].

Исследование влияния ФТ in vitro

Цитотоксичность бактерий определяли согласно методике [9], с модификациями. Монослой клеток HeLa, выращенный в среде IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) с добавлением 10% FBS (fetal bovine serum) и 2 mM L-глутамина в 96-луночных планшетах, промывали и добавляли IMDM, содержащую 1% FBS. Клетки HeLa заражали бактериальными культурами при начальной множественности инфекции (MOI), равной 5. Планшеты инкубировали 18 ч в присутствии ФТ (60 мкг/мл). В качестве контроля использовали 0,3M CH₃COONa, pH 7,0 ± 0,2. Клетки осаждали центрифугированием 20 мин при 1500 rpm. В супернатантах определяли активность высвобождающейся лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с помощью набора «CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit» («Promega») согласно протоколу производителя. Процент высвобождения ЛДГ рассчитывали относительно неинфицированного контроля (0% высвобождения ЛДГ) и клеток HeLa, лизированных тритоном X-100 (100% высвобождения ЛДГ).

Способность ФТ ингибировать плавательную подвижность изолятов оценивали на чашках Петри с 0,3% полужидким агаром [21]. Бактериальные культуры инкубировали с ФТ (100 мкг/мл) 3 ч при 37°C, затем по 2 мкл суспензии вносили в толщу полужидкого агара, содержащего ФТ (100 мкг/мл), и инкубировали 48 ч при 37°C. Степень подвижности бактерий определяли по диаметру радиальной миграции в агаре.

Для исследования влияния ФТ на образование бактериальной биоплёнки использовали следующий подход. На абиотической поверхности формировали статические биоплёнки по протоколу [22] с изменениями в условиях инкубации. ФТ (100 мкг/мл) добавляли в ночные бактериальные культуры с концентрацией 10⁷ микробных клеток/мл (OD₆₀₀) и инкубировали в лунках планшета 48 ч без замены среды, затем добавляли по 125 мкл 0,1% раствора кристаллического фиолетового (CV) для окрашивания биоплёнок. Связавшийся с биоплёнками краситель экстрагировали 100 мкл 96% этанола и

² St. Petersburg genome assembler, Russia.

URL: <http://cab.spbu.ru/software/spades>

³ Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center.

URL: <https://www.bv-brc.org>

⁴ Virulence Factor Database. URL: <http://www.mgc.ac.cn/VFs>

⁵ KEGG Orthology and Links Annotation.

URL: <https://www.kegg.jp/blastkoala>

⁶ PlasmidFinder 2.1.

URL: <https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder>

⁷ Comprehensive Antibiotic Resistance Database.

URL: <https://card.mcmaster.ca>

определяли оптическую плотность при $\lambda = 540$ нм на приборе «Multiskan EX» («Thermo Labsystems»). Качественные исследования биоплёнок выполняли под микроскопом «Nikon Eclipse 50i» («Nikon») при 20× увеличении.

Каждый эксперимент с ФТ повторяли 3 раза.

Статистическую обработку результатов анализа и визуализацию выполняли с помощью «Prism-GraphPad» («GraphPad Software»). Критерием статистической достоверности различия получаемых данных считали величину ошибки $p < 0,05$.

Результаты

Геномный анализ

Шесть изолятов филума *Pseudomonadota* представляли 3 рода. *A. ruhlandii* и *A. xylosoxidans*, выбранные для исследования, относились представителям рода, наиболее распространённым у пациентов с МВ в России. Выбор *B. cepacia* и *B. gladioli* определялся появлением новых видов *Burkholderia* spp., инфицирующих больных МВ на фоне сокращения распространения *B. cenocepacia* эпидемического генотипа ST709 [23]. *P. aeruginosa* разных генотипов, относящихся к EhoS-линии, согласно Е.А. Озер и соавт. [13], взяли в исследование как более распространённые при инфекциях пациентов с МВ по сравнению с EhoU-фенотипом [12, 24].

Геномы изолятов были представлены 1 хромосомой у *Achromobacter* и *Pseudomonas* и 3 хромосомами у *Burkholderia*. Конъюгативная плаزمид

48 Кб присутствовала только в геноме *A. ruhlandii* (IncP1), но не включала детерминант резистентности. Размер геномов *Burkholderia* на треть превышал геномы *Achromobacter* и *Pseudomonas* (табл. 1). Во всех геномах 92–98% выявленных генов кодировали белки.

При оценке потенциала резистентности исследуемых изолятов обратило на себя внимание количество эффлюксных систем, кодируемых геномами: по 12 у *P. aeruginosa*, по 16 — у *Achromobacter* spp., 27 — у *B. cepacia*, 38 — у *B. gladioli*, что создаёт дополнительные возможности для противодействия применяемой антибиотикотерапии.

Исследуя факторы вирулентности изолятов, мы сосредоточились на 4 основных группах, необходимых для адаптации бактерий к условиям нижних дыхательных путей: системы секреции, подвижности, токсины и сигналы системы QS.

Системы секреции (табл. 2) Sec, SRT, Tat и T2SS представлены в геномах изолятов всеми компонентами. T3SS обнаружены у всех изолятов, кроме *B. cepacia*; T6SS — у 5 изолятов, а у *A. ruhlandii* содержит только гены секретируемого субстрата Hcp и белка внутренней мембраны IcmF, наконец, полная T1SS есть у *B. gladioli*, а у остальных изолятов представлена только белком внешней мембраны TolC.

Основной аппарат подвижности — аппарат флагаелл — есть в геномах всех изолятов. Выявленные пили/фимбрии различались между изолятами по составу. Как видно из табл. 3, пили, отвечающие за подёргивающую подвижность и хе-

Таблица 2. Классы бактериальных систем секреции, представленные в геномах исследованных изолятов

Table 2. Classes of bacterial secretion systems represented in the genomes of the studied isolates

Классы бактериальных систем секреции белков Classes of bacterial protein secretion systems	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5045:PA33P25	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5047:PA33P30	<i>B. cepacia</i> SCCH90:Bcn202840	<i>B. gladioli</i> SCCH61:Bgd92-3601	<i>A. ruhlandii</i> SCCH137:Ach2231057	<i>A. xylosoxidans</i> SCCH131:Ach223717
Sec	+	+	+	+	+	+
SRT	+	+	+	+	+	+
Tat	+	+	+	+	+	+
T1SS	+ (TolC)	+ (TolC)	+ (TolC)	+ (TolC, HlyB, HlyD)	+ (TolC)	+ (TolC)
T2SS	+	+	+	+	+	+
T3SS	+	+		+	+	+
T4SS					+ VirD4	+ VirB5, VirB6
T6SS	+	+	+	+	+ Hcp, IcmF	+

Примечание. VirD4 — АТФаза; VirB5 — поверхностный или белок пилей; VirB6, IcmF — белки внутренней мембраны; Hcp — секретируемый субстрат.

Note. VirD4 — ATPase; VirB5 — surface/pilus protein; VirB6, IcmF — inner membrane protein; Hcp — secreted substrate.

Таблица 3. Системы пилей в геномах исследованных изолятов
Table 3. Pilus systems in the genomes of the studied isolates

Система пилей Pilus systems	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5045:PA33P25	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5047:PA33P30	<i>B. cepacia</i> SCCH90:Bcn202840	<i>B. gladioli</i> SCCH61:Bgd92-3601	<i>A. rhizandi</i> SCCH137:Ach2231057	<i>A. xylosoxidans</i> SCCH131:Ach223717
Пили, отвечающие за поддерживающую подвижность Twitching motility pili	<i>pilGHIJKRSTUKRS</i>	<i>pilGHIJKRSTUKRS</i>	-	-	-	-
Хемосенсорные пили Chemotensory pili	<i>chrABCDE</i>	<i>chrABCDE</i>	-	-	-	-
Пили IV типа Type IV pili	<i>piIABCDFFQPNMZVWXY1Y2E</i>	<i>piIABCDFFQPNMZVWXY1Y2E</i>	<i>piIABCDQW</i>	<i>piIABCDQW</i>	<i>piID</i>	<i>piID</i>
Пили IVb типа Type IVb pili	<i>flp, sraABCEf</i> <i>fimACD, cupE</i>	<i>flp, sraABCEf</i> <i>fimACD, cupE</i>	<i>flp, sraABCEf</i> <i>fimACD, cupE</i>	<i>flp, sraABCEf</i> <i>fimAD</i>	<i>flp, sraABCEf</i> <i>fimCD, cupE</i>	<i>flp, sraABCEf</i> <i>fimCD, cupE</i>
Пили, в сборке которых участвуют белки-помощники: шаперон и ушер Chaperone-Usher Pathway (CUP) pili	-	-	-	-	-	-
Белки положительной фототаксической подвижности Positive phototactic motility proteins	-	-	-	-	<i>pixH</i>	-

Примечание. *piID* — пептидаза препилина; *pixH* — регулятор ответа.
 Note. *piID* — prepilin peptidase; *pixH* — response regulator.

мосенсорику, обнаружены только в геномах *P. aeruginosa*. Пили IV типа есть у псевдомонад и *Burkholderia* spp., но отличаются перечнем компонентов, а у *Achromobacter* представлены только пептидазой препилина *piID*. Пили IVb типа есть у всех изолятов. Шаперон-ушер пили, которые кодируют 2 разных оперона: *fimACD* и *cupE1-6*, есть у *P. aeruginosa* и *B. cepacia* с полным комплектом компонентов. У *B. gladioli* в опероне *fimACD* отсутствует ген шаперона и не обнаружен оперон *cupE*. В геномах *Achromobacter* присутствует полный оперон *cupE1-6*, а в опероне *fimACD* отсутствует ген, кодирующий пилин.

Система QS как важнейшее средство коммуникации бактерий в проанализированных геномах представлена во всём многообразии. QS типа AI-1 (AutoInductor), сигнальными молекулами которой являются производные гомосеринлактона, обнаружили в геномах *P. aeruginosa* (по 2) и *Burkholderia* (по 1). В этих геномах присутствует также регулируемый AI-1 оперон биосинтеза рамнолипидов. Рамнолипиды включены в систему QS, используются бактериальными клетками для снижения поверхностного натяжения, важны для подвижности, биоплёнокообразования, поглощения гидрофобных субстратов [25].

Вторая система получила название DSF от сигнальных молекул, которые являются диффузионными сигнальными факторами. Для буркхолдерий это BDSF — *cys-2*-додеценная кислота. Другое название — *rpff/R/B/G* — по генам. В геномах ахромобактеров по 2 системы DSF, у *B. cepacia* — 1 DSF. В геномах *P. aeruginosa* и *B. gladioli* есть только гены *rpffB*.

Третья система — PQS (pseudomonas quinolone signal), сигнальной молекулой которой является 2-гептил-3-гидроксил-4-хинолон (C₇H₁₆NO₂), в полной комплектации: *pqsABCDHE*, *phnAB* — есть только у *P. aeruginosa*. В геноме *B. cepacia* присутствует *pqsE* — ген белка, отвечающего на хинолоновый сигнал, и *phnAB*, кодирующие белки синтеза антренилата — предшественника PQS [26]. У *Achromobacter* и *B. gladioli* есть только *phnAB*.

Токсины, которые способны продуцировать исследованные изоляты, можно разделить на 4 группы. Первая — токсины T3SS, действующие внутри эукариотической клетки. В геноме *P. aeruginosa* GIMC5045:PA33P25 они представлены 5 генами: *toxA*, *exoS*, *exoT*, *exoY*, *zot*. Ген *toxA* кодирует АДФ-рибозилтрансферазу. Ген *zot* — гомолог холерного токсина, действующего на зонулу окклюденс

(основной из белков плотных контактов эпителия кишечника), у второго изолята *P. aeruginosa* есть 4 гена этой группы. Ген эффектора T3SS нашли и в геномах *Achromobacter* — *axoU*. Во второй группе находятся гены токсинов, повреждающих мембрану клеток эукариот. Гены фосфолипазы С и гемолизина III есть во всех геномах, ген *tlhC* (токсина, формирующего поры) отсутствует у *Achromobacter*, в геноме *B. ceracia* есть еще один ген этой группы — *tlh*, кодирующий термолabileмный гемолизин. В третьей группе неспецифических токсинов только у *P. aeruginosa* присутствуют гены *hcnABC* (синтазы цианистого водорода). Четвертая группа токсинов, повреждающих внеклеточный матрикс, выявлена только у *B. ceracia* и представлена геном *colA* микробной коллагеназы.

Влияние ФТ in vitro

Влияние ФТ на цитотоксичность изолятов, выделенных от пациентов с МВ, начали исследовать с подбора времени контакта бактериальных клеток с клетками HeLa, учитывая медленный рост таких бактерий в культуре. Если при времени контакта 4 ч в дозах 10 и 50 МОИ цитотоксичность изолятов со-

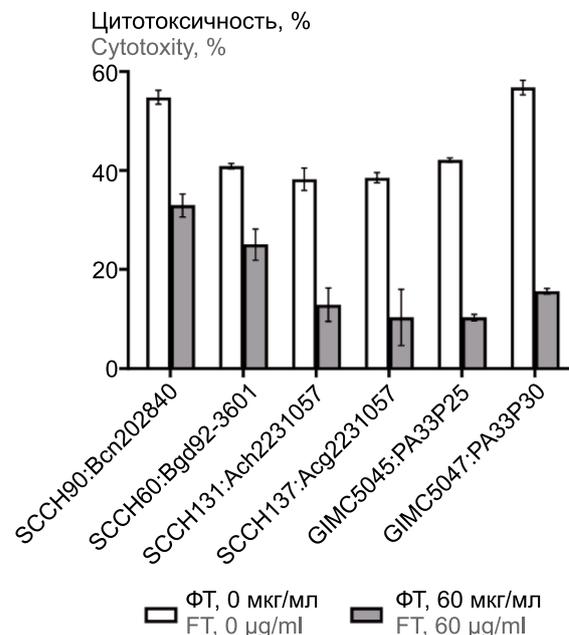


Рис. 1. Влияние ФТ на цитотоксичность бактериальных клеток в отношении клеток HeLa.

Fig. 1. Effect of FT on the cytotoxicity of bacterial cells against HeLa cells.

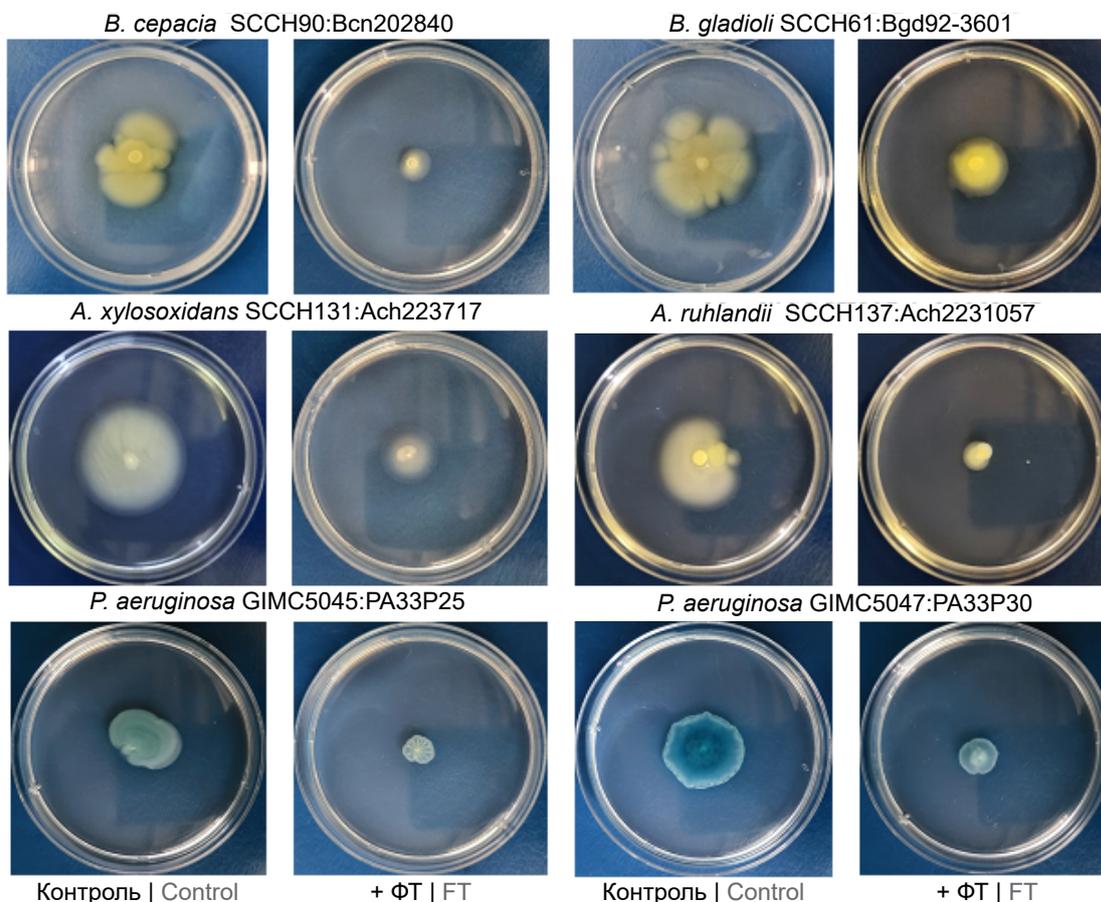


Рис. 2. Влияние ФТ на плавательную подвижность бактериальных клеток.

Fig. 2. Effect of FT on swimming mobility of bacterial cells.

ставила 16–26 и 27–43% соответственно, то после 20 ч контакта токсичность поднялась до 70–100%. Оптимальными для изучения влияния ФТ определили дозу 5 МОИ и время контакта 18 ч. Под влиянием ФТ произошло снижение цитотоксичности для всех изолятов: для изолятов *P. aeruginosa* — в 3,6 и 4,0 раза, для *B. cepacia* — в 2,6, для *B. gladioli* — в 3,2, для *A. xylosoxidans* — в 3,0, для *A. ruhlandii* — в 3,7 (рис. 1).

Подвижность изолятов *P. aeruginosa* в контроле была ниже, чем других бактерий (рис. 2). Под влиянием ФТ статистически значимо ($p < 0,05$) сократилась зона перемещения бактерий: для *P. aeruginosa* — в 2,2 и 2,8 раза, для *B. cepacia* — в 2,7, для *B. gladioli* — в 2,0, для *A. xylosoxidans* — в 2,0, для *A. ruhlandii* — в 3,6 (рис. 3).

Процесс формирования биоплёнок различался у изолятов 3 родов. Для *Burkholderia* и *Achromobacter* характерно было достаточно быстрое развитие плотных структур биоплёнки по всей площади лунки, а для *Pseudomonas* образование биоплёнки происходило медленнее и в основном было сосредоточено по краям лунки, где формировалось плотное кольцо (рис. 4). Влияние ФТ сильнее всего

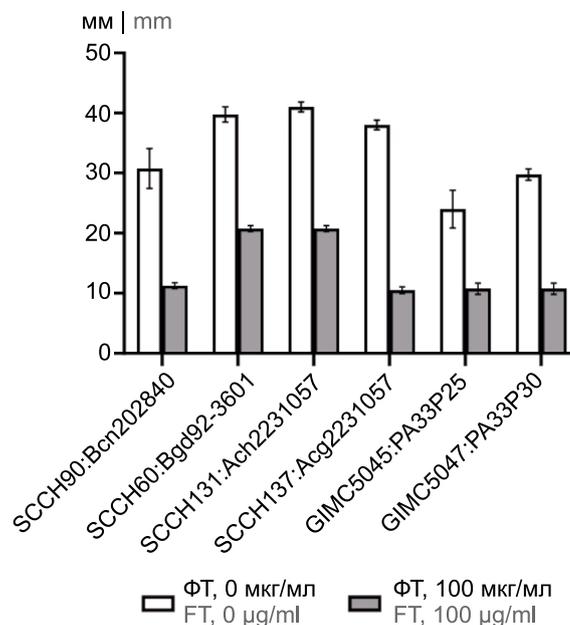


Рис. 3. Изменения диаметра зон плавательной подвижности бактерий.

Fig. 3. Changes in the diameter of bacterial swimming mobility zones.

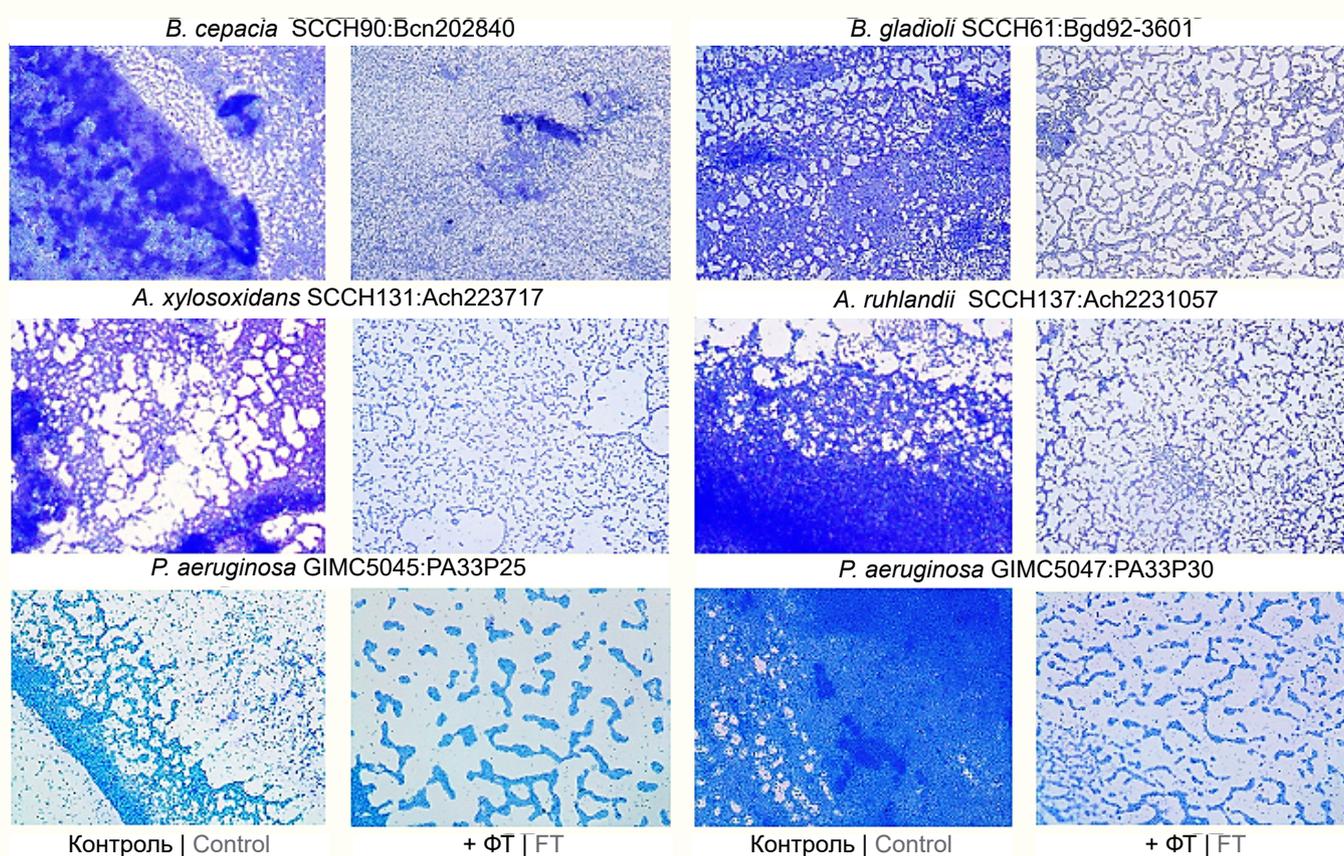


Рис. 4. Влияние ФТ на формирование бактериальных биоплёнок.

Приведены микрофотографии фрагментов образованной биоплёнки (самые плотные фрагменты).

Fig. 4. Effect of FT on the formation of bacterial biofilms.

Microphotographs of the formed biofilm fragments (the densest fragments) are shown.

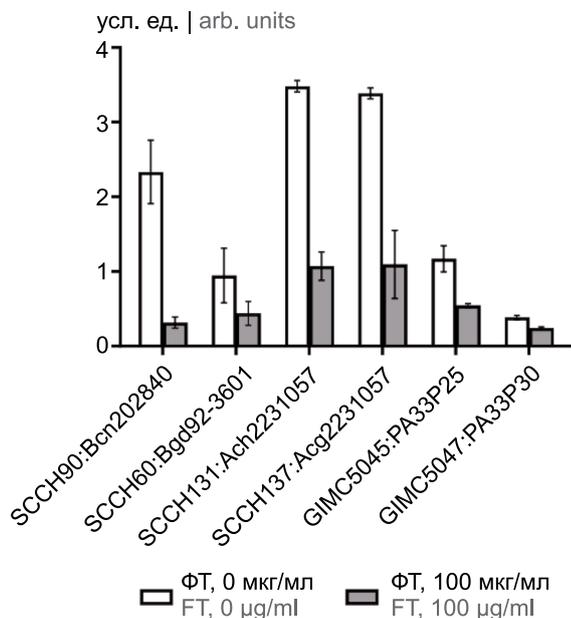


Рис. 5. Оценка накопления биомассы биоплёнок по степени окрашенности кристаллическим фиолетовым по оптической плотности при $\lambda = 540$ нм.

Fig. 5. Evaluation of biofilm biomass accumulation by the degree of crystal violet staining based on optical density ($\lambda = 540$ nm).

было выражено в отношении *B. ceracia*. Биомасса биоплёнки снизилась в 7,7 раза в присутствии антибактериального препарата. Для остальных изолятов снижение биомассы было ниже, но значительно: для *A. xylosoxidans* и *A. ruhlandii* — в 3 раза, для *B. gladioli* — в 2,3, для *P. aeruginosa* — в 2,4 и 2,0 (рис. 5).

Обсуждение

Инфекции респираторного тракта *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp. и *Burkholderia* spp. являются самыми частыми и наиболее опасными для пациентов с МВ. Множественная природная резистентность *B. ceracia complex* уже стала постулатом, предупреждение о ней прописано в рекомендациях о тестировании антибиотикочувствительности EUCAST⁸. Антибиотикограмма для *Achromobacter* spp. также является определённым вызовом для лабораторий, поскольку пороговые значения EUCAST даже в рекомендациях 2024 г. даны только для 3 субстанций. Для *P. aeruginosa* проблема заключается в том, что чувствительные *in vitro* изоляты не поддаются эрадикации выбранными препаратами. Проведённые нами геномные исследования показали, что потенциалом, обеспечивающим резистентность *P. aeruginosa* и других исследованных бактерий, мо-

гут быть системы эффлюкса, представленные в геномах в большом количестве. Не следует забывать и о биоплёнках, формирование которых успешно координируют сигналы QS, наличие и разнообразие которых мы подтвердили для всех изученных геномов. Эксперименты *in vitro* показали, что все 6 изолятов формировали плотные биоплёнки. Именно эти структуры помогают бактериям избегать действия антибиотиков в лёгких человека. Однако инновационный препарат ФТ был эффективен в отношении всех проверенных изолятов.

Цитотоксичность представителей трех родов является серьёзной проблемой для тканей лёгких больных МВ. Спектр экзотоксинов, которые могут производить изученные изоляты, достаточно широк. Следует отметить, что в исследовании протеомов *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp. и *Burkholderia* spp. нас ждёт ещё много неожиданностей и открытий, поскольку в настоящее время можно аннотировать чуть больше половины тех продуктов трансляции, которые кодируют секвенированные нами геномы. При этом лидером в аннотации является *P. aeruginosa* (57,8%), а последнее место остается за *B. gladioli* — 38,2%. В базах данных ресурсов для аннотирования отсутствуют, например, последовательности генов, кодирующих эффектор T3SS *Achromobacter* spp., поэтому мы провели дополнительный поиск гена *axoU*, обнаружив его в обоих геномах ахромобактеров, названным геном гипотетического белка. Для *B. gladioli* поиск эффекторов T3SS продолжается. S.K. Yadav и соавт. нашли ортолог эффектора T3SS у штамма *B. gladioli* NGJ1, показав наличие сигнала секреции на N-конце полипептида, аннотируемого как белок профага, и продемонстрировали его кальцийзависимую секрецию, опосредованную T3SS [27]. В составе профага рамка такого белка есть и в секвенированном нами геноме. В экспериментах *in vitro* все 6 протестированных изолятов проявили цитотоксичность в отношении клеток HeLa. Цитотоксичность *B. ceracia* была на уровне самого эффективного изолята *P. aeruginosa* при отсутствии T3SS, как показали наши геномные исследования. Следует отметить, что первая публикация, упомянувшая отсутствие T3SS у *B. ceracia*, относится к 2001 г. [28]. Возможно, еще одна наномашина, T6SS, участвует в доставке токсинов *B. ceracia*, тем более что у других бактерий T6SS и T3SS работают в координации [29].

Геномные исследования продемонстрировали арсенал факторов, отвечающих за подвижность исследованных бактерий филума *Pseudomonadota*. Основным из них для плавательной подвижности является флагелла, гены аппарата которой есть во всех 6 геномах. Такой вид подвижности мы наблюдали у протестированных изолятов, в большей степени выраженную у *B. gladioli* и *Achromobacter* в условиях эксперимента.

⁸ Antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia ceracia complex* (BCC). 2013. URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/BCC_susceptibility_testing_130719.pdf

Заклучение

Таким образом, геномные исследования и анализ изолятов *in vitro* позволили описать факторы вирулентности 6 бактерий, выделенных от хронически инфицированных пациентов, и продемонстрировать возможность их реализации всеми изолятами для важных в развитии и хронизации инфекции процессов: цитотоксичности, подвижности и формирования биоплёнки.

Инновационный антибактериальный препарат ФТ подавлял три процесса у всех изолятов *in vitro*. Эффективность ФТ в отношении изолятов, выделенных от пациентов с МВ, показана впервые. Проведённые эксперименты послужат заделом для дальнейших доклинических испытаний препарата в отношении новой нозологии, в том числе для опытов на моделях животных. Продолжающиеся всесторонние исследования самого ФТ продемонстрировали накопление препарата, введённого крысам внутрижелудочно, в различных органах животных, в том числе в лёгких [10]. Таким образом, доказательная база действенности ФТ *in vivo* и *in vitro* постоянно расширяется, что вселяет надежду в возможность появления нового помощника в предотвращении и лечении инфекций дыхательных путей у пациентов с МВ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2021 год. СПб.;2023.
2. Kazmierczak B.I., Mostov K., Engel J.N. Interaction of bacterial pathogens with polarized epithelium. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001;55:407–35. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.407>
3. Saldias M.S., Valvano M.A. Interactions of *Burkholderia cenocepacia* and other *Burkholderia cepacia* complex bacteria with epithelial and phagocytic cells. *Microbiology (Reading)*. 2009;155(Pt. 9):2809–17. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.031344-0>
4. Abdillahi S.M., Bober M., Nordin S., et al. Collagen VI is up-regulated in COPD and serves both as an adhesive target and a bactericidal barrier for *Moraxella catarrhalis*. *J. Innate Immun.* 2015;7(5):506–17. DOI: <https://doi.org/10.1159/000381213>
5. Li S.S., Saleh M., Xiang R.F., et al. Natural killer cells kill *Burkholderia cepacia* complex via a contact-dependent and cytolytic mechanism. *Int. Immunol.* 2019;31(6):385–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz016>
6. Subramani R., Jayaprakashvel M. Chapter 3. Bacterial quorum sensing: biofilm formation, survival behaviour and antibiotic resistance. In: Bramhachari P.V., ed. *Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry*. Singapore;2019:21–37. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-32-9409-7_3
7. Pickrum A.M., DeLeon O., Dirck A., et al. Achromobacter xylooxidans cellular pathology is correlated with activation of a type III secretion system. *Infect. Immun.* 2020;88(7):e00136–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00136-20>
8. Zigangirova N.A., Nesterenko L.N., Sheremet A.B., et al. Fluorothiazinon, a small-molecular inhibitor of T3SS, suppresses salmonella oral infection in mice. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2021;74(4):244–54. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00396-w>
9. Sheremet A.B., Zigangirova N.A., Zayakin E.S., et al. Small molecule inhibitor of type three secretion system belonging to a class 2,4-disubstituted-4H-[1,3,4]-thiadiazine-5-ones improves survival and decreases bacterial loads in an airway *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Biomed. Res. Int.* 2018;2018:5810767. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/5810767>
10. Savitskii M.V., Moskaleva N.E., Brito A., et al. Dose proportional pharmacokinetics, organ distribution, bioavailability and excretion of the antivirulence drug Fluorothiazinon in rats and rabbits. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-024-00719-1>
11. Zigangirova N.A., Kost E.A., Didenko L.V., et al. A small-molecule compound belonging to a class of 2,4-disubstituted 1,3,4-thiadiazine-5-ones inhibits intracellular growth and persistence of *Chlamydia trachomatis*. *J. Med. Microbiol.* 2016;65(1):91–8. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000189>
12. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С. и др. *Pseudomonas aeruginosa*. Ассистенты и конкуренты в микробиоме инфицированных легких больных муковисцидозом. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(2):186–91. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., et al. *Pseudomonas aeruginosa*. Assistants and competitors in the microbiome of infected of cystic fibrosis patients' lungs. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(2):186–91. DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15045> EDN: <https://elibrary.ru/izwatj>
13. Ozer E.A., Nnah E., Didelot X., et al. The population structure of *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by genetic isolation of exoU+ and exoS+ lineages. *Genome Biol. Evol.* 2019;11(1):1780–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evz119>
14. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001;Chapter 2:Unit 2.4. DOI: [10.1002/0471142727.mb0204s56](https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56)
15. Brettin T., Davis J.J., Disz T., et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* 2015;5:8365. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep08365>
16. Li W., O'Neill K.R., Haft D.H., et al. RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D1020–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1105>
17. Olson R.D., Assaf R., Brettin T., et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D678–89. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
18. Chen L., Yang J., Yu J., et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D325–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>
19. Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 2016;428(4):726–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
20. Alcock B.P., Huynh W., Chalil R., et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D690–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
21. Koroleva E.A., Soloveva A.V., Morgunova E.Y., et al. Fluorothiazinon inhibits the virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* involved in the development of urinary tract infection. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2023;76(5):279–90. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00602-5>
22. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilms. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2005;Chapter 1: Unit 1B.1. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>

23. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С. и др. Основные тенденции в изменении разнообразия буркхолдерий, инфицирующих российских больных муковисцидозом. *Сибирское медицинское обозрение*. 2019;(2):80–8. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., et al. Major tendencies in burkholderia diversity changes, infecting Russian patients with cystic fibrosis. *Siberian Medical Review*. 2019;(2):80–8. DOI: <https://doi.org/10.20333/2500136-2019-2-80-88> EDN: <https://elibrary.ru/aqpxee>
24. Martínez-Alemán S., Bustamante A.E., Jimenez-Valdes R.J., et al. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients induce neutrophil extracellular traps with different morphologies that could correlate with their disease severity. *Int. J. Med. Microbiol.* 2020;310(7):151451. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151451>
25. Wittgens A., Kovack F., Müller M.M., et al. Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017;101(7):2865–78. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8041-3>
26. Choi Y., Park H.Y., Park S.J., et al. Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Cells*. 2011;32(1):57–65. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10059-011-2322-6>
27. Yadav S.K., Das J., Kumar R., Jha G. Calcium regulates the mycophagous ability of *Burkholderia gladioli* strain NGJ1 in a type III secretion system-dependent manner. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):216. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01897-2>
28. Parsons Y.N., Glendinning K.J., Thornton V., et al. A putative type III secretion gene cluster is widely distributed in the *Burkholderia cepacia* complex but absent from genomovar I. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001;203(1):103–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10827.x>
29. Le Goff M., Vastel M., Lebrun R., et al. Characterization of the *Achromobacter xylosoxidans* type VI secretion system and its implication in cystic fibrosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:859181. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.859181>

Информация об авторах

Воронина Ольга Львовна[✉] — к.б.н., доцент, зав. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, olv550@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

Королева Екатерина Андреевна — к.б.н., с.н.с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9702-2940>

Кунда Марина Сергеевна — к.б.н., с.н.с. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1945-0397>

Рыжова Наталья Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5361-870X>

Аксенова Екатерина Ивановна — к.б.н., с.н.с. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>

Капотина Лидия Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0159-5053>

Нелюбина Станислава Андреевна — м.н.с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5157-1415>

Лазарева Анна Валерьевна — д.м.н., г.н.с. лаб. молекулярной микробиологии, зав. лаб. микробиологии НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3896-2590>

Зигангирова Наиля Ахатовна — д.б.н., профессор, г.н.с., зав. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3188-1608>

Вклад авторов: Воронина О.Л. — методология и дизайн геномного исследования, биоинформационный анализ, написание и редактирование рукописи; Королева Е.А. — исследования *in vitro*, анализ результатов, визуализация, написание рукописи; Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И. — геномные исследования, биоинформационный и статистический анализ, визуализация, написание рукописи; Капотина Л.Н. — исследования *in vitro*; Нелюбина С.А. — методика исследования биоплёнок *in vitro*; Лазарева А.В. — выделение культур микроорганизмов; Зигангирова Н.А. — методология и дизайн исследования *in vitro*, редактирование рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.02.2024;
принята к публикации 23.03.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Olga L. Voronina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Assistant Professor, Head, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, olv550@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

Ekaterina A. Koroleva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of chlamydia, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9702-2940>

Marina S. Kunda — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1945-0397>

Natalia N. Ryzhova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5361-870X>

Ekaterina I. Aksenova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>

Lidia N. Kapotina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of chlamydia, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0159-5053>

Stanislava A. Nelubina — junior researcher, Laboratory of chlamydia, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5157-1415>

Anna V. Lazareva — D. Sci. (Med.), chief researcher, Laboratory of molecular microbiology, Head, Laboratory of microbiology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3896-2590>

Nailya A. Zigangirova — D. Sci. (Biol.), Professor, chief researcher, Head, Laboratory of chlamydia, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3188-1608>

Author contribution: Voronina O.L. — methodology and design of genomic research, bioinformatics analysis, writing and editing of the manuscript; Koroleva E.A. — *in vitro* studies, analysis of results, visualization, writing the manuscript; Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I. — genomic research, bioinformatics and statistical analysis, visualization, manuscript writing; Kapotina L.N. — *in vitro* studies; Nelubina S.A. — methodology for studying biofilms *in vitro*; Lazareva A.V. — isolation of microorganism cultures; Zigangirova N.A. — methodology and design of the *in vitro* study, editing the manuscript.

The article was submitted 09.02.2024;
accepted for publication 23.03.2024;
published 29.04.2024