

На правах рукописи

ПОСПЕЛОВА Юлия Сагитовна

**КОНЬЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС ПРОИЗВОДНОЙ F-ПЛАЗМИДЫ В КЛЕТКИ
ШТАММОВ ЭКСТРАИНТЕСТИНАЛЬНОЙ *ESCHERICHIA COLI***

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2021

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент
Кузнецова Марина Валентиновна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН
Гриценко Виктор Александрович

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией антимикробной резистентности Института экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО) ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет»
Васильченко Алексей Сергеевич

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29)

Защита состоится «___» _____ 2021 г. в ____.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2021г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и состояние вопроса

У бактерий приобретение устойчивости к стрессовым факторам происходит постоянно и обусловлено мутациями в геноме или переносом генетического материала между клетками с помощью различных механизмов: конъюгации, трансформации и трансдукции. Самым распространенным вариантом изменения генома при горизонтальном переносе у бактерий является конъюгация, когда происходит однонаправленная передача плазмиды от клетки-донора к клетке-реципиенту при их непосредственном физическом контакте (Guglielmini *et al.*, 2011). Важность изучения переноса генов между клетками микроорганизмов определяется появлением множества лекарственно-устойчивых бактерий, связанным с широким применением антибиотиков в различных сферах человеческой деятельности (Bethke *et al.*, 2020). Во многих случаях мутационные изменения, ведущие к резистентности, дорого обходятся гомеостазу клетки, то есть снижают приспособленность, и поддерживаются только при условии присутствия антибиотика в среде. В противовес этому горизонтальный перенос генетической информации у бактерий может действовать как направленная эволюционная сила, способствуя распространению различных генов, включая гены устойчивости к антибиотикам, в популяциях, на которые не действуют факторы отбора (Woods *et al.*, 2020). Несмотря на многолетнюю историю изучения конъюгации, в настоящее время наблюдается возрастающий интерес к горизонтальной передаче генетической информации в микробных сообществах как механизму формирования новых, в том числе мультирезистентных, групп микроорганизмов (Leungtongkam *et al.*, 2018; McCarron *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2019; Bethke *et al.*, 2020). Эффективность горизонтального переноса генов в клетки диких штаммов *E. coli* на сегодняшний день мало изучена. Большинство работ показывают зависимость конъюгации от различных факторов на примере коллекционных штаммов (Leungtongkam *et al.*, 2018; Bello-López *et al.*, 2019; Ragupathi *et al.*, 2019), которые, в отличие от клинических или природных изолятов, имеют сниженный вирулентный потенциал.

Escherichia coli – основной модельный объект микробиологии. Однако важность изучения данного микроорганизма определяется также его клинической значимостью. Среди эшерихий выделяют как абсолютных патогенов (диареогенные *E. coli*, DEC), так и условно-патогенные штаммы, способные вызывать заболевания вне кишечного тракта (экстраинтестинальные *E. coli*, ExPEC). К числу последних относятся уропатогенные *E. coli* (UPEC), сепсис- и менингит-ассоциированные *E. coli* (SPEC и NMEC), а также патогенные для птиц *E. coli* (APEC) (Allocati *et al.*, 2013).

Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) являются наиболее распространенными инфекционными заболеваниями, как в амбулаторной, так и в госпитальной практике (Morales-Espinosa *et al.*, 2016; Terlizzi *et al.*, 2017; Tewawong *et al.*, 2020). Основными возбудителями ИМВП являются уропатогенные штаммы *E. coli*, часто характеризующиеся большим разнообразием биологических свойств (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Tewawong *et al.*, 2020), что может влиять на передачу плазмиды при внутривидовом скрещивании. Кроме того, при катетер-ассоциированных ИМВП эти бактерии часто обнаруживаются в ассоциациях с представителями таких родов, как *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Candida* (Палагин и др., 2019; Набока и др., 2020; Klein *et al.*, 2020; Ahmed, Yosry, 2021). В полимикробных сообществах формируются определенные взаимоотношения между участниками, которые могут носить как симбиотический, так и антагонистический характер (Гриценко и др., 2016; Juarez, Galvan, 2018). Вектор взаимодействий микроорганизмов может определять эффективность внутривидового распространения плазмид в популяции.

E. coli, патогенные для птиц, отнесенные к дополнительному «животному» патотипу, встречаются в микробиоте кишечника здоровой птицы, однако часто ассоциированы с внекишечными заболеваниями – аэросаккулитом и системным колибактериозом (Sarowska *et al.*, 2019; Thomrongsuwannakij *et al.*, 2020). Создание новых средств специфической профилактики и терапии бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных, и, в

частности, птицы, сопряженное с мониторингом и изучением биологических свойств наиболее распространенных бактериальных этиопатогенов, представляет существенную научную и практическую значимость. Многочисленные исследования доказывают, что данная группа *E. coli* обладает высоким зоонозным потенциалом (Mitchell *et al.*, 2015; Najafi *et al.*, 2019; Meena *et al.*, 2020; Zhuge *et al.*, 2020), а значит важность изучения «животных» штаммов больше не ограничивается областью ветеринарии.

Многokратно была подтверждена способность бактерий передавать гены резистентности к различным антибиотикам при горизонтальном переносе с высокой эффективностью (Leungtongkam *et al.*, 2018; Bello-López *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; McCarron *et al.*, 2019). Показано влияние ряда физиологических характеристик штаммов и факторов окружающей среды на конъюгацию (Harrison *et al.*, 2015; Loftie-Eaton *et al.*, 2017; Lopatkin *et al.*, 2017; Prensky *et al.*, 2021). Несмотря на зависимость от некоторых условий, конъюгация, по всей видимости, является настолько важным адаптивным механизмом, что бактерии не способны избегать участия в этом процессе (Moriguchi *et al.*, 2020). В связи с этим механизм конъюгативного переноса генов может быть рассмотрен в аспекте биотехнологии как основа для создания профилактических и лекарственных препаратов направленного действия. Сегодня активно разрабатывается концепция, названная технологией на основе бактериальной конъюгации, целью которой является использование биологии плазмид для борьбы с распространением антибиотикоустойчивых бактерий (Filutowicz *et al.*, 2008). Тем не менее, в вопросе конъюгативно-опосредованной изменчивости микроорганизмов остается большое количество недостаточно изученных аспектов, требующих более детального рассмотрения.

Цель исследования: охарактеризовать зависимость конъюгативного переноса плазмиды рОХ38 в клетки штаммов *E. coli* дикого типа от биологических свойств реципиентов и факторов окружающей среды.

Задачи исследования:

1. Сформировать коллекции штаммов уропатогенной *E. coli* и *E. coli*, патогенной для птиц, и изучить их фенотипические и молекулярно-генетические особенности.
2. Провести сравнительный анализ генетических профилей двух групп штаммов и оценить зоонозный потенциал *E. coli*, патогенных для птиц.
3. Охарактеризовать внутривидовой конъюгативный перенос плазмиды рОХ38 в клетки штаммов *E. coli in vitro* в зависимости от свойств реципиента и факторов окружающей среды.
4. Оценить возможность внутривидового конъюгативного переноса плазмиды рОХ38 в штаммы *E. coli* в модельных системах *in vivo*.

Научная новизна. Впервые оценена связь генетического профиля культур с уровнем специфической и неспецифической адгезии. Выявлено, что фимбриальные адгезины в большей степени определяли бактериальную адгезию и биопленкообразование, чем афимбриальные. Проанализирована встречаемость набора генов вирулентности уропатогенных, диареогенных и патогенных для птиц *E. coli* среди штаммов АРЕС, показано, что последние имеют высокий зоонозный потенциал и по генетическому профилю наиболее близки к представителям диареогенных эшерихий.

Впервые при анализе эффективности конъюгативной передачи генов применен комплексный подход, а именно, конъюгация оценена в зависимости от свойств бактерий реципиента, а также внешних факторов и условий передачи: состояния клеток – свободное/прикрепленное, физико-химических характеристик поверхности, присутствия клеток других видов бактерий или их метаболитов. Показано, что способность к приему конъюгативных плазмид широко распространена среди клинических штаммов *E. coli*, при этом, в условиях формирования биопленки передача плазмиды происходит значительно эффективнее, чем в планктоне. Массивность биопленки играет существенную роль в частоте конъюгации, а именно, штаммы, образующие менее массивные биопленки, имели более высокую частоту переноса плазмиды. Филогенетическая группа реципиентов, продукция бактериоцинов или наличие бактериофага не определяли данный параметр, тогда как

множественная устойчивость штаммов сильно коррелировала с высокой частотой конъюгации. Впервые проведены эксперименты по конъюгации с плазмидой pOX38 в смешанных микробных сообществах в условиях *in vitro* (для UPEC) и *in vivo* (для APEC). На примере трех ассоциаций продемонстрированы некоторые особенности взаимоотношений между разными видами микроорганизмов в биопленочном сообществе. Установлено, что при совместном росте *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae* частота передачи плазмиды внутри биопленки значительно не изменялась, а присутствие клеток *Enterococcus faecalis* и *Pseudomonas aeruginosa* снижало данный показатель. Доказан конъюгативный перенос гена *colE7* в клетки *E. coli in vitro* и *in vivo*. Показано, что штамм *E. coli* ŽP эффективно заселяет кишечник животных, сохраняется в нем длительное время и способен передавать плазмиду с частотой 10E-02.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты выполненного исследования расширяют представления о механизмах адаптации бактерий в окружающей среде. Собранная рабочая коллекция культур, различающихся по фено- и генотипу, может быть востребована и перспективна для проведения фундаментальных и прикладных исследований по изучению биологических свойств и физиологических процессов эшерихий, в том числе, характеризующих межвидовые взаимоотношения в бактериальных популяциях *E. coli*. Информация о бактериальной адгезии и колонизационной активности ведущего этиопатогена инфекций мочевыводящих путей на поверхности наиболее востребованных в урологической практике уретральных катетеров может быть полезна в экспериментальной работе, направленной на модификацию поверхности катетеров, с целью предотвращения или ингибирования формирования бактериальных биопленок. Разработанные и предложенные методики определения адгезивной активности и биопленкообразования (учет биомассы и количества жизнеспособных клеток с учетом формы катетера, в том числе в смешанных культурах (патент RU 2665840 C1), подана заявка на патент «Способ оценки влияния средств на бактериальную колонизацию поверхности катетеров», регистрационный номер 2021120614) могут быть использованы для оценки новых антибактериальных средств и материалов, предлагаемых для применения в здравоохранении.

Показано, что APEC состоят из разнообразных субпатотипов с преобладанием гибридных патотипов APEC/DEC и характеризуются высокими частотами встречаемости не только генов вирулентности, но и генов бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и участков интегронов 1 класса. Выявлено, что у представителей *E. coli* наличие генов *bla_{STX-M}* обычно коррелирует с множественной устойчивостью к антибактериальным агентам. Полученные данные могут служить эпидемиологическим инструментом в планировании и реализации методов профилактики и контроля эшерихиозов птиц, а также иметь решающее значение в руководстве эмпирического лечения инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных.

Описаны особенности конъюгации в различных моделях *in vitro* (планктон и биопленка) и *in vivo* (кишечный тракт). Изучение конкурентоспособности искусственно сконструированных штаммов в сравнении с дикими культурами позволило более точно оценить возможность использования генно-модифицированных микроорганизмов в открытых системах. Полученные данные могут служить теоретической основой для разработки бактериальных векторов, имеющих биотехнологическую ценность, например, ветеринарных пробиотиков нового поколения – препаратов направленного действия, обеспечивающих активную защиту животного от патогенных микроорганизмов за счет колонизационной резистентности и механизма горизонтального переноса выбранных генов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Биологические свойства внекишечных штаммов *E. coli*, выделенных от человека и птиц, существенно варьируют у индивидуальных представителей внутри групп. Независимо от патотипа культуры являются носителями множественных генов вирулентности, имеют высокий уровень устойчивости к антимикробным веществам и продуцируют БЛРС преимущественно TEM и STX типов. Подавляющее большинство штаммов APEC по

генетическому профилю имеют сродство с группой диареогенных эшерихий, что свидетельствует об их высоком зоонозном потенциале.

2. Биологические свойства реципиента, условия и факторы окружающей среды влияют на частоту передачи плазмиды рОХ38 при внутривидовом скрещивании штаммов *E. coli*. В условиях формирования биопленки реципиенты принимают плазмиду эффективнее, чем при росте в планктонной форме, при этом наблюдается обратная зависимость частоты конъюгации от биомассы биопленки, обусловленной биопленкообразующей способностью штамма-реципиента, характером абиотической поверхности и присутствием бактерий-ассоциантов. Множественная лекарственная устойчивость положительно коррелирует с высокой частотой передачи плазмиды.

3. Конъюгативно-опосредованная антибактериальная система эффективно работает в *in vitro* и *in vivo* моделях как средство направленного действия на потенциально патогенные штаммы *E. coli* и может быть рассмотрена в качестве основы для создания пробиотических препаратов.

Публикации и апробация работы. Научные положения и выводы обоснованы и базируются на воспроизводимых экспериментальных данных, степень достоверности которых доказана путем обработки полученных результатов с использованием статистических методов. По материалам диссертации опубликовано 24 печатные работы, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Зарегистрирован патент RU 2665840 С1.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на IV Международной конференции ICOMID «Микробное разнообразие: ресурсный потенциал» (Москва, 2016), II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Казань, 2016), II Международной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), 8 конгрессе сообщества генетиков Словении «GENETIKA 2018» (Любляна, 2018), Краевой сельскохозяйственной выставке «Агрофест 2019» (Пермь, 2019), Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии (XXII Кашкинские чтения; С.-Петербург, 2019), XII Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2020» (Пермь, 2020), 45 международном конгрессе FEBS 2021 (Любляна, 2021) и World Microbe Forum 2021 (online worldwide, 2021).

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 159 страницах машинописного текста, содержит 21 рисунок и 18 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, двух глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 228 наименований работ, в том числе 26 отечественных и 202 зарубежных авторов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» и является частью исследований, проводимых по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290009-1. Исследования поддержаны грантами В1-RU/16-18-047, РФФИ № 19-44-590014-р_а, МИГ № С-26/792, УМНИК № 14837ГУ/2019.

Личный вклад автора состоял в планировании и проведении экспериментов, включая бактериологические и молекулярно-генетические исследования, эксперименты *in vivo*. Автор проводил критический анализ полученных данных и их интерпретацию, подготавливал результаты работы к публикации и их представлению на научных конференциях.

Автор выражает благодарность профессору биотехнологического факультета университета Любляны, PhD, Marjanca Starcic Erjavec за предоставление бактериальной системы «kill»-«anti-kill», а также ряда коллекционных штаммов и содействие в работе, д.м.н., профессору Горовицу Эдуарду Семеновичу и сотрудникам кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ за помощь в

выделении культур АРЕС и в проведении экспериментов *in vivo*, Масленниковой Ирине Леонидовне – к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунорегуляции «ИЭГМ УрО РАН» за помощь в проведении экспериментов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объекты исследования. В работе в качестве реципиентов (R) использовали культуры *E. coli*, выделенные от пациентов медицинских учреждений г. Перми с инфекциями мочевыводящих путей (n=198) и от вынужденно забитой птицы с системным колибактериозом (n=50). В качестве донора (D) плазмидной ДНК выступал рекомбинантный штамм *E. coli* N4i pOX38 Gen^RCm^R (Starčič Erjavec *et al.*, 2015). Также в работе были использованы референс-штаммы: *E. coli* DL82 Amp^R (Rijavec *et al.*, 2006), *E. coli* K12 TG1 Amp^R (Данилов др., 2002), *K. pneumoniae* ATCC[®]700603, *P. aeruginosa* ATCC[®]27853 и *E. faecalis* ATCC[®]29212, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А. Тарасевича (сейчас ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, г. Москва).

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



Рисунок 1. Дизайн проведенного исследования.

Скрининг штаммов на продукцию бактериоцинов и чувствительности к бактериоцинам проводили с помощью техники «двойного слоя» по методу «отсроченного антагонизма» (Budič *et al.*, 2011). **Наличие бактериофага** в клетках определяли с помощью метода индукции УФ-излучением. **Определение уровня неспецифической адгезии** проводили в стеклянных пенициллиновых флаконах (гидрофильная поверхность) и в полистироловых 96-ти луночных плоскодонных планшетах («Медполимер», Россия) (гидрофобная поверхность), согласно (Николаев, 2000). **Уровень специфической адгезии** бактерий к эритроцитам человека (A0+) и куриц определяли по методу (Брилис и др., 1986).

Определение биомассы биопленок. Биопленки выращивали в плоскодонном полистироловом планшете, биомассу биопленки определяли с помощью окраски 0,1% генциановым фиолетовым в течение 30 мин, согласно (Merritt *et al.*, 2005). Для **оценки массивности полимерного матрикса** биопленки, выращенные в лунках черного непрозрачного планшета (Nunc, Дания), окрашивали водным раствором коА-тетраметилпродамина («Invitrogen», Life Technologies, США) (500 мкг/мл) в течение 40 мин в темноте. Массивность полисахаридного каркаса матрикса оценивали по интенсивности

флуоресценции биопленки на планшетном ридере Infinite M1000 pro (TECAN, Швейцария) при λ возбуждения/испускания 555/580 нм (Зорина и др., 2019).

Определение чувствительности штаммов к антибактериальным препаратам проводили, согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ, Версия-2018-03).

Производство бета-лактамаз расширенного спектра детектировали с помощью метода «двойных дисков», согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04.

Характеристика антибактериальной системы «kill»-«anti-kill». ColE7-опосредованная «kill»-«anti-kill» система создана на основе пробиотического штамма Nissle 1917, включает генномодифицированный штамм *E. coli* ŽP pOX38a Gm^RCm^R (киллерный донор, KD), несущий на конъюгативной плазмиде ген колицина E7 (*colE7*) с ДНКазной активностью, а также ген *immE7* в хромосоме, и штамм *E. coli* N4i pOX38 Gm^RCm^R (контрольный донор, D) без *colE7* на плазмиде (Starčič Erjavec *et al.*, 2015).

Эксперименты по конъюгативному переносу *in vitro*. Частоту конъюгации оценивали в стандартной модели (полистироловый планшет) в планктоне и биопленке. Конъюгативную смесь формировали из реципиента и донора в соотношении 4:1. Для оценки количества жизнеспособных клеток определяли число колониеобразующих единиц (КОЕ/мл). Клетки реципиента отбирали на среде с ампициллином (50 мкг/мл), клетки донора – на среде гентамицином (40 мкг/мл), клетки трансконъюганта – на среде с ампициллином (50 мкг/мл) и хлорамфениколом (50 мкг/мл). Частоту конъюгации оценивали как соотношение числа КОЕ трансконъюгантов к КОЕ реципиентов (Guglielmetti *et al.*, 2009).

Для оценки конъюгативного переноса на поверхности урологических катетеров использовали коммерчески доступные модели катетеров, разрешенные к применению в современной медицинской практике: Фолея 2-ходовой (латекс, силикон с серебряным напылением) и Нелатона (имплантационно-нетоксичный медицинский поливинилхлорид (ПВХ), силикон) («Arxmed International BV», Нидерланды). **В экспериментах по конъюгативному переносу в смешанных биопленках** конъюгативную смесь формировали из реципиента и донора в соотношении 4:1 (контрольная модель) или реципиент, ассоциант/бесклеточная культуральная жидкость, донор в соотношении 2:2:1 (экспериментальная модель).

Эксперименты по конъюгативному переносу *in vivo*. Все опыты выполняли в виварии на базе ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ. Общий уход за крысами и птицами осуществлялся в соответствии с ГОСТ 34088-2017 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными). Животные были разделены на три группы: контрольная группа (К), получавшая физиологический раствор, группа, получавшая бактерий контрольного донора (I), группа, получавшая бактерий киллерного донора (II). В контрольные точки определяли наличие в кишечнике бактерий-реципиентов, доноров и трансконъюгантов. Число жизнеспособных клеток рассчитывали на 1 г фекалий, частоту конъюгации определяли аналогично эксперименту *in vitro*.

Полимеразная цепная реакция. Генетическое типирование изолятов проводили методом гер-ПЦР с праймерами M13 и ERIC1/2 (Huey, Hall, 1989; Versalovic *et al.*, 1991), **определение филогенетической группы** осуществляли по методу (Clermont *et al.*, 2013).

Детектировали гены адгезинов, факторов вирулентности, продукции бактериоцинов, БЛРС. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы ООО «Синтол» (Россия), согласно литературным источникам. Амплификацию ДНК проводили на термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США), визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США).

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Office XP Excel и STATISTICA 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Характеристика уропатогенных *E. coli*. В ходе данного исследования была собрана и проанализирована коллекция из 198 изолятов UPEC, выделенных при ИМВП от пациентов поликлиник и стационаров. Первичная коллекция была проверена на генетическое разнообразие, в результате молекулярного типирования были выделены 116 культур с индивидуальным генетическим профилем. Поскольку основной задачей исследования была оценка частоты конъюгативного переноса производной F-плазмиды, штаммы были отобраны по фенотипу чувствительности к антибиотикам (Amp^R, Cm^S, Gen^S). Таким образом, в итоговую рабочую коллекцию были взяты 29 штаммов UPEC.

Среди исследуемых уропатогенных *E. coli* с помощью метода мультиплексной ПЦР были детектированы представители 6 распознаваемых филогрупп (A, B1, B2, C, E, F), а также U и Clad I/II. Большинство культур принадлежали к группе B2 (41,38%), которую принято ассоциировать с высоким вирулентным потенциалом UPEC. Продукция бактериоцинов была обнаружена у 13 штаммов, инфицирование бактериофагом выявлено только у 4 культур. Уропатогенные штаммы *E. coli* проявляли разную адгезивную активность по отношению к абиотическим поверхностям, при этом была обнаружена достоверная разница (*W*-test: $p=0,047$) в уровнях неспецифической адгезии штаммов к гидрофобной (Me: 5,58, Q1-Q3: 1,76-9,73) и гидрофильной (Me: 2,43, Q1-Q3: 1,39-3,41) поверхностям. Сильная корреляция ($rs=0,69$) была определена для принадлежности штамма к группе B2 и уровня гидрофобной адгезии.

Среди штаммов UPEC наибольший уровень резистентности был зафиксирован к ципрофлоксацину (58,62% культур), цефотаксиму (44,83% культур) и левофлоксацину (41,38% культур). Пять штаммов были отнесены к группе полирезистентных (устойчивость к 5 и более антибиотикам, согласно (Magiorakos *et al.*, 2012)). Продукция бета-лактамаз расширенного спектра была выявлена у 9 культур (31,03%). Двадцать четыре культуры UPEC (82,76%) обладали устойчивостью к пяти и более бактериоцинам, тринадцать штаммов (44,83%) – более чем к пятнадцати и пять штаммов оказались нечувствительны ко всем протестированным бактериоцинам.

Среди исследуемых штаммов самым часто детектируемым геном адгезинов был универсальный для бактерий *E. coli* *fimH* (72,41%). Вторым по распространенности оказался ген *flu*, кодирующий поверхностный антиген Ag43a (68,97%). Чуть менее половины представителей выборки (48,28%) имели *papGII*. Ген *iha*, гомолог адгезина, был обнаружен у 44,83% штаммов. В 34,48% детектировали ген Р-фимбрий *papC*. С равной частотой 20,69% встречались ген S-фимбрий *sfaDE*, ген нефимбриального адгезина *afa/draBC*, а также ген *yqi*, кодирующий фимбриальный адгезин, ассоциированный с группой *E. coli*, патогенных для птиц. Частота определения гена другого нефимбриального адгезина (*uraG*) была 13,79%, а *papGIII* – 10,34%. В результате анализа встречаемости генов адгезинов среди 29 штаммов были определены 22 индивидуальных адгезивных генотипа. Из представленной выборки повторялись следующие комбинации генов: *fimH+flu+papGII* (n=3), *fimH+papGII* (n=2), *flu+iha+papGII* (n=2), *fimH+flu+iha+papGII* (n=2). Вариативность сочетаний разных детерминант адгезии представлена на рисунке 2. Выявлено, что штаммы, несущие гены только фимбриальных адгезинов, в среднем, имели большие показатели адгезии к стеклу и эритроцитам (рис. 3, а, в), в то время как штаммы с генами только афимбриальных адгезинов – к полистиролу (рис. 3, б).

Среди вирулентных генов, наиболее часто характеризующих группу UPEC, самыми распространёнными были гены системы захвата и транспорта железа *chuA* (62,07%) и *iroN* (27,61%). Шесть штаммов (20,68%) были носителями генов цитотоксического некротического фактора 1 (*cnfI*) и гемолизина (*hlyA*). Четыре штамма (13,79%) были носителями гена *iss*, обеспечивающего резистентность к сыворотке крови, 10,98% имели ген

домен-связывающего белка Toll/интерлейкинового рецептора (*tcpC*). Отдельно стоит отметить, что 27,27% штаммов имели ген позитивного регулятора конъюгации *traJ*. Специфическая амплификация к гену *bla_{STX-M}* выявлена у одиннадцати (37,93%) штаммов, вторым по частоте встречаемости оказался *bla_{TEM}* (n=5; 17,24%), в двух случаях определены гены *bla_{SHV}* или *bla_{OXA}*. В восьми случаях (27,58%) детектированы фрагменты интегронов.

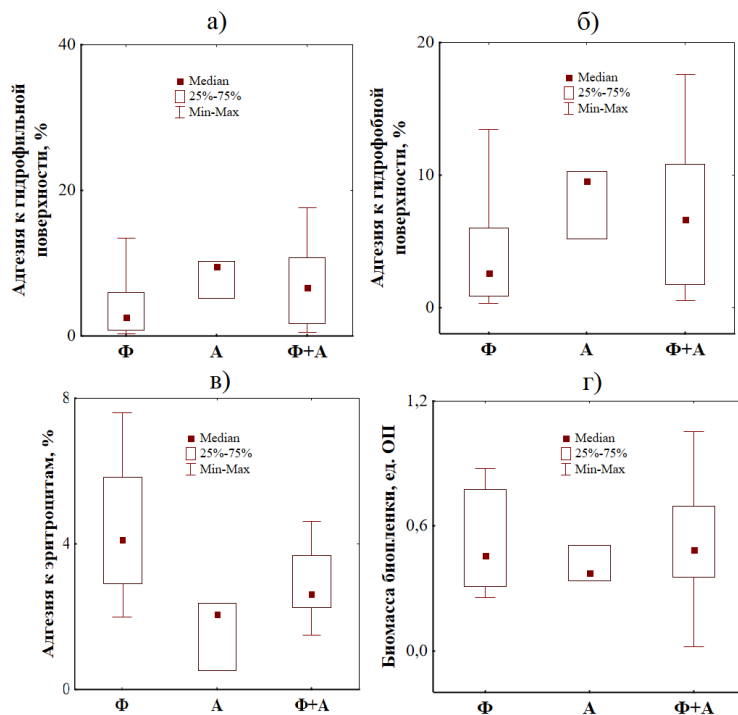
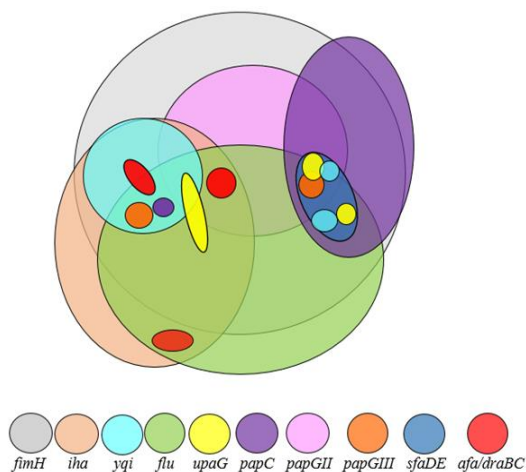


Рисунок 2. Варианты комбинаций генов адгезинов среди штаммов UPEC.

Рисунок 3. Уровни адгезии клеток UPEC к стеклу (а), полистиролу (б), эритроцитам (в) и массивность биопленки (г) в зависимости от присутствия генов фимбриальных (Φ) и афимбриальных (А) адгезинов или их комбинации (Φ+А).

Таким образом, изученные штаммы UPEC демонстрировали разнообразие биологических свойств, определяющих их успешное существование в мочеполовом тракте. Клинические UPEC в большинстве случаев принадлежали к филогруппе В2, проявляли устойчивость к широкому спектру колицинов и применяемых в урологии антибиотиков, среди культур часто встречались продуценты бактериоцинов. Исследуемые UPEC также характеризовались как носители множественных детерминант вирулентности, ассоциированных с адгезией, токсинообразованием и устойчивостью к антибиотикам.

Характеристика *E. coli*, патогенных для птиц. За период 2016-18 гг. было исследовано более 250 органов куриц с системной коли-инфекцией с птицефабрик Пермского края. Для эксперимента брали по одной культуре *E. coli*, выделенной от каждой птицы, всего для изучения были взяты 50 культур. По результатам ERIC-типирования среди первичной коллекции выявлены 28 индивидуальных геномвариантов АРЕС.

Среди штаммов *E. coli* (n=28) детектированы представители семи распознаваемых филогрупп. Чаще всего определялась группа В1 – 8 (28,57%) штаммов, вторыми по распространенности были группы В2 и Е – по 4 (14,28%) штамма, далее следовали группы А, С и F – по 2 (7,14%) штамма, D – 1 (3,57%) штамм. Продукция бактериоцинов определена у 20 (71,43%) АРЕС. Присутствие бактериофага было выявлено только в двух штаммах из коллекции (7,14%).

Бактерии АРЕС проявляли разную адгезивную активность по отношению к абиотическим поверхностям, однако не было обнаружено достоверных различий в уровнях

неспецифической адгезии штаммов к гидрофобной (Me: 3,43, Q1-Q3: 0,44-13,86) и гидрофильной (Me: 0,76, Q1-Q3: 0-6,63) поверхностям. Клетки двадцати штаммов (71,43%) лучше прикреплялись к поверхности куриных эритроцитов, шести штаммов (21,43%) – на поверхности человеческих, и у двух культур (7,14%) показатели адгезии не различались. Биопленки формировали 42,85% штаммов *E. coli*, и их массивность значительно варьировала внутри исследуемой выборки.

Практически у всех исследованных культур АРЕС выявлена устойчивость к тетрациклину, налидиксовой кислоте и триметоприм-сульфаметоксазолу (табл. 1). Для большинства штаммов детектирована устойчивость к ампициллину (82,13%), к цефатоксиму и цефтазидиму не чувствительными оказались 12 (42,90%) и 11 (39,39%) культур, соответственно. Устойчивость к аминогликозидам варьировала от 10,75% к амикацину до 46,43% к гентамицину. Уровень резистентности к фторхинолонам, напротив, сходен для ципрофлоксацина (50,0%) и левофлоксацина (46,45%). Все АРЕС обладали устойчивостью к десяти и более бактериоцинам, 11 штаммов (39,39%) – более чем к пятнадцати и 2 штамма оказались нечувствительны ко всем протестированным бактериоцинам. Обнаружена отрицательная слабая связь во взаимоотношении устойчивости эшерихий к антибиотикам и бактериоцинам: устойчивые к большому спектру бактериоцинов штаммы чаще чувствительны к антибиотикам ($r_s = -0,27$). Интересен тот факт, что эффективность колицинов с ДНКазной активностью не зависела от устойчивости штамма к антибиотикам, то есть данный тип колицинов эффективен даже для мультирезистентных бактерий.

Таблица 1

Распространенность устойчивости к различным антибактериальным агентам среди штаммов АРЕС

Антибиотики	Устойчивые штаммы, %	Бактериоцины	Устойчивые штаммы, %	Бактериоцины	Устойчивые штаммы, %
Амикацин	10,7	<i>Колицины группы А</i>		Е6	32,1
Гентамицин	46,4	А	96,4	Е7	53,6
Тетрациклин	78,6	К	53,6	Е8J	28,6
Ципрофлоксацин	50,0	Н	100	<i>Колицины группы В</i>	
Левофлоксацин	46,4	С4	92,9	В	100
Триметоприм	82,1	Е1	85,7	Іа	100
Сульфаметоксазол	82,1	Е2	46,4	Іб	96,4
Ампициллин	82,1	Е3	53,6	D	100
Цефотаксим	42,9	Е4	25,0	М	100
Цефтазидим	39,3	Е5	60,7		

Исследованные штаммы АРЕС в 92,8% случаев несли ген *fimH*, кодирующий фимбриальный адгезин. Двадцать один штамм (75,0%) АРЕС имел ген адгезина *iha*, относящийся к факторам патогенности диареогенных *E. coli*. Белок-адгезин уропатогенных штаммов *E. coli*, кодируемый геном *uraG*, был обнаружен у 67,88%. Следующим был специфический птичий адгезин *Yqi* (*yqi*) – 60,75%. Ген инвазина *ibeA* встречался у небольшого количества АРЕС – 27,58%. В результате анализа встречаемости генов адгезинов среди 28 штаммов были определены всего лишь 10 индивидуальных адгезивных генотипов. Из представленной выборки повторялись следующие комбинации генов: *fimH+iha+uraG+yqi* (n=10), *fimH+iha+uraG+yqi+ibeA* (n=4), *fimH+iha+uraG* (n=4), *fimH* (n=3).

Среди вирулентных генов, наиболее часто характеризующих патотип АРЕС, самым распространённым был ген специфического птичьего гемолизина *hlyF* (82,1%), 75,0% штаммов были носителями гена *subAB*, кодирующего цитотоксин субтилазы, характерный для шига-токсинов продуцирующих штаммов *E. coli*, однако при этом в представленной выборке отсутствовали гены шигаподобных токсинов (*stx1/2*), интимина (*eaeA*) и энтерогемолизина (*ehxA*). Тем не менее, широко были представлены носители генов других энтеротоксинов из группы энтеротоксигенных эшерихий. Гены термостабильных

энтеротоксинов *estI/II* были детектированы у 42,85% и 82,13% штаммов, соответственно, термолабильный энтеротоксин (*eltI*) был найден у 14,34%, а больше половины штаммов (60,77%) несли ген энтероагрегативного термостабильного энтеротоксина (*eastI*). Ген системы захвата и транспорта железа *iroN* встречался в 67,83%. Ген *iss*, экспрессия которого обеспечивает выживаемость штамма в сыворотке крови, несли 57,12% штаммов и 35,74% имели ген *iutA*, кодирующий рецептор аэробактина в острове патогенности SHI-2 (*Shigella pathogenicity island 2*). Специфическая амплификация к гену *bla*_{TEM} выявлена у 20 (71,43%) штаммов, вторым по частоте встречаемости оказался *bla*_{CTX-M} (n=15; 53,57%) и только в одном случае определен *bla*_{SHV}. В восьми случаях детектированы фрагменты интегронов.

Гены общей патогенности (*fimH*, *kpmS*, *ompT*, *iroN*) в выборке встречались чаще, чем гены АРЕС (*hlyF*, *yqi*, *iss*, *iutA*) (*F*-test: p=0,029) или UРЕС (*F*-test: p<0,01), АРЕС встречались чаще, чем UРЕС (*papC*, *papGII*, *papGIII*, *cnf1*, *upaG*, *usp*, *hlyA*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *ibeA*) (*F*-test: p<0,01), гены кишечных патогенных *E. coli* (IРЕС) (*estI*, *estII*, *eltI*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *ehxA*, *eastI*, *iha*, *subAB*) имели схожие частоты встречаемости в сравнении с общими генами, но значительно превышали частоты АРЕС и UРЕС (*F*-test: p<0,01) (рис. 4). По результатам кластерного анализа наличия генов патогенности были выделены три условных группы штаммов АРЕС (рис. 5): патогенные для птиц и человека (наличие одновременно 2-6 генов, связанных с АРЕС, и 2-6 генов, связанных с ExРЕС или IРЕС; 24 штамма), патогенные для птиц и не патогенные для человека (наличие 2-6 генов, связанных с АРЕС, и 0-1 гена, связанного с ExРЕС или IРЕС; 2 штамма) и непатогенные (0-1 ген из любой группы, АРЕС, ExРЕС, IРЕС, 2 штамма).

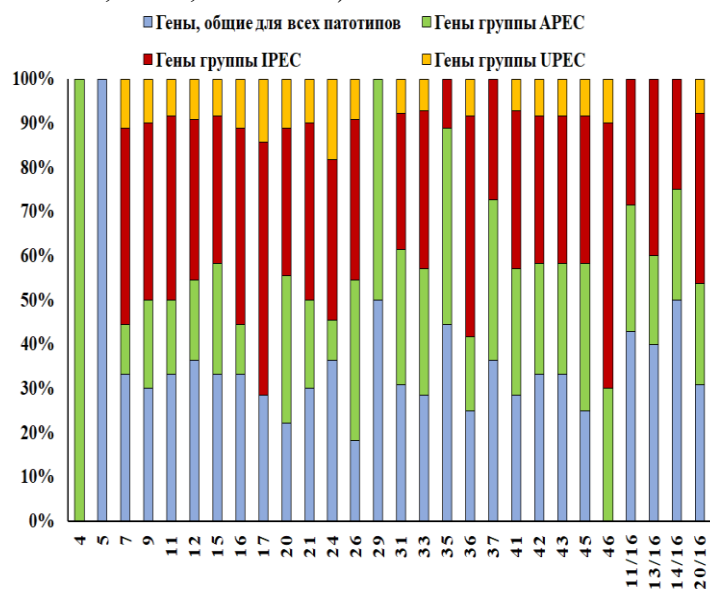


Рисунок 4. Соотношение генов, общих для всех патотипов, АРЕС, IРЕС и UРЕС в штаммах коллекции АРЕС.

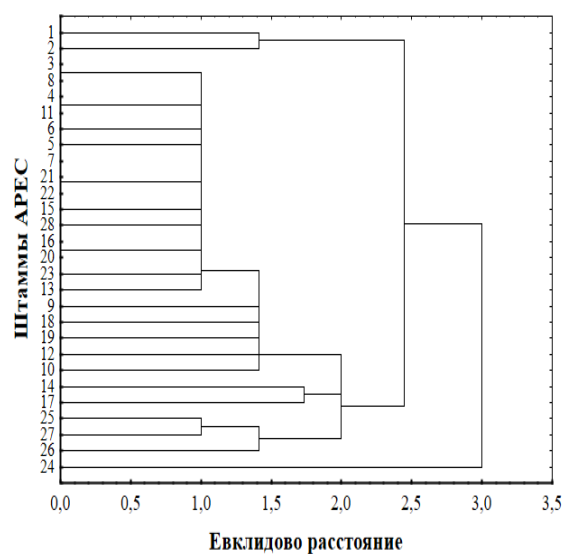


Рисунок 5. Кластерный анализ распределения генов патогенности среди штаммов АРЕС.

Таким образом, данная часть исследования показала, что штаммы АРЕС, циркулирующие на предприятиях птицеводства, устойчивы к большому числу антибиотиков, а более половины изолятов являются мультирезистентными. Изученные штаммы продуцируют бета-лактамазы TEM и CTX-M типа, большинство из которых ассоциировано с интегронами 1 класса. Кроме того, в условиях сельскохозяйственного производства начинают формироваться экovarы АРЕС с высоким уровнем устойчивости не только к антибиотикам, но и к бактериоцинам. Подавляющее большинство штаммов были охарактеризованы как патогенные для птиц и человека, что свидетельствует о потенциале АРЕС как резервуаре факторов вирулентности для возбудителей инфекций человека. В их геноме присутствовали одновременно гены вирулентности, характерные для нескольких

патотипов, при этом многие штаммы АРЕС по генетическому профилю имели сродство с группой диареогенных эшерихий.

2. КОНЬЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС В КЛЕТКИ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*

Конъюгативный перенос в клетки штаммов уропатогенной *E. coli*. Оценку эффективности переноса плазмиды проводили в стандартной модели – плоскодонном полистироловом планшете. Частота переноса плазмиды рОХ38 в уропатогенные штаммы *E. coli* в условиях планктонного роста в течение 6 ч варьировала от $1,28E-05 \pm 1,03E-05$ до $1,26E+00 \pm 2,05E-01$. Усредненные показатели эффективности горизонтального переноса в планктоне и биопленке составили Me: $3,54E-04$, Q1-Q3: $1,02E-04-1,08E-02$ и Me: $1,15E-02$, Q1-Q3: $3,84E-04-1,43E-01$, соответственно. Частота передачи плазмиды была значительно выше в условиях биопленки, чем в планктоне (*W*-test: $p=0,015$) (рис. 6). Корреляция между частотой конъюгации и биомассой смешанной биопленки была отрицательной и составила $rs=-0,41$ для планктона и $rs=-0,44$ для биопленки. В связи с этим штаммы-реципиенты были разделены на две группы в зависимости от толщины сформированной 6-часовой биопленки. Считали, что штаммы, имеющие показатель ОП $<0,3$, формируют тонкие биопленки, а штаммы с ОП $\geq 0,3$ – толстые биопленки. Показано, что эффективность переноса плазмиды рОХ38 в условиях тонкой биопленки (Me: $2,46E-02$, Q1-Q3: $7,09E-03-2,73E-01$) была выше, чем в толстой (Me: $3,77E-04$, Q1-Q3: $2,20E-04-6,63E-03$) (*U*-test: $p=0,008$) (рис. 7). Штаммы, имеющие множественную устойчивость к антибиотическим агентам (5 и более), достоверно не отличались по частоте конъюгации от штаммов, устойчивых менее чем к 5 антибиотикам в условиях планктонного роста. Однако конъюгативный перенос плазмиды был эффективнее в группе с множественной устойчивостью (Me: $7,29E-02$, Q1-Q3: $1,02E-04-4,74E-01$ против Me: $3,11E-04$, Q1-Q3: $1,02E-04-4,75E-03$). В биопленочной модели эффективность трансфера плазмиды в штаммы, имеющие устойчивость к 5 и более антибиотикам, также была выше по сравнению с другой группой (*U*-test: $p=0,043$).

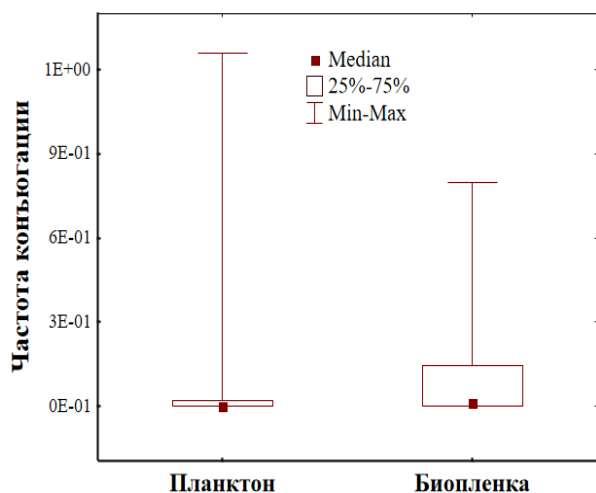


Рисунок 6. Частота конъюгации в клетки УРЕС в планктоне и биопленке.

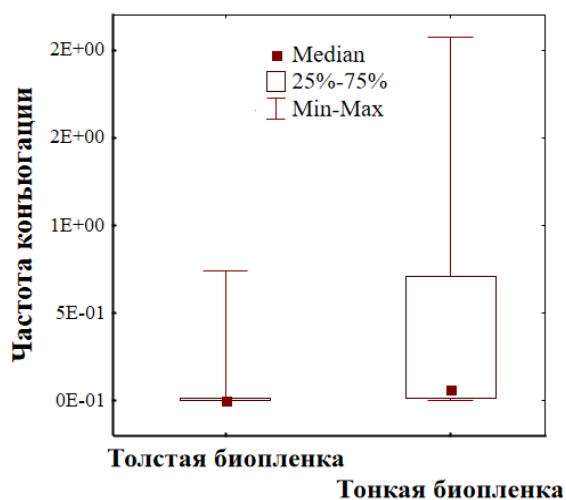


Рисунок 7. Частота конъюгации в клетки УРЕС в толстой и тонкой биопленке.

Конъюгативный перенос в биопленках на поверхности урологических катетеров.

На рисунке 8 представлены внешний вид, 3D-изображения рельефа и характеристика поверхности катетеров, использованных в работе.

Биопленки, сформированные на поверхности урологических катетеров штаммами УРЕС ($n=6$), различались по массивности. На латексе были образованы самые толстые биопленки Me: 0,139 ед. ОП, Q1-Q3: 0,112-0,231 ед. ОП, а на силиконе – тонкие Me: 0,034 ед. ОП, Q1-Q3: 0,032-0,042 ед. ОП (табл. 2). Необходимо отметить, что на силиконовом катетере с серебряным напылением биомасса биопленок не была определена, так как показатель оптической плотности отрицательного контроля (стерильный катетер) был выше, чем в опытах. Это объясняется следующим: биопленки на данном катетере были небольшие

(согласно значениям ОП₅₇₀), но при этом краситель не проникал в материал, а сам катетер (отрицательный контроль) активно его адсорбировал. Частота конъюгации в биопленках на поверхностях катетеров различалась. Однако статистически значимые отличия были получены только в отношении силиконового катетера, покрытого напылением серебра (W -test: $p=0,027$ в сравнении с остальными типами катетеров).

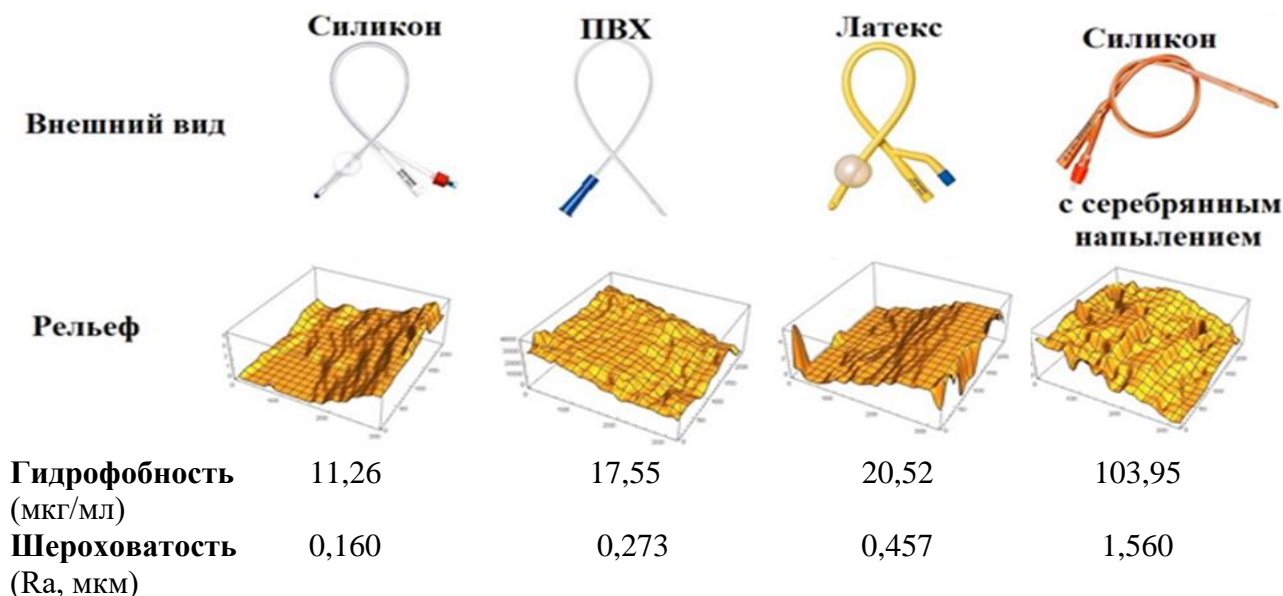


Рисунок 8. Внешний вид, 3D-изображения рельефа и характеристика поверхности урологических катетеров (использованы фотографии катетеров с сайта <http://www.apexmed.ru>, 3D-изображения получены с помощью оптического цифрового 3D-видео микроскопа Hirox KH-7700 (Япония)).

Таблица 2

Частота конъюгации и биомасса биопленок на поверхности катетеров

Поверхность	№	Частота конъюгации	Биомасса, ед. ОП (570 нм)
Латекс	1	2,77E-02 (2,94E-03-2,78E-02)	0,094 (0,076-0,150)
ПВХ	2	5,90E-02 (6,45E-03-3,18E-02)	0,042 (0,033-0,059) p ¹
Силикон	3	1,44E-03 (9,88E-05-9,35E-03)	0,052 (0,048-0,060) p ¹
Силикон с серебрянным напылением	4	0 (2,89E-06-0,00E+00) p ^{1,2,3}	н.п.

Примечание. н.п. – не представлено, pⁿ – показатель достоверно отличается от поверхности n (W -test).

Несмотря на технические проблемы с измерением биомассы биопленки, формирующейся на «серебряном» катетере, для остальных материалов была обнаружена сильная отрицательная зависимость эффективности конъюгативной передачи плазмиды рОХ38 от толщины биопленки *E. coli* ($r_s=-0,88$). Штаммы, формирующие менее массивную биопленку, имели бóльшую эффективность сопряжения и передачи плазмиды. То есть мы наблюдаем сходные тенденции (как и в экспериментах на полистироле) в отношении межклеточного взаимодействия эшерихий в различных по толщине биопленках.

Конъюгативный перенос в смешанных биопленках. При сравнении общей массивности моновидовых и дуальных биопленок показано, что совместный рост *E. coli* с *K. pneumoniae* или *P. aeruginosa* давал преимущество в формировании более массивной биопленки (W -test: $p<0,01$), в то время как показатель биомассы биопленок *E. coli*+*E. faecalis* не изменялся по сравнению с контрольным вариантом (DL-82+D) (рис. 9, а).

Влияние экзометаболитов данных ассоциантов на формирование 24-часовой биопленки *E. coli* также различалось: бесклеточная культуральная жидкость (БКЖ) *K. pneumoniae* не изменяла показатель биомассы по сравнению с контрольным вариантом (DL-82+D+LB), в то время как в вариантах с *E. faecalis* и *P. aeruginosa* были зарегистрированы более высокие показатели биомассы биопленок (W -test: $p < 0,01$). Показано, что полимерный матрикс биопленки *E. coli*+*P. aeruginosa* был наиболее массивный (W -test: $p < 0,05$ по сравнению со всеми вариантами) и не различался в других вариантах с добавлением клеточного компонента (рис. 9, б). При росте *E. coli* с БКЖ других бактерий были получены аналогичные результаты: самый высокий показатель флуоресценции был зарегистрирован для биопленки *E. coli*+*P. aeruginosa*_{БКЖ}, в то время как биопленки с БКЖ других видов не различались по массивности матрикса.

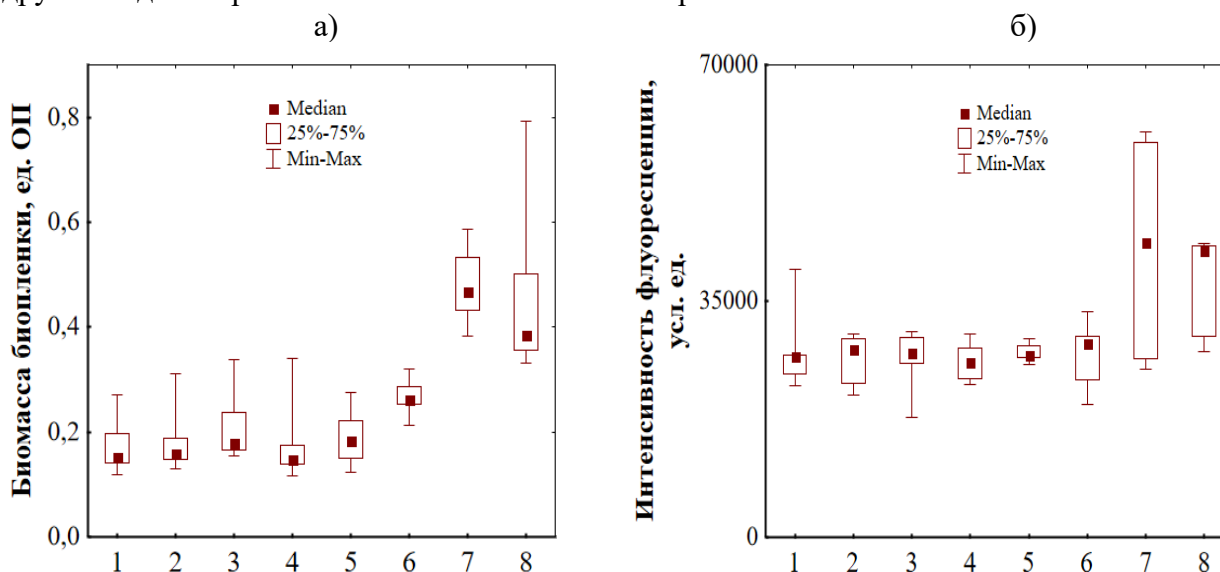


Рисунок 9. Показатели (а) биомассы биопленок и (б) массивности внеклеточного матрикса биопленок *E. coli* при совместном росте с клетками других бактерий и их супернатантами: 1 – DL-82+D, 2 – DL-82+D+LB, 3 – DL-82+D+*K. pneumoniae*_{ккл}, 4 – DL-82+D+*K. pneumoniae*_{БКЖ}, 5 – DL-82+D+*E. faecalis*_{ккл}, 6 – DL-82+D+*E. faecalis*_{БКЖ}, 7 – DL-82+D+*P. aeruginosa*_{ккл}, 8 – DL-82+D+*P. aeruginosa*_{БКЖ}.

Частота конъюгативного переноса производной F-плазмиды в контрольных вариантах биопленок *E. coli* составила в среднем $2,48E-03 \pm 2,95E-03$ (DL-82+D) и $4,72E-04 \pm 2,28E-04$ (DL-82+D+LB) (табл. 3). При совместном росте *E. coli* и *K. pneumoniae* частота передачи плазмиды внутри биопленки значительно не изменялась, а присутствие клеток *E. faecalis* и *P. aeruginosa* снижало данный показатель (W -test: $p = 0,008$). Ингибирующее действие на межклеточные контакты оказывали также метаболиты выбранных ассоциантов. Так при добавлении к конъюгативной смеси БКЖ *K. pneumoniae* и *E. faecalis* частота переноса снижалась примерно на 1,5 порядка, а в присутствии БКЖ *P. aeruginosa* конъюгация полностью отсутствовала.

Таблица 3

Частота конъюгации в присутствии бактерий-ассоциантов и их метаболитов

Ассоциация	№ п/п	Частота конъюгации	
		Клеточный компонент	БКЖ
Контроль (DL-82+D)	1	$2,48E-03 \pm 2,95E-03$	$4,72E-04 \pm 2,28E-04$
DL-82+D+ <i>K. pneumoniae</i>	2	$2,69E-04 \pm 1,01E-04$	$4,93E-05 \pm 3,66E-05^*$
DL-82+D+ <i>E. faecalis</i>	3	$1,78E-05 \pm 5,38E-06^*$	$1,93E-05 \pm 4,17E-07^*$
DL-82+D+ <i>P. aeruginosa</i>	4	$2,93E-05 \pm 3,07E-05^*$	0

Примечание. * – показатель достоверно отличается от контроля (W -test).

Таким образом, показано, что частота конъюгативного переноса в клетки штаммов *E. coli* определяется такими биологическими свойствами реципиентов как форма существования бактерий (планктонная или сессильная), уровнем биопленкообразования и резистентности к антимикробным препаратам. Физико-химические параметры материалов такие, как гидрофобность и шероховатость, определяют массивность образующихся на них бактериальных биопленок и опосредовано – частоту конъюгации в бактериальных сообществах. По нашим данным, в смешанных культурах бактерий частота конъюгативного переноса определяется не характером взаимоотношений участников сообщества, но самим фактом присутствия физической помехи для межклеточного контакта.

Конъюгативный перенос в клетки штаммов патогенной для птиц *E. coli*. Для выполнения основной задачи исследования – оценки частоты конъюгативного переноса производной F-плазмиды, штаммы необходимо было отобрать по фенотипу чувствительности к антибиотикам (Amp^R , Cm^S , Gen^S). После фенотипического анализа антибиотикограммы в эксперименты по конъюгативному переносу удалось включить только 6 штаммов АРЕС. Частота конъюгативного переноса варьировала в пределах $10E-06$ – $10E-02$ и была выше в формирующейся биопленке (Me: $7,38E-03$, Q1-Q3: $1,28E-03$ - $2,14E-02$), чем планктоне (Me: $1,09E-05$, Q1-Q3: $5,35E-06$ - $2,87E-05$) после 6 ч культивирования (W -test: $p=0,027$) (табл. 4).

С целью оценки возможности практического применения механизма конъюгативного переноса генов с использованием генно-модифицированного штамма была проведена серия экспериментов *in vitro* и *in vivo*, доказывающая пригодность бактериальной «kill»-«anti-kill» системы в качестве метода профилактики и/или лечения инфекционных заболеваний, например, в сфере ветеринарной медицины.

Таблица 4

Частота конъюгации в планктоне и биопленке АРЕС через 6 ч

Штамм	Частота конъюгации		Биомасса, ед. ОП (570 нм)
	Планктон	Биопленка	Смешанная биопленка
RB1	$5,39E-06 \pm 7,62E-06$	$1,92E-04 \pm 2,72E-04$	$0,143 \pm 0,012$
RB2	$5,33E-06 \pm 7,54E-06$	$1,08E-02 \pm 1,52E-02$	$0,114 \pm 0,024$
RB3	$3,27E-05 \pm 4,36E-05$	$4,01E-03 \pm 5,65E-03$	$0,305 \pm 0,044$
RB4	$7,17E-05 \pm 7,91E-05$	$3,73E-04 \pm 3,73E-04$	$0,382 \pm 0,031$
RB5	$1,64E-05 \pm 2,33E-05$	$6,36E-02 \pm 9,00E-02$	$0,373 \pm 0,041$
RB6	$4,58E-06 \pm 6,00E-06$	$2,50E-02 \pm 3,54E-02$	$0,143 \pm 0,012$

Оценка эффективности конъюгативной передачи гена *colE7* в клетки штаммов патогенной для птиц *E. coli in vitro*. В экспериментах с контрольным донорным штаммом *E. coli* N4i частота конъюгативного переноса через 24 ч варьировала в пределах $10E-06$ – $10E-02$ и была выше в модели биопленки (Me: $2,13E-03$, Q1-Q3: $7,10E-04$ - $6,83E-03$), по сравнению с планктоном (W -test: $p=0,07$) (табл. 5). Во всех вариантах конъюгации с киллерным донором *E. coli* ЖР и штаммами-реципиентами трансконъюганты не были детектированы. Данный результат означает, что клетки реципиентов, получившие *colE7*-ген посредством конъюгативного переноса, экспрессировали его и лизировались за счет ДНК-азной активности колицина.

Эксперимент по конъюгативному переносу плазмиды показал возможность эффективной передачи рОХ38 в клетки штаммов *E. coli*, выделенных от птиц. Из представленных результатов можно сделать предположение, что генно-модифицированные бактериальные штаммы с встроенной конъюгативно-опосредованной антибактериальной системой могут быть применены в практических целях, например, для создания пробиотических препаратов направленного действия, и требуют дальнейшего изучения.

Количество клеток доноров, реципиентов, трансконъюгантов и частота конъюгации в планктоне (А) и биопленке (Б) после 24 ч экспозиции

А								
Штамм АРЕС	<i>E. coli</i> N4i (контрольный донор)				<i>E. coli</i> ŽP (киллерный донор)			
	D	R	T	Y	KD	R	T	Y
RB1	1,04E+07 ±1,13E+06	1,70E+08 ±2,50E+07	2,10E+05 ±7,25E+04	1,33E-03 ±6,22E-04	3,14E+07 ±2,13E+06	9,13E+07 ±3,75E+06	0	-
RB2	1,76E+06 ±6,63E+05	1,16E+08 ±1,13E+07	2,62E+06 ±2,21E+06	2,46E-02 ±2,13E-02	8,43E+07 ±5,08E+07	3,86E+07 ±3,63E+06	0	-
RB3	5,71E+07 ±2,79E+07	5,50E+07 ±2,25E+07	2,16E+05 ±2,01E+05	2,92E-03 ±2,46E-03	1,70E+08 ±3,40E+07	6,80E+07 ±1,45E+07	0	-
RB4	1,74E+06 ±5,63E+05	3,65E+08 ±1,56E+07	1,84E+05 ±1,66E+05	5,03E-04 ±4,55E-04	2,03E+07 ±1,45E+07	1,59E+08 ±3,63E+07	0	-
RB5	2,36E+07 ±7,63E+06	2,89E+08 ±4,88E+07	1,13E+04 ±1,25E+03	3,94E-05 ±2,31E-06	6,83E+07 ±4,75E+07	1,88E+08 ±3,25E+07	0	-
RB6	3,88E+07 ±1,13E+07	2,79E+07 ±1,46E+07	2,80E+05 ±2,20E+05	8,13E-03 ±3,63E-03	2,35E+08 ±1,84E+08	3,58E+07 ±2,34E+07	0	-

Б								
Штамм АРЕС	<i>E. coli</i> N4i (контрольный донор)				<i>E. coli</i> ŽP (киллерный донор)			
	D	R	T	Y	KD	R	T	Y
RB1	1,15E+07 ±6,15E+06	1,15E+07 ±1,04E+06	5,13E+02 ±3,63E+02	4,89E-05 ±2,06E-05	7,94E+06 ±1,29E+06	3,04E+07 ±2,67E+07	0	-
RB2	4,07E+06 ±3,81E+06	7,76E+06 ±3,56E+06	7,38E+03 ±6,88E+03	1,60E-03 ±3,42E-04	3,43E+07 ±2,22E+07	3,03E+07 ±2,62E+07	0	-
RB3	5,32E+06 ±3,93E+06	4,78E+06 ±8,75E+05	1,13E+03 ±7,75E+02	2,13E-04 ±1,23E-04	4,70E+06 ±2,08E+06	5,25E+06 ±2,00E+06	0	-
RB4	8,16E+06 ±3,44E+06	3,96E+07 ±7,56E+06	2,49E+04 ±1,91E+04	5,58E-04 ±3,76E-04	1,48E+06 ±3,25E+05	2,83E+07 ±2,50E+07	0	-
RB5	7,43E+06 ±3,07E+06	2,02E+07 ±1,73E+07	2,50E+01 ±2,50E+01	8,47E-06 ±8,47E-06	1,55E+06 ±3,00E+05	2,96E+06 ±1,16E+06	0	-
RB6	7,82E+06 ±3,20E+06	2,01E+07 ±1,75E+07	1,10E+03 ±1,00E+02	2,40E-04 ±2,13E-04	9,38E+06 ±3,63E+06	7,74E+06 ±5,26E+06	0	-

Примечание. D – контрольный донор, KD – киллерный донор, R – реципиент, T – трансконъюгант, Y – частота конъюгативного переноса. Количество клеток представлено в КОЕ/мл.

Оценка эффективности конъюгативной передачи гена *colE7 in vivo*. Первый эксперимент по конъюгативному переносу плазмиды *in vivo* проводили на 30-дневных самцах беспородных крыс, разделенных на три группы (контрольная и две опытные). В предварительных исследованиях в кишечнике крыс не были обнаружены *E. coli*, устойчивые к ампициллину, хлорамфениколу и гентамицину. Трансконъюгантные *E. coli* с фенотипом Amp^RCm^R были детектированы на третий день после введения реципиента, в среднем их число составило 2,15E+02±1,75E+02 КОЕ/г, а частота конъюгации была 6,07E-02±5,58E-02 (табл. 6). В данной группе наблюдался рост числа клеток как штамма донора, так и реципиента в течение всего времени эксперимента. В группе II число жизнеспособных клеток киллерного донора и реципиента в те же сроки составило 1,50E+04±1,25E+03 КОЕ/г и 2,19E+03±1,25E+03 КОЕ/г, соответственно. В последующие сроки наблюдалось увеличение количества клеток *E. coli* ŽP до 10E+07 КОЕ/г, в то время как число реципиентов незначительно возросло после первого введения. Трансконъюганты в данной группе не

детектировались ни в один из контрольных сроков. В контрольной группе во все сроки не были обнаружены *E. coli*, устойчивые к ампициллину, хлорамфениколу и гентамицину.

Второй эксперимент по конъюгативному переносу *in vivo* проводили на маньчжурских перепелах (*Coturnix coturnix*). Учитывая результаты колонизации кишечника животных донорными штаммами в первом эксперименте, в модели с маньчжурскими перепелами введение реципиента и оценку конъюгативного переноса проводили на более ранних сроках. Уже через двое суток после применения препаратов *E. coli* численность клеток донорного и киллерного штаммов в кишечнике птицы составила $2,70E+06 \pm 2,01E+05$ и $8,12E+05 \pm 2,22E+05$ КОЕ/г, соответственно. Частота конъюгативного переноса в группе I с контрольным донором была на уровне E-02–E-03 в течение 6 дней наблюдения. Аналогично эксперименту с крысиной моделью, трансконъюганты во II группе (с киллерным донором) не были обнаружены ни в один из контрольных сроков. В контрольной группе бактерии *E. coli*, устойчивые одновременно к ампициллину, хлорамфениколу и гентамицину, в течение эксперимента детектированы не были.

Таблица 6

Эффективность конъюгативной доставки плазмиды и киллинга в условиях кишечного тракта крыс (А) и перепелов (Б)

А								
День	I группа <i>E. coli</i> N4i (контрольный донор)				II группа <i>E. coli</i> ŽP (киллерный донор)			
	R	D	T	Y	R	KD	T	Y
10	$3,54E+03$ $\pm 1,23E+03$	$2,96E+06$ $\pm 2,01E+06$	$2,15E+02$ $\pm 1,75E+02$	$6,07E-02$ $\pm 5,58E-02$	$2,19E+03$ $\pm 1,25E+03$	$5,97E+05$ $\pm 2,58E+05$	0	-
14	$5,21E+05$ $\pm 2,13E+04$	$1,26E+07$ $\pm 8,64E+06$	$4,11E+04$ $\pm 4,00E+03$	$7,87E-02$ $\pm 8,32E-03$	$4,22E+04$ $\pm 2,36E+04$	$5,64E+07$ $\pm 8,96E+06$	0	-
21	$8,69E+06$ $\pm 5,55E+06$	$7,25E+07$ $\pm 2,35E+07$	$6,15E+04$ $\pm 1,02E+03$	$7,08E-03$ $\pm 9,64E-04$	$5,91E+04$ $\pm 4,98E+03$	$2,23E+07$ $\pm 1,00E+07$	0	-

Б								
День	I группа <i>E. coli</i> N4i (контрольный донор)				II группа <i>E. coli</i> ŽP (киллерный донор)			
	R	D	T	Y	R	KD	T	Y
2	$5,00E+05$ $\pm 4,55E+05$	$2,70E+06$ $\pm 2,01E+05$	$5,00E+03$ $\pm 1,12E+03$	$1,00E-02$ $\pm 1,12E-01$	$4,68E+04$ $\pm 2,25E+04$	$8,12E+05$ $\pm 2,22E+05$	0	-
3	$3,05E+06$ $\pm 2,41E+05$	$4,45E+06$ $\pm 3,05E+06$	$1,05E+04$ $\pm 1,11E+04$	$3,44E-03$ $\pm 2,46E-03$	$7,39E+05$ $\pm 5,57E+05$	$1,74E+06$ $\pm 1,96E+06$	0	-
6	$9,12E+06$ $\pm 7,15E+06$	$6,42E+07$ $\pm 6,16E+07$	$4,18E+05$ $\pm 4,00E+05$	$4,58E-02$ $\pm 2,12E-01$	$8,29E+05$ $\pm 5,55E+05$	$2,57E+07$ $\pm 3,01E+07$	0	-

Примечание. D – контрольный донор, KD – киллерный донор, R – реципиент, T – трансконъюгант, Y – частота конъюгативного переноса. Количество клеток представлено в КОЕ/г.

Таким образом, эксперимент *in vivo* показал, что генно-модифицированный штамм *E. coli* ŽP, несущий ген синтеза колицина ColE7, способен эффективно заселять кишечник крыс и сельскохозяйственной птицы и сохраняться там на протяжении длительного времени. Конъюгативный перенос плазмиды от контрольного донора в условиях кишечного тракта происходил с достаточно высокой частотой, в то время как, в группе с киллерным донором трансконъюганты отсутствовали, что свидетельствует об эффективности работы конъюгативно-опосредованной антибактериальной системы. Сниженное число клеток реципиентов в группе II также доказывает активность изучаемого штамма в отношении патогенных *E. coli*. Исходя из проведенных исследований по конъюгативному переносу в различных моделях *in vitro* и *in vivo*, можно сделать заключение, что механизм конъюгативного переноса генов является перспективным инструментом в прикладных сферах и требует дальнейшего детального изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами были изучены биологические свойства штаммов уропатогенных *E. coli* (n=29) с индивидуальным генетическим профилем. Большинство культур принадлежали к группе В2, второй по распространенности была группа А, что согласуется с ранее проведенными исследованиями других авторов (Najafi *et al.*, 2017; Кузнецова и др., 2018; Cristea *et al.*, 2019; Tewawong *et al.*, 2020). Штаммы UPEC существенно различались по биофилмообразующей способности на полистироле и проявляли разную адгезивную активность по отношению к абиотическим материалам, а именно, лучше адгезировались к гидрофобной поверхности. Среди исследуемых UPEC наибольший уровень резистентности был зафиксирован к фторхинолонам, а самыми эффективными антибиотиками оказались меропенем и фосфомицин. В исследуемой выборке широко была распространена устойчивость к бактериоцинам всех групп. Были изучены генетические детерминанты вирулентности UPEC, включающие гены адгезинов, токсинов, белков наружной мембраны и капсулообразования. Основными факторами вирулентности представленных культур были участники систем захвата и транспорта железа, обеспечивающие длительную сохранность и возможность персистенции клеток в мочеполовом тракте.

Показано, что адгезия бактерий и скорость развития биофилмы могут определяться природой полимерного материала. Увеличение гидрофильности поверхности катетера снижало эффективность формирования 24-часовой биофилмы UPEC, однако при этом гидрофильные клетки активнее колонизировали поверхности с меньшим показателем гидрофобности.

В данной работе изучены биологические свойства штаммов APES, которые являются возбудителями колибактериоза – системного экстраинтестинального поражения внутренних органов сельскохозяйственной птицы, что приводит к значительным экономическим потерям в птицеводстве (da Rocha *et al.*, 2002; Новикова, Бартенев, 2015). Среди культур чаще всего встречались представители группы В1. Биофилмы активно формировали чуть менее половины штаммов. Внутри данной выборки APES широко был распространен такой признак, как продукция бактериоцинов. В отличие от группы UPEC, птичьих штаммы не демонстрировали выраженную адгезию к какой-либо абиотической поверхности. Показано, что бактерии APES, циркулирующие на предприятиях птицеводства, устойчивы к большому числу антибиотиков, включая бета-лактамы и фторхинолоны, а более половины изолятов являются мультирезистентными. Изученные культуры продуцируют бета-лактамазы TEM и CTX-M типа, большинство из которых ассоциировано с интегронами 1 класса. Кроме того, в условиях сельскохозяйственного производства начинают формироваться экovarы APES с высоким уровнем устойчивости не только к антибиотикам, но и к бактериоцинам.

Результаты данного исследования также показывают, что *E. coli*, выделенные при системном колибактериозе у птиц, по генетическому профилю имеют большее сходство со штаммами, вызывающими острые кишечные инфекции у человека, чем с уропатогенными *E. coli*. Несмотря на многочисленные исследования, доказывающие фено- и генотипическое сходство APES и UPEC (Mitchell *et al.*, 2015; Najafi *et al.*, 2019; Meena *et al.*, 2020; Zhuge *et al.*, 2020), фекально-оральный путь передачи возбудителя от зараженной птицы человеку является наиболее вероятным с эпидемиологической точки зрения. Изучаемые штаммы были выделены из различных экстраинтестинальных органов птицы, что свидетельствует о высоком риске заражения через продукты питания.

Нами показано, что эффективность передачи производной F-плазмиды в штаммы *E. coli* варьировала внутри группы и была значительно выше в биофилме, чем в планктоне. Частота конъюгативного переноса плазмиды rOX38 была выше в группе штаммов, формирующих тонкие биофилмы (ОП<0,3) и не зависела от филогенетической группы реципиентов, продукции бактериоцинов, присутствия конъюгативных плазмид, наличия бактериофага или каких-либо генов вирулентности. Эффективность конъюгации на поверхности катетеров различалась и была также выше в тонких биофилмах. На катетере с серебряным напылением частота горизонтального переноса была наименьшей, что может

являться результатом действия ионов серебра, включенных в поверхность: расхождение нитей ДНК, вызванное воздействием серебра, препятствует репликации и передаче плазмидной ДНК (Asmaa *et al.*, 2020).

В представленной работе рассмотрены межвидовые взаимодействия в полимикробных биопленках, образованных двумя штаммами *E. coli* (донором конъюгативной плазмиды и реципиентом) и представителями трех различных таксонов (*K. pneumoniae*, *E. faecalis* и *P. aeruginosa*). Для пары *E. coli* и *K. pneumoniae* получены следующие данные: доля бактерий *E. coli* в смешанной биопленке была существенно меньше, чем *K. pneumoniae*. В случае с *E. faecalis* наблюдалась противоположная ситуация: количество клеток *E. coli*, а также биомасса совместной биопленки были сопоставимы с контролем, однако конъюгация была ниже на два порядка, как в присутствии клеток ассоцианта, так и его БКЖ. В последнем случае частота конъюгации могла снизиться и за счет формирования более массивной биопленки, в которой клетки сохраняли жизнеспособность, но передача происходила только в ее верхних слоях. В варианте *E. coli*+*P. aeruginosa* наблюдался ранее изученный тип взаимоотношений для данной пары микроорганизмов (Кузнецова и др., 2012; Kuznetsova *et al.*, 2013; Гриценко и др., 2016). Следует отметить, что в представленном исследовании было зарегистрировано полное ингибирование процесса передачи плазмиды после воздействия БКЖ *P. aeruginosa* на *E. coli*. Полученные данные свидетельствуют о разнохарактерном ответе бактериальных клеток, содержащихся в биопленках при симбиотических или антагонистических взаимоотношениях. Во всех случаях присутствие бактерий-ассоциантов или их экзопродуктов негативно влияло на скорость конъюгации. Однако, несмотря на схожий вектор изменений, вопрос о механизмах взаимодействия клеток внутри биопленки остается открытым и требует дальнейшего исследования.

Генно-модифицированный штамм *E. coli* ЖР, несущий ген синтеза колицина ColE7, является перспективным в качестве основы пробиотического препарата за счет возможности воздействия на устойчивые к антибиотикам и бактериоцинам энтеробактерии. Эксперимент *in vivo* показал, что штамм *E. coli* ЖР способен эффективно заселять кишечник крыс и сельскохозяйственной птицы и сохраняться на протяжении длительного времени. Конъюгативный перенос плазмиды от контрольного донора в условиях кишечного тракта происходил с достаточно высокой частотой, в то время как, в группе с киллерным донором трансконъюганты отсутствовали, что свидетельствует об эффективности реализации конъюгативно-опосредованной антибактериальной системы. Сниженное число клеток реципиентов в последней группе также доказывает действие изучаемого штамма на потенциально патогенные *E. coli*. Эффективность работы штамма *E. coli* ЖР определяется альтернативной системой доставки колицина, что обеспечивает его высокую конкурентоспособность в различных экологических нишах, где могут присутствовать, в том числе, и эшерихии патогенных патотипов – продуценты бактериоцинов. Учитывая, что в условиях птицеводческих и животноводческих комплексов эти штаммы активно циркулируют, сельское хозяйство является наиболее важной областью его применения. Использование конъюгативного механизма при создании нового пробиотического средства в птицеводстве является перспективным и соответствует мировым тенденциям в данной области науки и практики. В полной мере раскрыть биотехнологический потенциал генно-модифицированного штамма *E. coli* ЖР, в том числе, его действие на зоотехнические показатели птицы, помогут дополнительные исследования. Актуальным является изучение его эффективности при лечении и профилактике эшерихиозов у животных и оценка терапевтического и противоэпидемического потенциала.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы уропатогенной *E. coli* и *E. coli*, патогенной для птиц, характеризовались вариабельностью биологических свойств внутри групп как по частоте встречаемости, так и в отношении уровня активности некоторых факторов: гемолитической активности, адгезивной

и биопленкообразующей способности, чувствительности к антимикробным агентам, бактериоциногении, лизогении.

2. Среди вирулентных генов, наиболее часто характеризующих группу UPEC, самыми распространёнными были гены системы захвата и транспорта железа *chuA* (62,07%), цитотоксического некротического фактора 1 (*cnf1*) и гемолизина (*hlyA*) (по 20,68%).

3. Культуры, выделенные при системном колибактериозе птиц, характеризуются высокой патогенностью в отношении сельскохозяйственной птицы, по генетическому профилю являются более близкими к штаммам группы DEC и обладают зоонозным потенциалом. Среди штаммов APEC 75%, классифицированных как высокопатогенные для птиц и человека, характеризовались высокими частотами встречаемости генов вирулентности патогенных для птиц и диареогенных *E. coli*, островка патогенности SH1-2, а также генов бета-лактамаз расширенного спектра и участков интегронов 1 класса.

4. Показано, что в общей выборке частота конъюгативного переноса плазмиды pOX38 *in vitro* была выше в биопленке, чем в планктоне, при этом толщина биопленки играла существенную роль в эффективности передачи плазмиды. Полиантибиотикоустойчивые штаммы характеризовались более высокой частотой конъюгации в биопленке, но не в планктоне.

5. В присутствии клеток бактерий других видов – *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* или их метаболитов частота переноса плазмиды pOX38 в клетки UPEC снижалась на один-два порядка, независимо от взаимного положительного или отрицательного влияния ассоциантов друг на друга при формировании биопленки. Включение ионов серебра в поверхность силикона не ингибировало адгезию бактерий, но снижало жизнеспособность клеток и эффективность конъюгации в зрелых биопленках.

6. Установлено, что в условиях *in vivo* генно-модифицированный штамм *E. coli* ЖР, несущий ген синтеза колицина ColE7, эффективно заселял кишечник животных и сохранялся там не менее месяца. Конъюгативный перенос производной F-плазмиды pOX38 происходил со средней частотой 10E-02, что позволяет рассматривать штамм *E. coli* ЖР как основу для нового ветеринарного пробиотического препарата.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Гизатуллина Ю.С. (Поспелова Ю.С.) Формирование биопленок уропатогенными штаммами *Escherichia coli* на различных абиотических поверхностях / Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), М.В. Кузнецова // Вестник ПГУ. Серия Биология. – 2017. – № 2. – С. 185-192.

2. Гизатуллина Ю.С. (Поспелова Ю.С.) Экспериментальное обоснование применения покрытых серебром урологических катетеров / Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), В.Н. Аптуков, Ю.А. Митин, И.А. Морозов, М. Starčić Erjavec, М.В. Кузнецова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21, № 1. – С. 75-80. (Scopus).

3. Кузнецова М.В. Биопрепарат на основе штамма *Escherichia coli* ЖР. Сообщение I. Оценка эффективности колицина при конъюгативной доставке *colE7* в клетки APEC *in vitro* и *in vivo* / М.В. Кузнецова, И.Л. Масленникова, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), D. Zgur-Bertok, M. Starčić Erjavec // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55, №2. – С. 364-377. (Scopus).

4. Kuznetsova M.V. *Escherichia coli* isolated from cases of colibacillosis in Russian poultry farms (Perm kraj): sensitivity to antibiotics and bacteriocins / M.V. Kuznetsova, J.S. Gizatullina (J.S. Pospelova), L.Yu. Nesterova, M. Starčić Erjavec // Microorganisms. – 2020. – V. 8(741). (Scopus).

5. Кузнецова М.В. Генетические профили адгезии и адгезивная вариабельность уропатогенных штаммов *Escherichia coli* / М.В. Кузнецова, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова) // Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11, № 3. – С. 481-490. (Scopus).

6. Кузнецова М.В. Характеристика уропатогенных изолятов *Escherichia coli*, выделенных в условиях стационара / М.В. Кузнецова, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66, № 4. – С. 248-256. (Scopus).

Публикации в других журналах и сборниках

7. Гизатуллина Ю.С. (Поспелова Ю.С.) Формирование биопленок уропатогенными штаммами *Escherichia coli* в моновидовой и смешанной культуре *in vitro* / Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), М.В. Кузнецова // Матер. II Междунар. школы-конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2016. – С. 24.

8. Кузнецова М.В. Конъюгативная передача производной F-плазмиды уропатогенными штаммами *Escherichia coli* в биопленках / М.В. Кузнецова, И.Л. Масленникова, В.А. Демаков, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), М. Starčič Erjavec, D. Žgur-Bertok // Матер. IV Междунар. конф. ICOMID «Микробное разнообразие: ресурсный потенциал». – Москва, 2016. – С. 45.

9. Гизатуллина Ю.С. (Поспелова Ю.С.) Конъюгационный перенос производной F-плазмиды в клинические уропатогенные штаммы *Escherichia coli* в биопленках // Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии: матер. регион. с междунар. участием студ. науч. конф. (19-25 апреля 2017 г.). – Пермь, 2017. – С. 129.

10. Gizatullina J.S. (Pospelova J.S.) Effectiveness of conjugation transfer of the F-plasmid derivative pOX38 to uropathogenic *Escherichia coli* strains / J.S. Gizatullina (J.S. Pospelova), M.V. Kuznetsova, I.L. Maslennikova, D. Žgur-Bertok, M. Starčič Erjavec // Высокие технологии, определяющие качество жизни. Материалы II Междунар. конф. (17-19 сентября 2018 г.). – Пермь, 2018. – С. 197-199.

11. Каримова Н.В. Колонизационная активность уропатогенных *Escherichia coli* в полимикробных ассоциациях / Н.В. Каримова, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), В.А. Демаков // Высокие технологии, определяющие качество жизни. Матер. II Междунар. конф. (17-19 сентября 2018 г.). – Пермь, 2018. – С. 197-199.

12. Кузнецова М.В. Биологическая характеристика штаммов *Escherichia coli*, вызывающих колибактериоз у цыплят-бройлеров / М.В. Кузнецова, И.Л. Масленникова, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), Л.Ю. Нестерова, L. Predojevič, M. Starčič Erjavec // Высокие технологии, определяющие качество жизни. Матер. II Междунар. Конф. (17-19 сентября 2018 г.). – Пермь, 2018. – С. 246-248.

13. Kuznetsova M.V. Evaluation of the efficiency of *colE7* conjugation-based «kill»-«anti-kill» antimicrobial system for avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) / M.V. Kuznetsova, I.L. Maslennikova, J.S. Gizatullina (J.S. Pospelova), D. Žgur-Bertok, M. Starčič Erjavec // 8th congress of the genetics society of Slovenia and 8th meeting of the Slovenian society of human genetics with international participation «GENETIKA 2018» (September 19-21). – Ljubljana, 2018. – p. 126.

14. Кузнецова М.В. Уропатогенные штаммы *Escherichia coli*: биологические свойства и колонизационная активность / М.В. Кузнецова, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), В.А. Демаков // Вестник ПНЦ. – 2019. – № 1. – С. 14-22.

15. Gizatullina J.S. (Pospelova J.S.) Биологические свойства уропатогенных *Escherichia coli* / J.S. Gizatullina (J.S. Pospelova), M.V. Kuznetsova, M. Starčič Erjavec // Матер. научн.-практич. конф. по медицинской микологии (XXII Кашкинские чтения). С.-Петербург. – Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 55-56.

16. Kuznetsova M.V. Natural *Escherichia coli* strains as recipients in conjugation: thickness of biofilm matters / M.V. Kuznetsova, I.L. Maslennikova, J.S. Gizatullina (J.S. Pospelova), L. Predojevic, D. Zgur-Bertok, M. Starcic Erjavec // ASM Microbe. – 2019.

17. Кузнецова М.В. Филогенетическое разнообразие и биологические свойства уропатогенных штаммов *Escherichia coli* / М.В. Кузнецова, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова) // Бюллетень Оренбургского научного центра. – 2019. – № 3. – С. 1-29.

18. Gizatullina J.S. (Pospelova J.S.) Prevalence of antibiotic resistance genes and class I integrons among avian pathogenic *Escherichia coli* strains / J.S. Gizatullina (J.S. Pospelova), M.

- Starcic Erjanvec, M.V. Kuznetsova // 7th Colloquium of Genetics 30th of September, Ljubljana, 2019. – P. 82-83.
19. Maslennikova I.L. Effect of per oral administration of the ŽP strain, a new potential probiotic, on rats / I.L. Maslennikova, E.G. Orlova, J.S. Gizatullina (J.S. Pospelova), M. Starčić Erjavec, N.P. Loginova, Y.N. Troinich, M.V. Kuznetsova. // Acta Biologica Slovenica. – 2019. – V. 62. – P. 15-25.
20. Гизатуллина Ю.С. (Поспелова Ю.С.) Биологическая характеристика штаммов *Escherichia coli*, изолированных от сельскохозяйственных животных / Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), Н.В. Ваньков, А.А. Головкова, О.А. Степанова, Н.Б. Ремезовская // Матер. XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с междунар. участием «Симбиоз-Россия 2020» (Пермь, 28–30 сентября 2020 г.). – Пермь, 2020. – С. 77-80.
21. Каримова Н.В. Чувствительность к антимикробным препаратам уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных в условиях стационара / Н.В. Каримова, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), Д.Д. Дубенкова, М.В. Кузнецова // Матер. XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с междунар. участием «Симбиоз-Россия 2020» (Пермь, 28–30 сентября 2020 г.). – Пермь, 2020. – С. 120-123.
22. Орлова Е.Г. Оценка безопасности пробиотического штамма ŽP при пероральном использовании у цыплят-бройлеров и крыс / Е.Г. Орлова, И.Л. Масленникова, Ю.С. Гизатуллина (Ю.С. Поспелова), М. Старчич Эрьявец, Н.П. Логинова, Я.Н. Тройнич, М.В. Кузнецова // Проблемы медицинской микологии. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 111-112.
23. Maslennikova I.L. Effect of the potential probiotic *Escherichia coli* ŽP strain on the intestinal microbiota of chickens / I.L. Maslennikova, J.S. Gizatullina (J.S. Pospelova), E.V. Afanasievskaya, M. Starčić Erjavec, M.V. Kuznetsova // International Scientific and Practical Conference «Development of the Agro-Industrial Complex in the Context of Robotization and Digitalization of Production in Russia and Abroad» (DAIC 2020). – V. 222.
24. Gizatullina J.S. (Pospelova J.S.) The prospect of creating farm animal probiotics based on genetically modified *Escherichia coli* strains / J.S. Gizatullina (J.S. Pospelova), M. Starčić Erjavec, G. Koraimann, M.V. Kuznetsova // The Materials of the International Scientific Conference Actual Problems of Organic Chemistry and Biotechnology (November 18–21, 2020, Ekaterinburg, Russia). – Т. 2. – P. 273-275.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БКЖ	- бесклеточная культуральная жидкость	D	- контрольный донор
БЛРС	- бета-лактамазы расширенного спектра	DEC	- диарегенные <i>E. coli</i>
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота	ExPEC	- экстраинтестинальные <i>E. coli</i>
Ед. ОП	- единицы оптической плотности	Gen	- гентамицин
ИМВП	- инфекции мочевыводящих путей	IPES	- кишечные патогенные <i>E. coli</i>
КОЕ	- колониеобразующая единица	KD	- киллерный донор
ПВХ	- поливинилхлорид	NMES	- менингит-ассоциированные <i>E. coli</i>
ПЦР	- полимеразная цепная реакция	R	- реципиент
Amp	- ампициллин	SEPEC	- сепсис-ассоциированные <i>E. coli</i>
APES	- птичь патогенные <i>E. coli</i>	T	- трансконъюгант
Ст	- хлорамфеникол	UPES	- уропатогенные <i>E. coli</i>

ПОСПЕЛОВА Юлия Сагитовна

КОНЪЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС ПРОИЗВОДНОЙ F-ПЛАЗМИДЫ В КЛЕТКИ ШТАММОВ
ЭКСТРАИНТЕСТИНАЛЬНОЙ *ESCHERICHIA COLI*

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать ____ . ____ . ____ . Формат 60×90/16.
Усл. печ. л. 1. Тираж 120 экз. Заказ.
Набор компьютерный.

Отпечатано в «Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук» - филиале Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского
отделения Российской академии наук
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13