

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук заведующего лабораторией антимикробной резистентности Института экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО) ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет» Васильченко Алексея Сергеевича на диссертационную работу Поспеловой Юлии Сагитовны на тему «Конъюгативный перенос производной F-плазмиды в клетки штаммов экстраинтестинальной *Escherichia coli*» по специальности 03.02.03 - микробиология на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Актуальность избранной темы

Диссертация Поспеловой Юлии Сагитовны посвящена изучению актуального вопроса современной микробиологии – резистентности бактерий к антимикробным веществам и особенностям распространения детерминант устойчивости среди микроорганизмов путем горизонтального переноса генов.

Вопрос межклеточной коммуникации бактерий является актуальным для современной микробиологии как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте. Важность изучения горизонтального переноса генов в бактериальных сообществах определяется появлением множества лекарственно-устойчивых бактерий, связанным с широким применением антибиотиков в медицине и ветеринарии. F-подобные плазмиды имеют большое значение в процессах поддержания и распространения различных свойств бактериальных клеток, в том числе, устойчивости к антимикробным агентам. Процесс конъюгации достаточно хорошо изучен на ряде коллекционных штаммов, однако, его особенности в гетерогенных популяциях и при воздействии разных факторов на сегодняшний день малопонятный феномен.

В представленной работе изучено влияние большого ряда факторов как биотического, так и абиотического характера на распространение плазмид в популяции *E. coli*. Достоинством представленной работы является использование комплексного подхода к изучению процесса конъюгативного переноса детерминант антибиотикорезистентности.

Следует отметить, что конъюгативно-опосредованный механизм передачи генов может иметь прикладное значение в сфере биотехнологии, как основа для создания пробиотических препаратов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Интересным является аспект использования механизма конъюгации в качестве инструмента для направленного уничтожения бактериальных клеток. В отношении данного направления работа Юлии Сагитовны также представляется актуальной, поскольку в ней отображены такие моменты, как конъюгативный перенос в условиях смешанной бактериальной культуры и условиях *in vivo* (кишечный тракт), а также рассмотрена возможность использования антибактериальной системы в качестве средства

направленного действия для уничтожения условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Escherichia coli – один из основных модельных объектов микробиологии, микроорганизм, имеющий важное значение как для научно-теоретических исследований, так и для практики (в медицинской и ветеринарной сферах). Представители выбранных групп (уропатогенные (UPEC) и патогенные для птиц *E. coli* (APEC)) являются наиболее распространенными условно-патогенными микроорганизмами, важность изучения которых многократно подчеркивается в современной научной литературе. В работе подробно охарактеризованы свойства бактерий данных групп, а также проанализированы взаимосвязи различных признаков между собой, что дополняет знания о высоко гетерогенных популяциях *E. coli*.

В связи с вышеизложенным актуальность диссертационной работы Поспеловой Ю.С., посвящённая изучению влияния различных факторов на конъюгацию в клетки диких штаммов *E. coli*, не вызывает сомнений.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация Ю.С. Поспеловой является цельной, законченной работой. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, и выводы, основываются на значительном объеме проведенных микробиологических, молекулярно-генетических и биологических исследований.

Для анализа полученных данных автором были использованы адекватные методы статистического анализа, позволяющие сделать обоснованные заключения о результатах проведенных экспериментов.

Материалы диссертации нашли свое отражение в 24 публикациях, из них 5 работ опубликовано в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus и WoS.

Новизна исследования, значимость для науки и практики полученных автором результатов

Научная новизна диссертации Ю.С. Поспеловой заключается в первую очередь в том, что в исследованиях конъюгативной передачи плазмиды pOX38 впервые был использован комплексный подход. Конъюгативный перенос рассмотрен в широком диапазоне условий передачи: форма существования клеток, поверхности для формирования

био пленок, присутствие клеток других бактерий, а также их метаболитов, в условиях *in vivo*. Кроме того, был проанализирован большой набор свойств реципиентов и их связь с эффективностью приема клетками плазмиды.

В качестве объекта исследований были выбраны две группы штаммов *E. coli*, представляющих клиническую и ветеринарную значимость. Собранные коллекции штаммов представляются ценными для фундаментальных и прикладных исследований в качестве модельных образцов и референтных выборок. В ходе работы штаммы были всесторонне описаны.

Полученные автором результаты расширяют представление о вирулентном потенциале уропатогенных и патогенных для птиц эшерихий. Важным этапом анализа было определение профиля чувствительности к антимикробным веществам, в результате которого были подробно описаны уровни устойчивости штаммов к антибиотикам, применяющимся в медицинской практике, и бактериоцинам. Кроме того, определена отрицательная связь между устойчивостью к данным группам антимикробных веществ. Полученные данные могут быть использованы при разработке систем мониторинга антибиотикочувствительности бактерий.

Часть исследования посвящена оценке встречаемости генов вирулентности уропатогенных, диареогенных и патогенных для птиц *E. coli* среди штаммов АРЕС, циркулирующих на промышленных предприятиях птицеводства в регионе. Значимым является заключение о том, что последние имеют высокий зоонозный потенциал и по генетическому профилю ближе к представителям диареогенных эшерихий, а не к уропатогенным штаммам, что указывается в большинстве литературных источников.

Интересными являются результаты экспериментов по совместному культивированию штаммов АРЕС и генно-модифицированного штамма *E. coli* ZP, обладающего киллинговой активностью, а также конъюгативному переносу и киллингу в условиях кишечного тракта. Показано, что генно-модифицированные штаммы могут быть конкурентоспособны при росте с продуцентами бактериоцинов. Полученные результаты расширяют представления об использовании искусственно сконструированных бактериальных системах и возможностях их использования в практических целях.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные данные по адгезивной и колонизационной активности *E. coli* на поверхности различных катетеров могут быть использованы для совершенствования материалов, применяемых для изготовления инвазивных медицинских устройств.

Заклучение о целесообразности «серебряного» покрытия на уретральных катетерах с целью предотвращения не только бактериальной колонизации, но и межклеточной коммуникации (передачи генов) может быть полезно для совершенствования методов лечения катетер-ассоциированных инфекций.

Результаты оценки уровней устойчивости *E. coli* к антибиотикам и бактериоцинам, показывающие, что в популяциях данных бактерий могут быть широко распространены носители генов бета-лактамаз расширенного спектра, свидетельствуют о необходимости модифицирования системы мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов как в медицинских учреждениях, так и на сельскохозяйственных предприятиях. Исследование группы АРЕС на присутствие у их представителей генов вирулентности показало, что в крупных хозяйствах могут встречаться носители генов вирулентности из группы диареогенных эшерихий, что представляет значительную эпидемическую угрозу в отношении людей. В связи с этим необходимость совершенствования системы мониторинга возбудителей инфекций сельскохозяйственных животных становится еще более острой.

Представленные результаты совместного роста генно-модифицированного штамма и диких штаммов *E. coli* демонстрируют возможность и оправданность внедрения искусственных векторов в биотехнологические процессы. Показано, что штамм *E. coli* ЖР может быть перспективен в качестве основы пробиотического препарата за счет альтернативного механизма действия на резистентные формы бактериальных клеток.

Содержание диссертации, ее завершенность

Представленная работа оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями, изложена на 158 страницах машинописного текста, 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 источников, из которых 26 отражают исследования отечественных ученых и 202 зарубежных авторов. Диссертация включает 18 таблиц и 21 рисунок.

В разделе «Введение» автор подробно описывает актуальность темы исследования с опорой на литературные данные, исходя из этого, ставит цель и задачи исследования, формулирует положения, выносимые на защиту, научную новизна, теоретическую и практическую значимость работы.

Глава 1 посвящена обзору литературы по выбранной теме исследования. В ней автор приводит многочисленные данные российских и зарубежных авторов, касающиеся биологических свойств уропатогенной и патогенной для птиц *E. coli*. Особое внимание уделено генетическим детерминантам вирулентности, характеризующим выбранные группы. Также большой блок посвящен анализу имеющихся данных об антибиотикочувствительности *E. coli* в разных странах мира. Часть обзора литературы посвящена непосредственно истории изучения горизонтального переноса генов у бактерий. Подробно описано строение F-плазмиды, на основе которой был создан штамм, использованный в данной работе, механизма конъюгативного переноса и регуляция процесса. Отмечено, что изучение переноса именно генов резистентности является одной из актуальных задач современной микробиологии. В конце главы подчеркивается, что большинство исследований, посвященных теме конъюгации, проведены с использованием коллекционных штаммов, а данные об особенностях этого процесса в природных гетерогенных бактериальных популяциях представлены единичными авторами.

В Главе 2 «Объекты и методы исследования» описаны штаммы, использованные в работе, источник их выделения и методы идентификации. Детально описаны все методики, применяемые автором в ходе работы, указаны ссылки на литературные источники и ГОСТы. Прописаны методы статистического анализа и оценки достоверности полученных результатов.

Глава 3 (собственные исследования) посвящена изучению и анализу биологических свойств штаммов уропатогенной и патогенной для птиц *E. coli*. Подробно описаны как фенотипические характеристики (биопленкообразующая способность, бактериоциногенная, лизогенная, устойчивость к антибиотикам и бактериоцинам), так и генотипические (филогенетическая группа, маркеры вирулентности и антибиотикорезистентности). Детально описаны адгезионные профили штаммов UPEC, представлены доминирующие паттерны генов адгезинов. Проведен корреляционный анализ ряда признаков. Показано, что устойчивость к антибиотикам и бактериоцинам имеют отрицательную связь. Проанализирована распространенность генов разных патотипов среди штаммов APES, показано, что на предприятиях циркулируют носители генов диареогенных *E. coli*. Описаны критерии, по которым штаммы были отобраны в эксперименты по конъюгативному переносу.

В Главе 4 (собственные исследования) посвящена собственно экспериментам по конъюгации. Основные особенности и закономерности продемонстрированы на выборке штаммов UPEC. Оценена эффективность конъюгации в планктоне и биопленке, показано, что в последнем случае реципиенты принимают плазмиду эффективнее, при этом толщина

биоленки имеет значение, другие же характеристики реципиента, кроме профиля устойчивости к антибиотикам, не влияют на частоту конъюгации. Отдельный блок посвящен переносу генов в биоленках на поверхности катетеров. Показано, что гидрофобность и шероховатость поверхности определяют массивность биоленки и опосредовано частоту конъюгации, а покрытие серебром ингибирует этот процесс практически полностью. Представлены интересные данные о конъюгации в полимикробных сообществах, которые показывают, что не характер взаимоотношений ассоциантов определяет эффективность межклеточного взаимодействия, а сам факт присутствия физической помехи в среде. Неоспоримо важным является часть исследования, посвященная конъюгативному переносу в условиях *in vivo*. Эксперименты показали, что генно-модифицированный штамм *E. coli* ЖР, во-первых, является достаточно конкурентоспособным при росте с дикими штаммами АРЕС, во-вторых, способен эффективно заселять кишечник крыс и сельскохозяйственной птицы и сохраняться там на протяжении длительного времени. Показано, что в условиях кишечного тракта эффективно происходит как конъюгативный перенос плазмиды от контрольного донора, так и киллинг штаммов-реципиентов при использовании киллерного донора *E. coli* ЖР.

В главе «Заключение» автор анализирует полученные им данные, сравнивает их с имеющимися в литературе, делает выводы о значимости проведенных исследований и их перспективах. Выводы, сделанные автором, полностью соответствуют поставленной цели, задачам и содержанию работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Содержание, изложение и оформление материала диссертационной работы соответствуют всем установленным правилам. Достоинствами работы является резюмирование результатов каждой части исследования после их подробного описания, а также детально описанные методы, использованные в работе.

Работа выполнена на высоком методическом уровне, написана хорошим литературным языком. Принципиальных замечаний к работе и тексту диссертации при ее прочтении не возникло. Автореферат диссертации составлен по стандартной схеме, соответствует требованиям и полностью отражает содержание и результаты диссертационного исследования.

При анализе диссертации возник ряд вопросов и замечаний к автору.

Вопросы:

1. Из текста диссертации не в полной мере понятны характеристики филогенетической группы В2. На основании каких конкретно свойств эта филогруппа ассоциируется с высоким вирулентным потенциалом? Возможен ли пересмотр вирулентного статуса филогруппы В2 или внесение дополнений к ее известным характеристикам с учетом полученных в диссертации данных о фенотипических и генетических детерминантах вирулентности штаммов (биопленкообразовании, адгезии, антимикробной резистентности, бактериоциногении и тд)?

2. Диссертант установил, что анализируемые параметры штаммов *E.coli* UPEC имеют достоверную взаимосвязь между наличием способности к адгезии на поверхностях (стр. 72), генетическими детерминантами адгезии (стр. 77) и принадлежностью к филогруппе В2, но отсутствует достоверная взаимосвязь между адгезией и биопленкообразованием.

Возникает вопрос: есть ли достоверная взаимосвязь между биопленкообразованием и принадлежностью штаммов к филогруппе В2? Иными словами, является ли способность к биопленкообразованию фактором вирулентности штаммов *E.coli* UPEC из филогруппы В2?

Замечания:

1. Таблица 2. Неплохо было бы познакомить читателя с признаками, определяемые указанными генами (только для гена *chuA* есть описание в тексте). Является ли дихотомическая схема дифференциации филогрупп (Рисунок 4) авторством диссертанта или адаптирована по материалам литературы (в этом случае отсутствует ссылка на авторство).

2. Стр. 73. Последний абзац. Видимо, здесь следует читать «устойчивость к бактериоцинам», вместо «к бактерицидным веществам», с целью избежать путаницы с описанными выше штаммам, резистентными к конвенциональным антибиотикам.

3. Когда автор пишет о толщине биопленок (стр. 98 – это не совсем корректное определение. Использование конфокальной микроскопии или зондовое профилирование могло бы дать корректные данные именно о толщине. В этой связи, определение «биомасса» (стр. 99 и далее) является более корректным.

4. Необходимо пояснить, что имеется ввиду под взаимным расположением клеток в биопленке (стр. 102. Параграф 4.1.1.). Нет никаких инструментальных свидетельств характера распределения клеток двух разных штаммов относительно друг друга.

Данные замечания не являются принципиальными, не уменьшают значимость полученных результатов и носят рекомендательных характер, а рецензируемая

