

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПЕРМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
«ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ПОСПЕЛОВА Юлия Сагитовна

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

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Кузнецова Марина Валентиновна

Пермь – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Уропатогенные <i>E. coli</i>	15
1.1.1. Место <i>E. coli</i> в микробном спектре инфекций мочевыводящих путей.....	15
1.1.2. Характеристика уропатогенного потенциала <i>E. coli</i>	19
1.1.3. Чувствительность уропатогенных <i>E. coli</i> к антимикробным агентам	25
1.2. <i>E. coli</i> , вызывающие системный колибактериоз у птиц	28
1.2.1. Факторы вирулентности патогенных для птиц <i>E. coli</i>	28
1.2.2. Чувствительность патогенных для птиц <i>E. coli</i> к антимикробным агентам	32
1.2.3. Зоонозный потенциал патогенных для птиц <i>E. coli</i>	33
1.3. Конъюгативный перенос генов	34
1.3.1. Плазмиды как внехромосомные элементы	37
1.3.2. Механизм конъюгации у бактерий	42
1.3.3. Регуляция процесса конъюгации у бактерий.....	45
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Объекты исследования	49
2.2. Оценка бактериоциногении, лизогении, чувствительности к бактериоцинам	50
2.3. Определение уровней неспецифической и специфической адгезии.....	51
2.4. Оценка биопленкообразования	52
2.5. Окраска полисахаридного каркаса матрикса биопленок.....	52
2.6. Определение чувствительности к антибиотикам	53
2.7. Характеристика антибактериальной системы «kill»-«anti-kill».....	53
2.8. Эксперименты по конъюгативному переносу <i>in vitro</i>	55
2.8.1. Конъюгативный перенос в лунках полистиролового планшета.....	55
2.8.2. Конъюгативный перенос на поверхности урологических катетеров.....	56
2.8.3. Определение гидрофобности и шероховатости поверхности катетеров ...	57
2.8.4. Конъюгативный перенос в смешанных биопленках.....	58

2.8.5. Динамика роста <i>E. coli</i> ŽP в смешанных культурах	58
2.9. Эксперименты по конъюгативному переносу <i>in vivo</i>	59
2.10. Выделение ДНК	60
2.11. Полимеразная цепная реакция	60
2.11.1. Генетическое типирование	61
2.11.2. Определение филогенетической группы <i>E. coli</i>	61
2.11.3. Детекция ряда генов	62
2.12. Статистическая обработка данных	66
ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ	67
3.1. Характеристика уропатогенных <i>E. coli</i>	67
3.1.1. Ростовые характеристики и биопленкообразование	68
3.1.2. Филогенетическая группа, бактериоциногения и лизогения	70
3.1.3. Неспецифическая и специфическая адгезия	71
3.1.4. Чувствительность к антибактериальным веществам	73
3.1.5. Гены белков, обеспечивающих адгезию	74
3.1.6. Гены белков, обеспечивающих вирулентный потенциал штаммов	80
3.2. Характеристика <i>E. coli</i> , патогенных для птиц	81
3.2.1. Филогенетическая группа, бактериоциногения и лизогения	83
3.2.2. Неспецифическая и специфическая адгезия и биопленкообразующая способность	84
3.2.3. Чувствительность к антибактериальным веществам	86
3.2.4. Гены белков, обеспечивающих адгезию	89
3.2.5. Гены белков, обеспечивающих вирулентный потенциал штаммов	91
ГЛАВА 4. КОНЪЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС В КЛЕТКИ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	96
4.1. Конъюгативный перенос в клетки штаммов уропатогенной <i>E. coli</i>	97
4.1.1. Конъюгативный перенос в зависимости от взаиморасположения клеток в биопленке	102

4.1.2. Конъюгативный перенос в биопленках на поверхности урологических катетеров.....	104
4.1.3. Конъюгативный перенос в смешанных биопленках.....	108
4.2. Конъюгативный перенос в клетки штаммов патогенной для птиц <i>E. coli</i> .	112
4.2.1. Оценка эффективности конъюгативной передачи гена <i>colE7</i> в клетки штаммов патогенной для птиц <i>E. coli in vitro</i>	113
4.2.2 Динамика роста <i>E. coli</i> ЖР в смешанных культурах <i>in vitro</i>	115
4.2.3 Оценка эффективности конъюгативной передачи гена <i>colE7 in vivo</i>	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ВЫВОДЫ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132

ВВЕДЕНИЕ

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. Горизонтальная передача генов реализуется через такие каналы генетической коммуникации как конъюгация, трансформация и трансдукция. 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 (Munita, Cesar, 2016). Важность изучения переноса генов между клетками микроорганизмов определяется появлением множества лекарственно-устойчивых бактерий, связанным с широким применением антибиотиков в различных сферах человеческой деятельности. Во многих случаях мутационные изменения, ведущие к резистентности, дорого обходятся гомеостазу клетки, то есть снижают приспособленность, и поддерживаются только в случае присутствия антибиотика в среде. В противовес этому команда Woods L.C. показала, что 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 (Leungtonkam *et al.*, 2018; McCarron *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2019). Биомедицинские инженеры из Университета Дьюка продемонстрировали, что по крайней мере 25% резистентных к антибиотикам патогенных бактерий, обнаруженных в медицинских учреждениях, способны распространять свою устойчивость на

другие бактериальные виды посредством горизонтального переноса (Bethke *et al.*, 2020).

Escherichia coli – основной модельный объект микробиологии. Однако важность изучения данного микроорганизма определяется также его клинической значимостью. Среди эшерихий выделяют как абсолютных патогенов (диареегенные *E. coli*, DEC), так и комменсальные 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) относятся к наиболее распространенным инфекционным заболеваниям, которые широко распространены 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*, однако часто обнаруживаются представители таких родов, как *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Candida* (Саъдуллоев, 2015; Палагин и др., 2019; Klein *et al.*, 2020; Ahmed, Yosry, 2021). Уропатогенные штаммы имеют ряд физиологических особенностей, обеспечивающих их повышенную адаптацию в мочеполовом тракте (Бухарин и др., 2001; Flores-Mireles *et al.*, 2015). Для данной группы характерно присутствие множественных детерминант вирулентности, связанных между собой (Caza, Kronstad, 2013; Tabasi *et al.*, 2016). Отдельной проблемой являются катетер-ассоциированные инфекции мочевыводящих путей, вызванные биопленкообразующими бактериями (Balasubramanian *et al.*, 2012; Малей, 2015; Куу *et al.*, 2020). В микробных сообществах формируются определенные взаимоотношения между участниками, которые могут носить как симбиотический, так и антагонистический характер (Гриценко и др., 2016; Keogh *et al.*, 2016; Juarez, Galvan, 2018). Вектор взаимодействий микроорганизмов может определять эффективность внутривидового распространения плазмид в популяции. Особенности горизонтального переноса генов в клетки диких штаммов *E. coli* на

сегодняшний день мало изучены. 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.

E. coli, патогенные для птиц, отнесенные к дополнительному «животному» патотипу, могут встречаться в микробиоте кишечника здоровой птицы, однако часто ассоциированы с внекишечными заболеваниями – аэросаккулитом и системным колибактериозом (Sarowska *et al.*, 2019; Thomrongsuwannakij *et al.*, 2020). В России доля колибактериоза в структуре всех инфекционных болезней птиц варьирует от 60% до 88% (Джаилиди и др., 2014). Предполагается, что патогенные для птиц *E. coli* имеют уникальные факторы вирулентности, которые реализуются в патогенезе внекишечных инфекций, включая инфекции дыхательных путей (Antão *et al.*, 2009). Кроме того, показано, что большинство изолятов содержат высоко консервативный кластер плазмид-сцепленных генов вирулентности, встречающийся у относительно небольшого количества изолятов фекальной *E. coli* здоровых птиц (Johnson *et al.*, 2006). 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. Однако большинство работ направлено на сравнение генетических профилей птичьих и уропатогенных штаммов, а попытки сравнить распространение факторов вирулентности среди птичьих патогенов и возбудителей острых кишечных инфекции человека проводились единичными авторами (Dziva *et al.*, 2013; Ramadan *et al.*, 2016).

Многократно 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. Команда Moriguchi К. пыталась идентифицировать мутанты *E. coli*, у которых бы наблюдался дефект конъюгации, тем не менее по результатам полногеномного секвенирования не было выделено никаких мутантов, дефектных при конъюгативном переносе (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 аспекте конъюгативно-опосредованной изменчивости микроорганизмов остается большое количество недостаточно изученных вопросов, требующих более детального рассмотрения.

Цель настоящего 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 уropатогенной *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 pOX38 в клетки штаммов *E. coli in vitro* в зависимости от свойств реципиента и факторов окружающей среды.
4. Оценить возможность внутривидового конъюгативного переноса плазмиды pOX38 в штаммы *E. coli* в модельных системах *in vivo*.

Научная новизна

Результаты выполненного исследования расширяют представления о механизмах фенотипической и генотипической изменчивости *E. coli*, дополняют знания по биологическим свойствам и распространенности генетических детерминант патогенности и антибиотикорезистентности штаммов уропатогенной *E. coli* и патогенных для птиц *E. coli*. 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 культуры имеют высокий зоонозный потенциал и по генетическому профилю наиболее близки к представителям диареогенных эшерихий.

Впервые при анализе эффективности конъюгативной передачи применен комплексный подход, а именно, конъюгация оценена в зависимости от свойств клеток реципиента, а также внешних факторов и условий передачи: состояния бактерий – свободное/прикрепленное, взаимного расположения клеток донора и реципиента в биопленке, 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. 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, а также взаиморасположение клеток донора и реципиента не определяли данный параметр, тогда как конъюгативный перенос плазмиды был эффективнее в группе штаммов с множественной устойчивостью. Доказан конъюгативный перенос гена *colE7* в клетки *E. coli in vitro* и *in vivo*. Показано, что штамм *E. coli* ЖР эффективно заселяет кишечник животных, сохраняется в нем длительное время и обеспечивает передачу плазмиды с частотой $10E-02$. Впервые проведены эксперименты по конъюгации с плазмидой рОХ38 в смешанных микробных сообществах в условиях *in vitro* (для УРЕС) и *in vivo* (для АРЕС). На примере трех ассоциаций продемонстрированы взаимоотношения между разными видами микроорганизмов в биопленочном сообществе. Установлено, что совместный рост *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae* значительно не изменял частоту передачи плазмиды внутри биопленки, а клетки *Enterococcus faecalis* и *Pseudomonas aeruginosa* снижали данный показатель.

Научно-практическая значимость работы

Результаты выполненного исследования расширяют представления о механизмах адаптации бактерий в окружающей среде. Изучена распространенность различных факторов вирулентности среди штаммов человеческого и птичьего происхождения. 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 практического здравоохранения.

АРЕС могут выступать как в качестве источника генов вирулентности для других патотипов *E. coli*, так и сами являться причиной инфекций человека, то есть имеют высокий зоонотический потенциал. Показано, что АРЕС состоят из разнообразных субпатотипов с преобладанием гибридных патотипов АРЕС/ДЕС, 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*_{СТХ-М} обычно коррелирует с множественной устойчивостью к антибактериальным агентам, что позволило предложить при мониторинге возбудителей колибактериоза проводить скрининг на продукцию БЛРС СТХ-М типа. 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 живых системах. Полученные данные

могут служить теоретической основой для разработки бактериальных систем, 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 ТЕМ и СТХ типов. Подавляющее большинство штаммов АРЕС 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

По материалам диссертации опубликовано 24 печатные работы: 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 5 публикаций в журналах, входящих в базу Scopus или Web of Sciences, 2 статьи в журналах, входящих в базу РИНЦ, тезисы 16 докладов. Зарегистрирован патент RU 2665840 С1 «Способ оценки эффективности конъюгативного переноса в полимикробном сообществе».

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 158 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 VI-RU/16-18-047 «Факторы, влияющие на конъюгационный перенос в популяциях бактерий» («Factors influencing conjugation in natural bacterial strains»), РФФИ № 19-44-590014-р_а «Биопленкообразование *Escherichia coli* как триггер катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей», МИГ № С-26/792 «Разработка новых методов антимикробной защиты в птицеводстве с целью контроля над распространением бактериальной кишечной инфекции», «УМНИК» «Разработка препарата на основе штамма *Escherichia coli* ЖР с конъюгативным механизмом пробиотической активности» № 14837ГУ/2019 от 16.12.2019 г.

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. Автор подготавливал результаты работы к публикации и их представлению на научных конференциях.

Автор выражает глубокую 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. Благодарность выражается Горовицу Эдуарду Семеновичу – д.м.н., профессору и сотрудникам кафедры микробиологии и вирусологии ГБОУ 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, Морозову Илье Александровичу – с.н.с. лаборатории микромеханики структурно-неоднородных сред «ИМСС УрО РАН» за проведение микроскопии поверхностей.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Escherichia coli – представитель семейства Enterobacteriaceae, является одним из наиболее изученных видов микроорганизмов. Эти бактерии отличаются значительной внутривидовой гетерогенностью: среди штаммов *E. coli* встречаются как комменсалы, так и безусловные патогены, ответственные за широкий спектр кишечных заболеваний. Диареегенные *E. coli* (DEC) достаточно подробно изучены во многих аспектах, однако среди эшерихий выделяют также возбудителей экстраинтестинальных инфекций (ExPEC), например, сепсис- (sepsis-associated *E. coli*, SEPEC) и менингит-ассоциированные *E. coli* (neonatal meningitis-associated *E. coli*, NMEC), штаммы, вызывающие инфекций мочевыводящих путей или системный колибактериоз птиц (Allocati *et al.*, 2013). Данные группы представляют большой интерес для исследователей, поскольку широко представлены в спектре болезней, вызванных бактериями *E. coli*, имеют специфические факторы вирулентности и обособленную филогению.

1.1. Уропатогенные *E. coli*

Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) относятся к числу наиболее распространенных инфекционных заболеваний, которые широко встречаются как в амбулаторной, так и в стационарной практике (Morales-Espinosa *et al.*, 2016; Terlizzi *et al.*, 2017; Tewawong *et al.*, 2020). Основной представитель бактериальной микрофлоры в моче больных – *E. coli* (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2016; Sheikh *et al.*, 2019; Klein *et al.*, 2020). Штаммы, вызывающие заболевания мочевыводящих путей, называют уропатогенными *E. coli* (UPEC) (Chakraborty *et al.*, 2017).

1.1.1. Место *E. coli* в микробном спектре инфекций мочевыводящих путей

В микрофлоре мочи пациентов с ИМВП часто могут быть обнаружены такие бактерии как *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. (Саъдуллоев, 2015; Палагин и др., 2019; Klein *et al.*, 2020; Ahmed, Yosry, 2021). Микробный состав возбудителей ИМВП

может различаться в зависимости от нозологической формы заболевания (пиелонефрит, цистит, уретрит), пола и возраста пациентов, а также от их физиологического статуса и сопутствующей патологии. По данным нескольких независимых исследований, среди всей микробиоты, выявляющейся при бактериологическом исследовании пациентов с ИМВП, *E. coli* в клинически значимых концентрациях регистрируется в 75-90% случаев (Morales-Espinosa *et al.*, 2016; Klein *et al.*, 2020). Уропатогенные эшерихии вызывают от 71% до 90% инфекций мочевыводящего тракта среди амбулаторных пациентов и до 50% нозокомиальных инфекций (Grabe *et al.*, 2015). У людей с сахарным диабетом доля *E. coli* меньше, но увеличивается процент *Klebsiella* spp. и *Proteus* spp. (Grabe *et al.*, 2015). Среди больных с мочекаменной болезнью основными возбудителями, кроме *E. coli* (24%), являются *P. aeruginosa* (17,6%) и *Staphylococcus* spp. (19,3%) (Саъдуллоев, 2015). Воспалительные процессы, вызванные микроорганизмами, часто возникают в постоперационный период. Бактериурия выявляется у 35-80% больных. ИМВП развиваются после операций по трансплантации почки в 75% случаев, от 30% до 80% таких инфекций вызываются *E. coli* и другими грамотрицательными бактериями. Alkatheri А.М. представил различия в частоте развития ИМВП при трансплантации живой и трупной почки. Процент инфекции при получении органа от живого донора был выше, чем при трансплантации почки трупа. Основными культурами, вызывавшими ИМВП, были *E. coli* (53,3%) и *P. aeruginosa* (20%) (Alkatheri, 2013). В исследовании мочи 200 беременных женщин с ИМВП были обнаружены бактерии *Staphylococcus saprophyticus* (35,0%), *E. coli* (26,2%), *Staphylococcus aureus* (19,4%), *Candida albicans* (5,8%), *Staphylococcus epidermidis* (2,9%), а также *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus* spp. (1,9%) и *P. aeruginosa* (1,0%) (Ahmed, Yosry, 2021).

На сегодняшний день особо остро стоит проблема катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей (КАИМВП). Риск развития в основном зависит от метода и длительности катетеризации: 1-5% – при кратковременной катетеризации (Куу *et al.*, 2020), 90-100% – у больных с

долгосрочно установленными катетерами (Balasubramanian *et al.*, 2012; Малей, 2015). Спектр микроорганизмов, вызывающих КАИМВП, практически идентичен возбудителям ИМВП, чаще всего встречается *E. coli*, реже *Proteus* spp., *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Candida* spp. (Weiner *et al.*, 2016; Majumder *et al.*, 2018). По сравнению с неосложненными ИМВП, при катетеризации количество выделяемых видов обычно ограничено тремя-пятью таксонами (Holla, Ruzicka, 2011; Кузнецова и др., 2018).

Известно, что причиной 65% внутрибольничных инфекций являются биопленочные ассоциации бактерий (Grabe *et al.*, 2015; Окулич и др., 2017). У пациентов с катетеризацией мочевыводящих путей на 20% чаще инфекции вызваны микроорганизмами в форме биопленок. Биопленка – это форма организации бактериальных клеток, при которой они существуют внутри матрикса и прикреплены к субстрату. Матрикс представляет собой синтезированные клетками полимерные вещества, которые полностью покрывают клетки, обеспечивая сообществу бактерий защиту от внешних воздействий (Мальцев, Мансурова, 2013). На сегодняшний день биопленки способны заселять поверхности практически всех медицинских приборов, делая их тем самым непригодными в использовании (Винник и др., 2013). Команда Balasubramanian A. обнаружили, что среди сорока пяти уретральных катетеров на тридцати семи сформировались биопленки, и, чем дольше использовался катетер, тем биопленка на нем была толще (Balasubramanian *et al.*, 2012). Несмотря на то, что не все материалы в биомедицинской практике одинаково подвержены колонизации бактериями, любой катетер, не зависимо от срока его эксплуатации, является дополнительным фактором риска развития инфекции (Grabe *et al.*, 2015). Ferrières L. *et al.* показали, что силиконовые и латексные катетеры способствуют формированию биопленки для группы штаммов UPEC, в отличие от комменсальных культур *E. coli* (Ferrières *et al.*, 2007). Другое исследование выявило, что представители некоторых видов микроорганизмов формируют более массивные биопленки на силиконовых катетерах (без покрытия), чем на латексе или поливинилхлориде (ПВХ) (Немец и др., 2013). С целью снижения

возникновения КАИМВП разрабатываются катетеры с антибактериальными покрытиями, например, пропитанные антибиотиками или импрегнированные ионами серебра. В литературе встречаются противоречивые данные об их эффективности: одни исследования не подтверждают различий в бактериальной колонизации поверхности катетеров без покрытия и «серебряных» катетеров (Johnson, Johnston, 2012; Al-Qahtani *et al.*, 2019), другие показывают, что серебряное напыление обладает выраженным антимикробным действием в отношении разных видов микроорганизмов, включая *E. coli* (Gotlib *et al.*, 2021; Vaitkus *et al.*, 2021). Согласно исследованиям Kart D. *et al.*, катетеры, пропитанные нитрофуразоном, значительно снижали количество жизнеспособных клеток *E. faecalis* и полностью подавляли образование биопленок *P. aeruginosa* и *S. epidermidis* по сравнению с другими видами катетеров (Kart *et al.*, 2017).

Инфекции мочевыводящих путей на фоне катетеризации редко бывают вызваны одним видом бактерий, обычно причиной являются полимикробные ассоциации. Чем дольше катетер используется, тем выше видовое разнообразие бактерий в биопленке, образующейся на его поверхности. Hola V. и Ruzicka F. описали, что в полимикробных сообществах, образованных на уретральных катетерах, в 76,5% встречается *E. coli* и хотя бы один вид рода *Enterococcus*. В 64,0% случаев была выделена *Candida spp.*, *Klebsiella spp.* – в 41,0% биопленок (Hola, Ruzicka, 2011). *Proteus mirabilis* является одной из наиболее распространенных причин полимикробных КАИМВП совместно с *E. faecalis*, *E. coli*, *Providencia stuartii* и *Morganella morganii* (Pelling *et al.*, 2019). Бактерии *P. mirabilis* особенно опасны из-за фермента уреазы, который способствует образованию кристаллов струвита, инкрустации катетера, закупорке и образованию мочевых камней. Показано, что взаимодействия между *P. mirabilis* и другими уропатогенами могут усиливать уреазную активность при экспериментальной полимикробной инфекции (Learman *et al.*, 2019).

Полимикробные ассоциации встречаются также и при неосложненных ИМВП, доля *E. coli* в них составляет 65-75% (Flores-Mireles, 2015). В исследованиях клинических образцов показано, что основными ассоциантами

являются *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* и *S. aureus* (Foxman, 2014; Кузнецова и др., 2018). Известно влияние некоторых видов бактерий на клетки эшерихий. Во многих работах показано, что *P. aeruginosa* угнетает жизнеспособность *E. coli* при совместном росте. Гриценко В.А. и соавт. показали, что клинические штаммы *P. aeruginosa* обладают достаточно выраженной антагонистической активностью в отношении клинических культур энтеробактерий (клебсиелл, эшерихий), будучи устойчивыми к действию последних, то есть антагонистические взаимоотношения между этими микроорганизмами носят одностороннюю направленность, а антагонистически активным их участником выступают только псевдомонады (Гриценко и др., 2016). Ранее показано, что клинические штаммы *P. aeruginosa* подавляли свечение генно-модифицированного штамма *E. coli*, несущего *lux*-оперон, в смешанной биопленке, а супернатанты увеличивали длительность лаг-фазы *E. coli*, а в короткие сроки экспозиции ингибировали свечение планктонных клеток (Кузнецова и др., 2012; Kuznetsova *et al.*, 2013). Juarez G.E. и Galvan E., изучив способность *E. coli* и *K. pneumoniae* формировать смешанную биопленку в различных условиях, показали, что через сутки после совместной инокуляции количество адгезированных клеток *E. coli* значительно уменьшалось, а число клеток *K. pneumoniae* не изменялось в смешанной биопленке, в сравнении с моновидовой (Juarez, Galvan, 2018). В ассоциации *E. coli*+*E. faecalis* представители первого вида получают больше преимуществ: *E. faecalis* значительно усиливает формирование биопленок и жизнеспособность *E. coli in vitro* и *in vivo* за счет экспорта L-орнитина. Этот метаболический сигнал облегчает биосинтез сидерофоров энтеробактерии *E. coli*, обеспечивая рост *E. coli* и образование биопленок в железо-ограничивающих условиях (Keogh *et al.*, 2016).

1.1.2. Характеристика уропатогенного потенциала *E. coli*

В основе патогенеза ИМВП лежат взаимоотношения между макро- и микроорганизмом, характер которых зависит не только от состояния иммунобиологической реактивности (восприимчивости) хозяина, но и

биоагрессивного потенциала (уропатогенности) инфекционных агентов. Уропатогенность – способность бактерий проникать в органы мочеполовой системы макроорганизма и вызывать патологические процессы в различных клинических проявлениях (Бухарин и др., 2001). Штаммы UPEC имеют ряд особенностей, обуславливающих повышенную адаптацию бактерий в мочеполовом тракте. К ним относятся поверхностные структурные компоненты, такие как липополисахарид (ЛПС), полисахаридная капсула, белки наружной мембраны (OMPs) и везикулы, жгутики, пили, кёрли (*curli*), непилусные адгезины, а также секретируемые токсины и TonB-зависимые рецепторы поглощения железа, в том числе рецепторы сидерофоров (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Филогенетическая группа также считается одной из характеристик вирулентности штамма. В большинстве исследований сообщается, что среди UPEC преимущественно встречаются представители филогруппы B2 (Najafi *et al.*, 2017; Кузнецова и др., 2018; Cristea *et al.*, 2019; Tewawong *et al.*, 2020) или B2 и D (Yahiaoui *et al.*, 2015; Rezatofghi *et al.*, 2021). В кросс-секционных исследованиях пациентов с ИМВП, которые были приняты или госпитализированы в медицинские клиники Ирана и Пакистана, продемонстрировано, что среди UPEC могут встречаться штаммы всех филогрупп, тем не менее преобладающими оставались *E. coli* филогенетической группы B2 – 39,3% (Iranpour *et al.*, 2015) и 44,2% (Kumar *et al.*, 2017). Во многих работах показано, что именно бактерии группы B2 или D имеют намного больше факторов вирулентности, в том числе и генов адгезии, чем представители других распознаваемых филогрупп (Khairy *et al.*, 2019; Sheikh *et al.*, 2019; Dadi *et al.*, 2020). Yahiaoui M. *et al.* показали, что полирезистентные UPEC филогрупп B2 и D чаще обладали факторами вирулентности, играющими роль в колонизации и длительном персистировании у людей (Yahiaoui *et al.*, 2015). В исследовании по изучению взаимосвязи между филогенетической группой штамма и присутствием маркеров вирулентности среди UPEC выявлена существенная связь между группой B2 и всеми изученными генами адгезии (*fimH*, *papC*, *papG*, *afa*, *sfa/foc*) (Najafi *et al.*, 2017).

Факторы адгезии. Основными факторами адгезии являются супрамолекулярные нитчатые прикрепительные органеллы – пили или фимбрии.

Пили 1 типа с помощью концевоего белка FimH распознают маннозилированный гликопротеиновый рецептор, присутствующий на уротелиальных клетках хозяина, опосредуя прикрепление бактерий, что в итоге приводит к развитию цистита из-за последующей бактериальной инвазии (Donnenberg, 2013; Kot, 2017). Адгезин FimH считается самым распространенным фактором вирулентности среди UPEC. Tiba M.R. et al. обнаружили *fimH* в 97,5% UPEC, выделенных от пациентов с циститом (Tiba et al., 2008). При анализе генов факторов вирулентности Chakraborty A. et al. показали, что 90% штаммов обладали геном *fimH* (Chakraborty et al., 2017), Khairy R.M. et al. детектировали данный ген у 66,9% изолятов (Khairy et al., 2019), а Казанцев А.В. с соавт. – в 99,0% (Казанцев и др., 2019). Одно из исследований штаммов, выделенных от детей с ИМВП и асимптоматической бактериурией, выявило присутствие гена адгезина FimH в 100% изолятов (Yun et al., 2014).

P-фимбрии, ответственные за адгезию к слизистой оболочке, а также за выработку цитокинов, состоят из гетерополимерных волокон, включающих различные белковые субъединицы, кодируемые опероном *papA-K* (Donnenberg, 2013, Baby et al., 2016). Naboka Y.L. et al. продемонстрировали, что существует значимая корреляция между наличием *papE* и частотой рецидивов (более четырех рецидивов в течение 1 года), а также связь между лейкоцитурией и наличием *papE* и *papGII* (Naboka Y.L. et al., 2020). Исследования показывают, что как минимум половина штаммов UPEC несут ген *papC*, ответственный за адгезию при пиелонефрите (Asadi et al., 2014; Chakraborty et al., 2017; Spindola et al., 2018). Fattahi S. et al. обнаружили, что 90,4% изолятов имеют данный ген (Fattahi et al., 2017). Реже встречаются гены *papE/F* и *papG*, а *papA* – менее чем в 20% штаммов (Tiba et al., 2008; Tabasi et al., 2016; Khairy et al., 2019).

S-пили относятся к маннозорезистентным и подразделяются на SfaI, SfaII, F1C-пили (Foc) и S/F1C-связанные пили (Sfr). S-пили распознают лактозосодержащие рецепторы и экспрессируются преимущественно штаммами

сепсис-ассоциированных (sepsis-associated *E. coli*, SEPEC) и менингит-ассоциированных (neonatal meningitis-associated *E. coli*, NMEC) *E. coli*, но могут достаточно часто встречаться и у UPEC (Asadi *et al.*, 2014; Fattahi *et al.*, 2017; Khairy *et al.*, 2019).

Кроме фимбриальных адгезинов среди штаммов UPEC широко распространены нефимбриальные, например, афимбриальный адгезин Afa, выделенный из штаммов, вызывающих пиелонефрит, – маннозорезистентный белок, экспрессирующийся с гена *afa-1*, опосредует маннозорезистентную гемагглютинацию и адгезию к уротелиальным клеткам (Khairy *et al.*, 2019). Встречаемость данного фактора среди штаммов UPEC достаточно сильно варьирует, так Zhao L. *et al.* детектировали *afa* только у 4% изолятов (Zhao *et al.*, 2009), у 11,3% штаммов данный ген был обнаружен в исследовании Spindola M.G. *et al.* (Spindola *et al.*, 2018), а Asadi S. *et al.* показали присутствие гена *afa* в более чем 50% штаммов (Asadi *et al.*, 2014). Другие адгезины, FdeC (белок бактериального иммуноглобулин-подобного домена) и Iha (*iha*), также участвуют в колонизации мочевого пузыря и почек. Белки UраВ/С/Н/Г, члены семейства ауто транспортерных адгезинов, проявляют сродство к фибронектину и ламинину, обеспечивая прилипание UPEC к эпителию мочевого пузыря. Кроме того, UраG участвует в создании биопленки на пластике, что способствует колонизации урологических катетеров (Valle *et al.*, 2008).

Кёрли (*curli*) – поверхностные выросты, которые выделяются клеткой как растворимые мономерные белки, кодируемые генами *crl* и *csg*, и обладают типичной структурой и физической характеристикой амилоидных фибрилл, которые образуются при некоторых человеческих дегенеративных заболеваниях. Бактериальные амилоиды могут способствовать образованию биопленки, позволяющей бактериям долгое время сохраняться в организме (Schwan, 2008; Kot, 2017). Другими органеллами, которые обеспечивают адгезию и инвазивность некоторых штаммов UPEC и играют ключевую роль в динамике биопленок, являются жгутики. Schwan W.R. показал, что жгутики *E. coli* могут иметь важное

значение для того, чтобы бактерии могли подняться из мочевого пузыря и вызвать инфекцию почек (Schwan, 2008).

Факторы вирулентности. Важным фактором патогенности являются токсины, повреждающие клетки хозяина и нарушающие их метаболизм, что делает среду биотопа более благоприятной для *E. coli*. Наиболее изученным секретируемым фактором вирулентности уропатогенных *E. coli* является липопротеин, называемый α -гемолизином – HlyA (*hlyA*), который относится к порообразующим токсинам, лизирующим эритроциты и ядродержащие клетки, вызывая воспаление и повреждение почек (Ristow, Welch, 2016). Исследования показывают, что данный токсин не является широко распространенным среди штаммов UPEC (Fattahi *et al.*, 2017, Yazdanpour *et al.*, 2020).

Цитотоксический некротизирующий фактор 1 (CNF1) препятствует полиморфно-ядерному фагоцитозу и вызывает апоптотическую гибель эпителиальных клеток мочевого пузыря (Yang *et al.*, 2018). Роль данного токсина в патогенезе ИМВП остается недостаточно ясной. Например, команда Michaud J.E. в исследовании *in vivo* на мышинной модели с пиелонефритом показала, что наличие фактора CNF1 у штаммов UPEC не дает последним преимуществ в развитии восходящих ИМВП (Michaud *et al.*, 2017). Однако в 2018 г. Yang H. *et al.*, используя модель мышей с пиелонефритом, показали, что CNF1 способствует увеличению количества нейтрофилов и титров бактерий в инфицированных тканях мочевого пузыря и почек, что приводит к сильному воспалению и повреждению тканей (Yang *et al.*, 2018). Распространенность гена *cnf1* в штаммах UPEC варьирует от 2% (Mahmoud *et al.*, 2020) до 95,6% (Morales-Espinosa *et al.*, 2016).

Выработка сидерофоров (железо-переносящие белки), определяющих способность бактериальных клеток к захвату железа, повышает жизнеспособность микроорганизмов внутри уретрального тракта. Основные сидерофоры UPEC включают энтеробактин и сальмохелин (катехолатные сидерофоры), иерсиниабактин (фенолятный сидерофор) и аэробактин (сидерофор смешанного типа). Поскольку энтеробактин обнаружен практически во всех штаммах *E. coli*,

как комменсальных, так и патогенных, существует вопрос, следует ли его рассматривать как фактор вирулентности. Сальмохелин, гликозилированное производное энтеробактина, был впервые обнаружен у *Salmonella* spp., кодируется генным кластером *iroBCDEN*, расположенным на плаزمиде вирулентности ColV или ColBM или на островках патогенности (Bister *et al.*, 2004). Аэробактин (*aer*) также кодируется плазмидами вирулентности ColV и ColBM, его рецептор проявляет гораздо большую эффективность в захвате железа, чем энтеробактин (Terlizzi *et al.*, 2017). Изотопные исследования активности сидерофоров, а также исследования экспрессии их генов в моче у пациентов, страдающих бактериальной ИМВП, подтверждают, что системы получения железа активируются во время инфекции, а активность сидерофоров повышена в UPEC по сравнению с комменсальными штаммами *E. coli* (Hagan *et al.*, 2010). Некоторые авторы показывают, что 90-100% штаммов, выделенных при ИМВП, несут гены системы захвата железа (Morales-Espinosa *et al.*, 2016; Ahmed, Yosry, 2021), что свидетельствует о высоком значении данного фактора для реализации вирулентного потенциала бактериями.

Липополисахариды – это молекулы с амфипатическими свойствами, состоящие из жирных кислот, связанных с олигосахаридным ядром (Donnenberg, 2013). ЛПС обеспечивают устойчивость к гидрофобным антибиотикам, снижая эффективность терапии. Доказано, что гиперчувствительность к гидрофобным токсичным молекулам (такие как соли желчных кислот и некоторые антибиотики) возникает, когда количество ЛПС на поверхности клетки уменьшается (Aguiniga *et al.*, 2016). Капсулы – полисахаридные структуры, покрывающие бактерию и защищающие ее от иммунной системы хозяина (Zhang *et al.*, 2013). Определенные капсульные типы, например, K1 и K5, проявляют молекулярное сродство к тканевым компонентам, предотвращая «правильный» гуморальный иммунный ответ инфицированного хозяина (Abed *et al.*, 2014). По данным Zhao L. *et al.*, капсульный тип K1 (*kpsMT*) является самым распространенным (более 90% штаммов) среди UPEC, вторым по встречаемости является K2 (*kpsMTII*) (Zhao *et al.*, 2009).

Многие исследования показывают наличие в бактериях сразу нескольких вирулентных факторов, часто сильно коррелирующих между собой. Landraud L. et al. определили, что ген *cnf1* всегда встречался в штаммах UPEC с опероном *hlyCABD* (Landraud et al., 2003). Tabasi M. et al. детектировали множественные маркеры вирулентности (три и более) в 90,4% изолятов UPEC и обнаружили положительную связь *hlyA* с *papEF*, *sfa/foc*, *cnf1*, *iroN* и *usp* у пациентов с циститом и пиелонефритом (Tabasi et al., 2016). Положительная корреляция между геном *hlyA* и *iroN* также была показана в исследовании, в котором сообщалось, что продукция гемолизина является одним из альтернативных механизмов получения железа бактериями (Caza, Kronstad, 2013). Команда Spurbeck R.R. показала, что присутствие четырех генов *yfcV*, *vat*, *fyuA* и *chuA* определяет способность UPEC более эффективно колонизировать мочевого пузыря (Spurbeck et al., 2012).

1.1.3. Чувствительность уропатогенных *E. coli* к антимикробным агентам

Повышение устойчивости к антибиотикам и появление патогенов с множественной лекарственной устойчивостью при ИМВП связано с высокими показателями нерациональной антибиотикотерапии, назначаемой без тестирования на чувствительность к антибактериальным препаратам (Adamus-Białek et al., 2018).

В отношении UPEC наибольшей активностью обладает фосфомицин. Сравнительное исследование чувствительности UPEC к фосфомицину, проведенное в Германии, Бельгии и Испании, показало, что менее 1,5% изолятов были устойчивы к этому антибиотику (Kresken et al., 2016). По данным многоцентрового исследования «ДАРМИС-2018» в России доля устойчивых к фосфомицину штаммов UPEC не превышает 3% (Палагин и др., 2019).

Анализ Yamaji R. et al., проведенный в США, показал, что частоты устойчивости UPEC к триметоприму/сульфаметоксазолу в 1999-2000 гг. и в 2016-2017 гг. существенно не изменились (Yamaji et al., 2018). Однако в последнее время во многих странах наблюдается рост устойчивости к этому препарату. В

Швейцарии Erb S. et al. сообщили о высоком уровне устойчивости к триметоприму/сульфаметоксазолу (24,5%) среди *E. coli*, выделенных из мочи в 2012-2015 гг. (Erb et al., 2018). Процент резистентных штаммов в Индии в 2013 г. составлял 52%, а в 2017 г. он увеличился до 59,6% (Prasada et al., 2019). В России доля устойчивых штаммов по данным многоцентрового исследования на момент 2018 г. составляла почти 40% среди взрослого населения и более 30% среди детей (Палагин и др., 2019).

Во всем мире сообщается о росте числа представителей *E. coli*, устойчивых к фторхинолонам. Prasada et al. выявили высокий уровень резистентности к данной группе препаратов UPEC в Индии (более 60%) (Prasada et al., 2019). В Европе устойчивость была зарегистрирована у 22% штаммов, а в США распространенность нечувствительных к фторхинолонам штаммов составляла около 31% среди госпитализированных пациентов (Asadi Karam et al., 2019). В группе штаммов UPEC, выделенных в 2013-2014 гг. от пациентов с острым неосложненным и осложненным пиелонефритом, 12,1% были устойчивы к ципрофлоксацину (Talan et al., 2016). В Бразилии в этот же период 18,8% имели устойчивость к этому антибиотику (Moreira da Silva et al. 2017). В Бельгии, Германии и Испании процент устойчивых штаммов UPEC составлял 12,9%, 17,3% и 39,8%, соответственно (Kresken et al., 2016). В России уровень нечувствительных к ципрофлоксацину UPEC в последние годы варьирует от 36,9% (Кузнецова и др., 2018) до 60,0% (Палагин и др., 2019) среди взрослого населения. Согласно анализу, проведенному в рамках многоцентрового исследования устойчивости культур к антибиотикам, наблюдается снижение доли устойчивых штаммов на 20% по сравнению с уровнем, зарегистрированным 7 лет назад (Палагин и др., 2019).

В последние годы также значительно увеличилась устойчивость UPEC к антибиотикам бета-лактаминового ряда (Zhao et al., 2015; Halaji et al., 2020). Одним из основных механизмов резистентности к данной группе антимикробных агентов является продукция бета-лактамаз – ферментов, способных расщеплять бета-лактаминовое кольцо антибиотика. Бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС),

гидролизующие оксимино- β -лактамы (цефалоспорины широкого спектра действия и азтреонам), чаще всего кодируются генами, расположенными на плазмидах, что является серьезной проблемой с эпидемиологической точки зрения. В настоящее время в штаммах UPEC наиболее распространенными типами БЛРС являются СТХ-М, ТЕМ, SHV и ОХА (Zhao *et al.*, 2015). Частота встречаемости бактериальных изолятов, экспрессирующих БЛРС фенотип, варьируется в разных географических регионах. В исследованиях «ДАРМИС-2011» в России в 2010-2011 гг. был отмечен уровень в 8,5%, а к 2018 г. он возрос до 27,0% (Палагин и др., 2019). В Европе распространенность БЛРС-продуцентов, в том числе и среди UPEC, существенно ниже. В многоцентровом исследовании (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, T.E.S.T.), проведенном в 2004-2010 гг. в сорока двух центрах Восточной Европы, БЛРС-позитивные изоляты *E. coli* были зафиксированы во всех странах, участвовавших в проекте, а их доля, в среднем, составила 15% (Allocati *et al.*, 2013). В недавнем ретроспективном исследовании, проведенном в лаборатории мочевых инфекций клинического центра университета Сараево (Босния и Герцеговина) в период 2018 г., показано, что БЛРС культуры из общего числа изолятов *E. coli* составили только 6,8% (Jukić *et al.*, 2019). Среди многих вариантов бета-лактамаз СТХ-М, о встречаемости которых в UPEC неоднократно сообщалось, *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{СТХ-М-14}, ферменты из групп СТХ-М-1 и СТХ-М-9, соответственно, наиболее часто идентифицируются во всем мире, что определяется их эффективной передачей с различными генетическими элементами (Shi *et al.*, 2015; Al-Zuhairy, Al-Dahmoshi, 2018). Группа Zhao R. из Китая проанализировала 120 культур UPEC, продуцирующих БЛРС, изолированных от длительно госпитализированных пациентов в больнице Университета Сучжоу, и показала, что гены ферментов СТХ-М, ТЕМ, SHV и ОХА были идентифицированы в 90,8%, 40,0%, 10,8% и 10,0% случаях соответственно. Авторы отмечают, что большинство изолятов обладали более чем одним геном БЛРС, а всего было идентифицировано девять различных паттернов (Zhao *et al.*, 2015). Аналогичную тенденцию продемонстрировал в своем

исследовании Halaji M. et al.: 53,2%, 45% и 5,4% изолятов UPEC содержали гены *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} и *bla*_{SHV} соответственно (Halaji et al., 2020).

1.2. *E. coli*, вызывающие системный колибактериоз у птиц

Птичьи патогенные *E. coli* (avian pathogenic *E. coli*, АРЕС), отнесенные к дополнительному «животному» патотипу, могут встречаться в микробиоте кишечника здоровой птицы, однако часто ассоциированы с внекишечными заболеваниями (Sarowska et al., 2019; Thomrongsuwannakij et al., 2020).

Колибактериоз представляет одну из основных проблем на птицефабриках: уровень инфицированности эшерихиями сельскохозяйственной птицы в Канаде составил 96%, согласно отчету CSCRA в 2016 г. (CSCRA, 2016). В России доля колибактериоза в структуре всех инфекционных болезней птиц варьирует от 60% до 88% (Джаилиди и др., 2013). В результате анализа данных за 14 лет наблюдений на птицефабриках Пермского края было показано, что частота высеваемости штаммов *E. coli* из органов вынуждено забитой птицы может достигать 80% (Кузнецова и др., 2018).

*1.2.1. Факторы вирулентности патогенных для птиц *E. coli**

Первой характеристикой вирулентного потенциала штамма принято считать его принадлежность к определенной филогенетической группе. Большинство исследований показывают, что чаще представители АРЕС относятся к филогруппе В1 или F (Borzi et al., 2018; Saha et al., 2020; Oliveira et al., 2021), куда входят патогены с большим разнообразием факторов вирулентности. АРЕС обладает различными факторами вирулентности и механизмами, способствующими развитию колибактериоза у домашней птицы. Эти факторы включают адгезины, инвазины, протектины, системы усвоения железа, токсины (Sarowska et al., 2019).

Адгезины и инвазины. Вирулентность АРЕС – сложное явление, связанное с многочисленными механизмами, в которых задействованы различные внеклеточные и внутриклеточные структуры для преодоления барьеров хозяина. Первоначальное прикрепление или адгезия бактерий к клеткам-хозяевам имеет

жизненно важное значение для бактериального патогенеза и определяется различными адгезинами. Первичную адгезию АРЕС обеспечивают фимбрии 1-го типа, Р-фимбрии и S-фимбрии (Dziva, Stevens, 2008; Sarowska *et al.*, 2019). В штаммах птичьих *E. coli* было найдено множество генов, кодирующих эти фимбрии и дополнительные адгезины. Фимбриальные адгезины Fim (*fimH*, *fimC*) являются самыми распространенными среди штаммов АРЕС, поскольку считаются универсальными белками адгезии рода *Escherichia*, их встречаемость обычно превышает 90% (Paixao *et al.*, 2016; Saha *et al.*, 2020; Ugwu *et al.*, 2020). Р-фимбрии, кодируемые генами *papA*, *papC*, *papEF*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *felA*, не так широко представлены в данной группе, менее 25% штаммов, так как наиболее характерны для уропатогенных штаммов *E. coli* (Ewers *et al.*, 2007; Borzi *et al.*, 2018).

В последние годы, благодаря быстро развивающейся биоинформатике и растущей популярности методов секвенирования, был идентифицирован оперон *yad*, который является гомологом кластера *fim* (Korea *et al.*, 2010). Делеция гена *yadL* в штамме АРЕС O78 снижала адгезивную способность этого штамма, что подтверждает роль *Yad* как фактора вирулентности и адгезина АРЕС (Dziva *et al.*, 2013). Кластер *yqi* был идентифицирован в 2009 г. в геноме штамма АРЕС IMT5155 и включает гены *yqiG* и *yqiH*, кодирующие вспомогательные белки, *yqiI* с неизвестной функцией и *ygi* (или *ygiL*), который проявляет адгезивные свойства. Сравнительный анализ показал, что этот кластер встречался только у патотипов внекишечных *E. coli*, UPEC (65,9%), NMEC (60,0%), АРЕС (54,4%) и SEPEC (52,6%) и не присутствовал в группе кишечных патогенов и непатогенных штаммов (Antão *et al.*, 2009). Предполагается, что *Yqi* является уникальным фактором вирулентности, который опосредует патогенез внекишечных инфекций, включая инфекции дыхательных путей АРЕС-этиологии. Согласно Antão E. *et al.*, делеция гена *yqi* в штамме АРЕС IMT5155 приводит к значительному снижению адгезии к фибробластам и эпителиальным клеткам.

Кроме генетических детерминант фимбриальных адгезинов в геноме АРЕС встречаются также гены афимбриальных адгезинов и белков наружной мембраны

таких как *afaIBC* (афимбриальный адгезин), *lpfA*, *lpf0141*, *lpf0154* (длинные полярные фимбрии), *mat/espA* (фимбриллин), *crl*, *csg* (кёрли), *iha* (адгезин, гомолог IrgA) и *kii* (ген, кодирующий К-капсулу), *ibeA*, *ibeB*, *tia* (инвазивные протеины) (Aslam *et al.*, 2014; Maciel *et al.*, 2017; Zhuge *et al.*, 2020). Как показывают исследования, афимбриальные адгезины менее распространены, по сравнению с фимбриальными, например, ген *afa* встречается только в 10% штаммов (Alizade *et al.*, 2017).

Системы захвата железа. Железо является важным микронутриентом, необходимым для роста и размножения бактерий внутри хозяина (Sarowska *et al.*, 2019). АРЕС имеют различные системы усвоения железа, состоящие из нескольких сидерофоров (аэробактин, сальмохелин, иерсиниабактин) и переносчиков, чтобы извлекать железо из жидкостей организма (Dziva, Stevens, 2008; Sarowska *et al.*, 2019). К генам, кодирующим системы захвата и транспорта железа данной группы *E. coli*, относят *iucCD*, *iutA*, *aerJ* (аэробактин), *iroBCDEN* (сальмохелин), *fyuA* (иерсиниабактин), *sitABCD*, *mntH* (транспортеры ионов железа и марганца), *irp2* (белок, репресслируемый ионами железа), *feoB* (переносчик ионов двухвалентного железа), *fepC* (транспортер энтеробактина), *ireA* (железо-регулируемый ген вирулентности), *eitABCD* (предполагаемый переносчик железа), *chuA* (рецептор гема внешней мембраны) и *bfr* (бактериоферритин) (Tu *et al.*, 2016; Sarowska *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019). Исследования показывают, что системы захвата железа чрезвычайно важны для выживаемости клеток АРЕС, генетические маркеры, такие как *iroN*, *iutA*, *chuA* обнаруживаются в большом проценте (60-95%, 60-70%, 40%, соответственно) изолятов *E. coli*, полученных от птиц с системным колибактериозом (Li *et al.*, 2015; Paixao *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019; Ugwu *et al.*, 2020).

Протектины. Протектины защищают бактерии от иммунной системы хозяина, а также от различных неблагоприятных условий (Dziva, Stevens, 2008; Sarowska *et al.*, 2019). В частности, протектины включают бактериальные капсулы, наружную мембрану, белки и липополисахаридные компоненты, они обеспечивают защиту от фагоцитарного поглощения макрофагами и

опосредованного комплементом бактерицидного действия в сыворотке макроорганизма. Протектины АРЕС, кодируются несколькими генами: *iss* (повышенная выживаемость в сыворотке), *traT* (белок устойчивости к системе комплемента), *ompT* (протеаза внешней мембраны), *kpsMTI*, *kpsMTII*, *kpsmTIII*, *neuC*, *neuS*, *neuD* (капсула), *kfiC-K5* (гликозилтрансфераза) и *betA* (холиндегидрогеназа) (Xu *et al.*, 2019; Thomrongsuwannakij *et al.*, 2020; Zhuge *et al.*, 2020). Белки наружной мембраны YbjX и PagP также играют роль в устойчивости к факторам сыворотки крови и стрессам окружающей среды, инвазии и внутриклеточной выживаемости (Song *et al.*, 2019, 2020). Многие исследования показывают широкое распространение протектинов среди патогенных штаммов, например, ген *iss* встречается в 40-100% изолятов (Paixao *et al.*, 2016; Ugwu *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2021), а *ompT* – в 70% (Xu *et al.*, 2019).

Токсины. Самыми распространенными токсинами среди АРЕС считаются гемолизины, кодируемые генами *hlyF*, *hlyA*, *hlyE*, они встречаются 90-100% случаев (Murase *et al.*, 2016; Borzi *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020). Термочувствительный гемагглютинин представляет собой белок, синтезируемый штаммами АРЕС, кодируется геном *tsh*. Этот ген расположен в плаزمиде с высокой молекулярной массой, главным образом в плаزمиде ColV и часто встречается среди штаммов АРЕС. Sedeek D.M. *et al.* выявили ген *tsh* среди 25% изученных штаммов АРЕС серогруппы O78 (Sedeek *et al.*, 2020). Некоторые штаммы АРЕС способны продуцировать такие токсины, как лабильные температурные и стабильные температурные энтеротоксины (Parreira, Gyles, 2003), а также веротоксины, известные как шига-токсины, однако их гены обнаруживаются крайне редко (Jeong *et al.*, 2012). Parreira P.R. и Gyles C.L. описали также вакуолизирующий токсин, который экспрессируется АРЕС, этот токсин кодируется геном *vat*, который принадлежит к острову патогенности (Parreira, Gyles, 2003) и встречается примерно в 10% штаммов (Jeong *et al.*, 2012).

В соответствии с определением Ewers C. *et al.*, для того чтобы изолят считался патогенным, необходимо присутствие по крайней мере одного фактора адгезии, одного фактора приобретения железа и одного фактора резистентности в

сыворотке крови (Ewers *et al.*, 2007). Исследование Oliveira E.S. *et al.* показало, что 92,7% изолятов от кур на свободном выгуле соответствовали данному критерию (Oliveira *et al.*, 2021).

1.2.2. Чувствительность патогенных для птиц *E. coli* к антимикробным агентам

Длительное время в качестве стимуляторов роста, для профилактики и лечения инфекционных заболеваний промышленной птицы применялись поликомпонентные антимикробные препараты, в результате чего сформировались экovarы резистентных бактерий. Многочисленные исследования показывают, что среди изолятов *E. coli*, циркулирующих на предприятиях птицеводства, широко распространена устойчивость к тетрациклину, налидиксовой кислоте, ампициллину, амоксициллину, стрептомицину, триметоприму и ко-тримоксазолу, а более половины этиопатогенов имеют множественную резистентность (Akhtar *et al.*, 2016; Boulianne *et al.*, 2016; Homjan *et al.*, 2018; Yulistiani *et al.*, 2017). В Египте к 2020 г. среди АРЕС наблюдается резистентность к ампициллину (100%), амоксициллину-клавулонату (100%), тетрациклину (100%), колистину (92%), доксициклину (84%), спирамицину (84%), флорфениколу (69%), цефотаксиму (61%), ципрофлоксацину (53%) (Awad *et al.*, 2020), окситетрациклину (85%), канамицину (85%), клиндамицину (80%), стрептомицину (80%), энрофлоксацину (75%), хлорамфениколу (65%), гентамицину (55%), эритромицину (35%), оксациллину (30%) и триметоприм-сульфаметоксазолу (45%) (Amer *et al.*, 2018). В Китае в период 2015-2019 гг. зарегистрирована устойчивость к ампициллину (100%), тетрациклину (100%), цефотаксиму (53%), хлорамфениколу (83%), гентамицину (50%), канамицину (80%), спиромицину (64%), триметоприм-сульфаметоксазолу (58%), налидиксовой кислоте (89%) (Xu *et al.*, 2019), амикацину (53%), азтреонаму, цефтазидиму, сульфафуразолу, левофлоксацину (94%), офлоксацину (93%), норфлоксацину (89%) и цефтриаксону (88%) (Li *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2018). Эти данные указывают на устойчивость АРЕС практически ко всем классам антибиотиков, кроме карбапенемов.

Применяемые в сельском хозяйстве антибиотики являются ветеринарными, но все они находятся в соответствующих группах с антибактериальными препаратами, предназначенными для лечения тяжелых инфекций у людей, в том числе классифицированных как противомикробные агенты III и II («важные» и «очень важные») и даже I категории («критически важные»), например, цефалоспорины. Исследование Boulianne M. et al., проведенное в Канаде, показало значительную связь между использованием цефтиофура с устойчивостью изолятов *E. coli* к другим бета-лактамам антибиотикам (Boulianne et al., 2016). Наиболее распространенным механизмом устойчивости к бета-лактамам у *E. coli* является продукция бета-лактамаз широкого и расширенного спектра, которые придают устойчивость к нескольким антибиотикам, включая цефалоспорины и монобактамы четвертого поколения. Koga V.L. et al., исследовав более 200 штаммов *E. coli* из куриных тушек, выявили большое количество БЛРС-продуцирующих изолятов (в основном СТХ-М фермент) (Koga et al., 2015). В Бразилии и Японии в геноме АРЕС с большой частотой обнаруживаются гены *bla*_{СТХ-М}, *bla*_{СТХ-М-1}, *bla*_{ТЕМ}, *bla*_{ТЕМ-1}, *bla*_{SHV}, *bla*_{ОХА}, *bla*_{СМУ} (Ozaki et al., 2017; Hoepers et al., 2018). В Китае встречаются редкие типы ферментов, такие как СТХ-М-19, ТЕМ-1В, SHV-2, СМУ-2, ОХА-30 (Li et al., 2015; Xu et al., 2019).

1.2.3. Зоонозный потенциал патогенных для птиц *E. coli*

АРЕС принадлежит к подгруппе *E. coli* ExРЕС, как UРЕС и NМЕС (Mellata, 2013). Многочисленные исследования показали, что АРЕС также являются потенциальным зоонозным патогеном пищевого происхождения (Mitchell et al., 2015; Najafi et al., 2019; Meena et al., 2020; Zhuge et al., 2020). Доказано, что АРЕС имеет генетическое сходство с человеческими ExРЕС (UРЕС и NМЕС) и, наоборот, ассоциированные с птицами плазмиды ColV (например, pАРЕС078-ColV, pАРЕС-02-ColV, pАРЕС-01, p1ColV5155), необходимые для адаптации бактерий в организме птицы присутствуют в изолятах ExРЕС человека. Сравнение филогенетических полиморфизмов 323 изолятов АРЕС и ExРЕС человека,

принадлежащих к сиквенс-типу ST95 выявило генетическое перекрытие (отсутствие четкой кластеризации) между АРЕС и человеческими ЕхРЕС, что указывает на наличие у определенных клонов ЕхРЕС потенциала вызывать инфекцию как у домашней птицы, так и у человека (Jorgensen *et al.*, 2019). В частности, плазмиды ColV, специфичные для АРЕС, присутствовали в изолятах ЕхРЕС человека и 10 генов вирулентности (*iucC*, *iucD*, *iutA*, *cvaA*, *etsA*, *hlyF*, *ompT*, *cvaB*, *cvaC* и *cvi*) были общими для данных групп. Другие исследования также показали общность генов вирулентности между АРЕС и изолятами ЕхРЕС человека. Гены вирулентности *iroN*, *traT*, *iucD*, *cvi/cva*, *ibeA*, *gimB*, *tia*, *neuC*, *kpsMTII*, *tsh*, *iss*, *sitD*, *chuA*, *fyuA*, *irp2*, *vat*, *malX* и *pic* присутствовали в АРЕС, UРЕС и NМЕС изолятах (Ewers *et al.*, 2007). Скрининг генов у 27 изолятов АРЕС позволил обнаружить различные гены вирулентности (*pap*, *sfa*, *usp*, *cnf1*, *kpsMTII*, *hlyA* и *ibeA*), более характерные для UРЕС и NМЕС (Cunha *et al.*, 2017). Детерминанты, связанные с UРЕС (рост в моче человека, *iha*, *foc*, *cnf*, *papC*, *papGII*, *iroN*, *iutA*, *kpsMTII*, *cvaC*, *hlyF*, *vat*, *malX*, *usp*) и NМЕС (*kpsMTK1* и *ibeA*), присутствовали в изолятах ЕхРЕС из образцов, взятых от цыплят (Meena *et al.*, 2020). Наличие общих черт вирулентности между АРЕС и ЕхРЕС человека может служить доказательством зоонозных угроз, исходящих от АРЕС.

1.3. Конъюгативный перенос генов

У бактерий приобретение устойчивости к стрессовым факторам происходит постоянно и обусловлено мутациями в геноме или переносом генетического материала между клетками с помощью различных механизмов. Горизонтальная передача генов реализуется через такие каналы генетической коммуникации как конъюгация, трансформация и трансдукция. Эти процессы отличаются друг от друга способом транспортировки дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Самым распространенным вариантом изменения генома при горизонтальном переносе является конъюгация, когда происходит однонаправленная передача плазмиды из клетки-донора в клетку-реципиента при их непосредственном физическом контакте (Guglielmini *et al.*, 2011).

Явление конъюгации у прокариот было открыто Lederberg J. и Tatum E. в 1946 г. Было доказано, что принадлежность клеток к донорам и реципиентам определяется наличием в них внехромосомного фактора фертильности, позже названного F-фактором. Установлено, что конъюгативные плазмиды содержат *tra*-опероны (от англ. transfer), ответственные за перенос генетического материала. Плазмиды определяют многие свойства бактериальной клетки, такие как резистентность к антибиотикам, бактериофагам, катионам тяжелых металлов, синтез собственных антибиотиков и бактериоцинов, синтез тиамина, пролина, способность к фиксации азота, а также являются факторами фертильности, т.е. определяют донорский фенотип клетки.

Многokратно была подтверждена способность бактерий передавать гены резистентности к различным антибиотикам при горизонтальном переносе (Leungtongkam *et al.*, 2018; Bello-López *et al.*, 2019). Результаты экспериментов на диких штаммах *E. coli*, продуцирующих БЛРС, показали, что устойчивость к ампициллину и цефалотину передается с эффективностью 100% (Li *et al.*, 2019). Был продемонстрирован перенос генов устойчивости к ванкомицину, триметоприму, тетрациклину и эритромицину от донора к клетке-реципиенту для бактерий *E. faecalis* (McCarton *et al.*, 2019). Биомедицинские инженеры из Университета Дьюка продемонстрировали, что по крайней мере 25% устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий, обнаруженных в клинических условиях, способны распространять свою устойчивость на другие бактериальные виды посредством горизонтального переноса (Bethke *et al.*, 2020). Доказана также возможность переноса генов резистентности к антибиотикам между разными видами бактерий. Плазида pKP3-A, содержащая *qnrS1*, была успешно перенесена из *E. coli* в клетки *Salmonella* spp., а плазмиду, содержащую *qnrS1* и *bla_{CTX-M-15}*, переносили из клеток *Shigella* spp. в клетки *Salmonella* spp. (Ragupathi *et al.*, 2019). Nonaka L. *et al.* исследовали конъюгативный перенос плазмиды множественной лекарственной устойчивости (pSEA1) между *E. coli* и *Vibrio ponticus*. Полногеномное секвенирование трансконъюгантов и последующий молекулярно-генетический анализ выявили двухэтапный механизм, лежащий в

основе межвидового переноса pSEA1, когда во время конъюгации pSEA1, Tn6283 на плазмиде сначала переносится в геном реципиента, и, следовательно, pSEA1 может быть интегрирована в геном через гомологичную рекомбинацию последовательностей Tn6283 между геномом реципиента и pSEA1 (Nanoka *et al.*, 2018). Крупное исследование методом полногеномного секвенирования показало, что вспышки инфекций, вызванные продуцентами БЛРС, могут быть опосредованы трансмиссивными генетическими элементами, перемещающимися между видами бактерий. Несколько из первых задокументированных случаев плазмид-опосредованных вспышек произошли между 2007 и 2013 гг., когда плазмиды, кодирующие *bla*_{KPC}, передались от *K. pneumoniae* по крайней мере пяти другим видам в трех отдельных больницах (Mathers *et al.*, 2011; Tofteland *et al.*, 2013; Conlan *et al.*, 2014). Устойчивый к ванкомицину *S. aureus* (VRSA) произошел от метицилин-резистентного *S. aureus* (MRSA) в результате приобретения плазмиды от *E. faecalis* (Gardete, Tomasz, 2014). Это событие представляет собой ключевой пример того, как горизонтальный перенос концентрирует гены устойчивости в геномах, способствуя появлению так называемых «супербактерий», для которых отсутствуют эффективные антибиотики.

Сегодня известно, что большинство бактериальных клеток в природных условиях существуют не в планктонной форме, а в виде биопленок (Stalder, Top, 2016). Рассматривая микробные биопленки, нужно отметить, что внутри новой среды обитания между бактериями возникают определенные взаимоотношения. Явление передачи информации от клетки к клетке с использованием системы, которая приводит к индукции специализированных наборов генов, способствует быстрой адаптации популяций бактерий к меняющимся условиям среды и их выживанию в природных условиях, получило название «Quorum sensing». Quorum sensing регулирует способность микроорганизмов изменять фенотип, особенно это важно для патогенных бактерий. Так же чувством кворума регулируется переход некоторых клеток в планктонную форму, плотность их на данной территории, отделение целого кластера для расселения. Ghigo J.M. обнаружил,

что все исследованные конъюгативные плазмиды способствуют развитию биопленок, обеспечивая адгезионные свойства клеточной поверхности (Ghigo, 2001). Эти результаты были поддержаны Reisner A. et al., которые продемонстрировали, что образование биопленок было наиболее характерным для природных изолятов *E. coli*, несущих конъюгативные плазмиды (Reisner et al., 2006). Молекулярно-генетические исследования показали, что конъюгативная плазида pCF10 *E. faecalis* кодирует три закрепленных за клеточной стенкой белка (PrgA, PrgB и PrgC), которые способствуют межклеточной адгезии на ранней стадии образования биопленок (Bhatty et al., 2015), а плазида *K. pneumoniae* pOLA52 несет гены, кодирующие фимбрии типа III, которые участвуют в прикреплении клеток к поверхностям (Burmolle et al., 2008).

1.3.1. Плазмиды как внехромосомные элементы

Плазмиды представляют собой внехромосомные генетические элементы, способные к автономной репликации в цитоплазме и интеграции в бактериальную хромосому. Плазмиды – это двунитевые молекулы ДНК размерами 1-600 мегадальтон, которые имеют различную конформацию: двуцепочечная кольцевая молекула, сверхспирализованная кольцевая молекула, линейная молекула и другие формы, они обнаруживаются у многих представителей доменов Bacteria, Archaea и Eukayota (Clark et al., 2019).

Существует много классификаций плазмид, базирующихся на: топологии (линейные или кольцевые), механизмах репликации, маркерных генах, содержащихся в плазидах (устойчивость к антибиотикам, гены биодegradации ксенобиотиков, системы рестрикции-модификации, гены синтеза бактериоцинов и др.; или полному отсутствию таких свойств – криптические плазмиды), круге хозяев (узкий/широкий), копийности (однокопийные плазмиды – одна плазида данного вида на клетку, мультикопийные – две и более плазмиды данного вида на клетку), совместимости, способности к переносу в другие клетки.

Диапазон хозяев плазмид варьирует. Некоторые плазмиды ограничены несколькими близкородственными видами бактерий, например, F-плазмиды

характерны только для *E. coli* и родов *Salmonella* и *Shigella*. Другие имеют широкий круг хозяев, например, Р-плазмиды, изначально описанные для рода *Pseudomonas*, встречаются почти во всех клинически значимых видах бактерий, поскольку несут гены, кодирующие устойчивость к ряду антибиотиков, включая пенициллины (Clark *et al.*, 2019).

В зависимости от свойств, приобретаемых клеткой в результате получения плазмиды, последние разделяют на множество классов (Wang *et al.*, 2009). Самыми распространенными являются:

- 1) F-плазмиды (от англ. fertility – плодовитость; определяют донорную клетку, индуцируют деление, несут гены синтеза F-пилей),
- 2) R-плазмиды (от англ. resistance – устойчивость; определяют устойчивость клетки к антибиотикам, бактериоцинам и др.),
- 3) Col-плазмиды (от англ. colicinogeny – колициногенность; несут гены синтеза колицинов),
- 4) Hly-плазмиды (от англ. hemolysin – гемолизин; несут гены синтеза гемолизинов),
- 5) Ent-плазмиды (от англ. enterotoxin – энтеротоксин; несут гены синтеза энтеротоксинов),
- 6) Tox-плазмиды (от англ. toxin – токсин; несут гены синтеза токсинов).

В основу классификации плазмид с 1970-х гг. положено такое уникальное генетическое свойство как несовместимость (от англ. incompatibility) – неспособность родственных плазмид стабильно сосуществовать в одной клетке. Inc-плазмиды были независимо классифицированы у трех различных таксонов микроорганизмов: в составе Enterobacteriaceae имеется 27 Inc групп, у *Pseudomonas* – 14 Inc групп, у *Staphylococcus* – приблизительно 18 (Sota, Tor, 2008).

Классификация плазмид по их совместимости:

- 1) Совместимые – совместимы с близкородственными и другими плазмидам,
- 2) Несовместимые или Inc-плазмиды – несовместимы с близкородственными, но совместимы с другими плазмидами.

Согласно современной классификации, существует пять типов плазмид на основе секреторной системы типа IV (T4SS), участвующей в образовании пар спаривания (MPF) в процессе конъюгирования (Smillie *et al.*, 2010):

- 1) Непропускаемые (неконъюгативные) плазмиды, которые не кодируют релаксазу («non-mob»),
- 2) Плазмиды, которые не содержат релаксазы, но содержат связывающий белок типа IV (T4CP), белок АТФазы VirB4 и MPF или любые два из этих трех элементов («non-mob», «export protein»),
- 3) Мобилизуемые плазмиды, которые содержат ген релаксазы, но не содержат VirB4 и MPF («mob»),
- 4) Конъюгативные плазмиды, которые содержат известный тип T4SS (MPFF, MPFT, MPFI или MPFG), а также релаксазу и T4CP («determined conjugative»),
- 5) Конъюгативные плазмиды, которые содержат гены релаксазы, T4CP и VirB4, но T4SS которых не принадлежит конкретному MPF («undetermined conjugative»). Конъюгативные плазмиды грамотрицательных бактерий обычно имеют полные наборы генов, необходимых для переноса: точки начала переноса (*oriT*), белка релаксазы, связывающего белка типа IV (T4CP) и секреторной системы типа IV (T4SS). Smillie C. *et al.* сообщили, что около 14% полностью секвенированных плазмид являются конъюгативными (Smillie *et al.*, 2010).

Основной конъюгативной плазмидой для *E. coli* является F-фактор или фактор фертильности. F-плазида представляет собой кольцевую молекулу ДНК, размером 100 Кб (рис. 1).

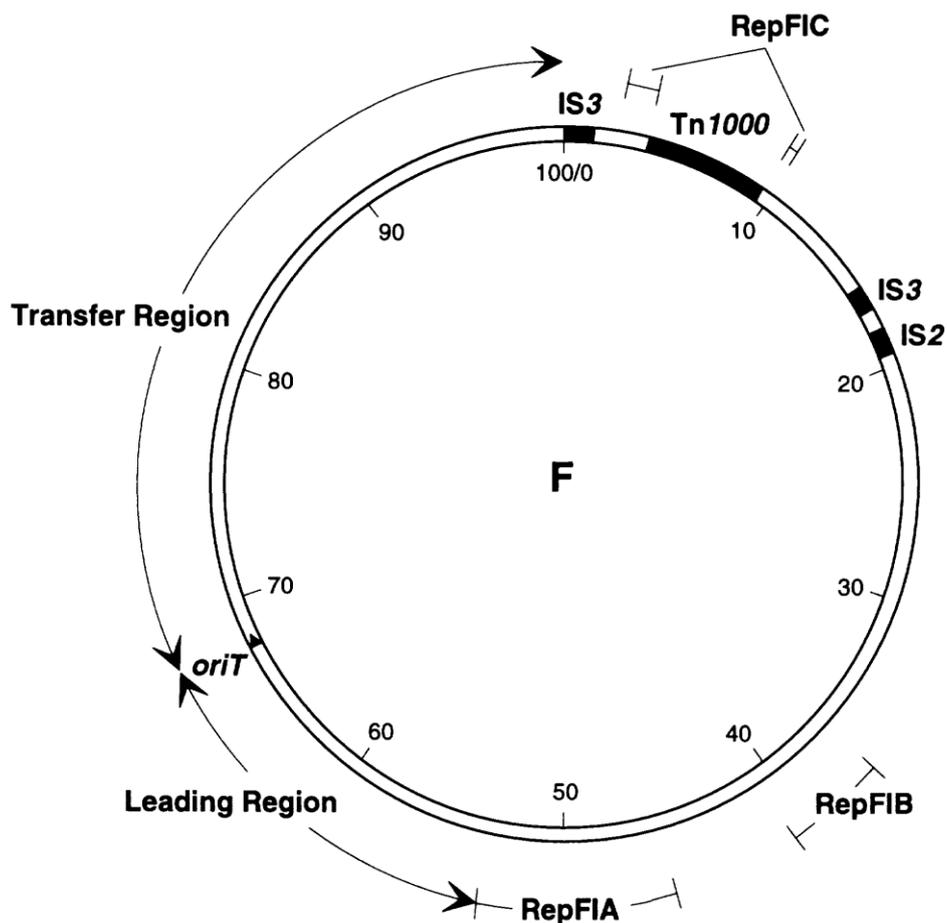


Рисунок 1. Структура фактора фертильности *E. coli* (Firth *et al.*, 1996).

Последовательность нуклеотидов, расположенная между точкой начала репликации *oriT* и репликоном RepFIA, называется лидерной областью, так как является местом, первым вступающим в контакт с клеткой реципиента. Область RepFIA ответственна за типичные репликационные процессы, она содержит однонаправленную (*oriS*) и двунаправленную (*oriV*) точки начала репликации. Участок RepFIB независимо функциональный и может поддерживать репликацию плазмиды без RepFIA. Область RepFIC содержит фрагменты репликационных систем родственных плазмид. Последовательность нуклеотидов F-плазмиды включает инсерционные элементы: одну копию транспозона Tn1000, а также последовательности IS2 (одна копия) и IS3 (две копии). Транспозон Tn1000 включен в участок RepFIC. Последовательности IS2 и IS3 служат специфическими сайтами для интеграции плазмиды в хромосому клетки.

Последовательность между *oriT* и IS3 (по направлению противоположному RepFIA) называется передающим участком, так как обеспечивает эффективную конъюгативную передачу. В составе плазмиды имеется *tra*-оперон, включающий гены, обеспечивающие синтез и сборку функциональных F-пилей. Гены *traG* и *traN* необходимы для стабилизации аппарата спаривания (Arutyunov, Frost, 2013).

В зависимости от наличия плазмиды клетки разделяют на клетки-доноры, содержащие плазмиду, и клетки-реципиенты, не содержащие плазмиду данного типа. Клетки-доноры в свою очередь делятся на F⁺, Hfr и F'. Эта классификация основана на положении F-фактора в клетке (Traxler, 2013). В случае F⁺-клеток плазида находится в свободном состоянии. При скрещивании с клетками F⁻ фактор фертильности реплицируется и передается независимо от репликации хромосомы клетки. В данном случае достаточно небольшого числа F⁺-клеток, чтобы за короткий период все клетки в популяции стали донорами. В клетках Hfr F-фактор находится в интегрированном состоянии, т.е. связан с бактериальной хромосомой. Такой тип клеток образуется из-за наличия в плазмиде мобильных участков IS2 и IS3, которые гомологичны участкам хромосомы. По одному из мобильных участков IS2, IS3 или Tn1000 происходит случайное объединение F-фактора и хромосомы клетки, и путем кроссинговера плазида встраивается в последовательность бактериальной хромосомы. Название Hfr происходит от английского сочетания «high frequency of recombination» – высокая частота рекомбинации. Это объясняется тем, что данные клетки при скрещивании с реципиентами передают им гены с частотой в 1000 раз больше, чем F⁺-клетки. Особенностью конъюгации между Hfr и F⁻ является то, что F-фактор передается клеткам реципиентам крайне редко. Происходит это из-за того, что перенос начиная с точки *oriT*, идет в сторону противоположную включению F-фактора. Таким образом фактор фертильности передается в клетку-реципиент последним, поэтому высока вероятность, что к этому моменту уже будет разрушен конъюгативный мостик или нарушена целостность хромосомы. F'-клетки – это клетки, образованные от Hfr-штаммов путем спонтанного выхода F-фактора из хромосомы с захватом хромосомных маркеров. При конъюгации с F⁻ они

передают F-фактор с высокой частотой, но при этом также переносятся хромосомные маркеры, ставшие частью F-фактора, это явление получило название сексдукции. Клетки, получившие F-фактор от F', становятся донорами, но они способны передавать реципиентам не только F-фактор и свои хромосомные гены, но и гены, полученные от F'-клеток. Таким образом, они обладают свойствами F⁺ и Hfr и получили название промежуточных доноров.

Была выявлена способность мобильных генетических элементов (интегрирующие конъюгативные и мобилизуемые элементы – ICE и IME соответственно, геномные острова) активировать неконъюгативные плазмиды, создавая новые механизмы для горизонтального переноса генов резистентности (Nguyen, Vedantam, 2011). Это явление получило название мобилизация. В одной из плазмид *Psychrobacter maritimus* обнаружен элемент ISPrp1, обладающий способностью мобилизовать прилежащие к нему гены резистентности к стрептомицину и тетрациклину, и перемещать их в другие плазмиды за счет механизма одноконцевой транспозиции (Петрова, 2012).

1.3.2. Механизм конъюгации у бактерий

Под конъюгацией (от лат. conjugatio – соединение) понимается прямой перенос молекулы ДНК из клетки-донора в клетку-реципиента посредством плазмид. У бактерий принято выделять 6 этапов конъюгативного переноса (Ленгерлер и др., 2005).

Этап 1. Образование и стабилизация межклеточного контакта с участием конъюгативных (половых) пилей (рис. 2, а). Для процесса конъюгации необходим непосредственный контакт клеток, который обеспечивается специальными поверхностными структурами – половыми пиями. Половые пили – это волосовидные выросты на поверхности бактериальной клетки, белки которых закодированы в конъюгативных плаزمидах (Arutyunov, Frost, 2013). Морфология пилей напрямую зависит от среды, в которой может происходить конъюгация. Первичный контакт клеток образуется между кончиком пия и рецепторным сайтом клетки-реципиента, но такая связь является очень нестабильной и быстро

разрушается, поэтому для стабилизации межклеточного взаимодействия происходит частичная деполимеризация пили. Явление поверхностного исключения (исключение проникновения), которое выражается в способности многих плазмид резко снижать возможность клеток выступать реципиентами при конъюгации с клетками, несущими близкородственные плазмиды, может препятствовать образованию плотного контакта (Shintani *et al.*, 2015).

Этап 2. Сайт-специфическое разрезание в точке *oriT* одной из цепей ДНК, предназначенной для переноса, инициирует начало транспортировки плазмиды в клетку.

Этап 3. Сборка релаксосомы для инициации конъюгативного переноса ДНК. Релаксосомы – это специализированные нуклеопротеиновые комплексы, состоящие из сверхспирализованной плазмидной ДНК и компонентов релаксазы, специфично связанных с областью начала переноса, необходимые для разрезания и соединения цепей ДНК. Для конъюгативного переноса белок TraI, обладающий релаксазной активностью, производит разрезание цепи специфично для сайта *oriT*. Предполагается, что белок TraI необходим также для инициации транслокации ДНК от донора к реципиенту. Релаксосомы IncP находятся в плазмидсодержащих клетках независимо от наличия реципиентных клеток в среде. Считается, что образование контакта между клетками приводит к формированию и передаче условного сигнала, который вызывает необратимое разрезание в локусе *oriT* и синтез ДНК с последующим ее переносом. Разрезание цепи ДНК приводит к образованию свободного 3'-конца, на котором начинается элонгация.

Этап 4. Рециркуляризация цепей ДНК. После элонгации на 3'-конце начинается замещающий синтез. При этом 5'-конец переносится через канал в мембране, образованный MPF-системой. Релаксаза, присоединенная к 5'-концу, взаимодействует с MPF-системой посредством белков TraG и TraD, которые разделяют цепи и обеспечивают перемещение ДНК в клетку реципиента (рис. 2, б).

Этап 5. Синтез комплементарной цепи в клетке реципиента. При передаче плазмиды транспортируется белок TraC1, катализирующий прерывистый синтез

комплементарной цепи ДНК в клетке реципиента. Однако в большинстве случаев межвидовой и внутривидовой конъюгации наличие гена *traC1* не требуется, так как в клетке присутствуют SSB-белки. Известно, что для сборки праймосомы, участвующей в синтезе отстающей цепи ДНК, необходим сайт *pas*, узнаваемый генами *priA* клетки-хозяина. Интересно, что среди первых 130 нуклеотидов лидирующего региона у F-плазмиды отсутствуют как промотор, так и сайт *pas*. Таким образом, локализация локусов инициации синтеза комплементарной цепи ДНК пока остается неясной.

Этап 6. Терминация переноса ДНК и разделение конъюгирующих клеток (рис. 2, в). Предполагается, что терминация представляет собой вторичное разрезание цепи ДНК в месте уже регенерированного разреза, приводящее к её рециркуляризации.

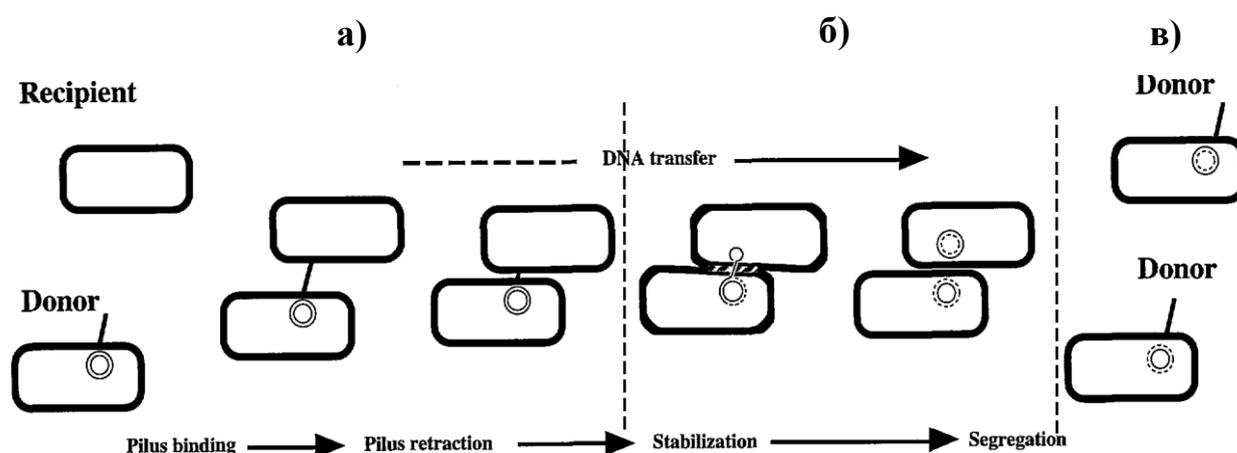


Рисунок 2. Общая схема конъюгативного переноса у бактерий: установление контакта между клетками посредством пилей (а), перенос цепи ДНК из F⁺ в F⁻ и синтез комплементарной цепи (б), разделение клеток после завершения процесса конъюгации (в) (Firth *et al.*, 1996).

Основной показатель конъюгативного переноса – частота конъюгации, который обычно рассчитывается как отношение числа трансконъюгантов к числу реципиентов (1) (Guglielmini *et al.*, 2011):

$$v = T/R \quad (1).$$

Однако в некоторых источниках пересчет ведется на клетку донора (2) (Гигани, 2012) или общее число клеток (3) (Селянская и др., 2014):

$$v=T/D \text{ (2);}$$

$$v=T/(D+R+T) \text{ (3).}$$

1.3.3. Регуляция процесса конъюгации у бактерий

Способность донорского штамма к конъюгации зависит от экспрессии генов переноса, сгруппированных в *tra*-локусе плазмиды. Гены-переносчики кодируют все белковые факторы, участвующие в образовании конъюгативного пилуса и T4SS, необходимых для образования пары для спаривания, а также компоненты релаксосомы, необходимые для обработки плазмиды перед переносом. Экспрессия *tra*-генов регулируется несколькими факторами, включая этап клеточного цикла и условия окружающей среды. Большинство *tra*-генов собраны в одном опероне под контроль промотора P_Y, в то время как гены *traJ* и *traM* расположены выше и контролируются независимыми промоторами (Irpen-Ihler *et al.*, 1972). Экспрессия генов переноса идет по определенному каскаду регуляции, начинающегося с производства белка TraJ, который активирует промотор P_Y и транскрипцию *tra*-оперона. Первый транскрибируемый ген, *traY*, кодирует белок-регулятор TraY, который активирует промотор P_M, что приводит к образованию релаксосомы (Penfold *et al.*, 1996). Интересно, что *tra*-гены обычно находятся в клетке в репрессированном состоянии (Koraimann, Wagner, 2014). В большинстве F-подобных плазмид (R100, R1, R6-5 и ColB2-K77) экспрессия *traJ* репрессируется на посттранскрипционном уровне система ингибирования фертильности FinOP. FinP – это антисмысловая РНК, комплементарная к структурам стебель-петля мРНК TraJ. Связывание FinP скрывает сайт связывания рибосомы и предотвращает синтез TraJ. FinO – это шаперон РНК, который защищает FinP от деградации РНКазой E и стабилизирует образование дуплекса мРНК FinP-*traJ* (Virolle *et al.*, 2020). Кроме того, экспрессия гена *tra* также регулируется факторами клетки. Один из типов регуляций включает подавление промоторов P_Y, P_M и P_J с помощью гистоноподобного нуклеоид-связывающего

белка (H-NS) (Will, Frost, 2006). Число копий H-NS на клетку меняется во время роста, то есть скорость переноса F-плазмиды зависит от фазы роста: максимальная в экспоненциальной фазе, сниженная в среднеэкспоненциальной фазе и в почти исчезает в стационарной фазе (Headd, Bradford, 2020). Однако во время экспоненциальной фазы репрессивной активности H-NS противодействует кооперативному связыванию TraJ и белка ArcA (контроль аэробного дыхания или контроль окислительно-восстановительного потенциала) с промотором P_Y (Lu *et al.*, 2019).

Для некоторых грамотрицательных бактерий экспрессия гена *tra* регулируется механизмами Quorum Sensing (QS). Наиболее изученный пример такой регуляции – конъюгативная плазида, индуцирующая опухоль у растений (pTi), которая позволяет бактериям рода *Agrobacterium* инфицировать и распространяться среди растений-хозяев. При высокой плотности клеток агробактерии продуцирует молекулы агроцинопина, которые активируют различные опероны, в том числе оперон, кодирующий TraR, LuxR-подобный белок. Привязка TraR к молекуле QS 3-оксооктаноилгомосеринлактона (OOHL) запускает транскрипцию *trb* и оперона *tra*, приводящую к продукции белков T4SS и релаксасом. В стационарной фазе или во время углеродного и азотного голодания, связанного с гибелью растения-хозяина, сигнал QS в виде молекулы лактоназы индуцирует образование VlcC, что приводит к деградации молекул OOHL. *P. aeruginosa* использует QS в качестве защитного механизма против межвидовой конъюгации за счет продукции молекулы N-ацилгомосеринлактона (АГЛ), который участвует в регуляции таких механизмов, как вирулентность, образование биопленок и метаболизм в популяции псевдомонад. АГЛ-аутоиндукторы, продуцируемые *P. aeruginosa*, могут связываться с LuxR-подобным транскрипционным фактором SdiA *E. coli*, который затем подавляет экспрессию гена *traI* и предотвращает конъюгацию плазмиды широкого диапазона хозяев RP4, которая интегрирована в хромосому *E. coli*.

Динамика конъюгации зависит от образования и размножения нового потомства клеток – трансконъюгантов, и в основном регулируется двумя

кинетическими процессами: скоростью переноса гена (называемой эффективностью конъюгации) и относительной скоростью роста трансконъюгантов (называемой динамикой роста). Как эффективность конъюгации, так и динамика роста могут зависеть от множества внешних и внутренних факторов. Например, физиологическое состояние клетки может изменить эффективность конъюгации определенных плазмид на порядки. Эксперименты на разных штаммах доказывают, что клетки экспоненциальной фазы роста имели значение частоты переноса почти на четыре порядка больше, чем клетки стационарной фазы (Lopatkin *et al.*, 2017). Динамика роста, в свою очередь, сильно зависит как от функциональной пользы, так и от метаболической нагрузки данной плазмиды. В экспериментах трансконъюганты *de novo* росли значительно медленнее или с продолжительным временем задержки по сравнению с линиями, которые реплицировались в течение нескольких поколений, что указывает на наличие затрат на приобретение плазмиды. Эти эффекты были общими для плазмид различных групп несовместимости, штаммов и видов грамотрицательных реципиентов, а также условий экспериментов (Prensky *et al.*, 2021). Исследования показали, что энергозатраты на сохранность плазмид могут изменять структуру и динамику популяции; например, дорогостоящие с энергетической точки зрения плазмиды могут быть вытеснены из популяции или компенсированы мутациями, которые уменьшают метаболическую нагрузку, продлевая со временем устойчивость плазмиды (Harrison *et al.*, 2015; Loftie-Eaton *et al.*, 2017). Помимо затрат на приспособленность, получение плазмиды посредством конъюгации требует немедленной физиологической адаптации (San Millan *et al.*, 2018) и, следовательно, также влияет на клеточный метаболизм. Например, было показано, что кодируемые плазмидой гены ответа на стресс временно экспрессируются в хозяине в течение 20-40 мин после приобретения плазмиды (Baharoglu *et al.*, 2010). Несмотря на «высокую стоимость», конъюгация, по всей видимости, является настолько важным адаптивным фактором, что бактерии не способны избегать участия в этом процессе. Команда Moriguchi К. пытались идентифицировать мутанты *E. coli*, у которых бы наблюдался дефект

конъюгации, тем не менее, по результатам полногеномного секвенирования не было выделено никаких мутантов, дефектных при конъюгативном переносе (Moriguchi *et al.*, 2020).

В заключении данной главы, следует еще раз подчеркнуть, что большая часть исследований по конъюгативному переносу генов проведена с использованием референтных штаммов эшерихий с ограниченным набором и выраженностью биологических свойств. Условия окружающей среды и большинство *in vivo* ситуаций, включая биотопы человека, диктуют разнообразие экспериментальных моделей, но ни в одном из приведенных выше исследований не были использованы одновременно различные модельные системы (в том числе разноплановые модели биопленок). Кроме того, для *E. coli* более характерно функционирование в качестве составной части полимикробного сообщества, но исследований конъюгативного переноса генов в присутствии клеток бактерий других видов или их экзометаболитов не проводилось. Отсутствие комплексного подхода, позволяющего провести адекватную оценку влияния ряда свойств реципиента и факторов окружающей среды на процесс конъюгации, послужило поводом для начала исследований. Изучение конъюгативного переноса в высокогетерогенной популяции внекишечной *E. coli* в различных модельных системах позволит более широко взглянуть на механизмы внутривидового взаимодействия, а также оценить риск распространения устойчивых к различным антропогенным факторам и условиям внешней среды штаммов *E. coli*, выступающих в качестве резервуара плазмидных генов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования явились штаммы *E. coli* различного происхождения. Уропатогенные *E. coli* (n=198) были выделены от пациентов медицинских учреждений г. Перми с инфекциями мочевыводящих путей. Все клинические изоляты были идентифицированы согласно Приказу МЗ СССР №535 от 22.04.1985 г. в бактериологических лабораториях. Штаммы патогенных для птиц *E. coli* (n=50) были выделены от вынужденно убитой птицы с признаками колибактериоза на крупных птицефабриках Пермского края. Также в работе были использованы референс-штаммы: уропатогенный штамм *E. coli* DL82 Amp^R, депонированный в коллекции университета Любляны (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). Все вышеуказанные штаммы *E. coli* использовались в качестве реципиентов (R).

В качестве донора (D) плазмидной ДНК был использован рекомбинантный штамм *E. coli* N4i pOX38 Gen^RCm^R (сконструирован на основе штамма *E. coli* Nissle 1917, модифицированный путем введения конъюгативной плазмиды pOX38 – производной F-плазмиды *E. coli* K12), полученный от профессора кафедры Молекулярной генетики и биологии микроорганизмов Биотехнологического факультета Люблянского Университета Starčič Erjavec M. (Словения) (Starčič Erjavec *et al.*, 2015).

Штаммы выращивали на богатой среде Лурия-Бертани (LB-среда, «Amresco», США) при 37 °С в статичном режиме. Контроль роста культуры осуществляли по измерению оптической плотности на планшетном ридере Tecan Infinite M1000 (Австрия) при длине волны 570 нм в единицах оптической плотности (ед. ОП).

2.2. Оценка бактериоциногении, лизогении, чувствительности к бактериоцинам

Скрининг на продукцию бактериоцинов штаммами проводили с помощью техники «двойного слоя» по методу «отсроченного антагонизма» (Budič *et al.*, 2011). Одиночные колонии каждого исследуемого штамма выращивали на агаризованной LB-среде 24 ч. Выросшую культуру обрабатывали парами хлороформа в течение 15 мин, после чего оставляли чашки открытыми при комнатной температуре в вытяжном шкафу для испарения остатков хлороформа (10 мин). В растопленный 0,6% агар (46 °С) вносили предварительно выращенную 24-часовую суспензию чувствительного штамма *E. coli* DH5α (2,0 по МакФарленду), перемешивали и наслаивали на подготовленную чашку с колониями. После застывания агара чашки термостатировали 24 ч, затем визуально оценивали. Колициногенными считали культуры, имеющие зоны ингибирования роста от 1 мм. Параллельно готовили чашки с отрицательным (без культур) и положительным контролем (штамм *E. coli* N4i pOX38a, продуцирующий колицин E7).

Скрининг культур на чувствительность к бактериоцинам проводили вышеописанным методом с использованием коллекции индикаторных штаммов-продуцентов бактериоцинов и микроцинов (BZB, Университет Любляны, Словения). Оценивалось действие колицинов групп А и В, а также микроцинов классов I и II.

Наличие бактериофага в клетках UPEC определяли с помощью метода индукции УФ-излучением. Жидкую культуру изучаемого штамма (2,0 по МакФарленду) выдерживали под УФ в течение 70 сек, после чего инкубировали 1 ч при 37 °С. Суспензию смешивали с культурой чувствительного штамма *E. coli* DH5α и добавляли в растопленный 0,6% агар (46 °С), перемешивали и наслаивали на заранее подготовленные чашки с агаризованной LB-средой. Инкубировали 24 ч при 37 °С. Фиксировали наличие зон лизиса чувствительного штамма. Параллельно готовили чашки с отрицательным (без культур) контролем.

2.3. Определение уровней неспецифической и специфической адгезии

Определение уровня неспецифической адгезии проводили в стеклянных пенициллиновых флаконах (гидрофильная поверхность) и в полистироловых 96-ти луночных плоскодонных планшетах («Медполимер», Россия) (гидрофобная поверхность). согласно Николаеву Ю.А. (Николаев, 2000). Бактериальные клетки осаждали при 8000 об/мин, дважды промывали в фосфатном буфере, стандартизовали до 0,150-0,200 ед. ОП и вносили 3,0 мл во флаконы и 200 мкл в лунки микропланшета. Флаконы и иммунологические планшеты помещали в термостат при 37 °С с перемешиванием 150 об/мин. Под величиной адгезии понимали количество клеток, прилипших на стенки флакона/планшета, выраженное в % от их исходного количества. Показатель адгезии (А) рассчитывали по формуле (4):

$$A=(ОП_{НАЧ}-ОП_{ЭКС})/ОП_{НАЧ}*100 \text{ (4)},$$

где ОП_{НАЧ} и ОП_{ЭКС} – оптическая плотность (ОП₅₄₀) в момент засева и через 1 ч, соответственно.

Уровень специфической адгезии бактерий к эритроцитам человека (А0+) и куриц определяли по методу Брилиса В.И. с соавт. (Брилис и др., 1986). Эритроциты отмывали фосфатным буфером, затем разводили до концентрации 10E+08 эритроцитов в мл. Бактериальную суспензии (2,0 по МакФарленду) смешивали с эритроцитарной массой в соотношении 1:1 и инкубировали при 37 °С с перемешиванием 120 об/мин в течение 30 мин. Готовили препарат для микроскопии: клетки фиксировали в метаноле, затем окрашивали метиленовым синим (2%). Адгезивную активность бактерий оценивали с помощью индекса адгезии микроорганизма (ИАМ), который рассчитывали по формуле (5):

$$ИАМ=(СПА/КА)*100\% \text{ (5)},$$

где СПА – средний показатель адгезии (среднее число клеток, прикрепившихся к одному эритроциту, не менее 25 эритроцитов), КА – коэффициент адгезии (процент эритроцитов, имеющих на своей поверхности бактерий).

2.4. Оценка биоупленкообразования

Жидкие культуры *E. coli* (2,0 по МакФарленду) разводили 100-кратно в среде LB, в лунки плоскодонного 96-луночного полистиролового планшета («Медполимер», Россия) вносили 200 мкл суспензии для оценки массивности однокомпонентной биоупленки и 160 мкл суспензии штамма-реципиента и 40 мкл штамма-донора для оценки биомассы двухкомпонентной биоупленки. Оценивали биомассу, согласно Merritt J.H. et al. (Merritt et al., 2005). Сформированные биоупленки трехкратно отмывали физиологическим раствором (0,89%), окрашивали 0,1% генциановым фиолетовым в течение 30 мин, дважды промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе, затем проводили экстракцию связавшегося с биоупленками красителя этанолом (96%). Измеряли оптическую плотность спиртовых растворов на планшетном ридере Tecan Infinite M1000 (Австрия) при длине волны 570 нм в ед. ОП.

В эксперименте с урологическими катетерами биомассу оценивали аналогично вышеописанному. Биоупленки формировали в плоскодонных 24-луночных полистироловых планшетах («Медполимер», Россия), в общем объеме 1000 мкл, для двухкомпонентных биоупленок использовали соотношение 800 мкл суспензии штамма-реципиента и 200 мкл штамма-донора. Биомассу биоупленок на катетерах сравнивали с учетом площади поверхности (в пересчете на 1 см²).

2.5. Окраска полисахаридного каркаса матрикса биоупленок

Для оценки массивности полимерного матрикса биоупленки, выращивали в лунках черного непрозрачного планшета («Nunc», Дания) в общем объеме 100 мкл (для двухкомпонентных биоупленок смешивали 80 мкл суспензии реципиента и 20 мкл суспензии донора), после чего окрашивали 100 мкл водного раствора копА-тетраметилродамина (500 мкг/мл) в течение 40 мин в темноте, удаляли краситель, отмывали биоупленку 1 раз 100 мкл 0,89% NaCl. В качестве контроля краситель вносили в пустую лунку, удаляли и отмывали, как описано выше. Массивность полимерного матрикса оценивали по интенсивности

флюоресценции на планшетном ридере Infinite M1000 pro («ТЕСАН», Швейцария) при λ возбуждения/испускания 555/580 нм (Зорина и др., 2019).

2.6. Определение чувствительности к антибиотикам

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

Определяли устойчивость к цефалоспорином (цефотаксим, цефтазидим, цефуроксим), карбапенемам (меропенем), фторхинолонам (ципрофлоксацин, левофлоксацин), аминогликозидам (амикацин), сульфаниламидам (триметоприм-сульфаметоксазол), нитрофуранам (фурадонин), производным фосфоновой кислоты (фосфомицину).

2.7. Характеристика антибактериальной системы «kill»-«anti-kill»

На кафедре биотехнологии Университета Любляны на основе штамма Nissle 1917 был создан генномодифицированный штамм *E. coli* ŽP (киллерный донор) путем введения *colE7*-гена на конъюгативную плазмиду pOX38a – производную F-плазмиды (Starčič Erjavec *et al.*, 2015). В целях защиты Nissle 1917 от летального действия ДНКазы ColE7 в его хромосому вставлен *immE7*-ген. Была выдвинута гипотеза: плазида pOX38a переносит *colE7* в клетку реципиента, где начинается его немедленная транскрипция и синтез бактериоцина, который «убивает» получателя. В качестве контроля конъюгативного переноса использовали штамм *E. coli* N4i без *colE7* на pOX38 (контрольный донор) (рис. 3).

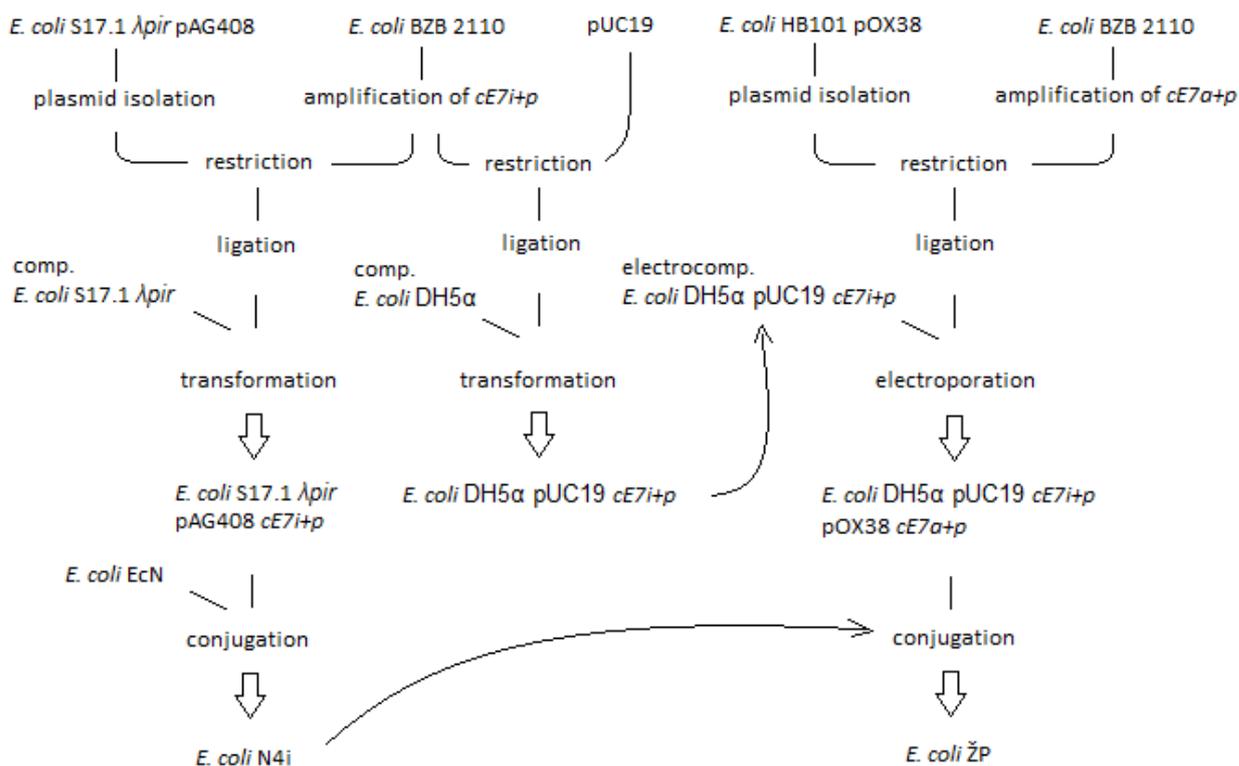


Рисунок 3. Конструирование «kill»-«anti-kill» конъюгативной системы на основе колицина ColE7 (Starčič Erjavec *et al.*, 2015).

Производство колицина ColE7 вновь сконструированным штаммом *E. coli* ŽP было доказано с помощью чувствительного штамма *E. coli* DH5α (Budič *et al.*, 2011). Потери или перестроек плазмиды, влияющих на экспрессию бактериоцина, не наблюдалось.

Для подтверждения работы созданной системы авторами были выбраны несколько современных методов (Maslennikova *et al.*, 2018). С помощью ПЦР в реальном времени доказана экспрессии гена *traJ*, кодирующего основной положительный регулятор конъюгации F-плазмид, белка TraJ в течение 2-24 ч.

Метод проточной цитометрии позволяет дифференцировать живые и мертвые бактерии по окрашиванию флуоресцентными красителями, Syto 9 (зеленый цвет/бактерии с неповрежденными мембранами) и пропидиум йодид (PI) (красный цвет/бактерии с поврежденными мембранами) соответственно. В конъюгативной смеси со штаммом-киллером было меньше поврежденных клеток вследствие их быстрого лизиса, чем в смеси с контрольным донорным штаммом.

В последующих исследованиях, показано, что билюминесценция *E. coli* K-12 TG1 (pXen lux⁺ Amp^R) (lux оперон *Photorhabdus*) уменьшалась в конъюгативной смеси со штаммом-киллером на протяжении всего эксперимента и, особенно после 24 ч, и была ниже по сравнению с билюминесценцией *E. coli* K-12 TG1 (pXen lux⁺ Amp^R) *per se*, а также в конъюгативной смеси с контрольным донорным штаммом. Коэффициент корреляции между числом клеток реципиента и билюминесценцией составлял 0,54. Трансконъюганты не выявлены в смеси с донорским штаммом-киллером. Таким образом, билюминесцентные клетки-мишени позволили быстро и количественно оценить эффективность антимикробной конъюгативной системы ColE7. По результатам билюминесцентного анализа, клетки-мишени *E. coli* были убиты уже после 2 часов взаимодействия с антимикробной системой на основе бактериальной конъюгации ColE7.

Затем использовали штамм *E. coli* C600 с плазмидой pPLS-1, кодирующей lux гены *Photobacterium leiognathi* под контролем сильного промотора SOS. В ходе работы показано, что индукция lux генов *E. coli* C600 наблюдалась в смеси с контрольным донорным штаммом, где наблюдалась повышенная билюминесценция в течение 6-24 ч при сравнении с билюминесценцией *E. coli* C600 *per se*. В конъюгативных смесях *E. coli* C600 со штаммом-киллером после 6 ч и 24 ч инкубации была более низкая индукция SOS по сравнению с контрольным донором. Более низкая SOS-индукция происходила из-за лизиса реципиента *E. coli* вследствие ДНКазной активности ColE7. Число клеток реципиента в конъюгативной смеси со штаммом-киллером было ниже, чем у контрольного донорного штамма через 24 ч.

2.8. Эксперименты по конъюгативному переносу *in vitro*

2.8.1. Конъюгативный перенос в лунках полистиролового планшета

Конъюгативный перенос осуществляли в планктонной среде и биопленке в течение 6 и 24 ч при 37 °C в полистироловом планшете («Медполимер», Россия). Жидкие культуры *E. coli* (2,0 по МакФарленду) разводили 100-кратно в среде LB.

Для проведения конъюгации в течение 6 ч штаммы дополнительно инкубировали 2 ч при 37 °С. Конъюгативную смесь формировали из реципиента и донора в соотношении 4:1, вносили 200 мкл конъюгативной смеси в лунку. Инкубировали в течение 6 или 24 ч при 37 °С.

Планктонную культуру отбирали из лунок и десятикратно разводили в физиологическом растворе, после чего делали высевы на селективные агаризованные среды. Сформированные биопленки трехкратно отмывали стерильным физиологическим раствором, затем снова вносили физиологический раствор в лунки и 5 раз по 1 мин обрабатывали планшеты ультразвуком (37 кГц, «Elma 30S», Германия). Полученную суспензию бактерий разводили десятикратно и высевали на чашки с селективной агаризованной средой. Для оценки числа жизнеспособных клеток в планктоне и биопленке 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). Контролировали возможность переноса плазмиды от штаммов-реципиентов в штамм-донор, для этого дополнительно делали высевы на чашки с ампициллином (50 мкг/мл) и гентамицином (40 мкг/мл).

Частоту конъюгации оценивали как соотношение числа КОЕ трансконъюгантов и КОЕ реципиентов (6) (Guglielmetti *et al.*, 2009):

$$v=T/R \text{ (6).}$$

2.8.2. Конъюгативный перенос 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, силикон) («Apexmed International BV», Нидерланды). Потенциальную атакуемую площадь рассчитывали по формулам (7) для ПВХ, (8) для латекса и (9) для силикона и силикона с серебряным напылением, где R_1 – наружный радиус, R_2 , R_3 – внутренние радиусы, a , b – стороны

прямоугольного хода (для силикона и силикона с серебряным напылением), h – длина фрагмента:

$$S=2\pi h*(R_1+R_2) + 2\pi*(R_1^2-R_2^2) \quad (7);$$

$$S=2\pi h*(R_1+R_2+R_3) + 2\pi*(R_1^2-R_2^2-R_3^2) \quad (8);$$

$$S=2\pi h*(R_1+R_2+R_3) + 2*(ab+ah+bh) + 2*(\pi R_1^2-\pi R_2^2-\pi R_3^2-ab) \quad (9).$$

Конъюгативную смесь формировали из реципиента и донора в соотношении 4:1. В 24-луночный планшет («Медполимер», Россия) вносили 1000 мкл конъюгативной смеси в лунку и помещали фрагменты урологических катетеров (1 см). Конъюгативный перенос проводили в течение 24 ч, согласно описанному в пункте 2.8.1. Число адгезированных жизнеспособных клеток на катетерах сравнивали с учетом площади поверхности (в пересчете на 1 см²).

2.8.3. Определение гидрофобности и шероховатости поверхности катетеров

Гидрофобность атакванной поверхности определяли по количеству нафталина, адсорбированного из насыщенного водного раствора этого вещества (Коваленко и др., 2009). Количество нафталина (в мкг/см²) в начале эксперимента и после адсорбции определяли по величине оптической плотности при длине волны 220 нм. Количество адсорбированного вещества рассчитывали по убыли его содержания в растворе с учетом адсорбции на стеклянной поверхности лабораторной посуды.

Для характеристики структуры поверхности материала использовали оптический цифровой 3D-видео микроскоп Hirox KH-7700 (Япония) в режиме измерения пространственного рельефа при помощи изменения фокусного расстояния камеры. Регистрировали снимки с разных участков поверхности на масштабе 220×165 мкм, что позволяло проводить усреднение показателей микрорельефа. Рассчитывали средние значения параметра шероховатости материала R_a (среднеарифметическое абсолютных отклонений профиля в пределах базовой длины согласно ГОСТ 2789-73) по строкам и столбцам матрицы оптических измерений высоты рельефа поверхности. Микроскопию и обработку

данных проводил Морозов Илья Александрович – с.н.с. лаборатории Микромеханики структурно-неоднородных сред «Института механики сплошных сред УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН.

2.8.4. Конъюгативный перенос 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). В лунки планшета вносили 100 мкл конъюгативной смеси. Конъюгативный перенос проводили в течение 24 ч, согласно описанному в пункте 2.8.1. Клетки реципиента учитывали на LB-среде с ампициллином (50 мкг/мл), клетки донора – на LB-среде с гентамицином (40 мкг/мл), трансконъюгантов – на LB-среде с хлорамфениколом (50 мкг/мл) и ампициллином (50 мкг/мл). Жизнеспособность бактерий-ассоциантов в биопленках также оценивали методом прямого посева на селективные среды (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск, Россия): агар МакКонки-ГРМ (*K. pneumoniae*), Цетримидный агар (*P. aeruginosa*) и Энтерококкагар (*E. faecalis*).

Бесклеточную культуральную жидкость (БКЖ) получали из 24-часовой бактериальной культуры путем центрифугирования 2,0 мл ночной культуры при 8000 об/мин 10 мин на микроцентрифуге «Эппендорф» (Германия) и последующей фильтрации через мембранный фильтр Millex[®]-GS («Merck Millipore Ltd», Ирландия) с размером пор 0,22 мкм. Стерильность фильтратов была проверена методом прямого посева на агаризованную LB-среду.

2.8.5. Динамика роста *E. coli* ŽP в смешанных культурах

Совместный рост бактерий оценивали с использованием богатой (LB) среды в лунках полистиролового плоскодонного иммунологического 96-луночного планшета («Медполимер», Россия) при 37 °С в период 1-3-х суток. Высев проводили из десятичных разведений бактериальной суспензии на селективные агаризованные среды с антибиотиками: ампициллин (50 мкг/мл) – для штаммов АРЕС, хлорамфеникол (50 мкг/мл) и гентамицин (40 мкг/мл) – для *E. coli* ŽP.

2.9. Эксперименты по конъюгативному переносу *in vivo*

Все опыты выполняли в виварии на базе ГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ. Условия содержания (плотность посадки, фронт кормления и поения, температура, влажность, освещенность) были в пределах норм, рекомендуемых ВНИТИП. 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). Все эксперименты проводились в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Эксперимент по конъюгативному переносу *in vivo* проводили на двух группах животных в два этапа. В первом эксперименте использовали самцов 30-дневных крыс (линия Wistar) массой $175,25 \pm 10,31$ г, разделенных на три группы (контрольная и две опытные) по 10 особей в каждой. Крыс содержали 21 день в пластиковых клетках (по 5 особей в клетке) в отапливаемом (температурный режим 21-23 °С) и вентилируемом помещении с естественным освещением, доступ к корму и воде *ad libitum*. В предварительных исследованиях в кишечнике животных не были обнаружены *E. coli*, устойчивые к ампициллину, хлорамфениколу и гентамицину. Живые клетки контрольного (группа I) и киллерного (группа II) донора вводили с водой в концентрации $10E+08$ бактерий на голову в течение 7-и дней, определяли заселение кишечника на 3-й и 6-й дни эксперимента путем высева фекалий на селективные среды. С 8-го дня эксперимента в обеих опытных группах с водой начали вводить живые клетки штамма APES, устойчивого к ампициллину (реципиент), в концентрации $10E+08$ бактерий на голову, через 6 ч меняли воду и вводили донорные штаммы. Контрольная группа (группа III) не получала ни один из штаммов *E. coli*. Наличие в кишечнике ампициллиноустойчивых реципиентов, контрольного/киллерного донора и трансконъюгантов определяли на 10-й, 14-й и 21-й дни эксперимента.

Число жизнеспособных клеток рассчитывали на 1 г фекалий, частоту конъюгации определяли аналогично эксперименту *in vitro*.

На втором этапе использовали маньчжурских перепелов (*Coturnix coturnix*) массой $114,0 \pm 7,50$ г, которых содержали в условиях, аналогичных первому этапу, в течение недели по 5 особей в каждой группе. В этом случае живые клетки контрольного (группа I) и киллерного (группа II) донора вводили с водой в концентрации $10E+08$ бактерий на голову в течение 3-х дней, ежедневно контролируя заселение кишечника путем высева фекалий на селективные среды. Со 2-го дня эксперимента в обеих опытных группах с водой начали вводить живые клетки штамма АРЕС, устойчивого к ампициллину (реципиент), в концентрации $10E+08$ бактерий на голову, через 6 ч меняли воду и вводили донорные штаммы. Контрольная группа (группа III) не получала ни один из штаммов *E. coli*. Наличие в кишечнике ампициллиноустойчивых реципиентов, и трансконъюгантов определяли на 2-й, 3-й и 6-й дни эксперимента. Число жизнеспособных клеток рассчитывали на 1 г фекалий, частоту конъюгации определяли аналогично эксперименту *in vitro*, пункт 2.8.1.

2.10. Выделение ДНК

Образцы ДНК для ПЦР-анализа готовили следующим образом: одну микробиологическую петлю биомассы бактерий переносили в микропробирки объемом 500 мкл, суспендировали в 100 мкл стерильной дистиллированной воды, прогревали при 95°C в течение 10 мин в твердотельном термостате «Термит» и откручивали на центрифуге «MiniSpin» (Eppendorf, Германия) при 13 тыс. об/мин 5 мин.

2.11. Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию ДНК проводили с применением реагентов производства ООО «Синтол» (Россия) на термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы ООО «Синтол» (Россия), согласно литературным источникам. Визуализацию

полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США).

2.11.1. Генетическое типирование

Генетическое типирование культур осуществляли в системе двойного контроля посредством гер-ПЦР с праймером M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT) и -ERIC1R/ERIC2 (5'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA/5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG), используя соответствующие режимы реакций (Huey, Hall, 1989; Versalovic *et al.*, 1991).

2.11.2. Определение филогенетической группы *E. coli*

Определение филогенетических групп изученных штаммов проводили с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (quadruplex PCR) с праймерами, указанными в таблице 1 (Clermont *et al.*, 2013).

Таблица 1

Праймеры для определения филогенетической группы

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Размер, п.н.
<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
	ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA	
<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
	chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i>	YjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211
	YjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
	TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC	

Результаты интерпретировали, используя ключ для определения филогенетической группы (рис. 4). В качестве контроля использовали штаммы *E. coli*, принадлежащие к филогруппе B2.

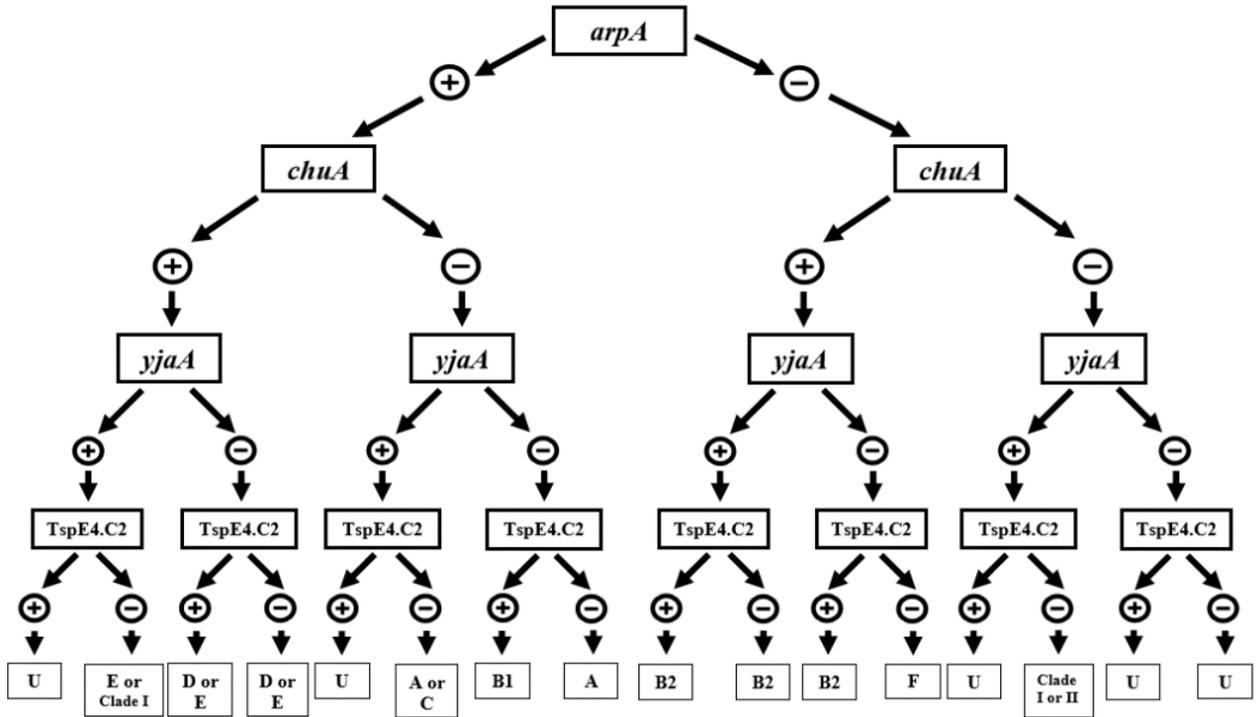


Рисунок 4. Схема определения филогенетической группы методом мультиплексной ПЦР.

2.11.3. Детекция ряда генов

Детекцию генов адгезинов, вирулентности и продукции бета-лактамаз проводили с использованием праймеров (табл. 2) и режимов амплификации, согласно рекомендациям авторов.

Таблица 2

Праймеры для детекции ряда генов в штаммах *E. coli*

Ген-мишень	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Размер, п.н.	Источник
<i>Адгезины и белки наружной мембраны</i>				
<i>ibeA</i>	Ibe10_f	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170	Johnson, Stell, 2000
	IbeA_r	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC		
<i>fimH</i>	FimH1	CAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG	461	Guiral <i>et al.</i> , 2011
	FimH2	TGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC		
<i>papGII</i>	papG_II _f	GGGATGAGCGGGCCTTTGAT	190	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
	papG_II _r	CGGGCCCCAAGTAACTCG		
<i>papGIII</i>	papG_III _f	GGCCTGCAATGGATTTACCTGG	258	
	papG_III _r	CCACCAAATGACCATGCCAGAC		

<i>papC</i>	Pap1	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	200	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
	Pap2	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA		
<i>sfaDE</i>	SFA-1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	
	SFA-2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		
<i>afa/dra BC</i>	afa/dra BC-f	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	592	Johnson, Stell, 2000
	afa/dra BC-r	CCCGTAACGCGCCAGCATCTC		
<i>yqi</i>	IMT- P2512	ATGCAATGGCAGTACCCTTC	400	Antão <i>et al.</i> , 2009
	IMT- P2513	CTGGTGGCAACATCAAATTG		
<i>upaG</i>	upaG-F	GATAGGCAAGGACGCAAGA	1218	O'Hara <i>et al.</i> , 2019
	upaG-R	GGTCGCAATATCCGTAGT		
<i>flu</i>	flu-F	GGGTAAAGCTGATAATGTCTG	508	Ulett <i>et al.</i> , 2007
	flu-R	GTTGCTGACAGTGAGTGTGC		
<i>iha</i>	IHA-F	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	827	Chapman <i>et al.</i> , 2006
	IHA-R	TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA		
<i>eaeA</i>	eaeA-F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	
	eaeA-R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>ompT</i>	ompT-F	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT	496	Subedi <i>et al.</i> , 2018
	ompT-R	TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC		
<i>Токсины</i>				
<i>usp</i>	USPdeg1	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTSTGT	1017	Nakano <i>et al.</i> , 2001
	USPdeg2	CATCRTGTAGTCKGGGSGTAACAAT		
<i>cnf1</i>	CNF1-1	CTGACTTGCCGTGGTTTAGTCCGG	1295	Kuhar <i>et al.</i> , 1998
	CNF1-2	TACACTATTGACATGCTGCCCGGA		
<i>stx2</i>	stx2-F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	Chapman <i>et al.</i> , 2006
	stx2-R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>stx1</i>	stx1-F	ATAAATCGCCTATCGTTGACTAC	180	
	stx1-R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<i>estI</i>	STa1	TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	166	
	STa2	ACAGGCAGGATTACAACAAG		
<i>estII</i>	STb-1	ATCGCATTTCTTCTTGCATC	172	
	STb-2	GGGCGCCAAAGCATGCTCC		
<i>ehxA</i>	ehxA-F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	
	ehxA-R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		
<i>eltA</i>	LTA-1	GGCGACAGATTATACCGTGC	696	
	LTA-2	CCGAATTCTGTTATATATGTC		
<i>eastI</i>	east 11a	CCATCAACACAGTATATCCGA	111	
	east 11b	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT		

Продолжение таблицы 2

<i>hlyF</i>	hlyF1	TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAAC	444	Moulin-Schouleur <i>et al.</i> , 2007
	hlyF2	TTTGGCGGTTTAGGCATTCC		
<i>hlyA</i>	hlyA1	GTCTGCAAAGCAATCCGCTGCAAAT AAA	561	Kerényi <i>et al.</i> , 1998
	hlyA2	CTGTGTCCACGAGTTGGTTGATTA G		
<i>subAB</i>	RTsubA BF	GCAGATAAATACCCTTCACTTG	232	Orden <i>et al.</i> , 2011
	RTsubA BR	ATCACCAGTCCACTCAGCC		
<i>Другие гены</i>				
<i>tcpC</i>	tcpC-for	GGCAACAATATGTATAATATCCT	386	Cirl <i>et al.</i> , 2008
	tcpC-rev	GCCAGTCTATTTCTGCTAAAGA		
<i>kpsMTII</i>	kpsMT_II _f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	270	Jonson, Stell, 2000
	kpsMT_II _r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA		
<i>iroN</i>	iroN f	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	925	
	iroN r	GACGCCGACATTAAGACGCAG		
<i>chua</i>	chua.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	Clermont <i>et al.</i> , 2013
	chua.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>iutA</i>	iutA-F	GGCTGGACATCATGGGA _{ACTGG}	301	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
	iutA-R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		
<i>iss</i>	iss-F	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323	Jonson, 2008
	iss-R	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA		
<i>traJ</i>	PTraJ-1	TCCAAAAAATGATGATGAAT	226	Čitar <i>et al.</i> , 2010
	PTraJ-2	ATAGGAACCTCCTCACAAAG		
	RepFIB r	GGAGATCCTGCGTACACTGCCT		
<i>Производство бета-лактамаз</i>				
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-C	ATCAGCAATAAACCAGC	516	
	TEM-H	CCCCGAAGAACGTTTTTC		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F	AGGATTGACTGCCTTTTTG	392	Aleisa, 2013
	SHV-R	ATTTGCTGATTTGCTCG		
<i>bla_{OXA}</i>	OXA-F	ATATCTCTACTGTTGCATCTCC	619	
	OXA-R	AAACCCTTCAAACCATCC		
<i>bla_{CTX-M}</i> <i>унив.</i>	CTX-M-F	CGCTTTGCGATGTGCAG	551	Ahmed <i>et al.</i> , 2007
	CTX-M-R	ACCGCGATATCGTTGGT		
<i>bla_{CMY}</i>	CMY-2-F	GCAGGCYATTCCGGGTATG	915	Koo; Woo, 2012
	CMY-2-R	GCYACGTAGCTGCCAAAYCC		
Интегрон 1 класса	5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Обрывки цепи	Lévesque <i>et al.</i> , 1995
	3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA		

Продукция бактериоцинов				
A	ColA-F	CGTGGGGAAAAGTCATCATC	475	Šmajš <i>et al.</i> , 2010
	ColA-R	GCTTTGCTCTTTCCTGATGC		
B	colicinB-F	AAGAAAATGACGAGAAGACG	492	Gordon, O'Brien, 2006
	colicinB-R	GAAAGACCAAAGGCTATAAGG		
D	ColD-F	CTGGACTGCTGCTGGTGATA	420	Šmajš <i>et al.</i> , 2010
	ColD-R	GAAGGTGCGCCTACTACTGC		
E1	colicinE1F	TGTGGCATCGGGCGAGAATA	649	Gordon, O'Brien, 2006
	colicinE1R	CTGCTTCCTGAAAAGCCTTTT		
E2	ColE2-F	TGATGCTGCTGCAAAAGAG	409	Šmajš <i>et al.</i> , 2010
	ColE2-R	TTCAAAGCGTTCCCTACCAC		
E3	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	413	
	ColE3-R	TCGGATCTGGACCTTTCAAC		
E4	ColE4-F	GAAGGCTGCATTTGATGCT	409	
	ColE4-R	CGGATCCGGACCTTTAATTT		
E5	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	430	
	ColE5-R	TTGAATTCTCGAATCGTCCA		
E6	ColE6-F	ACCGAACGTCCAGGTGTT	399	
	ColE6-R	TTTAGCCTGTGCTCCTGAT		
E7	ColE7-F	GCATTCTGCCATCTGAAAT	431	
	ColE7-R	CTTCTGCCCACTTTCTTTCG		
Ia	ColIa-F	GCATGCAAATGACGCTCTTA	473	
	ColIa-R	GAGGACGCCAGTTCTCTGTC		
Ib	ColIb-F	AACGAGTGGGTCGATGATTC	464	
	ColIb-R	CCTTTTCTGCGCTCGTATTC		
K	ColK-F	CAGAGGTCGCTGAACATGAA	469	
	ColK-R	TCCGCTAAATCCTGAGCAAT		
M	ColM-F	GCTTACCACTTCGAAAACC	429	Micenková <i>et al.</i> , 2014
	ColM-R	GAGCGACTCTCCGATAATGC		
N	ColN-F	AGCTTGGCGAGTATCTTGGA	401	
	ColN-R	CAACACAGCCCCGAATAAAC		
S4	ColS4-F	TATATGGCCCAACTGCTGGT	456	Šmajš <i>et al.</i> , 2010
	ColS4-R	CGTAAGGACGGACACCTGTT		
Js	ColJs-F	TCAAAATGTTTGGGCTCCTC	254	
	ColJs-R	TAATCTGCCCTGTCCCACTG		
B17	microcin B17-F	TCACGCCAGTCTCCATTAGGTGTTGG CATT	135	Gordon, O'Brien, 2006
	microcin B17-R	TTCCGCCGCTGCCACCGTTTCCACCA CTAC		

C7	microcin C7-F	CGTTCAACTGTTGCAATGCT	134	Šmajš <i>et al.</i> , 2010
	microcin C7-R	AGTTGAGGGGCGTGTAATTG		
J25	microcin J25-F	TCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTA CCAAT	175	Gordon, O'Brien, 2006
	microcin J25-R	TGATTAAGCATTTTCATTTTAATAAAA GTGT		
V	microcin V-F	CACACACAAAACGGGAGCTGTT	680	
	microcin V-R	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT		

2.12. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Office XP Excel и STATISTICA 10. Показатели представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD) для каждого штамма; медианы (Me) и квартилей ($Q1-Q3$) для группы штаммов. Достоверности отличий определяли с помощью теста Уилкоксона (W -test) для зависимых выборок и Манна-Уитни (U -test) для независимых выборок. Для оценки качественных параметров определяли точный критерий Фишера (F -test). Различия между группами данных считали достоверными при $p < 0,05$. Для исследования связи двух признаков вычисляли непараметрический коэффициент корреляции – коэффициент Спирмана (r_s), статистическая достоверность рассчитывалась при уровне значимости $p = 0,05$.

Все программы, которые использовались в данном исследовании, относились к классу свободного/открытого программного обеспечения или были лицензионными.

ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Известно, что эшерихии характеризуются значительной внутривидовой гетерогенностью, причем у штаммов разных филогенетических групп имеется специфичная локализация при развитии патологического процесса, а также патогенетические особенности их персистенции в макроорганизме, связанные с набором вирулент-ассоциированных детерминант. В то время как большинство лабораторных штаммов утратило способность образовывать массивные биопленки, многие естественные (клинические и сельскохозяйственные) изоляты эффективно их формируют, вызывая угрозу здоровью человека, колонизируя не только биотические поверхности, но и медицинские устройства. Кроме того, широкое применение антибиотиков в медицине и ветеринарии способствовало появлению множественных лекарственно-устойчивых бактерий, различающихся по антибиотикофенотипу. Биологические свойства реципиента (поверхностные компоненты клеточной стенки, продукция бактериоцинов, биопленкообразующая способность, наличие плазмид и др.) могут существенно влиять на передачу плазмиды при внутривидовом скрещивании различных штаммов *E. coli*. В рамках первой задачи диссертационного исследования были собраны и подробно охарактеризованы фено- и генотипические свойства клинических и природных штаммов *E. coli* патотипов UPEC и APEC.

3.1. Характеристика уропатогенных *E. coli*

В ходе данного исследования была собрана и проанализирована коллекция из 198 изолятов UPEC, выделенных при различных ИМВП от пациентов поликлиник и стационаров. Анализ таксономического состава ассоциаций выявил, что разнообразие видов и их встречаемость существенно различались в двух исследуемых группах. *Enterococcus* доминировал в ассоциациях как с поликлиническими, так и с нозокомиальными UPEC (58,35% и 54,28% соответственно). В девяти случаях и в той, и в другой группе вместе с *E. coli* были

обнаружены клебсиеллы (37,58% против 18,84% ассоциаций). Сравнение нозокомиальных культур, выделенных при ИМВП из мочи и с поверхности катетера, показало, что при катетеризации видовой спектр ассоциантов ограничен несколькими видами: клебсиелла, протей и неферментирующие бактерии встречались достоверно чаще (F -test: $p < 0,005$), тогда как при неосложненных ИМВП изолированы коринебактерии, стрептококки, кандиды, которые вообще не были обнаружены при катетеризации.

Первичная коллекция уропатогенных штаммов *E. coli* была проверена на генетическое разнообразие с помощью гер-ПЦР с праймерами ERIC1/2. В результате ERIC-типирования были выделены 116 «поликлинических» и нозокомиальных штаммов 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, и дана их подробная характеристика.

3.1.1. Ростовые характеристики и биопленкообразование

Оценка количества жизнеспособных клеток при суточном росте культур в планктоне и биопленке методом подсчета КОЕ показала, что штаммы не различались по жизнеспособности как в планктоне, так и в биопленке (табл. 3). В первой модели число КОЕ варьировало от $2,73E+07 \pm 1,77E+07$ до $1,14E+09 \pm 1,00E+09$, медиана и квартили составили Me: $9,75E+07$, Q1-Q3: $5,18E+07$ - $1,93E+08$. В биопленочной модели количество жизнеспособных клеток было ниже: от $1,63E+06 \pm 1,01E+06$ до $1,41E+08 \pm 2,33E+08$ (Me: $1,43E+07$, Q1-Q3: $6,76E+06$ - $2,72E+07$), однако статистически значимые различия по данному показателю получены не были.

Число жизнеспособных клеток и биомасса биопленок *E. coli* через 24 ч экспозиции

Штамм	Число жизнеспособных клеток, КОЕ/мл				Биомасса, ед. ОП (570 нм)	
	Планктон		Биопленка			
	М	SD	М	SD	М	SD
R11	4,34E+08	4,55E+08	8,66E+06	8,96E+06	0,099	0,019
R13	2,59E+08	3,18E+08	7,90E+06	5,94E+06	0,106	0,039
R14	1,87E+08	6,42E+07	2,99E+06	1,26E+06	0,100	0,027
R28	1,25E+08	5,41E+07	1,73E+07	1,33E+07	0,235	0,026
R29	1,99E+08	1,12E+08	1,30E+07	1,23E+07	0,088	0,017
R30	7,67E+07	5,30E+07	4,30E+07	1,87E+07	0,108	0,032
R31	9,75E+07	3,25E+07	3,20E+07	3,07E+07	0,137	0,032
R32	2,85E+08	2,11E+08	1,01E+08	1,64E+08	0,084	0,010
R33	1,54E+08	2,14E+08	1,25E+08	1,34E+08	0,551	0,053
R34	3,48E+07	1,10E+07	1,46E+07	2,24E+07	0,152	0,012
R35	6,11E+07	8,86E+06	1,94E+06	1,63E+06	0,128	0,007
R36	4,76E+07	4,88E+06	3,28E+07	1,63E+07	0,311	0,020
R37	1,85E+08	2,19E+08	4,15E+06	3,58E+06	0,173	0,029
R38	3,73E+08	2,90E+08	4,51E+07	6,84E+07	0,135	0,015
R40	1,79E+08	4,45E+07	2,24E+07	3,15E+07	0,152	0,006
R41	5,67E+07	1,28E+07	1,43E+07	7,83E+06	0,333	0,032
R42	3,10E+08	1,48E+08	5,23E+06	6,36E+06	0,186	0,015
R43	3,57E+08	1,66E+08	1,41E+08	2,33E+08	0,104	0,014
R44	1,14E+09	1,00E+09	1,99E+07	1,68E+07	0,199	0,022
R45	1,06E+08	7,40E+07	4,66E+07	2,87E+07	0,281	0,037
R48	7,34E+07	5,67E+07	2,99E+06	2,57E+06	0,081	0,009
R49	3,20E+07	2,57E+07	1,56E+07	2,28E+07	0,090	0,006
R50	3,96E+07	2,76E+07	1,63E+06	1,01E+06	0,076	0,006
R52	5,13E+07	3,79E+07	8,70E+06	5,28E+06	0,256	0,018
R53	6,51E+07	7,89E+07	9,74E+06	1,22E+07	0,080	0,006
R54	3,29E+07	2,57E+07	1,56E+07	1,12E+07	0,190	0,025
R55	3,91E+07	7,44E+06	7,17E+06	5,63E+06	0,228	0,027
R58	2,73E+07	1,77E+07	1,28E+07	4,65E+06	0,189	0,019
R59	5,23E+07	3,30E+07	6,36E+06	1,62E+06	0,129	0,014

Биомасса 24-часовых биопленок штаммов UPEC варьировала достаточно широко: от $0,099 \pm 0,019$ до $0,551 \pm 0,053$ ед. ОП. Медиана и квартили составили Ме: $0,137$ ед. ОП, Q1-Q3: $0,100-0,199$ ед. ОП.

3.1.2. Филогенетическая группа, бактериоциногения и лизогения

Среди исследуемых штаммов уропатогенной *E. coli* с помощью метода мультиплексной ПЦР были детектированы представители 6 распознаваемых филогрупп (А, В1, В2, С, Е, F), а также U и Clad I/II (рис. 5). Большинство культур принадлежали к группе В2 (41,38%), которую принято ассоциировать с высоким вирулентным потенциалом UPEC. Второй по распространенности была группа А (17,24%), часто соответствующая комменсальным культурам *E. coli*. Реже встречались штаммы, принадлежавшие группам В1 и Е (10,34%), С (6,89%), к группам F и Clad I/II принадлежат по 1 штамму (3,45%), не идентифицированными остались 2 культуры (6,89%).

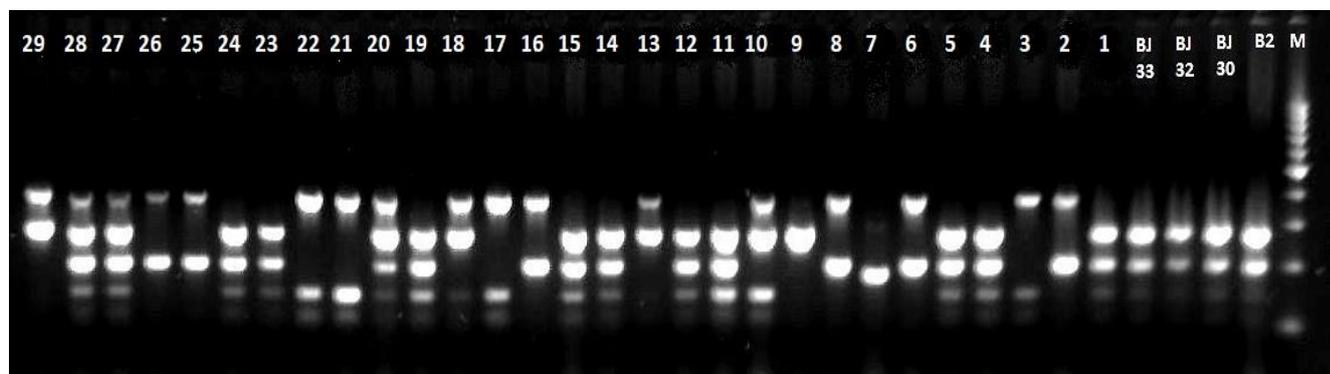


Рисунок 5. Электрофореграмма результатов мультиплексной ПЦР для определения филогенетической группы (М – маркер молекулярных масс 100 бр; В2, ВJ30, ВJ32, ВJ33 – контрольные штаммы для филогруппы В2; 1-29 – исследуемые культуры).

Продукция бактериоцинов была обнаружена у 13 штаммов (рис. 6, а). Связь между бактериоциногенией и принадлежностью к филогруппе В2 не была выявлена. Различия в биопленкообразовании между группами бактериоцинпродуцирующих и непродуцирующих штаммов не были обнаружены

(*U*-test: $p=0,083$). Несмотря на это, биомасса 24-часовых биопленок во второй группе была выше (Me: 0,127 ед. ОП vs Me: 0,186 ед. ОП).

Инфицирование бактериофагом выявлено только у 4 культур (рис. 6, б). Наличие фага не определялось филогруппой. Биомасса биопленок была достоверно выше в группе неинфицированных штаммов (*U*-test: $p=0,015$), так медиана и квартили для первой группы составили Me: 0,085 ед. ОП, Q1-Q3: 0,078-108 ед. ОП, а для второй – Me: 0,152 ед. ОП, Q1-Q3: 106-228 ед. ОП.

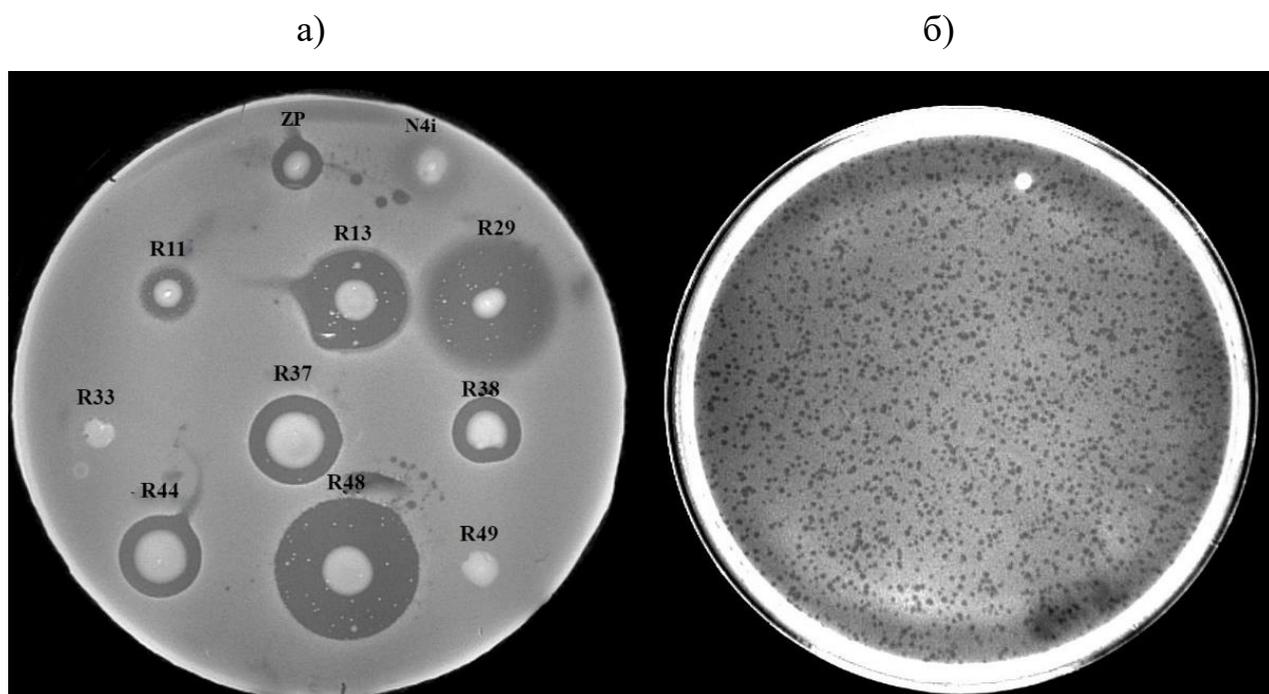


Рисунок 6. Фотографии зон подавления роста контрольного штамма *E. coli* DH5 α , образованных продукцией бактериоцинов (а) и высвобождением бактериофага UPEC (б).

3.1.3. Неспецифическая и специфическая адгезия

Уропатогенные штаммы *E. coli* проявляли разную адгезивную активность по отношению к абиотическим поверхностям (табл. 4). Наименьший показатель адгезии к полистироловому планшету (гидрофобная поверхность) составил $0,55\% \pm 0,12\%$, а наибольший – $17,68\% \pm 12,64\%$. Для гидрофильной поверхности стекла значения были 0% и $43,55\% \pm 29,86\%$, соответственно. Корреляционная связь между двумя показателями носила умеренный характер и составила $r_s=0,43$,

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 ($r_s=0,69$) была определена для принадлежности штамма к группе В2 и уровня гидрофобной адгезии.

Таблица 4

Показатели неспецифической и специфической адгезии штаммов UPEC

Штамм	Адгезия				
	к гидрофобной поверхности, %		к гидрофильной поверхности, %		к эритроцитам человека
	М	SD	М	SD	ИАМ
R11	7,05	5,45	14,55	12,76	2,40
R13	1,50	0,99	3,20	2,29	2,71
R14	0,55	0,12	0,95	0,67	2,28
R28	3,15	2,92	2,05	1,56	2,19
R29	4,27	3,87	12,68	10,06	3,56
R30	3,30	2,22	1,66	0,84	2,64
R31	0,83	0,56	1,20	0,62	4,68
R32	0,99	0,73	1,59	1,19	2,00
R33	1,73	1,51	1,53	0,99	2,25
R34	1,67	1,25	3,77	2,54	4,43
R35	1,28	0,98	0,13	0,06	2,06
R36	5,16	3,29	0,01	0,03	2,36
R37	2,26	1,84	3,29	2,99	2,96
R38	2,12	2,00	7,74	7,00	2,75
R40	6,65	5,92	1,77	1,13	3,15
R41	10,79	9,95	2,63	1,98	3,68
R42	6,00	5,02	4,45	3,07	2,90
R43	9,10	8,66	0	0	2,65
R44	3,68	3,00	0	0	3,96
R45	12,78	10,81	2,61	1,43	3,96
R48	8,16	7,06	2,87	2,45	1,50
R49	4,23	3,19	1,75	1,02	2,29
R50	13,42	10,20	2,55	1,97	7,60
R52	17,60	12,64	43,27	29,86	3,75
R53	9,56	9,03	0	0	2,06

Продолжение таблицы 4

R54	11,49	10,08	2,31	2,09	2,00
R55	10,25	7,54	1,46	1,51	0,51
R58	13,78	11,24	7,79	6,32	2,70
R59	11,69	10,81	3,27	3,14	2,13

Уровень специфической адгезии к эритроцитам человека в выборке в среднем составил Me: 2,67, Q1-Q3: 2,23-3,69. Достоверной связи между уровнем адгезии к клеткам крови и к абиотическим материалам не было обнаружено. Также не были связаны между собой уровень адгезии (верно для всех типов) и биопленкообразующая способность UPEC.

3.1.4. Чувствительность к антибактериальным веществам

Среди штаммов UPEC наибольший уровень резистентности был зафиксирован к ципрофлоксацину (58,62% культур), цефотаксиму (44,83% культур) и левофлоксацину (41,38% культур) (табл. 5). Нулевые показатели устойчивости были определены в отношении фосфомицина и меропенема. Пять штаммов были отнесены к группе полирезистентных (устойчивость к 5 и более антибиотикам (Magiorakos *et al.*, 2012), остальные 24 культуры имели устойчивость к 1, 2, 3 или 4 препаратам. Продукция бета-лактамаз расширенного спектра была выявлена у 9 культур (31,03%). Резистентность к антибиотическим агентам не была связана с принадлежностью штамма к филогруппе. Биомасса биопленок БЛРС-продуцирующих и не продуцирующих штаммов не различалась.

Отобранные штаммы показали высокий уровень устойчивости к бактерицидным веществам. 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. Бактериоцины с пороформирующим механизмом (колицины A, B, D, K, N, M, S4, E1, Ia, Ib,) показали очень низкую эффективность действия в отношении UPEC, устойчивость к ним обнаружена более чем у 80% штаммов, за исключением колицинов B и K (72,41% и 75,86%

устойчивых культур). Колицины с ДНКазной и РНКазной активностью (колицины E3, E4, E5, E6, E7, Js) оказались более эффективны: устойчивость к ним ограничивалась 50% культур, а к колицину E2 были нечувствительны 41,23% штаммов. Микроцины с разными механизмами киллинга бактериальных клеток проявляли наименьший антагонистический потенциал в отношении *E. coli*. Подавляющее большинство УРЕС имели резистентность к протестированным микроцинам: к В17 – 93,10%, к V – 75,86%, С7 – 96,55% штаммов.

3.1.5. Гены белков, обеспечивающих адгезию

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%.

Среди других генов, косвенно обеспечивающих прикрепление бактериальных клеток к биотическим и абиотическим поверхностям, у 64,53% штаммов встречался ген капсулообразования *kpsM7*, а у 15% – ген белка наружной мембраны с протеазной активностью *ompT*.

Профили чувствительности штаммов UPEC к антимикробным агентам

Агент	Ципрофлоксацин	Левифлоксацин	Цефуроксим	Цефотаксим	Цефтазидим	Меропенем	Гриметоприм-ульфаметоксаз.	Фосфомидин	Фурадонин	Амикацин	Колицин А	Колицин К	Колицин N	Колицин S4	Колицин E1	Колицин E2	Колицин E3	Колицин E4	Колицин E5	Колицин E6	Колицин E7	Колицин Js	Колицин B	Колицин Ia	Колицин Ib	Колицин D	Колицин M	Микроцин B17	Микроцин C7	Микроцин V	
Штамм UPEC																															
R11																															
R13																															
R14																															
R28																															
R29																															
R30																															
R31																															
R32																															
R33																															
R34																															
R35																															
R36																															
R37																															
R38																															
R40																															
R41																															
R42																															
R43																															
R44																															
R45																															
R48																															
R49																															
R50																															
R52																															
R53																															
R54																															
R55																															
R58																															
R59																															

Примечание. Серые ячейки – штамм устойчив, белые ячейки – штамм чувствителен.

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). В целом, моновалентный адгезивный генотип обнаружен в четырех (13,79%) случаях, два гена в любой комбинации выявлены у четырех штаммов (13,79%), три – у пяти (17,24%). Множественные гены адгезии (4 и более) детектированы в пятнадцати (51,72%) случаях, один штамм не имел ни одного гена. Семь штаммов (24,14%) имели гены только фимбриальных адгезинов и три (10,34%) – только афимбриальных или белков наружной мембраны, у восемнадцати (62,07%) штаммов присутствовали одновременно гены обоих типов адгезинов. Вариативность сочетаний разных детерминант адгезии представлена на рис. 7.

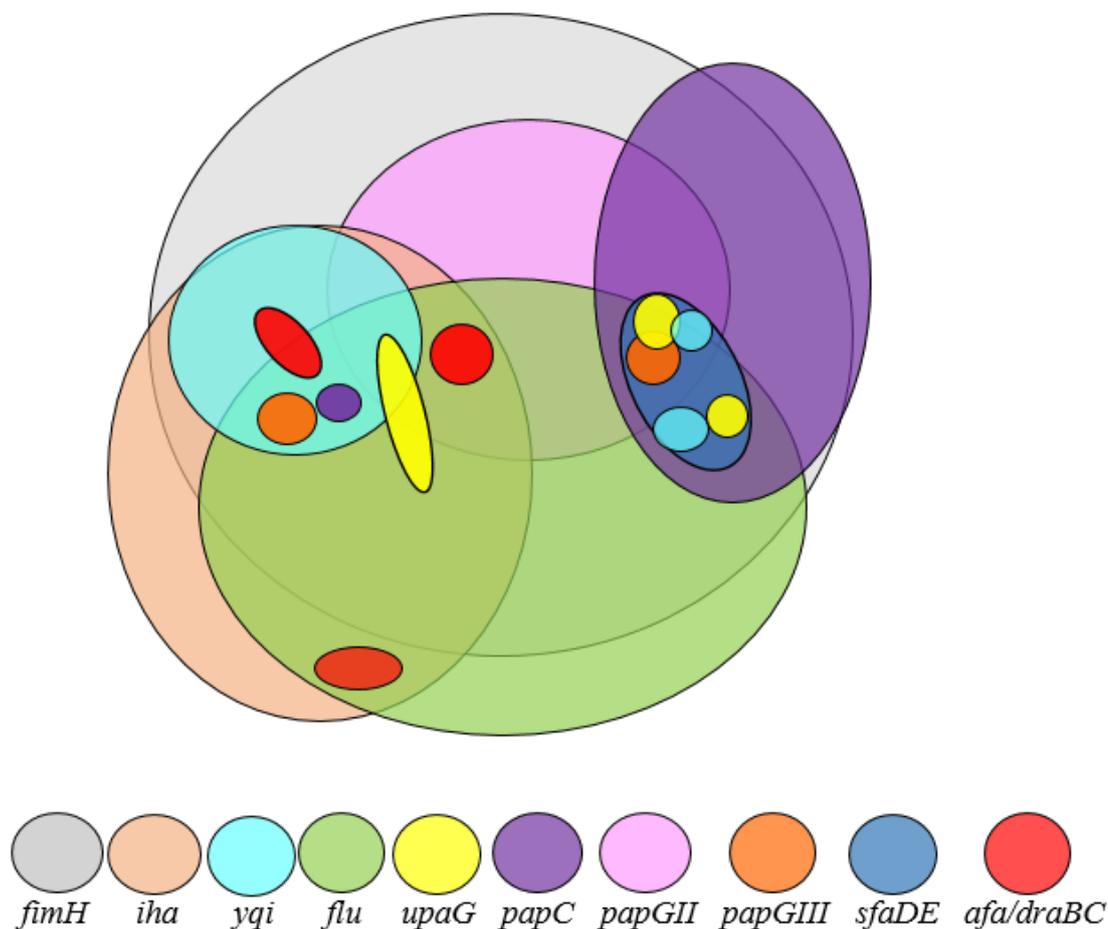


Рисунок 7. Варианты комбинаций генов адгезинов среди штаммов UPEC.

Анализ связи филогруппы и факторов адгезии показал, что 66,66% штаммов, несущих 4 и более гена адгезинов, принадлежали к филогруппе В2. Преобладание группы В2 среди UPEC с положительным адгезивным профилем было характерно для всех представленных генов, за исключением фимбриальных адгезинов *papGII/III* (табл. 6). Важно отметить, что достоверно чаще с данной филогруппой был ассоциирован ген *yqi*, для которого описана роль в патогенезе системных инфекций птиц. Кроме того, В2 также была широко распространена среди штаммов, несущих детерминанту *sfaDE*, которая часто встречается у менингит- и сепсис-ассоциированных штаммов *E. coli*.

Таблица 6

Частота встречаемости представителей филогруппы В2 среди штаммов UPEC с разными генотипами

Группа	Адгезин-ассоциированные гены									
	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>sfaDE</i>	<i>yqi</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>uraG</i>	<i>flu</i>	<i>iha</i>
«+» генотип	42,85	60,0	28,57	33,33	83,33*	83,33*	66,66	100*	55,0*	53,85
«-» генотип	37,5	31,58	53,33	42,31	30,43	30,43	34,78	32	11,11	31,25

Примечание. * – уровень достоверности $p < 0,05$ (*F*-test). Данные представлены в %.

Расчет отношения шансов показал, что встречаемость генов адгезии *yqi* и *sfaDE* в *E. coli* филогруппы В2 была выше в 14 раз (OR=14,286), в 10 раз чаще встречался ген *flu* (OR=10,000). Гены *afa/draBC* и *uraG* (OR=4,750), *iha* (OR=3,500) и *papC* (OR=3,200) также детектировались у представителей данной группы с большей частотой. Кроме того, в группе В2 вероятность встретить 4 и более гена одновременно была в 7,5 раз (OR=7,500) выше, чем в совокупности штаммов других групп.

Не было обнаружено связи между наличием какого-либо гена адгезина (без учета других генов), или их комбинации, и уровнем специфической адгезии штаммов (табл. 7). При этом были получены достоверные отличия в случае неспецифической адгезии: штаммы с профилем *fimH*⁺, *rapC*⁺, *rapGIII*⁺ имели более высокий уровень адгезии как к стеклу, так и к полистиролу, чем штаммы без данных генов. Носители гена *uraG*⁺ лучше адгезировались к стеклу, но не полистиролу, в то время как *rapGII*-позитивные штаммы имели преимущество в адгезии к гидрофобной поверхности полистирола.

Таблица 7

Специфическая и не специфическая адгезия с учетом генотипа

Группа штаммов	Уровень специфической адгезии, ИАМ, %	Уровень неспецифической адгезии, %	
		к гидрофобной поверхности	к гидрофильной поверхности
<i>fimH</i> ⁺	2,70 (2,25-3,75)	3,68 (1,50-8,62)*	2,63 (1,59-4,45)*
<i>fimH</i> ⁻	2,65 (2,21-3,05)	9,10 (5,90-9,90)	1,46 (0,01-2,16)
<i>rapC</i> ⁺	2,70 (2,10-3,90)	10,06 (7,33-13,23)*	2,85 (2,56-6,64)*
<i>rapC</i> ⁻	2,64 (2,26-3,46)	3,49 (1,68-8,81)	1,72 (0,99-3,28)
<i>rapGII</i> ⁺	2,64 (2,21-3,70)	3,49 (1,54-7,89)	2,46 (1,29-3,64)
<i>rapGII</i> ⁻	2,72 (2,11-3,10)	8,11 (2,98-11,31)*	2,43 (1,47-3,13)
<i>rapGIII</i> ⁺	3,68 (3,04-3,71)	10,79 (8,92-14,19)*	14,55 (8,59-28,90)*
<i>rapGIII</i> ⁻	2,65 (2,13-3,15)	4,27 (1,73-9,56)	2,05 (1,20-3,27)
<i>sfaDE</i> ⁺	2,40 (2,00-2,69)	7,05 (1,51-11,49)	3,20 (2,31-7,78)
<i>sfaDE</i> ⁻	2,75 (2,26-3,85)	5,16 (1,93-9,33)	2,26 (1,17-3,28)
<i>yqi</i> ⁺	2,78 (2,29-3,55)	8,92 (6,75-11,32)	2,46 (1,90-2,62)
<i>yqi</i> ⁻	2,41 (2,21-3,70)	10,97 (1,55-8,98)	3,05 (1,16-3,65)
<i>afa/draBC</i> ⁺	2,50 (2,28-3,02)	4,23 (2,13-6,28)	1,60 (1,48-1,74)
<i>afa/draBC</i> ⁻	2,70 (2,08-3,75)	6,44 (10,04-10,48)	2,62 (2,44-4,16)
<i>uraG</i> ⁺	2,55 (2,31-3,64)	5,36 (1,88-8,23)	4,13 (0,80-7,20)*
<i>uraG</i> ⁻	2,68 (2,20-3,65)	5,58 (1,83-10,07)	2,28 (1,48-3,25)
<i>flu</i> ⁺	2,60 (2,20-3,55)	6,76 (2,38-10,65)	2,46 (1,48-3,25)
<i>flu</i> ⁻	2,93 (2,37-4,40)	3,26 (0,87-8,32)	2,40 (1,30-4,16)
<i>iha</i> ⁺	2,64 (2,06-3,75)	6,65 (3,30-10,25)	1,66 (0,13-2,63)
<i>iha</i> ⁻	2,70 (2,27-3,26)	4,27 (2,26-11,49)	2,82 (1,59-4,45)

Примечание. * – уровень достоверности $p < 0,05$ (*U*-test).

Интересно, что штаммы, несущие гены только фимбриальных адгезинов, в среднем, имели бóльшие показатели адгезии к стеклу и эритроцитам (рис. 8, а, в), в то время как штаммы с генами только афимбриальных адгезинов – к полистиролу (рис. 8, б).

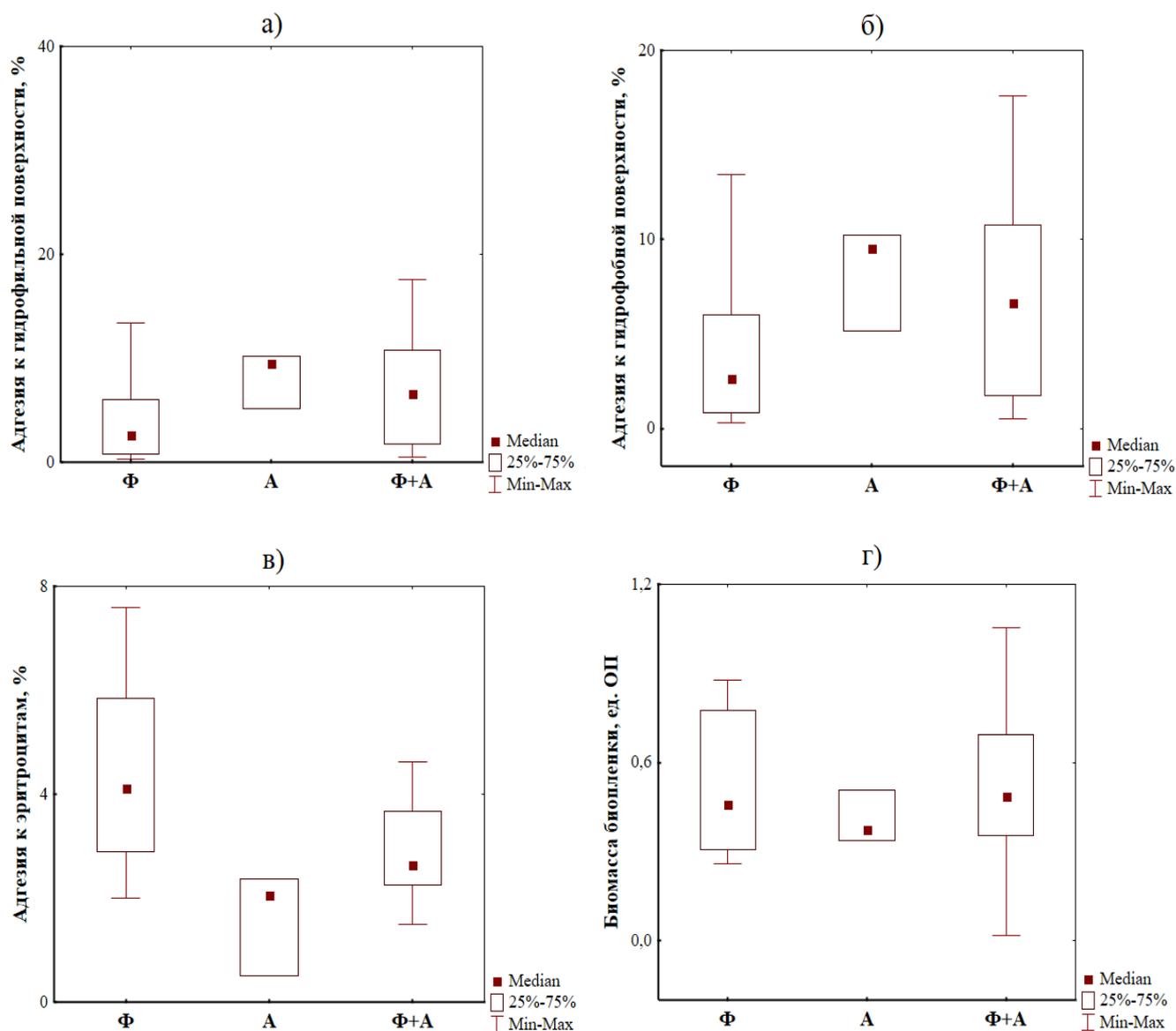


Рисунок 8. Уровни адгезии клеток UPEC к стеклу (а), полистиролу (б), эритроцитам (в) и массивность биопленки (г) в зависимости от присутствия генов фимбриальных (Ф) и афимбриальных (А) адгезинов или их комбинации (Ф+А).

3.1.6. Гены белков, обеспечивающих вирулентный потенциал штаммов

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 (*cnf1*), 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*). Девять штаммов (31,03%) имели только один ген вирулентности (*chuA*), три штамма (10,34%) несли по два гена, четыре (13,79%) – три гена в любой комбинации, были описаны паттерны из четырех (n=2) и пяти генов (n=2), у девяти штаммов не было детектировано ни одного из представленных генов. Отдельно стоит отметить, что 27,27% штаммов имели ген позитивного регулятора конъюгации *traJ*.

Среди генов синтеза бактериоцинов самыми распространёнными оказались гены микроцинов МссМ (27,6%) и В17 (24,1%). В 13,8% случаев встречались гены микроцина МссV и колицина E1, два штамма несли ген микроцина H47 и только один – колицина ColK.

Специфическая амплификация к гену *bla*_{CTX-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} (рис. 9). Гены сериновых бета-лактамаз классов C (*bla*_{CMY}) не обнаружены ни у одного из исследованных штаммов. В восьми случаях (27,58%) детектированы фрагменты интегронов. Не выявлено связи наличия генов продукции БЛРС с принадлежностью штамма к какой-либо филогруппе.

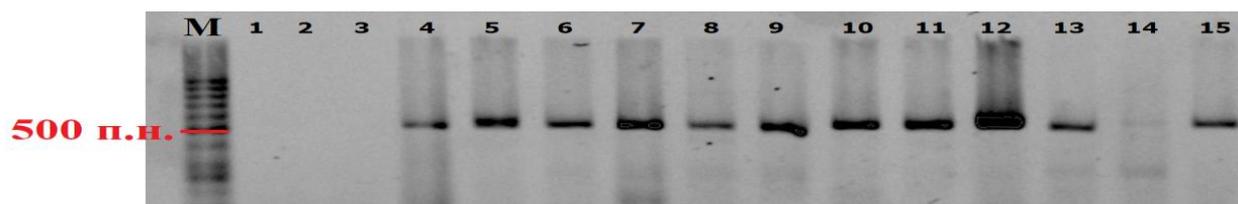


Рисунок 9. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами CTX-M-F/CTX-M-R (фрагмент гена 551 п.н., М – маркер молекулярных масс, 1-15 – номера штаммов UPEC).

Таким образом, изученные штаммы UPEC демонстрировали разнообразие биологических свойств, определяющих их успешное существование в мочеполовом тракте. Клинические UPEC в большинстве случаев принадлежали к филогруппе B2, проявляли устойчивость к широкому спектру колицинов и применяемых в урологии антибиотиков, среди культур часто встречались продуценты бактериоцинов. Наиболее вариабельными признаками были адгезивная активность и биопленкообразующая способность. Исследуемые UPEC также характеризовались как носители множественных детерминант вирулентности, ассоциированных с адгезией, токсинообразованием и устойчивостью к антибиотикам. Кроме того, присутствие конъюгативных плазмид в большинстве штаммов свидетельствует о возможности горизонтального переноса генов вирулентности и резистентности, что формирует высокий патогенный потенциал данной группы бактерий.

3.2. Характеристика *E. coli*, патогенных для птиц

Патотип APEC считается относительно новым в классификации *E. coli*, и, несмотря на активное изучение его представителей во всем мире, вопросы об автономности данной экологической группы и ее зоонозном потенциале остаются открытыми. В исследованиях последних лет активно обсуждается предположение, что штаммы APEC могут представлять опасность для здоровья людей (Manges, 2016; Santos *et al.*, 2020). С одной стороны, показана возможность трансмиссии APEC через продукты питания, в том числе, мясо птицы (Bergeron *et al.*, 2012). С другой – выявленная гомология последовательностей ДНК между APEC и другими патотипами ExPEC показывает, что они тесно связаны филогенетически (Johnson *et al.*, 2006). Отмечено появление и распространение гибридных и «гетеропатогенных» штаммов *E. coli*, несущих паттерны генов ExPEC и представителей кишечных патогенных *E. coli* (intestinal pathogenic *E. coli*, IPPEC) (Santos *et al.*, 2020). Наличие сходных вирулент-ассоциированных генов, обнаруженных в штаммах IPPEC/ExPEC и APEC, подтверждает, что последние могут либо сами выступать в качестве зоонозных патогенов, либо служить

резервуаром детерминант вирулентности для *E. coli*, обуславливающих инфекции у человека (Bergeron *et al.*, 2012).

За период 2016-18 гг. было исследовано более 250 органов куриц с птицефабрик Пермского края с системной коли-инфекцией (табл. 8). Образцы (органы с типичными признаками колисептицемии) были отобраны ветеринарами от 50 случайно выбранных больных птиц (возраст 7-36 и 177-364 дней) с симптомами колибактериоза (диарея, потеря веса, вялость и др.). Печень, сердце, селезенка и легкие были получены от каждой птицы, в некоторых случаях были исследованы почки (22 образца), яйцевод (18 образцов), трахея (5 образцов), кости (5 образцов).

Наиболее часто были поражены печень, легкие и селезенка. Для эксперимента брали по одной культуре *E. coli*, выделенных от каждой птицы, таким образом, для изучения были взяты 50 культур. По результатам ERIC-типирования среди первичной коллекции выявлены 28 индивидуальных геномовариантов АРЕС. В большинстве случаев на птицефабрике циркулировали несколько штаммов *E. coli*, при этом максимальная длительность циркуляции одного штамма составила 4 месяца (рис. 10).

Таблица 8

Количество образцов, полученных с птицефабрик Пермского края

Год	Птицефабрика 1 (бройлеры)		Птицефабрика 2 (родительское стадо)		Птицефабрика 3 (бройлеры)	
	Количество образцов (количество птиц)	Количество изолятов <i>E. coli</i>	Количество образцов (количество птиц)	Количество изолятов <i>E. coli</i>	Количество образцов (количество птиц)	Количество изолятов <i>E. coli</i>
2016	43 (6)	36	21 (3)	18	25 (3)	15
2017	26 (4)	22	29 (12)	26	27 (5)	24
2018	18 (2)	13	35 (11)	22	26 (4)	20

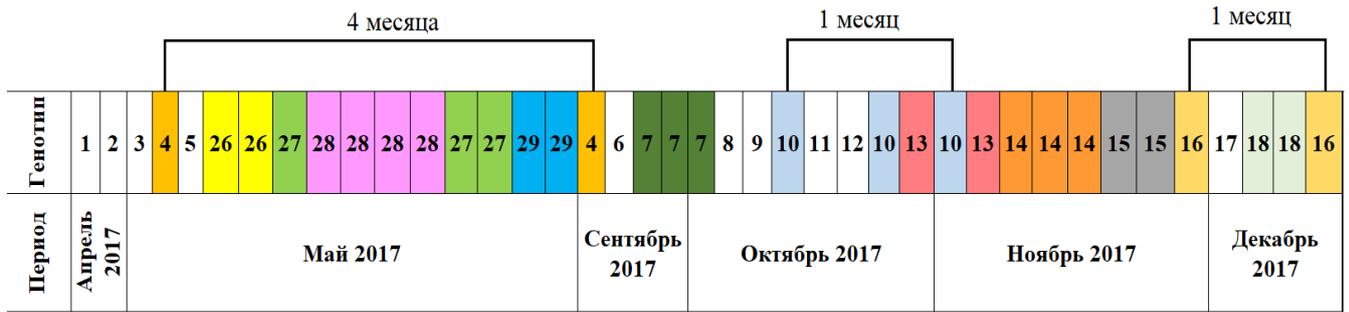


Рисунок 10. Пример оценки периода циркуляции штаммов АРЕС на птицефабрике.

3.2.1. Филогенетическая группа, бактериоциногенность и лизогения

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, А, С и F – по 2 (7,14%) штамма, D – 1 (3,57%) штамм. Не идентифицированными оказались 5 (7,14%) культур (рис. 11).

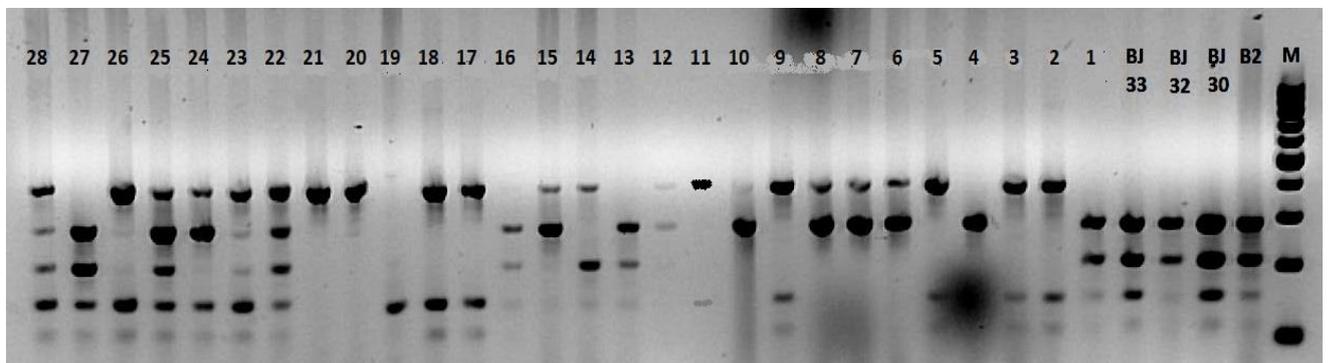


Рисунок 11. Электрофореграмма результатов мультиплексной ПЦР для определения филогенетической группы (М – маркер молекулярных масс 100 бр; В2, ВJ30, ВJ32, ВJ33 – контрольные штаммы для филогруппы В2; 1-28 – исследуемые культуры).

Продукция бактериоцинов обнаружена у 20 (71,43%) АРЕС. Корреляции между филогенетической группой и продукцией бактериоцинов отсутствовали. Различия в биопленкообразующей способности между бактериоциногенными и

небактериоциногенными штаммами также не были обнаружены. Присутствие бактериофага было обнаружено только в двух штаммах из коллекции (7,14%).

3.2.2. Неспецифическая и специфическая адгезия и биопленкообразующая способность

Штаммы АРЕС проявляли разную адгезивную активность по отношению к абиотическим поверхностям (табл. 9). Наименьший показатель адгезии к полистиролу (гидрофобная поверхность) составил 0%, а наибольший – 34,14%±28,64%. Для гидрофильной поверхности стекла значения были 0% и 40,10%±29,86%, соответственно. Корреляционная связь между двумя показателями носила средний характер и составила $r_s=0,53$, 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.

Таблица 9

Показатели неспецифической и специфической адгезии штаммов АРЕС

Штамм	Адгезия					
	к гидрофобной поверхности, %		к гидрофильной поверхности, %		к эритроцитам	
	М	SD	М	SD	человека ИАМ	куриц ИАМ
4	0	0	8,71	5,33	2,60	3,66
5	1,11	0,54	0	0	1,85	2,47
7	0	0	0	0	1,79	2,25
9	3,57	2,87	0	0	2,27	1,93
11	0	0	4,86	2,12	1,64	2,12
12	3,29	1,15	1,18	0,54	1,20	5,04
15	25,26	24,99	28,84	20,84	1,17	1,85
16	6,07	5,11	0	0	2,0	2
17	4,57	3,07	0	0	2,34	2
20	0	0	2,09	1,04	2,15	2,35
21	11,42	9,32	0	0	1,0	1,79
24	2,37	1,19	0	0	1,1	1,75
26	23,37	14,61	0	0	2,23	1,76
29	8,90	5,87	0	0	2,22	2,94
31	1,33	0,43	0	0	2,5	2,72

Продолжение таблицы 9

33	0	0	0,15	0,07	1,47	3,82
35	18,55	10,0	6,33	2,31	2	1,56
36	4,54	2,25	0	0	1,47	2,16
37	23,50	12,14	40,10	29,86	2,8	3,4
41	18,19	18,01	8,91	4,17	1,5	1,89
42	0	0	0	0	1,85	3,58
43	0,59	0,06	14,32	13,56	1,71	2,13
45	2,87	1,92	5,32	5,02	1,88	2,12
46	13,48	6,75	0,89	0,90	2	2,26
11/16	1,02	0,03	0	0	1,86	6,05
13/16	15,01	4,85	20,77	18,69	3,33	2,62
14/16	34,14	28,64	7,50	6,32	1,67	6
20/16	0	0	0	0	4	3,2

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. Уровень специфической адгезии к эритроцитам человека в выборке в среднем составил $Me: 1,87$, $Q1-Q3: 1,60-2,24$, а для куриных эритроцитов – $Me: 2,35$, $Q1-Q3: 2,0-3,44$, и эти различия были статистически значимыми (W -test: $p=0,006$). Преобладающая часть штаммов отнесена к низкоадгезивной группе независимо от типа использованных эритроцитов (60,71% культур в тесте с куриными эритроцитами и 85,71% культур – с человеческими эритроцитами), при этом корреляции между показателями ИАМ не выявлено ($r_s=0,046$). Достоверной связи между уровнем адгезии к клеткам крови и к абиотическим материалам не было обнаружено. Также не были связаны между собой уровень адгезии (верно для всех типов) и биопленкообразующая способность АРЕС. Принадлежность к филогенетической группе В1 не определяла преимущества к какому-либо типу адгезии для штаммов.

Биопленки формировали 42,85% штаммов *E. coli*, и их массивность значительно варьировала внутри исследуемой выборки. Наименьший показатель биомассы составил $0,121 \pm 0,095$ ед. ОП, а наибольший – $1,158 \pm 0,473$ ед. ОП. Связь между формированием массивной биопленки и принадлежностью штамма к

филогруппе В1, с которой принято ассоциировать высокопатогенные штаммы, не была обнаружена.

3.2.3. Чувствительность к антибактериальным веществам

Изученные штаммы имели высокий уровень резистентности к антимикробным препаратам (табл. 10). Практически у всех исследованных культур АРЕС выявлена устойчивость к тетрациклину, налидиксовой кислоте и триметоприм-сульфаметоксазолу. 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%). При этом 64,32% культур показали устойчивость более чем к трем антибиотикам, 53,66% – к пяти и более препаратам, и 10,78% – к восьми антибиотикам.

Так как фторхинолоносодержащие препараты применяются в птицеводческом хозяйстве на протяжении длительного периода времени, штаммы АРЕС были распределены в две группы: устойчивые и чувствительные к ципрофлоксацину. Ципрофлоксацинорезистентные *E. coli* были чаще полиантибиотикорезистентными (U -test: $p=0,023$). Кроме того, в большинстве случаев они продуцировали колицины (78,57%), были устойчивы не менее чем к восьми бактериоцинам (78,57%) и имели высокую удельную биопленкообразующую способность (42,85%). Связи между принадлежностью к филогруппе В2, которая ассоциируется с патогенным потенциалом *E. coli*, и изученными свойствами не выявлено как в отдельно сравниваемых группах, так и в общей выборке АРЕС.

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. Бактериоцины с пороформирующим механизмом (колицины А, К, N, S4, E1, В, Ia, Ib, D, M),

показали очень низкую эффективность действия в отношении АРЕС, устойчивость к ним обнаружена более чем у 90% штаммов (табл. 11), за исключением колицина К (53,61% устойчивых культур). Колицины с ДНКазной и РНКазной активностью (колицины Е2, Е3, Е4, Е5, Е6, Е7, Js) оказались более эффективны: устойчивость к ним ограничивалась 60% культур, а к колицину Е4 были нечувствительны только 25% штаммов. Микроцины с разными механизмами киллинга бактериальных клеток проявляли наименьший антагонистический потенциал в отношении птичьих *E. coli*. Практически все культуры АРЕС имели резистентность к протестированным микроцинам: к В17 – 78,64%, к V – 96,49%, С7 – 100% штаммов.

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. Чувствительность *E. coli* к бактериоцинам не связана с филогруппой или продукцией собственных бактериоцинов. Среди бактериоциногенных штаммов 60% оказались устойчивыми к 5 и более антибиотикам, а среди небактериоциногенных – только 37,57%. При этом устойчивость к бактериоцинам в обеих группах примерно одинакова (55% и 50% устойчивых к 15 и более бактериоцинам штаммов, соответственно).

Профили чувствительности штаммов АРЕС к антимикробным агентам

Агент	Ампициллин	Ципрофлоксацин	Левифлоксацин	Цефотаксим	Цефтазидим	Амикацин	Гентамицин	Тетрациклин	Гриметоприм-сульфаметоксазол	Колицин А	Колицин К	Колицин N	Колицин S4	Колицин E1	Колицин E2	Колицин E3	Колицин E4	Колицин E5	Колицин E6	Колицин E7	Колицин Js	Колицин В	Колицин Ia	Колицин Ib	Колицин D	Колицин M	Микроцин В17	Микроцин С7	Микроцин V	
Штамм АРЕС																														
4																														
5																														
7																														
9																														
11																														
12																														
15																														
16																														
17																														
20																														
21																														
24																														
26																														
29																														
31																														
33																														
35																														
36																														
37																														
41																														
42																														
43																														
45																														
46																														
11/16																														
13/16																														
14/16																														
20/16																														

Примечание. Серые ячейки – штамм устойчив, белые ячейки – штамм чувствителен.

3.2.4. Гены белков, обеспечивающих адгезию

Исследованные штаммы АРЕС в 92,8% случаев несли ген *fimH*, кодирующий фимбриальный адгезин. Двадцать один штамм (75%) АРЕС имели 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%. Уроспецифические белки, кодируемые такими генами как *papC*, *papGII/III*, *sfaDE*, *afa/draBC*, не были найдены в представленной выборке. Также ген *eaeA*, обеспечивающий адгезию и инвазию штаммов энтеропатогенной (ЕРЕС) и энтерогеморрагической (ЕНЕС) *E. coli*, не был обнаружен ни в одном из штаммов.

Среди других генов, косвенно обеспечивающих прикрепление бактериальных клеток к биотическим и абиотическим поверхностям, у 82,1% штаммов встречался ген капсулообразования *kpmST*, а у 71,4% – ген белка наружной мембраны с протеазной активностью *ompT*.

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). В целом, моновалентный адгезивный генотип обнаружен в трех (10,71%) случаях, два гена выявлены у одного штамма, три в любой комбинации – у шести (21,43%). Множественные гены адгезии (4 и более) детектированы в шестнадцати (57,14%) случаях, два штамма не имели ни одного гена (рис. 12).

Анализ связи филогруппы и факторов адгезии показал, что все штаммы, принадлежащие к филогруппе В1, имели более трех генов адгезии одновременно. Однако достоверных различий по частоте встречаемости конкретных генов в данной филогруппе не было обнаружено.

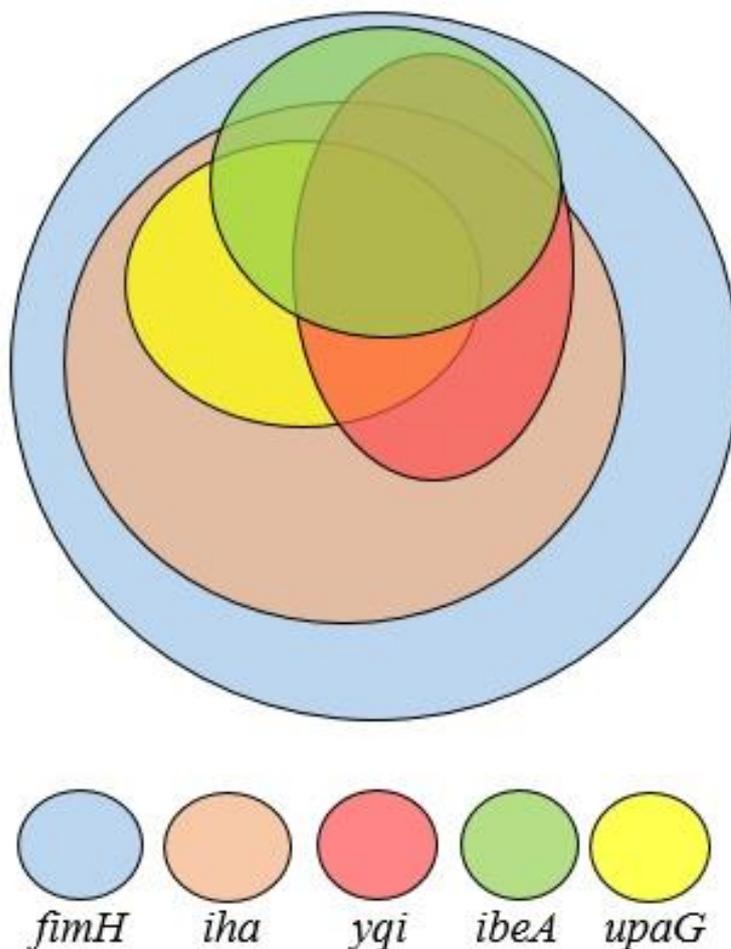


Рисунок 12. Варианты комбинаций генов адгезинов среди штаммов APES.

Были получены достоверные отличия в случае неспецифической адгезии: штаммы с профилем *fimH*⁺, имели более высокий уровень адгезии к полистиролу, а *ibeA*-положительные штаммы – к стеклу, чем штаммы без данных генов (табл. 11).

Штаммы, отнесенные к группе высокобиопленкообразующих, в 100% случаев имели три и более генов адгезинов, в то время как штаммы, образующие низкую биопленку – в 68,75%. Несмотря на это, достоверных отличий в массивности биопленки, образуемой двумя группами штаммов (имеющие менее трех генов vs имеющие три и более генов) не было обнаружено.

Специфическая и неспецифическая адгезия с учетом генотипа

Группа штаммов	Уровень специфической адгезии, ИАМ		Уровень неспецифической адгезии, %	
	к эритроцитам человека	к эритроцитам куриц	к гидрофобной поверхности	к гидрофильной поверхности
<i>fimH</i> ⁺	1,87 (1,53-2,22)	2,25 (1,96-3,30)	4,05 (0,70-14,63)*	0,07 (0,00-6,08)
<i>fimH</i> ⁻	2,22 (2,03-2,41)	3,06 (2,76-3,36)	0,55 (0,27-0,83)	4,35 (2,17-6,53)
<i>yqi</i> ⁺	2,00 (1,64-2,27)	2,16 (2,00-3,30)	3,29 (0,00-6,07)	0,15 (0,00-5,32)
<i>yqi</i> ⁻	1,85 (1,42-2,11)	2,54 (1,95-3,48)	8,90 (1,06-14,24)	0,00 (0,00-8,10)
<i>uraG</i> ⁺	1,79 (1,47-2,44)	2,12 (1,91-2,44)	3,29 (0,29-8,74)	0,00 (0,00-3,48)
<i>uraG</i> ⁻	2,22 (1,86-2,80)	3,20 (2,62-3,66)	8,90 (1,02-18,54)	6,33 (0,00-8,71)
<i>iha</i> ⁺	1,85 (1,47-2,15)	2,12 (1,87-2,62)	3,29 (0,00-11,42)	0,00 (0,00-4,86)
<i>iha</i> ⁻	2,22 (1,85-2,70)	3,40 (2,78-4,83)	8,90 (1,06-19,26)	7,50 (0,00-14,74)
<i>ibeA</i> ⁺	1,78 (1,62-2,40)	3,20 (2,03-3,49)	10,88 (0,44-23,94)	8,20 (0,00-17,95)*
<i>ibeA</i> ⁻	1,94 (1,59-2,00)	2,30 (2,00-3,82)	3,08 (0,76-14,24)	0,00 (0,00-5,83)

Примечание. * – уровень достоверности $p < 0,05$ (*U*-test).

3.2.5. Гены белков, обеспечивающих вирулентный потенциал штаммов

Среди вирулентных генов, наиболее часто характеризующих патотип АРЕС, самым распространённым был ген специфического птичьего гемолизина *hlyF* (82,1%), 75% штаммов были носителями гена *subAB*, кодирующего цитотоксин субтилазы, характерный для шига-токсин 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 энтероаггративного 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*). Два штамма (7,14%) имели только один из представленных генов, тринадцать (46,42%) – от трех до пяти генов одновременно в любой комбинации и тринадцать штаммов (46,42%) – шесть и более генов одновременно.

Среди штаммов АРЕС были широко распространены гены синтеза бактериоцинов. Самым часто детектируемым оказался ген микроцина B17 (75,0%), половина исследуемых штаммов имела ген колицина ColM. В 21,4% был обнаружен ген микроцина J25, а в 17,9% – колицина ColB. С равной частотой 10,7% встречались гены колицина ColE1 и микроцина MccV, 7,1% штаммов имели ген колицина ColK. Интересно отметить, что ни один штамм не являлся носителем гена колицина ColE7. Один штамм имел одновременно 7 генов бактериоцинов, один штаммов – пять генов, два – четыре гена, два – три гена, десять штаммов – два гена одновременно.

Специфическая амплификация к гену *bla*_{ТЕМ} выявлена у 20 (71,43%) штаммов, вторым по частоте встречаемости оказался *bla*_{СТХ-М} (n=15; 53,57%) и только в одном случае определен *bla*_{SHV}. Гены сериновых бета-лактамаз классов С (*bla*_{СМУ}) и D (*bla*_{ОХА}) не обнаружены ни у одного из исследованных штаммов. В восьми случаях детектированы фрагменты интегронов, размер которых варьировал от 800 до 2000 п.н. Не выявлено связи наличия генов продукции БЛРС с принадлежностью штамма к какой-либо филогруппе.

Гены общей патогенности (*fimH*, *kpmST*, *ompT*, *iroN*) в выборке встречались чаще, чем гены АРЕС (*hlyF*, *yqi*, *iss*, *iutA*) (*F*-test: p=0,029) или UPEC (*F*-test: p<0,01), АРЕС встречались чаще, чем UPEC (*papC*, *papGII*, *papGIII*, *cnf1*, *upaG*, *usp*, *hlyA*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *ibeA*) (*F*-test: p<0,01), гены IPEC (*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 UPEC (*F*-test: p<0,01) (рис. 13).

По результатам кластерного анализа наличия генов патогенности были выделены три условных группы штаммов АРЕС (рис. 14): патогенные для птиц и

человека (наличие одновременно 2-6 генов, связанных с АРЕС, и 2-6 генов, связанных с ЕхРЕС или IРЕС; 24 штамма), патогенные для птиц и не патогенные для человека наличие 2-6 генов, связанных с АРЕС, и гена 0-1, связанного с ЕхРЕС или IРЕС; 2 штамма) и непатогенные (ген 0-1 из любой группы, АРЕС, ЕхРЕС, IРЕС, 2 штамма). Штаммы с филогруппой В1 в 85,7% были отнесены в первую группу.

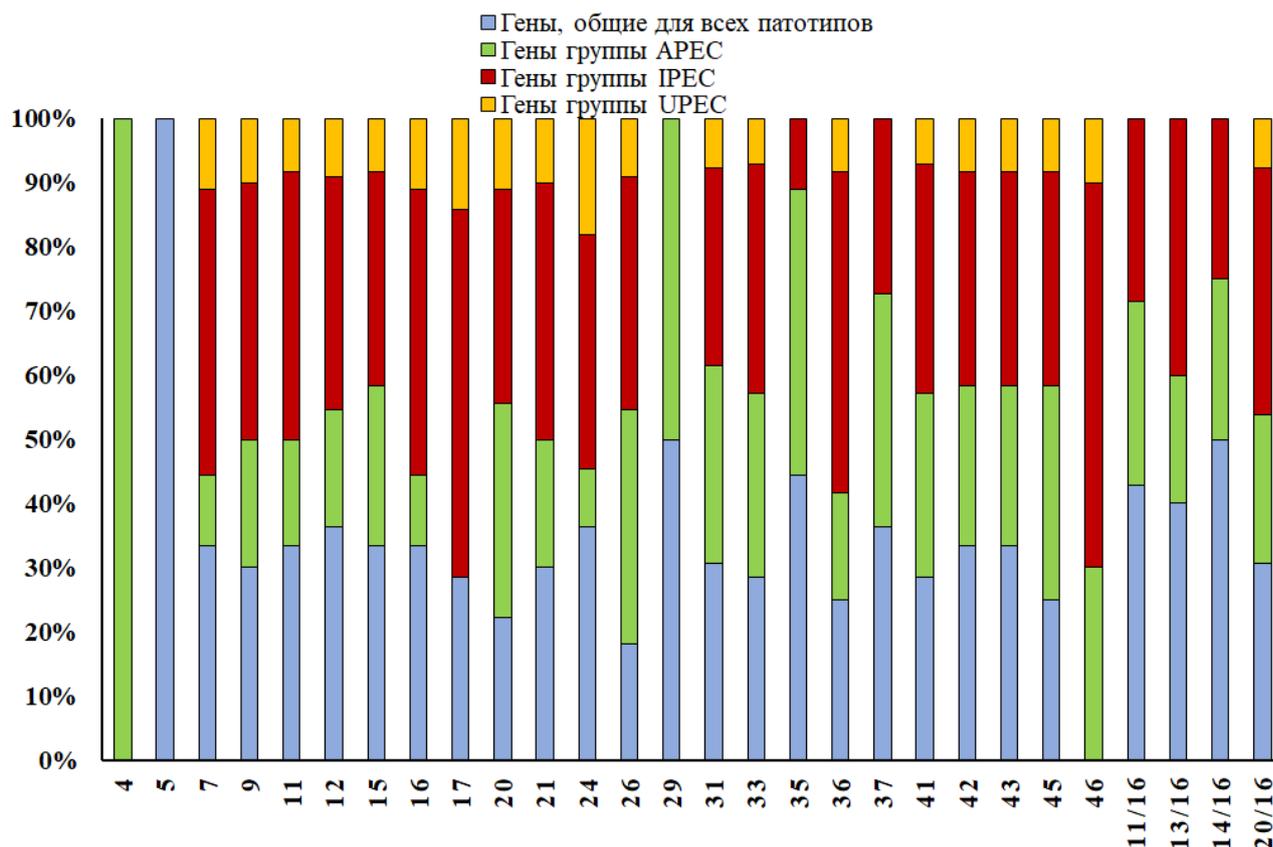


Рисунок 13. Соотношение генов, общих для всех патотипов, АРЕС, IРЕС и UРЕС в штаммах коллекции АРЕС.

Группа штаммов, выделенная как высокопатогенные для птиц и человека, характеризовалась высокими частотами встречаемости не только генов вирулентности, но и генов БЛРС, таких как СТХ (57,1% штаммов) и ТЕМ (71,4% штаммов) типов. Кроме того, 42,8% представителей данной группы имели ген *traJ* (60% от общей частоты встречаемости данного гена в выборке) и 28,5% – участки интегронов 1 класса (75% от общей частоты встречаемости в выборке).

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

Представленные в этой главе данные интересны в нескольких аспектах. С одной стороны, сформированы коллекции реципиентных штаммов UPEC и АРЕС, подробно изучены их фенотипические и молекулярно-генетические особенности, что позволяет перейти к решению одной из основных задач исследования – охарактеризовать зависимость конъюгативного переноса плазмиды рОХ38 в клетки штаммов *E. coli* дикого типа от биологических свойств реципиентов (Глава 4). С другой – проведенный сравнительный анализ фено- и генетических профилей двух групп штаммов выявил высокий зоонозный потенциал АРЕС, что ставит проблему циркуляции эшерихий на сельскохозяйственных предприятиях на медицинский уровень. Кроме того, последние оказались носителями множественных детерминант резистентности и были устойчивыми к большому числу бактериоцинов, что диктует необходимость разработки и апробации новых профилактических и лекарственных препаратов направленного действия на предприятиях птицеводческого направления. Интересным также является тот факт, что среди штаммов АРЕС не было обнаружено носителей гена синтеза колицина ColE7, который используется в исследуемой нами конъюгативно-опосредованной антибактериальной системе, что в том числе определяет перспективность ее изучения.

ГЛАВА 4. КОНЬЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС В КЛЕТКИ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*

Передача признака при внутривидовом скрещивании различных штаммов *E. coli* может существенно различаться в зависимости от биологических свойств реципиентного штамма. Показано, что строение белков наружной мембраны и липополисахарида имеет значение для переноса F-плазмид (Perez-Mendoza, Cruz, 2009). Снижение частоты конъюгативного переноса наблюдалось, если клетка-реципиент уже содержит F-фактор, в этом случае TгаТ и TraS обуславливают так называемое поверхностное исключение (surface exclusion) и мешают клетке стать реципиентом (Arutyunov, Frost, 2013). Эффективность конъюгации может зависеть не только от свойств самого реципиента, но и от условий проведения конъюгации (срока экспозиции, температурного режима, характера культуры – свободноплавающие или сессильные клетки, взаиморасположения клеток донора и реципиента в биопленке, характера адгезируемой поверхности и др.). Выбор представленных экспериментальных моделей для оценки частоты конъюгации обусловлен тем, что условия окружающей среды для бактерий, в том числе *in vivo*, чаще определяются их местом в биопленочном сообществе. Кроме того, в прикрепленном состоянии клеток конъюгативный перенос может внести дополнительную динамику за счет усиленной экспрессии факторов слипания во время передачи плазмиды и способствовать формированию биопленки новыми хозяевами. Учитывая, что в сессильные клетки функционируют в отличных от планктона условиях, изучение этого вопроса может дать дополнительную информацию о процессе конъюгации. Для *E. coli* более типично функционирование в качестве составной части полимикробного сообщества, что делает исследования конъюгативного переноса в присутствии клеток бактерий других видов или их экзометаболитов актуальным. Количественная оценка эффекта присутствия бактерий-ассоциантов на перенос генетического материала, в том числе с помощью конъюгативных плазмид также важна и для получения

информации об ограничивающих факторах распространения устойчивости к антибиотикам.

4.1. Конъюгативный перенос в клетки штаммов уропатогенной *E. coli*

Оценку эффективности переноса плазмиды проводили в стандартной модели – плоскодонном полистироловом планшете. Частота переноса плазмиды pOX38:Sm в уропатогенные штаммы *E. coli* в условиях планктонного роста в течение 6 ч варьировала от $1,28E-05 \pm 1,03E-05$ до $1,26E+00 \pm 2,05E-01$ (табл. 12). Минимальная частота конъюгации в биопленке была отмечена у штамма R33 ($6,03E-05 \pm 1,74E-05$), а максимальная ($7,98E-01 \pm 1,57E-01$) – у R32, как и в планктонной модели. 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 в штаммы UPEC была значительно выше в условиях биопленки, чем в планктоне (W -test: $p=0,015$).

Таблица 12

Частота конъюгации в планктоне и биопленке через 6 ч экспозиции

Штамм	Частота конъюгации				Биомасса, ед. ОП (570 нм)	
	Планктон		Биопленка		Смешанная биопленка	
	М	SD	М	SD	М	SD
R11	1,88E-02	2,38E-02	1,70E-02	1,90E-02	0,100	0,016
R13	4,35E-03	4,84E-03	6,63E-03	1,90E-03	0,088	0,018
R14	7,29E-02	6,87E-02	1,43E-01	1,42E-01	0,091	0,020
R28	5,40E-05	7,46E-05	3,71E-01	5,97E-01	0,228	0,038
R29	1,12E-04	1,36E-04	2,14E-01	3,12E-01	0,111	0,010
R30	4,74E-01	4,23E-01	3,32E-01	4,49E-01	0,173	0,016
R31	8,45E-02	1,29E-01	2,05E-02	1,47E-02	0,140	0,017
R32	1,26E+00	2,05E-01	7,98E-01	1,57E-01	0,181	0,018
R33	2,67E-04	4,00E-04	6,03E-05	1,74E-05	0,810	0,055
R34	1,33E-04	1,73E-04	2,70E-04	3,72E-04	0,781	0,051
R35	7,21E-04	3,40E-04	4,03E-03	1,31E-03	0,179	0,048
R36	1,49E-04	1,87E-04	3,84E-04	3,94E-04	1,424	0,148

Продолжение таблицы 12

R37	4,54E-03	5,41E-03	1,15E-02	1,61E-02	0,112	0,030
R38	4,90E-03	6,32E-03	1,43E-01	1,01E-01	0,111	0,009
R40	3,54E-04	2,87E-04	8,75E-03	9,79E-03	0,457	0,053
R41	1,02E-04	7,71E-05	5,37E-04	3,96E-04	0,197	0,024
R42	2,50E-03	1,44E-03	7,09E-03	3,26E-03	0,390	0,092
R43	1,09E-01	9,84E-02	5,36E-01	3,33E-01	0,126	0,043
R44	5,61E-05	8,81E-05	2,87E-02	4,02E-02	0,106	0,017
R45	9,69E-05	6,79E-05	2,20E-04	1,35E-04	0,998	0,084
R48	8,90E-05	3,13E-05	2,23E-04	1,98E-04	0,126	0,015
R49	4,60E-03	6,64E-03	6,63E-03	4,62E-03	0,126	0,016
R50	3,97E-02	6,38E-02	5,68E-01	4,64E-01	0,110	0,020
R52	2,34E-05	3,86E-05	3,77E-04	4,43E-04	0,413	0,057
R53	2,76E-02	2,52E-02	1,54E-02	1,17E-02	0,107	0,003
R54	1,07E-04	1,15E-04	9,91E-05	6,03E-05	0,537	0,063
R55	1,28E-05	1,03E-05	1,43E-04	6,03E-05	0,171	0,022
R58	2,40E-04	3,07E-04	3,46E-02	5,66E-02	0,119	0,014
R59	2,27E-05	1,41E-05	2,86E-01	4,95E-01	0,759	0,032

Корреляция между частотой конъюгации и биомассой смешанной биопленки была отрицательной и составила $r_s = -0,41$ для планктона и $r_s = -0,44$ 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:Сm 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. 15). Интересным оказался тот факт, что штаммы, формирующие менее массивные биопленки также имели более высокую частоту конъюгации и в планктоне (U -test: $p = 0,036$).

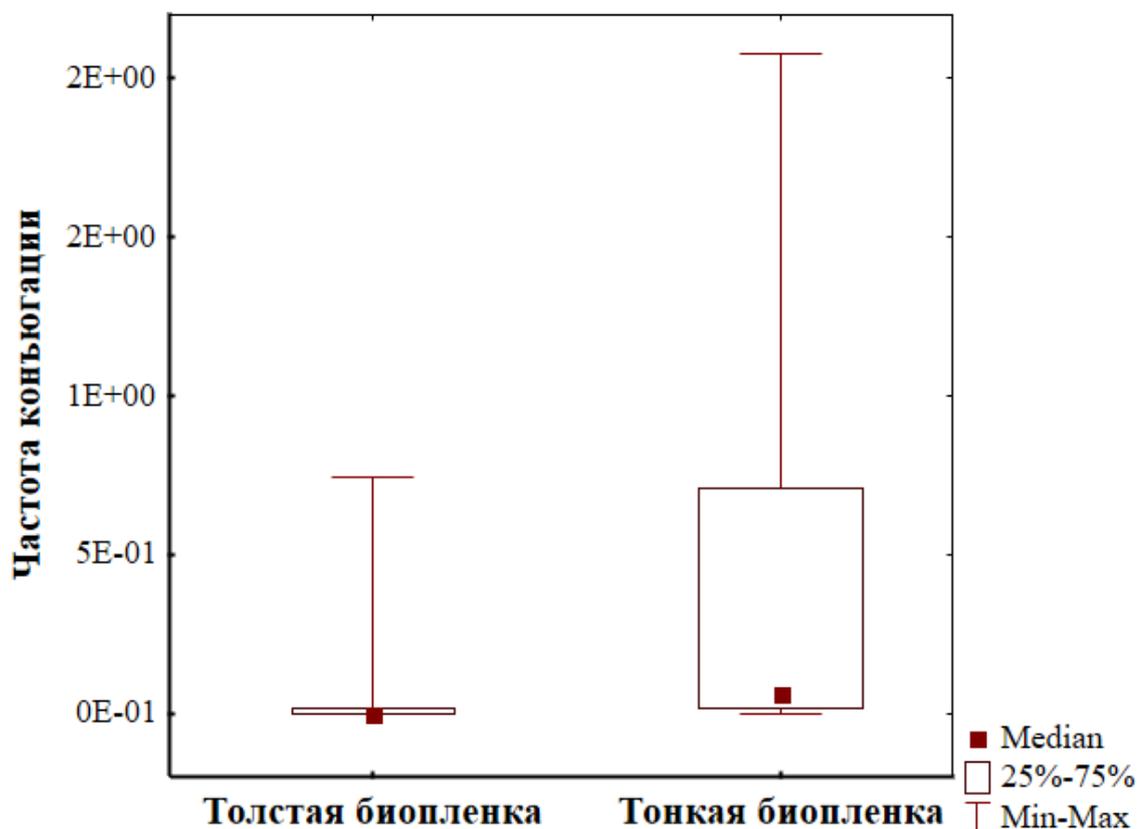


Рисунок 15. Частота конъюгации в толстой и тонкой биопленках.

С учетом того, что корреляция между биомассой моновидовой биопленки реципиентов и смешанной биопленки реципиента и донора составила $r_s=0,85$, а эффективность переноса в двух моделях коррелировала положительно ($r_s=0,50$), можно предположить, что частота конъюгации зависит от такого свойства реципиентов как биопленкообразующая способность. Кроме того, частота конъюгации в толстой биопленке была ниже из-за изменённого соотношения клеток донора и реципиента (рис. 16). В первом варианте на 1 клетку реципиента приходилось 0,1 клеток донора, а в тонкой биопленке – 0,6 клеток донора на 1 клетку реципиента.

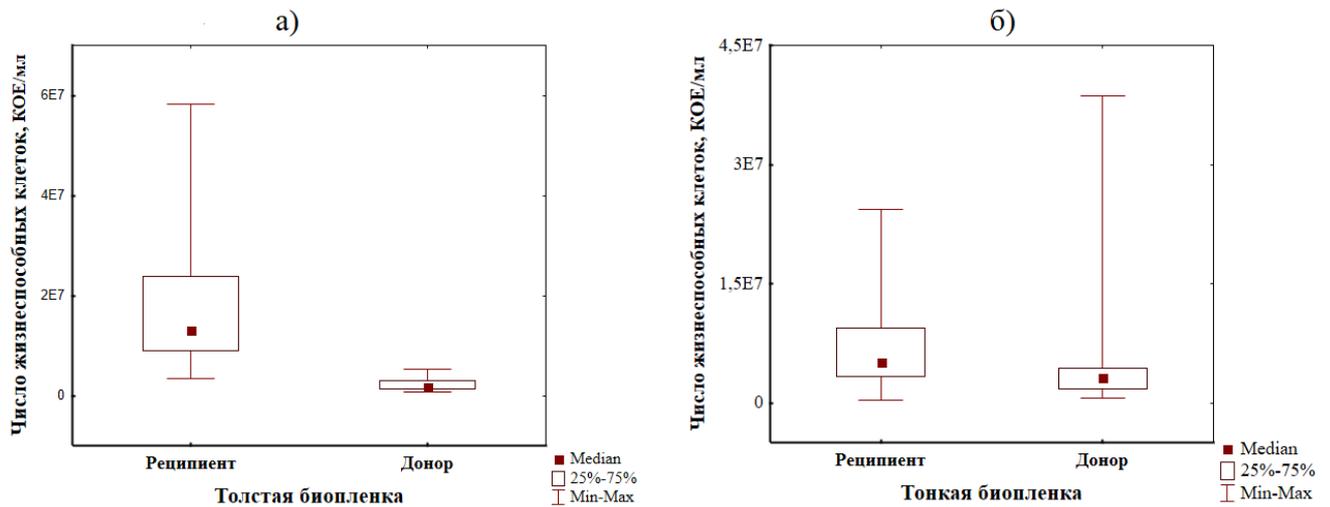


Рисунок 16. Соотношение клеток реципиента и донора в толстых биопленках (а) и тонких биопленках (б).

Принадлежность UPEC к филогруппе B2 не была ассоциирована с высокой или низкой частотой горизонтального переноса. Для штаммов, относящихся к группе B2, средние показатели эффективности конъюгативного переноса составили Me: 2,54E-04, Q1-Q3: 1,04E-04-1,63E-03 и Me: 5,33E-03, Q1-Q3: 2,00E-04-1,99E-02 в планктоне и биопленке, соответственно. Штаммы, у которых была идентифицирована любая другая филогруппа, имели следующие значения Me: 4,54E-03, Q1-Q3: 1,02E-04-3,97E-02 в планктоне и Me: 2,05E-02, Q1-Q3: 6,63E-03-2,86E-01 в биопленке.

Продукция бактериоцинов некоторыми штаммами-реципиентами не оказывала влияния на частоту конъюгации ни в одной из моделей. В планктонной культуре плазида переносилась с частотой Me: 4,35E-03, Q1-Q3: 1,07E-04-1,88E-02 и Me: 2,54E-04, Q1-Q3: 1,01E-04-1,04E-02 в группе штаммов, продуцирующих и не продуцирующих бактериоцины, соответственно. В биопленках частота конъюгации также не различалась в двух группах Me: 2,05E-02, Q1-Q3: 6,63E-03-2,14E-01 vs Me: 6,86E-03, Q1-Q3: 3,50E-04-6,17E-02 (штаммы-продуценты бактериоцинов против штаммов-непродуцентов). Кроме того, число жизнеспособных клеток реципиента и донора для каждого штамма было

сопоставимо в обеих моделях, то есть бактериоцины, продуцируемые UPEC, не угнетали рост донорного штамма N4i pOX38.

Частота конъюгации в штаммы, содержащие и не содержащие бактериофаг, также не различалась. В планктоне перенос проходил с частотой Me: 2,66E-03, Q1-Q3: 5,63E-04-1,04E-02 в группе лизогенных штаммов и Me: 2,67E-04, Q1-Q3: 1,02E-04-1,88E-02 в группе не лизогенных штаммов. В биопленке UPEC, содержащие и не содержащие бактериофаг, получали плазмиду с частотой Me: 5,33E-03, Q1-Q3: 3,08E-03-8,82E-03 и Me: 1,70E-02, Q1-Q3: 3,84E-04-2,14E-01, соответственно.

Штаммы, имеющие множественную устойчивость к антибиотическим агентам (к 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: $p=0,043$) (рис. 17), коэффициент корреляции составил $r_s=0,314$. Усредненные показатели частоты конъюгации составили Me: 3,32E-01, Q1-Q3: 1,43E-01-3,71E-01 для полирезистентных UPEC и Me: 7,92E-03, Q1-Q3: 3,24E-04-3,17E-02 для устойчивых менее чем к 5 препаратам. Продукция БЛРС штаммами UPEC не оказывала влияния на эффективность передачи плазмиды в планктоне или биопленке.

Не было обнаружено значимых связей между наличием у реципиентов какого-либо гена адгезина/вирулентности/продукции бета-лактамаз или их комбинации с частотой конъюгативного переноса.

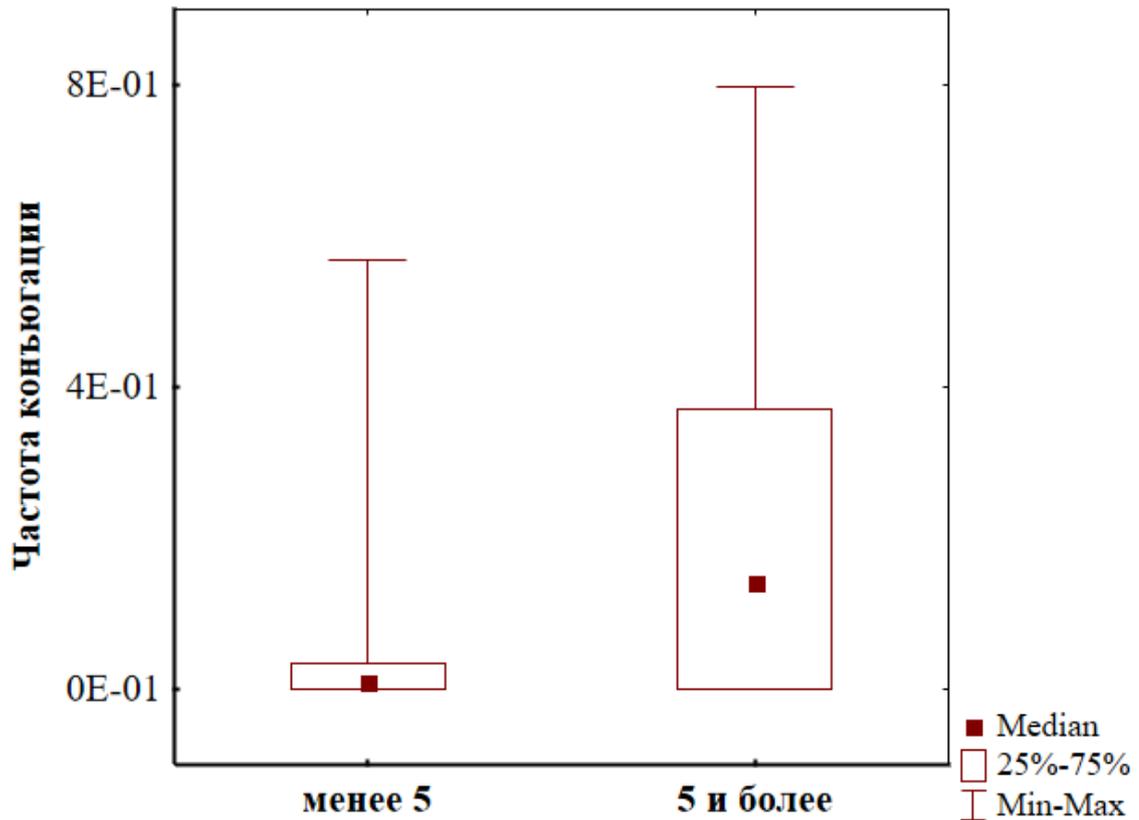


Рисунок 17. Частота конъюгации в биопленке в зависимости от уровня резистентности.

4.1.1. Конъюгативный перенос в зависимости от взаиморасположения клеток в биопленке

Было сделано предположение, что частота конъюгации может зависеть от взаиморасположения клеток донора и реципиента в смешанной биопленке. Для проверки этой гипотезы на примере шести клинических и двух референс-штаммов были сформированы три модели биопленок: при совместном росте D и R (D+R), к сформированной 24-часовой биопленке D добавляли R (D₂₄+R) и наоборот (R₂₄+D).

Минимальные показатели частоты конъюгации во всех моделях отмечены у штамма 1063 ($5,51E-06 \pm 9,54E-06$ в D+R, $7,36E-06 \pm 9,20E-06$ в D₂₄+R, $5,88E-05 \pm 8,52E-05$ в R₂₄+D). Максимальное значение $2,75E-02 \pm 1,05E-02$ было зафиксировано у штамма 1021 в модели R₂₄+D. В среднем частота конъюгации в моделях D+R, D₂₄+R, R₂₄+D была $2,42E-03 \pm 2,81E-03$, $1,40E-03 \pm 1,31E-03$ и $9,37E-03 \pm 7,89E-03$ соответственно (табл. 13, А). Достоверных отличий в эффективности

переноса между тремя моделями не было обнаружено. Биомасса биопленок клинических изолятов на полистироле в смешанной культуре с донором в различных моделях была невысокой и в среднем составила $0,097 \pm 0,013$ ед. ОП в модели D+R, $0,110 \pm 0,015$ ед. ОП в модели D₂₄+R и $0,135 \pm 0,015$ ед. ОП в модели R₂₄+D. Биомасса смешанной биопленки в варианте R₂₄+D была достоверно больше, чем в варианте D+R и D₂₄+R (*W*-test: $p=0,046$ и $p=0,028$ соответственно). Выявлена корреляция частоты конъюгации с биомассой биопленки, образованной на полистироле, во всех моделях: D+R ($r_s=0,37$), D₂₄+R ($r_s=0,61$) и R₂₄+D ($r_s=0,69$).

Таблица 13

Частота конъюгации в биопленках, сформированных клиническими (А) и контрольными штаммами (Б) *E. coli*

Штаммы	Модель		
	D+R	D ₂₄ +R	R ₂₄ +D
А			
50yn	4,97E-05±4,38E-05	5,13E-04±5,22E-04	1,06E-03±1,64E-03
1021	7,68E-03±9,38E-03	5,50E-03±5,12E-03	2,75E-02±1,05E-02
1038	1,94E-03±1,01E-03	1,23E-03±8,48E-04	1,03E-03±5,57E-04
1046	1,42E-03±1,08E-03	7,06E-04±1,01E-03	2,38E-04±1,40E-04
1063	5,51E-06±9,54E-06	7,36E-06±9,20E-06	5,88E-05±8,52E-05
1068	3,43E-03±5,33E-03	4,21E-04±3,24E-04	2,63E-02±3,45E-02
Б			
<i>E. coli</i> K12	2,02E-02±2,44E-02	8,67E-02±1,05E-01	3,70E-02±1,16E-02
<i>E. coli</i> DL82	2,87E-02±7,90E-03	1,04E-01±1,17E-01	4,63E-02±5,12E-02

В контрольных штаммах частота конъюгации для *E. coli* K12 составила $2,02E-02 \pm 2,44E-02$ в модели D+R, $8,67E-02 \pm 1,05E-01$ в модели D₂₄+R и $3,70E-02 \pm 1,16E-02$ в модели R₂₄+D (Табл. 13, Б). Для *E. coli* DL82 частота конъюгации составила $2,87E-02 \pm 7,90E-03$ в модели D+R, $1,04E-01 \pm 1,17E-01$ в модели D₂₄+R и

4,63E-205,12E-02 в модели R₂₄+D. Достоверных отличий в частоте конъюгации между моделями для обоих штаммов не выявлено.

4.1.2. Конъюгативный перенос в биопленках на поверхности урологических катетеров

На рис. 18 представлены внешний вид и 3D-изображения рельефа поверхности катетеров, использованных в работе.

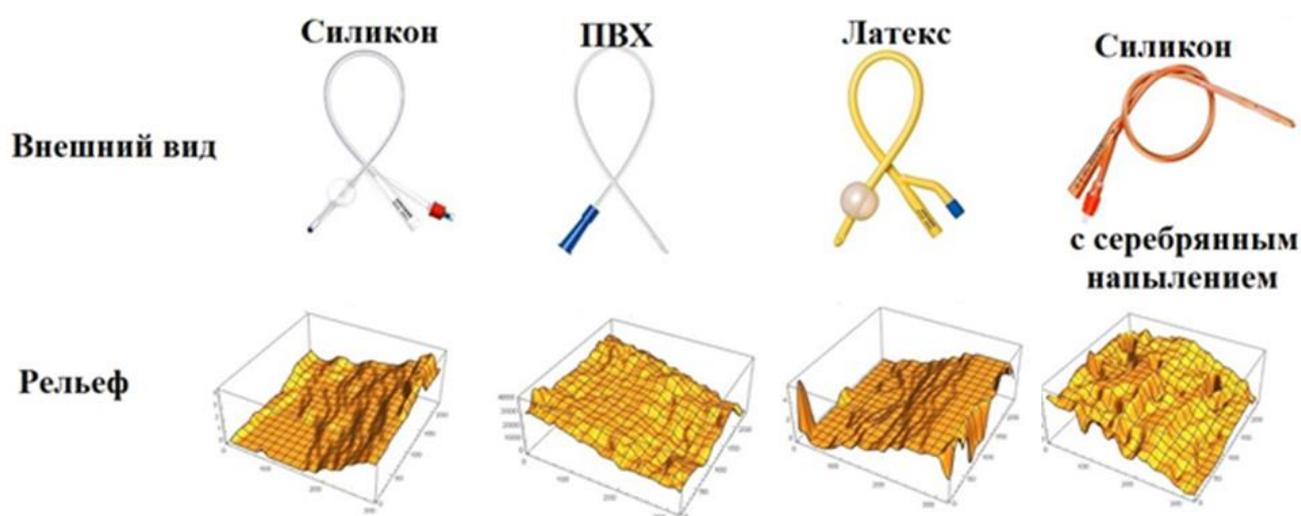


Рисунок 18. Внешний вид и 3D-изображения рельефа поверхности урологических катетеров (использованы фотографии катетеров с сайта <http://www.apexmed.ru>, 3D-изображения получены с помощью оптического цифрового 3D-видео микроскопа Nirox КН-7700 (Япония)).

По результатам теста с адсорбцией нафталина материалы расположились в порядке роста гидрофобности: силикон (11,26 мкг/мл), ПВХ (17,55 мкг/мл), латекс (20,52 мкг/мл), силикон с серебряным напылением (103,95 мкг/мл). Несмотря на существующие стандарты шероховатости имплантационных медицинских материалов, обработка данных микроскопии поверхности позволила получить разные значения параметров шероховатости (Ra): для латекса – 0,457 мкм, для ПВХ – 0,273 мкм, для силикона – 0,160 мкм и силикона с серебряным напылением – 1,560 мкм. Проверка корреляционной зависимости между показателями гидрофобности и шероховатости поверхности выявила сильную

связь ($r_s=0,99$). Это означает, что гидрофобность, являющаяся характеристикой интенсивности молекулярного взаимодействия вещества с водой, в значительной степени зависит и от геометрических параметров материала, в данном случае, от шероховатости.

Биопленки, сформированные на поверхности урологических катетеров штаммами UPEC ($n=6$), 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 (рис. 19). 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.

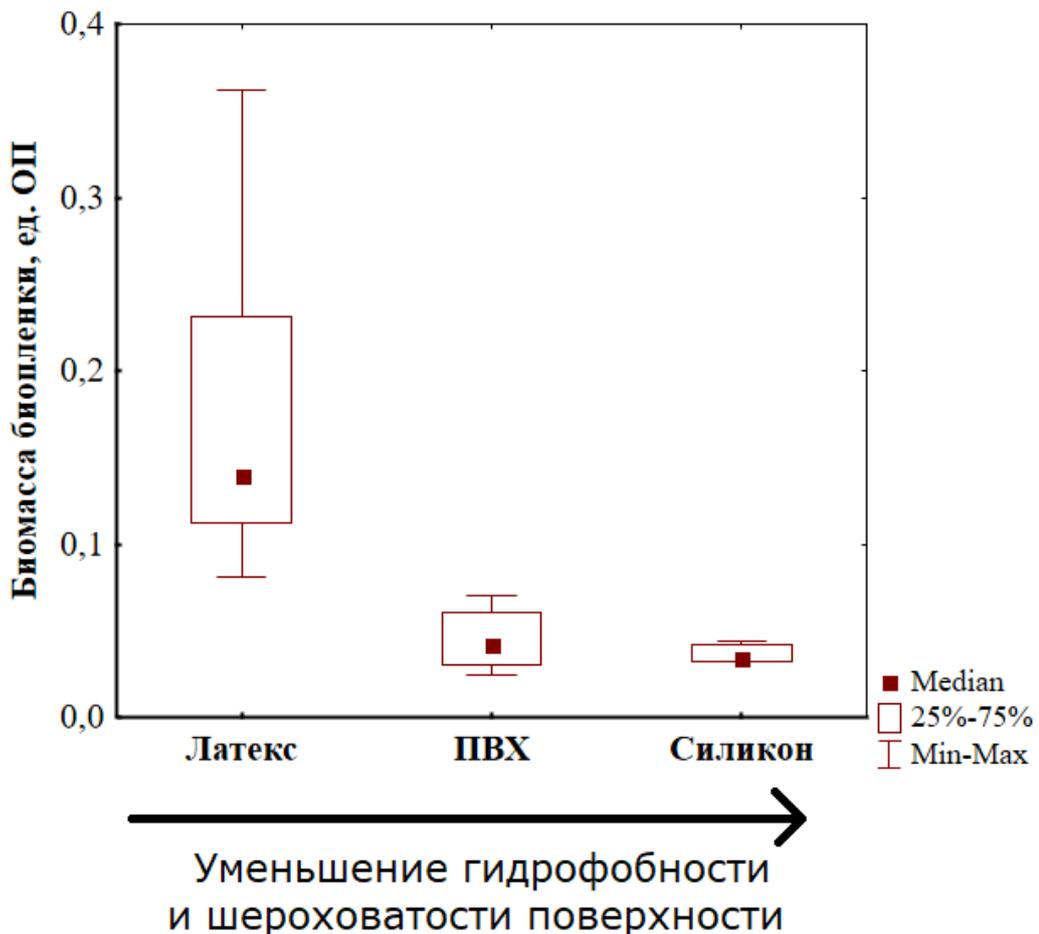


Рисунок 19. Биомасса биопленок *E. coli* на поверхности катетеров.

Биомасса 24-часовых биопленок уропатогенных *E. coli* сильно коррелировала с гидрофобностью и шероховатостью поверхности ($rs=0,75$). То есть более массивные биопленки формировались на относительно более гидрофобных и шероховатых поверхностях (результаты приведены для трех типов катетеров, исключая силикон с серебряным напылением).

При экспозиции фрагментов катетеров в течение суток количество жизнеспособных клеток в биопленках достоверно увеличивалось для всех материалов (W -test: $p=0,001$), за исключением силикона с серебряным напылением, где, напротив, обнаружено снижение числа бактерий по сравнению с шестичасовой колонизацией. После 24 ч число детектированных живых клеток *E. coli* составило Me: $1,04E+05$ КОЕ/мл/см², Q1-Q3: $5,31E+04$ - $2,72E+05$ КОЕ/мл/см² для латекса (против 6 ч W -test: $p<0,001$), Me: $1,44E+05$ КОЕ/мл/см², Q1-Q3: $7,26E+04$ - $4,93E+06$ КОЕ/мл/см² для ПВХ (против 6 ч W -test: $p=0,001$), Me: $1,22E+07$ КОЕ/мл/см², Q1-Q3: $2,33E+05$ - $1,97E+07$ КОЕ/мл/см² для силикона (против 6 ч W -test: $p=0,001$), Me: $1,46E+03$ КОЕ/мл/см², Q1-Q3: $2,84E+02$ - $1,20E+05$ КОЕ/мл/см² для силикона с серебряным напылением (против 6 ч W -test: $p=0,349$). Скорость изменения количества жизнеспособных бактерий (6-24 ч) для латекса и ПВХ оставалась на прежнем уровне ($4,03E+03 \pm 1,27E+02$ и $6,59E+03 \pm 4,95E+02$ КОЕ/см²/ч), для силикона увеличилась на два порядка ($6,77E+05 \pm 3,02E+04$ КОЕ/см²/ч), для силикона с серебряным покрытием была отрицательной ($-1,69E+03 \pm 1,22E+03$ КОЕ/см²/ч) – это объясняется антибактериальным действием серебра. Интересно, что в период 2-6 ч скорость прироста бактерий увеличивалась с ростом параметра шероховатости, а в период 6-24 ч наблюдается ярко выраженная обратная зависимость.

Для гидрофобности поверхности и числа адгезированных через 2 ч клеток была выявлена отрицательная корреляция ($rs= -0,50$), что, скорее всего, определяется степенью гидрофобности клеточной стенки бактерий, то есть, клетки *E. coli* с низкой гидрофобностью эффективнее закрепляются на гидрофильных поверхностях. Еще более сильная обратная зависимость выявлена через 24 ч ($rs= -0,99$).

Отмечено, что в наименее массивной биопленке, образованной на силиконовом катетере, в течение 24 ч сохранялось самое большое число жизнеспособных клеток. Несмотря на то что биомасса биопленок на латексе и ПВХ также различалась, значимых отличий по сохранности бактерий не было выявлено. Кроме того, корреляционная связь между количеством живых клеток и массивностью биопленки составила $r_s = -0,41$. То есть в тонких биопленках формировались более благоприятные условия для бактерий в отношении уровня кислорода, распределения питательных веществ и других факторов.

Штаммы UPEC (при совместном росте с N4i pOX38) формировали на поверхности урологических катетеров биопленки различной толщины. Самая массивная биопленка через 24 ч была образована на катетере из латекса, а на ПВХ – самая тонкая (Табл. 14). Катетер с серебряным напылением не был оценен на предмет подверженности колонизации по показателю массивности биопленки.

Таблица 14

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 серебряным напылением	4	0,00E+00 (2,89E-06-0,00E+00) $p^{1,2,3}$	н.д.

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1-Q3) для 6 штаммов в 3 повторах, p^1 – показатель достоверно ниже, чем на поверхности n ($p < 0,05$), н.д. – нет данных.

Как видно из таблицы 14, 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). 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:Сm 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.

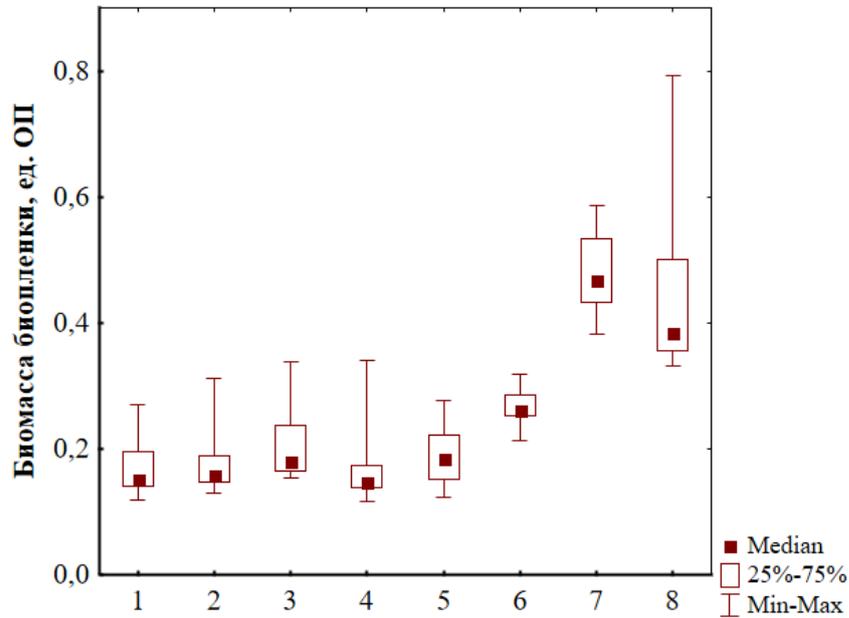
4.1.3. Конъюгативный перенос в смешанных биопленках

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. 19, а). Сравнение между собой дуальных биопленок разных бактерий, показало, что наиболее массивные структуры формировала ассоциация *E. coli*+*P. aeruginosa*, а пленки с *K. pneumoniae* и *E. faecalis* не различались по биомассе. Влияние экзометаболитов данных ассоциантов на формирование 24-часовой биопленки *E. coli* также различалось: 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 *E. coli* (W -test: $p < 0,01$). Следует отметить, что при добавлении к формирующим биопленку эшерихиям клеточной суспензии либо бесклеточных фильтратов синегнойной палочки, обнаружены сходные эффекты стимуляции.

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. 19, 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.

а)



б)

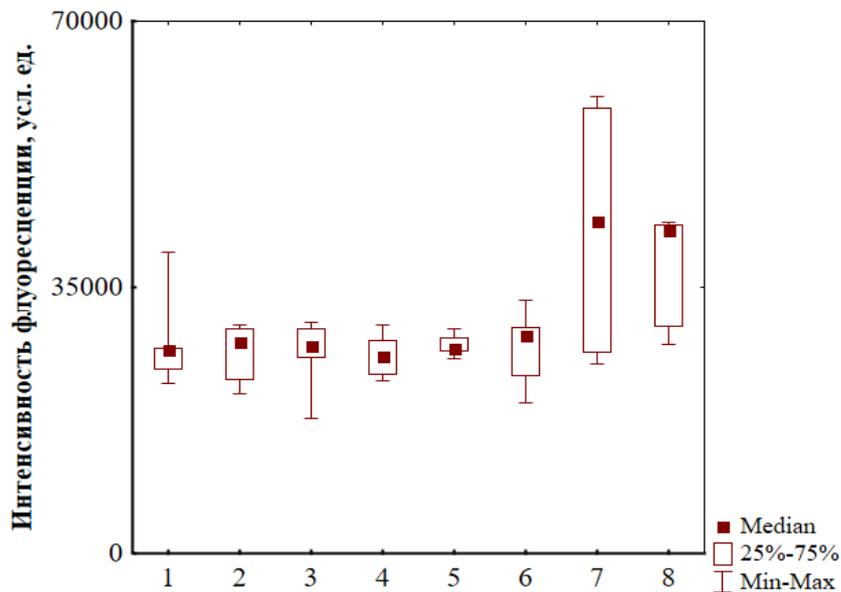


Рисунок 19. Показатели (а) биомассы биопленок и (б) массивности внеклеточного матрикса биопленок *E. coli* при совместном росте с клетками других бактерий и их супернатантами: 1 – DL-82+D, 2 – DL-82+D+LB, 3 – DL-82+D+*K. pneumoniae*_{кл}, 4 – DL-82+D+*K. pneumoniae*_{БКЖ}, 5 – DL-82+D+*E. faecalis*_{кл}, 6 – DL-82+D+*E. faecalis*_{БКЖ}, 7 – DL-82+D+*P. aeruginosa*_{кл}, 8 – DL-82+D+*P. aeruginosa*_{БКЖ}.

Соотношение жизнеспособных клеток бактерий разных видов было неодинаково в дуальных биопленках (рис. 20). Так, если ассоциация *E. coli*+*E. faecalis*, где доля *E. coli* составляла 98,61%, почти не отличалась от контроля, то в вариантах с *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* большая часть клеток от общего микробного числа приходилась на ассоциантов. Необходимо отметить, что несмотря на различающуюся долю эшерихий в исследованных дуальных биопленках, соотношение клеток донора и реципиента существенно не изменялось (данные не представлены).

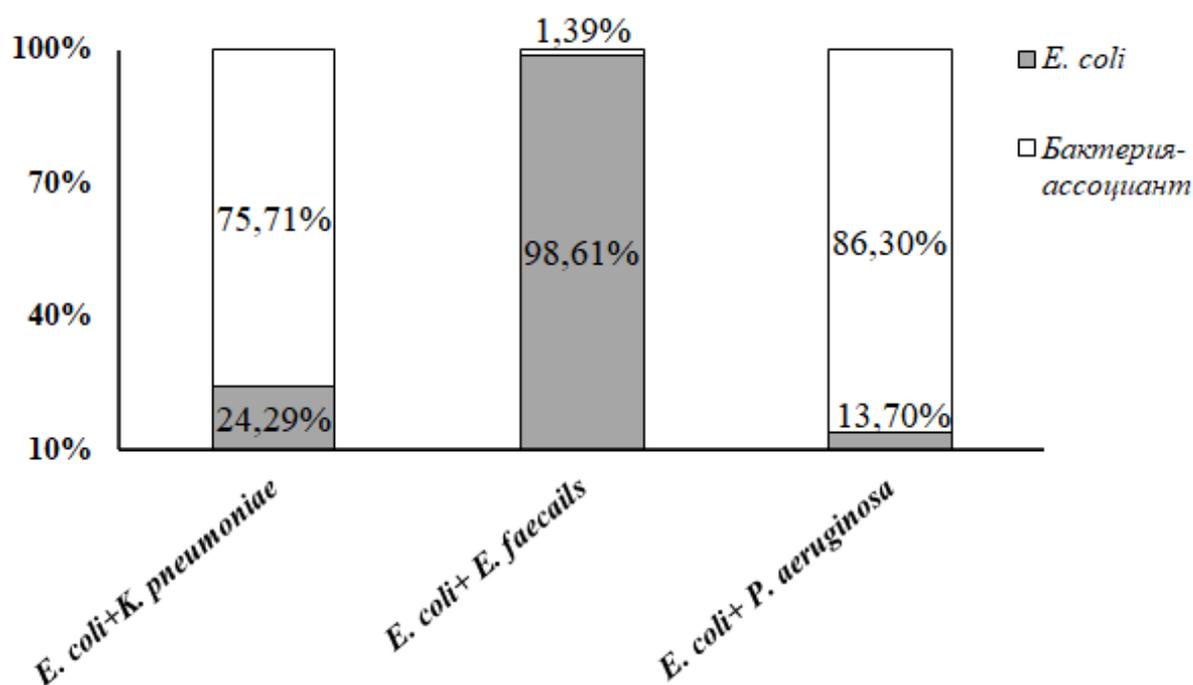


Рисунок 20. Соотношение жизнеспособных клеток *E. coli* и бактерий-ассоциантов в дуальных биопленках.

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. 15). Совместный рост *E. coli* и *K. pneumoniae* значительно не изменял частоту передачи плазмиды внутри биопленки ($2,69E-04 \pm 1,37E-04$), а клетки *E. faecalis* ($1,78E-05 \pm 1,09E-05$) и *P. aeruginosa* ($2,93E-05 \pm 2,33E-05$) снижали 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.

Разница между ассоциациями была отмечена только в вариантах DL-82+D+*K. pneumoniae*_{БКЖ} и DL-82+D+*E. faecalis*_{БКЖ} в сравнении с полным ингибированием переноса в модели DL-82+D+*P. aeruginosa*_{БКЖ}.

Таблица 15

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±2,95E-03	4,72E-04±2,28E-04
DL-82+D+ <i>K. pneumoniae</i>	2	2,69E-04±1,01E-04	4,93E-05±3,66E-05 p ¹
DL-82+D+ <i>E. faecalis</i>	3	1,78E-05±5,38E-06 p ¹	1,93E-05±4,17E-07 p ¹
DL-82+D+ <i>P. aeruginosa</i>	4	2,93E-05±3,07E-05p p ¹	0,00E+00

Примечание. pⁿ – показатель достоверно отличается от варианта n (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.

4.2. 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 отобрать 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 в планктоне (Me: $1,09E-05$, Q1-Q3: $5,35E-06$ - $2,87E-05$) после 6 ч культивирования (W -test: $p=0,027$) (табл. 16). Корреляция между передачей плазмиды в планктоне и биопленке была отрицательной и составила $r_s=-0,304$.

Таблица 16

Частота конъюгации в планктоне и биопленке АРЕС через 6 ч

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

Частота конъюгации в штаммах АРЕС не зависела от принадлежности к какой-либо филогруппе. В данной выборке сохранялась слабая тенденция, описанная для УРЕС, когда штаммы, формирующие менее массивную биопленку, принимали плазмиду эффективнее, чем штаммы с высокой биопленкообразующей способностью ($r_s=0,760$ для планктона и $r_s=0,305$ для биопленочной модели).

Зависимости эффективности переноса от наличия каких-либо генов или их комбинации у реципиентов не было обнаружено.

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.

4.2.1. 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 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 через 24 ч (*W*-test: $p=0,07$) (табл. 17). Во всех вариантах конъюгации с «киллерным» донором *E. coli* ЖР и штаммами-реципиентами трансконъюганты не были детектированы. Данный результат значит, что клетки реципиентов, получившие *colE7*-ген посредством конъюгативного переноса, экспрессировали его и лизировались за счет ДНК-азной активности колицина.

Необходимо отметить, что количество клеток «контрольного» и «киллерного» доноров в конъюгативной смеси через 24 ч экспозиции составило в среднем $2,22E+07 \pm 2,03E+07$ и $1,02E+08 \pm 7,69E+07$ КОЕ/мл в планктоне и $7,38E+06 \pm 2,33E+06$ и $9,89E+06 \pm 1,13E+07$ КОЕ/мл в биопленке соответственно, что может свидетельствовать о высокой конкурентоспособности доноров в полимикробных сообществах. Данное предположение было проверено в экспериментах по совместному росту «киллерного» донора и штаммов АРЕС.

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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00

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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00
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	0,00E+00	0,00E+00

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

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.

4.2.2 Динамика роста *E. coli* ŽP в смешанных культурах *in vitro*

Перед проведением экспериментов по конъюгативному переносу плазмиды в модели *in vitro*, целесообразным было оценить выживаемость и конкурентоспособность штамма-киллера (*E. coli* ŽP) в условиях совместного роста с потенциальными патогенами.

Эксперименты по конкурентной динамике микроорганизмов проведены с использованием киллерного донора *E. coli* ŽP и трех штаммов АРЕС – RB2 (не продуцирующий бактериоцины и нечувствительный к ColE7), RB3 (продуцирующий бактериоцины и чувствительный к ColE7) и RB4 (продуцирующий бактериоцины и нечувствительный к ColE7). Кривые роста культур представлены на рис. 21.

Конкурентная динамика между *E. coli* ŽP и штаммами АРЕС существенно различалась. В отсутствие антагонизма между штаммами (реципиент RB2 не колициногенный и устойчивый к действию ColE7) сразу же после инокуляции происходило увеличение численности клеток обеих культур, а некоторое изменение в соотношении бактерий конкурирующих штаммов обусловлено, скорее всего, преимуществом в скорости роста природного штамма RB2. Через 5 ч совместного роста число клеток *E. coli* ŽP было стабильным, и отмечалась тенденция к снижению бактерий *E. coli* RB2 за счет их лизиса в результате конъюгативного переноса плазмиды, который был достаточно эффективным ($2,46E-02 \pm 3,02E-02$). При совместном росте *E. coli* ŽP и RB4 к моменту достижения стационарной фазы, напротив, выявлено снижение числа клеток *E. coli* ŽP. По-видимому, на этом этапе проявляется антагонистическая активность штамма АРЕС, обусловленная синтезом бактериоцина, который индуцируется увеличением плотности культуры, начиная с конца логарифмической фазы роста.

Учитывая, что бактерии *E. coli* RB4 не чувствительны к ColE7, а частота конъюгации невысокая, соотношение клеток через 24 ч в этой паре вполне объяснимо. Интересно, что в смешанной культуре *E. coli* ŽP и RB3, который также продуцирует бактериоцины, но чувствителен к ColE7, антагонистической активности между штаммами не обнаружено.

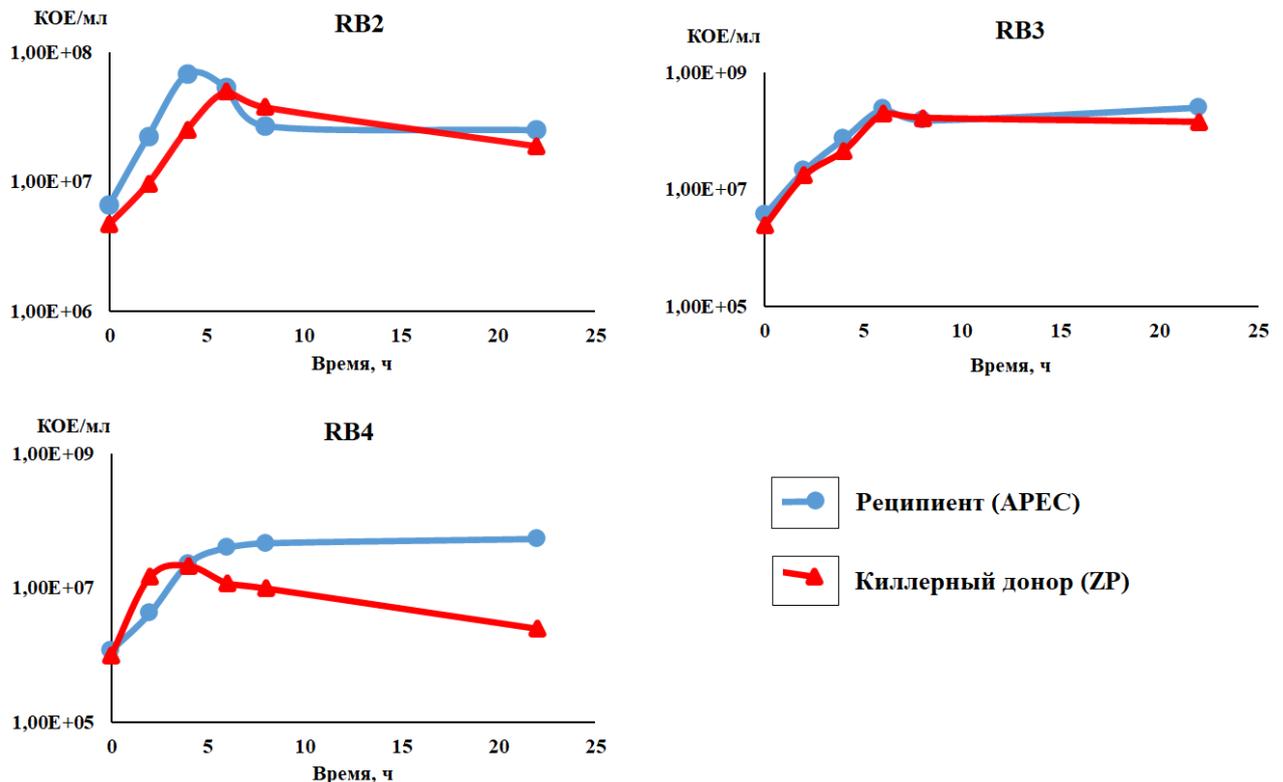


Рисунок 21. Рост клеток штаммов АРЕС в смешанных культурах с *E. coli* ŽP.

Таким образом, показано, что штамм *E. coli* ŽP при совместном росте с потенциально патогенными культурами сохраняет высокую жизнеспособность и является конкурентноспособным, что позволяет прогнозировать его эффективную работу в модели *in vivo*.

4.2.3 Оценка эффективности конъюгативной передачи гена *colE7* *in vivo*

Первый эксперимент по конъюгативному переносу плазмиды *in vivo* проводили на самцах 30 дневных 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.

В результате проведенного эксперимента были получены следующие данные. В группе I на третьи сутки после введения число жизнеспособных клеток «контрольного» донора и реципиента (отдельно для каждого штамма) в среднем составило $3,50E+04 \pm 2,15E+03$ КОЕ/г и $3,54E+03 \pm 1,23E+03$ КОЕ/г, соответственно (табл. 18).

Трансконъюгантные *E. coli* с фенотипом Amp^RCm^R были детектированы на третий день после введения реципиента, в среднем их число составило $2,15E+02 \pm 1,75E+02$ КОЕ/г, а частота конъюгации была $6,07E-02 \pm 5,58E-02$. 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 $1,50E+04 \pm 1,25E+03$ КОЕ/г и $2,19E+03 \pm 1,25E+03$ КОЕ/г, соответственно. В следующие сроки наблюдалось увеличение количества клеток *E. coli* \checkmark P до $10E+07$ КОЕ/г, в то время как число реципиентов не значительно возросло после первого введения. Трансконъюганты в данной группе не были обнаружены 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 18

**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
3	н.о	3,50E+04 ±2,15E+03	н.о	н.о	н.о	1,50E+04 ±1,25E+03	н.о	н.о
6	н.о	7,21E+05 ±5,29E+04	н.о	н.о	н.о	2,34E+05 ±1,74E+05	н.о	н.о
10	3,54E+03 ±1,23E+03	2,96E+06 ±2,01E+06	2,15E+02 ±1,75E+02	6,07E-02 ±5,58E-02	2,19E+03 ±1,25E+03	5,97E+05 ±2,58E+05	0,00E+00	0,00E+00
14	5,21E+05 ±2,13E+04	1,26E+07 ±8,64E+06	4,11E+04 ±4,00E+03	7,87E-02 ±8,32E-03	4,22E+04 ±2,36E+04	5,64E+07 ±8,96E+06	0,00E+00	0,00E+00
21	8,69E+06 ±5,55E+06	7,25E+07 ±2,35E+07	6,15E+04 ±1,02E+03	7,08E-03 ±9,64E-04	5,91E+04 ±4,98E+03	2,23E+07 ±1,00E+07	0,00E+00	0,00E+00
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
1	н.о	8,00E+03 ±5,21E+03	н.о	н.о	н.о	5,04E+04± 1,22E+04	н.о	н.о
2	5,00E+05 ±4,55E+05	2,70E+06 ±2,01E+05	5,00E+03 ±1,12E+03	1,00E-02 ±1,12E-01	4,68E+04 ±2,25E+04	8,12E+05 ±2,22E+05	0,00E+00	0,00E+00
3	3,05E+06 ±2,41E+05	4,45E+06 ±3,05E+06	1,05E+04 ±1,11E+04	3,44E-03 ±2,46E-03	7,39E+05 ±5,57E+05	1,74E+06 ±1,96E+06	0,00E+00	0,00E+00
6	9,12E+06 ±7,15E+06	6,42E+07 ±6,16E+07	4,18E+05 ±4,00E+05	4,58E-02 ±2,12E-01	8,29E+05 ±5,55E+05	2,57E+07 ±3,01E+07	0,00E+00	0,00E+00

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

Таким образом, эксперимент *in vivo* показал, что генно-модифицированный штамм *E. coli* ЖР, 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

Распространенность плазмид у бактерий из различных природных мест обитания хорошо известна, а горизонтальный перенос генов с помощью механизма конъюгации способствует генетическому разнообразию естественных микробных сообществ (Заварзин, Колотилова, 2001). Доказано, что F и F-подобные плазмиды имеют огромное значение в процессах поддержания и распространения полезных для микроорганизма экофизиологических признаков: с их приобретением могут изменяться не только устойчивость к факторам окружающей среды или антропогенному воздействию, но также морфологические и физиологические свойства бактерий (Reisner *et al.*, 2006).

E. coli является одним из самых хорошо изученных микроорганизмов, это определяется, в том числе, ее ролью во многих инфекционных заболеваниях человека и животных. В естественных условиях *E. coli* вынуждена взаимодействовать и конкурировать с представителями различных таксонов или другими культурами этого вида. Так, например, в желудочно-кишечном тракте человека в любой момент времени присутствуют один или более резидентных и несколько транзиторных штаммов *E. coli* (Nowrouzian, 2003). Более современные исследования, основанные на молекулярных методиках, свидетельствуют, что уровень популяционного разнообразия, обнаруженный у животных, оказался чрезвычайно высок и составлял около 1000 одновременно присутствующих штаммов *E. coli* (Летаров, 2014).

Инфекции мочевыводящих путей относятся к наиболее распространенным заболеваниям среди взрослого населения как в амбулаторной, так и в госпитальной практике во всем мире (Morales-Espinosa *et al.*, 2016; Terlizzi *et al.*, 2017; Tewawong *et al.*, 2020). Этиологическая структура этой группы заболеваний определяется ведущей ролью *E. coli* в монокультуре или в составе ассоциаций. Уропатогенные *E. coli* характеризуются высоким вирулентным потенциалом за счет сильного тканевого тропизма и наличия большого числа факторов патогенности в отношении клеток уротелия (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Нами были изучены биологические свойства штаммов уропатогенных *E. coli* (n=29) с индивидуальным генетическим профилем. Большинство культур принадлежали к группе B2, второй по распространенности была группа A, что согласуется с ранее проведенными исследованиями других авторов (Najafi *et al.*, 2017; Кузнецова и др., 2018; Cristea *et al.*, 2019; Tewawong *et al.*, 2020). Продукция бактериоцинов и лизогения не были широко распространенными свойствами в данной коллекции. Штаммы UPEC существенно различались по биопленкообразующей 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: только половина штаммов была чувствительная к данной группе препаратов. 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. В последнее время появляется все больше данных, указывающих на то, что преимущественное связывание микроорганизма со специфичными субстратными молекулами определяется его принадлежностью к конкретному адгезивному фенотипу и обуславливает способность успешно колонизировать разные экологические ниши и вызывать патологический процесс (Tiba *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2014; Chakraborty *et al.*, 2017). Настоящее исследование свидетельствует о высокой распространенности адгезин-кодирующих генов в UPEC и подтверждает многочисленные данные о том, что эти структуры являются ключевыми факторами развития ИМВП. Множественные гены адгезии (4 и более) детектированы у половины культур, при этом более чем в 60%

штаммов присутствуют одновременно гены и фимбриальных, и афимбриальных адгезинов. Показано, что группа UPEC может быть высоко гетерогенной по адгезивному профилю: среди 29 штаммов были определены 22 индивидуальные комбинации изученных генов. Следует отметить, что штаммы, несущие множественные детерминанты адгезии, чаще принадлежат к филогруппе B2, ассоциированной с высоким уровнем вирулентности UPEC. При этом внутри группы B2 все штаммы имели не менее трех генов адгезии. Аналогичные данные были получены Yahiaoui M. et al., которые показали, что полирезистентные UPEC филогрупп B2 и D чаще обладали факторами вирулентности, участвующими в колонизации и длительном персистировании у людей (Yahiaoui *et al.*, 2015).

Широкое применение в урологической практике биологических и искусственных материалов, на поверхности которых формируются бактериальные биопленки, повышает риск персистенции возбудителя в организме (Balasubramanian *et al.*, 2012; Малей, 2015; Grabe *et al.*, 2015; Куу *et al.*, 2020). Показано, что адгезия бактерий и скорость развития биопленки могут определяться природой полимерного материала и поверхностью катетера. А именно, первичная адгезия клеток UPEC происходила почти с одинаковой активностью на всех катетерах. Количество жизнеспособных клеток в биопленках и скорость их прироста на поверхностях, имеющих сходные значения показателей гидрофобности и шероховатости (латекс и ПВХ), статистически значимо не различались. Увеличение гидрофильности материала катетера снижало эффективность формирования 24-часовой биопленки UPEC, однако при этом гидрофильные клетки активнее колонизировали и оставались жизнеспособными на поверхностях с меньшим показателем гидрофобности. Катетер, покрытый серебром, характеризовался оптимальной (для прикрепления бактерий) шероховатостью, однако количество бактерий на силиконе с серебряным напылением через 2 и 6 ч экспозиции не отличалось от других материалов за счет антибактериального действия ионов серебра. Наиболее выраженный ингибирующий эффект покрытия был обнаружен через 24 ч на этапе сформированной биопленки. Механизм активности серебра обусловлен

связыванием ионов металла с электрон-донорскими группами биологических молекул. Ионы взаимодействуют с ДНК и белками, участвующими в бактериальном метаболизме, а также проницаемости мембраны, вызывая дефекты в клеточной стенке бактерий (Yamanaka *et al.*, 2005). Hertrick E.M. *et al.* показали, что полимеры с серебряным покрытием действуют как резервуары и способны высвобождать ионы в течение длительного времени (Hertrick *et al.*, 2006), что и определяет их эффективность при длительном использовании. Такое действие серебра снижает риск персистенции возбудителя в организме при длительном применении изделий медицинского назначения.

В данной работе изучены биологические свойства штаммов АРЕС, 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). В филогенетическом отношении чаще всего встречались представители группы В1, биопленки активно формировали чуть менее половины штаммов. Внутри данной выборки АРЕС широко был распространен такой признак, как продукция бактериоцинов. В отличие от группы UРЕС, птичьих штаммы не демонстрировали выраженную адгезию к какой-либо абиотической поверхности. Преобладающая часть штаммов была отнесена к низкоадгезивной группе независимо от типа использованных эритроцитов – птичьих или человеческие. Показано, что штаммы АРЕС, циркулирующие на предприятиях птицеводства, устойчивы к большому числу антибиотиков, включая бета-лактамы и фторхинолоны, 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, исключения составили только ColE4, ColE6 и ColE-8J, устойчивость к которым была значительно ниже.

Результаты данного исследования также показывают, что штаммы *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 фeno- и генотипическое сходство APEC 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.

Важность изучения переноса генов между клетками микроорганизмов определяется появлением множества лекарственно-устойчивых бактерий, связанным с широким применением антибиотиков в различных сферах человеческой деятельности. 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). Доказано, что конъюгативный перенос генов возможен не только в природных биотопах, но и в организме человека (Huddleston, 2014; Machado, Sommer, 2014). Эффективность горизонтального переноса в клетки диких штаммов *E. coli* на сегодняшний день мало изучена. Большинство работ показывают зависимость конъюгации от различных факторов на примере коллекционных штаммов, которые имеют сниженный вирулентный потенциал в отличие от клинических или природных изолятов.

Нами показано, что эффективность передачи производной F-плазмиды в штаммы *E. coli* варьировала внутри группы и была значительно выше в биопленке, чем в планктоне. Частота конъюгативного переноса плазмиды рОХ38 была выше в группе штаммов, формирующих тонкие биопленки (ОП<0,3) и не зависела от филогенетической группы реципиентов, продукции бактериоцинов, присутствия

конъюгативных плазмид, наличия бактериофага или каких-либо генов вирулентности. Взаиморасположение донора и реципиента в биопленке не влияло на эффективность конъюгативного переноса производной F-плазмиды. Эффективность конъюгации на поверхности катетеров различалась и была также выше в тонких биопленках. 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).

Нарушение коммуникации между sessильными клетками моновидовой популяции, опосредованное природными факторами, в том числе бактериального происхождения, может обуславливать изменение экспрессии генов, обеспечивающих контроль над жизненно важными процессами бактерий, а также связанных с обменом генетической информацией. Предполагается, что присутствие бактерий-ассоциантов может нарушать оптимальное количественное соотношение клеток доноров и реципиентов, необходимое для эффективного горизонтального переноса. 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*. Интересно, что несмотря на вытеснение *E. coli* при совместном росте, частота внутривидовой конъюгации снижалась незначительно, что, возможно, обусловлено сохраненным соотношением донор:реципиент и пространственной структурой биопленок с небольшим матричным компонентом у данных микроорганизмов. Сходные данные представлены в работе Juarez G.E. и Galván E., где была изучена способность *E. coli* и *K. pneumoniae* формировать смешанную биопленку в различных условиях. Авторы показали, что через сутки после совместной инокуляции количество адгезированных клеток *E. coli* значительно уменьшалось,

а число клеток *K. pneumoniae* не изменялось в смешанной биопленке, в сравнении с моновидовой. Бактерии *E. coli* были равномерно представлены в толще смешанной биопленки, несмотря на то что *K. pneumoniae* частично вытеснила *E. coli* (соотношение клеток составило 55:1) (Juarez, Galván, 2018). 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). Так в составе смешанной биопленки большая часть клеток от общего микробного числа приходилась на *P. aeruginosa*, при этом, в отличие от варианта с *K. pneumoniae*, где также превалировал ассоциант, эффективность конъюгативного переноса была существенно меньше. Кроме того, в данном варианте значительно больше была биомасса биопленки и массивность матрикса, что также может препятствовать контакту клеток. Учитывая, что матрикс биопленки действует как молекулярный резервуар из-за ограниченной диффузии наружу, молекулы, выделяемые бактериями антагонистами в биопленке, будут действовать более сосредоточенно в местных районах биопленки, что приводит к увеличению вредного воздействия на *E. coli*. Следует отметить, что в представленном исследовании наблюдалось 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. При формировании смешанных биопленок взаимодействие имеет либо односторонний характер, либо наблюдается взаимное положительное или отрицательное влияние сессильных культур друг на друга. Тем не менее, во всех случаях присутствие бактерий

ассоциантов или их экзометаболитов негативно влияло на скорость конъюгации. Однако, несмотря на схожий вектор изменений, вопрос о механизмах взаимодействия клеток внутри биопленки остается открытым и требует дальнейшего исследования. Пространственное распределение бактерий в смешанных биопленках, определенное методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в сочетании с видоспецифичной флуоресцентной маркировкой, может предоставить дальнейшее подтверждение процессов, происходящих в полимикробных сообществах.

В настоящее время наблюдается рост числа инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам бактериями, что является одной из основных проблем общественного здравоохранения. Длительное время в качестве стимуляторов роста, для профилактики и лечения инфекционных заболеваний промышленной птицы применялись поликомпонентные антимикробные препараты, в результате чего сформировались экovarы резистентных бактерий. В связи со сложившейся ситуацией. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) внедрена новая стратегия борьбы с инфекционными заболеваниями сельскохозяйственных животных – применение пробиотических препаратов. Пробиотики на основе живых клеток микроорганизмов, в том числе и культур *E. coli*, используются для формирования в кишечнике хозяина колонизационного барьера, а также в качестве антагонистических агентов, продуцирующих бактериоцины. Тем не менее, данные препараты могут быть недостаточно эффективными из-за нарастающей бактериоциноустойчивости энтеропатогенных бактерий, связанной с модификацией рецепторов или систем транслокации этих веществ (Budič *et al.*, 2011). Генно-модифицированный штамм *E. coli* ŽP 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* ŽP 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* ŽP 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* ŽP, 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 APES 75%, классифицированных как высокопатогенные для птиц и человека, характеризовались высокими частотами встречаемости генов вирулентности патогенных для птиц и диареегенных *E. coli*, островка патогенности SHI-2, а также генов бета-лактамаз расширенного спектра и участков интегронов I 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 рОХ38 происходил со средней частотой $10E-02$, что позволяет рассматривать штамм *E. coli* ЖР как основу для нового ветеринарного пробиотического препарата.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БКЖ – бесклеточная культуральная жидкость

БЛРС – бета-лактамазы расширенного спектра

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Ед. ОП – единицы оптической плотности

ИМВП – инфекции мочевыводящих путей

КАИМВП – катетер-ассоциированные инфекции мочевыводящих путей

КОЕ – колониеобразующая единица

ЛПС – липополисахарид

ПВХ – поливинилхлорид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Amp – ампициллин

АРЕС – avian pathogenic *E. coli*, патогенные для птиц *E. coli*

Сm – хлорамфеникол

D – донор

DEC – diarrheagenic *E. coli*, диареегенные *E. coli*

ExPEC – extraintestinal pathogenic *E. coli*, экстраинтестинальные *E. coli*

Gen – гентамицин

KD – киллерный донор

LB – среда Лурия-Бертани

NMEC – newborn meningitis *E. coli*, менингит-ассоциированные *E. coli*
новорожденных

R – реципиент

SEPEC – sepsis-associated pathogenic *E. coli*, сепсис-ассоциированные *E. coli*

T – трансконъюгант

UPEC – uropathogenic *E. coli*, уропатогенные *E. coli*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брилис, В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Т.А. Брилен, Х.П. Ленцнер // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 210-212.
2. Бухарин, О.В. Факторы уропатогенности бактерий: роль в патогенезе и значение в диагностике пиелонефрита / О.В. Бухарин, В.А. Гриценко, А.А. Вялкова // Нефрология и диализ. – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 469-475.
3. Винник, Ю.С. Особенности формирования микробных биоплёнок на различных субстратах. Возможность изучения биоплёнок на желчных конкрементах / Ю.С. Винник, Е.В. Серова, Р.И. Андреев, О.В. Перьянова, Т.В. Рукосуева, А.В. Лейман, Е.И. Мичуров // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5.
4. Гигани, О.Б. Биология: руководство к лабораторным занятиям: учебное пособие / О.Б. Гигани. – М.: ГЭОТАР – Медицина, 2012. – 272 с.
5. Гриценко, В.А. Антагонистические взаимоотношения с грамотрицательными бактериями / В.А. Гриценко, Т.М. Мругова, П.П. Курлаев, Ю.П. Белозерцева, С.Д. Борисов // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2016. – № 4. – 11 с.
6. Данилов, В.С. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе *lux*-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / В.С. Данилов, А.П. Зарубина, Г.Е. Ерошников, Л.Н. Соловьева, Ф.В. Карташев, Г.Б. Завильгельский // Вестник МГУ. Биология. – 2002. – № 3. – С. 20-24.
7. Джаилиди, Г.А. Анализ эпизоотического состояния птицеводства в Российской Федерации / Г.А. Джаилиди, А.А. Лысенко, Ю.Ю. Пономаренко, А.Е. Лосаберидзе // Ветеринария Кубани. – 2014. – № 2. – С. 25-27.
8. Заварзин, Г.А. Введение в природоведческую микробиологию / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова – М: Университет, 2001. – 255 с.
9. Зорина, А.С. Биопленкообразование моно- и смешанных культур штаммов *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* GT 1 / А.С. Зорина, Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков // Микробиология. – 2019. – Т. 88, № 2. – С. 175-183.

10. Казанцев, А.В. Факторы вирулентности и филогенетическая характеристика уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных на территории г. Саратова / А.В. Казанцев, Н.А. Осина, Т.О. Глинская, О.Н. Кошелева, Ю.В. Максимов, З.Л. Девдариани, А.Н. Микеров // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 4. – С. 56-60
11. Коваленко, Г.А. Приготовление и исследование нанопористых углеродных носителей на катализаторе Ni/сибунит / Г.А. Коваленко, Л.В. Перминова, Н.А. Рудина, О.В. Скрыпник, Т.В. Чуенко // Кинетика и катализ. – 2009. – Т. 50, № 4. – С. 618-626.
12. Кузнецова, М.В. Видовое разнообразие и динамика антибиотикочувствительности энтеробактерий, выделенных от цыплят-бройлеров из промышленного стада: 14-летние исследование / М.В. Кузнецова, Е.В. Афанасьевская, М.О. Покатилова, А.А. Круглова, Э.С. Горовиц // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54, № 4. – С. 754-766.
13. Кузнецова, М.В. Влияние экзометаболитов *Pseudomonas aeruginosa* на планктонные и пленочные культуры *Escherichia coli* / М.В. Кузнецова, Т.И. Карпунина, И.Л. Масленникова, Л.Ю. Нестерова, В.А. Демаков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 6. – С. 17-22.
14. Кузнецова, М.В. Сравнительная характеристика штаммов уропатогенной *Escherichia coli*, выделенных в условиях поликлиники и стационара / М.В. Кузнецова, С.В. Проворова, О.Г. Кубарев, Д.С. Юдин, Н.В. Каримова, Н.В. Баяндина, М.А. Теплякова, В.А. Демаков // Урология. – 2018. – № 6. – С. 20-27.
15. Ленгелер Й. Современная микробиология. Прокариоты. / Й. Ленгерлер, Г. Дреус, Г. Шлегель. – М.: Мир, 2005. – 667 с.
16. Летаров, А.В. Эволюционная динамика белков адсорбционного аппарата некоторых групп бактериофагов. дис. ... док. биол. наук: 03.01.03 / Летаров Андрей Викторович. – М., 2014. – 208 с.
17. Малей, М. Лечение инфекций мочевыводящих путей: фокус на фторхинолоны / М. Малей // Медицинские аспекты здоровья мужчины. – 2015. – Т. 2, № 17. – С. 27-31.

18. Мальцев, С.В. Что такое биопленка? / С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова // Природная медицина. – 2013. – № 13. – С. 86-89.
19. Немец, Е.А. Образование биопленок штаммами госпитальной флоры, выделенными из биологических субстратов пациентов, на поверхности материалов и изделий медицинского назначения / Е.А. Немец, Р.А. Юнес, А.К. Худошин, Н.И. Габриэлян, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2013. – № 4. – С. 92-97.
20. Николаев, Ю.А. Регуляция адгезии у бактерий *Pseudomonas fluorescens* под влиянием дистантных межклеточных взаимодействий // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 3. – С. 356-361.
21. Новикова, О.Б. Проблема колибактериоза в птицеводстве / О.Б. Новикова, А.А. Бартенев // Современные тенденции развития науки и технологий. – 2015. – № 8(4). – С. 35-37.
22. Окулич, В.К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с.
23. Палагин, И.С. Антибиотиковрезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты исследования «ДАРМИС-2018» / И.С. Палагин, М.В. Сухорукова, А.В. Дехнич, М.В. Эдельштейн, Т.С. Перепанова, Р.С. Козлов, исследовательская группа «ДАРМИС-2018» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 134-146.
24. Петрова, М.А. Новый мобильный элемент ISPpy1 древнего штамма *Psychrobacter maritimus*: перемещение в клетках *Escherichia coli* K-12 и образование сложных транспозонов / А.М. Петрова // Генетика. – 2012. – № 48. – С. 324-332.
25. Саъдуллоев, Ф.С. Внутрибольничные инфекции у больных с мочекаменной болезнью в послеоперационном периоде / Ф.С. Саъдуллоев // Исследования и практика в медицине. – 2015. – Т. 2, № 3. – С. 25-29.
26. Селянская, Н.А. Реципиентная способность штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп / Н.А. Селянская, Л.М. Веркина, О.Д. Кирилова, Т.Е.

Арсеньева // Холеpa и патогенные для человека вибрионы: материалы совещания специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой. – 2014. – № 27. – С. 118-122.

27. Abed, N.E. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of thymus capitata essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat / N.E. Abed, B. Kaabi, M.I. Smaali, M. Chabbouh, K. Habibi, M. Mejri, M.N. Marzouki, S.B.H. Ahmed // Evid. Complemen. Alter. Med. – 2014. – V. 2014(30): 152487.

28. Adamus-Białek, W. The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains / W. Adamus-Białek, A. Baraniak, M. Wawszczak, S. Głuszek, B. Gad, K. Wróbel, P. Bator, M. Majchrzak, P. Parniewski // Mol. Biol. Rep. – 2018. – V. 45(5). – P. 1055-1065.

29. Aguiniga, L.M. Lipopolysaccharide domains modulate urovirulence / L.M. Aguiniga, R.E. Yaggie, A.J. Schaeffer, D. Klumpp // J. Infect. Immun. – 2016. – V. 84. – P. 3131-3140.

30. Ahmed, A.M. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes / A.M. Ahmed, Y. Motoi, M. Sato, A. Maruyama, H. Watanabe, Y. Fukumoto, T. Shimomoto // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73(20). – P. 6686-6690.

31. Ahmed, M.G. Genotypic detection of the virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains isolated from pregnant females and their correlation with antibiotic resistance pattern / M.G. Ahmed, L.M. Yosry // Az. J. Pharm Sci. – 2021. – V. 63. – P. 149-172.

32. Akhtar, F. Comparative antibiotic resistance profile of the multidrug resistant *E. coli* isolated from commercial and backyard poultry / F. Akhtar, M. Rabbani, K. Muhammad, M. Younus, A. Ghafoor, A.A. Sheikh, A. Ahmad, J. Muhammad, A. Rasool, A.Y. Shaheen // J. Anim. Plant Sci. – 2016. – V. 26. – P. 1628-1632.

33. Aleisa, A.M. Molecular detection of β -lactamases and aminoglycoside resistance genes among *Escherichia coli* isolates recovered from medicinal plant 2013 / A.M. Aleisa // Afr. J. Microbiol. Res. – 2013. – V. 7(20). – P. 2305-2310.

34. Alizade, H. Phylogenetic typing and molecular detection of virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from colibacillosis cases in Japanese quail / H. Alizade, R. Ghanbarpour, M. Jajarami, A. Askari // *Vet. Res. Forum.* – 2017. – V. 8(1). – P. 55-58.
35. Alkatheri, A.M. Urinary tract infections in Saudi renal transplant recipients / A.M. Alkatheri // *J. Infect. Dis. Immun.* – 2013. – V. 5(2). – P. 18-23.
36. Allocati, N. *Escherichia coli* in Europe: An overview / N. Allocati, M. Michele, M.F. Alexeyev, D.C. Ilio // *Int. J. Envir. Res. Pub. Health.* – 2013. – V. 10. – P. 6235-6254.
37. Al-Qahtani, M. Efficacy of antimicrobial catheters in preventing catheter associated urinary tract infections in hospitalized patients: A review on recent updates / M. Al-Qahtani, A. Safan, G. Jassim, S. Abadla // *J. Infect. Pub. Health.* – 2019. – V. 12(6). – P. 760-766.
38. Amer, M.M. Antimicrobial resistance genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased broiler chickens in Egypt and their relationship with the phenotypic resistance characteristics / M.M. Amer, H.M. Mekky, A.M. Amer, H.S. Fedawy // *Vet. World.* – 2018. – V. 11. – P. 1082-1088.
39. Antão, E. Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesin / E. Antão, C. Ewers, D. Gürlebeck, R. Preisinger, T. Homeier, G. Li, L.H. Wieler // *PLoS ONE.* – 2009. – V. 4(11): e7796.
40. Arutyunov, D. F conjugation: Back to the beginning / D. Arutyunov, L.S. Frost // *Plasmid.* – 2013. – V. 70. – P. 18-32.
41. Asadi Karam, M.R. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against uropathogenic *Escherichia coli* / M.R. Asadi Karam, M. Habibi, S. Bouzari // *Mol. Immunol.* – 2019. – V. 108. – P. 56-67.
42. Asadi, S. The association of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* with antibiotic resistance, Jundishapur / S. Asadi, M. Kargar, K. Solhjoo, A. Najafi, S. Ghorbani-Dalini // *J. Microbiol.* – 2014. – V. 7(5): e9936.

43. Aslam, M. Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada / M. Aslam, M. Toufeer, C. Narvaez Bravo, V. Lai, H. Rempel, A. Manges, M.S. Diarra // Int. J. Food Microbiol. – 2014. – V. 177. – P. 49-56.
44. Asmaa, A.S. Silver ions caused faster diffusive dynamics of histone-like nucleoid-structuring proteins in live bacteria / A.S. Asmaa, K. Prabhat, F. Jack, K.G. Ravi, H.M. Ryan, R. Mason, R.K. Venkata, K.T. Suresh, C. Jingyi, W. Yong // App. Envir. Microbiol. – 2020. – V. 86(6): e02479-19.
45. Awad, A.M. Incidence, pathotyping, and antibiotic susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* among diseased broiler chicks / A.M. Awad, N.A. El-Shall, D.S. Khalil, M.E. Abd El-Hack, A.A. Swelum, A.H. Mahmoud, H. Ebaid, A. Komany, R.H. Sammour, M.E. Sedeik // Pathog. – 2020. – V. 9: 114.
46. Baby, S. Adhesins of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) / S. Baby, V.K. Karnaker, R. Geetha // Int. J. Med. Microbiol. Trop. Dis. – 2016. – V. 2. – P. 10-18.
47. Baharoglu, Z. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation / Z. Baharoglu, D. Bikard, D. Mazel // PLoS Genet. – 2010. – V. 6: e1001165.
48. Balasubramanian, A. Isolation and identification of microbes from biofilm of urinary catheters and antimicrobial susceptibility evaluation / A. Balasubramanian, K. Chairman, A.J. Ranjit Singh, G. Alagumuthu // As. Pas. J. Trop. Biomed. – 2012. – V. 8. – P. 1780-1783.
49. Bello-López, J.M. Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *Aeromonas* spp. / J.M. Bello-López, O.A. Cabrero-Martínez, G. Ibáñez-Cervantes, C. Hernández-Cortez, L.I. Pelcastre-Rodríguez, L.U. Gonzalez-Avila, G. Castro-Escarpulli // Microorganisms. – 2019. – V. 7(9): 363.
50. Bergeron, C.R. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada / C.R. Bergeron, C. Prussing, P. Boerlin, D. Daignault, L. Dutil, R.J. Reid-Smith, G.G. Zhanel, A.R. Manges // Emerg. Infect. Dis. – 2012. – V. 18(3). – P. 415-421.

51. Bethke, J.H. Environmental and genetic determinants of plasmid mobility in pathogenic *Escherichia coli* / J.H. Bethke, A. Davidovich, L. Cheng, A.J. Lopatkin, W. Song, J.T. Thaden, V.G. Fowler Jr., M. Xiao, L. You // *Sci. Advances*. – 2020. – V. 6(4).
52. Bister, B. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica* / B. Bister, D. Bischoff, G.J. Nicholson, M. Valdebenito, K. Schneider, G. Winkelmann, K. Hantke, R.D. Süssmuth // *Biometals*. – 2004. – V. 17. – P. 471-481.
53. Borzi, M.M. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from free-range helmeted guineafowl / M.M. Borzi, M.V. Cardozo, E.S. Oliveira, A.S. Pollo, E.A.L. Guastalli, L.F. Santos, F.A. Ávila // *Br. J. Microbiol.* – 2018. – V. 49(S1). – P. 107-112.
54. Boulianne, M. Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada / M. Boulianne, J. Arsenault, D. Daignault, M. Archambault, A. Letellier, L. Dutil // *Can. J. Vet. Res.* – 2016. – V. 80(1). – P. 49-59.
55. Budič, M. *Escherichia coli* bacteriocins: 248 antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia / M. Budič, M. Rijavec, Z. Petkovsek, D. Zgur-Bertok // *PLoS One*. – 2011. – V. 6: e28769.
56. Caza, M. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans / M. Caza, J.W. Kronstad // *Front. Cell Infect. Microbiol.* – 2013. – V. 3: 80.
57. Chakraborty, A. Molecular characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* isolates at a tertiary care hospital in South India / A. Chakraborty, P. Adhikari, S. Shenoy, V. Saralaya // *Ind. J. Med. Microbiol.* – 2017. – V. 35(2). – P. 305-410.
58. Chapman, T.A. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine / T.A. Chapman, X.Y. Wu, I. Barchia, K.A. Bettelheim, S. Driesen, D. Trott, M. Wilson, J.J. Chin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72(7). – P. 4782-4795.
59. Cirl, C. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins / C. Cirl, A. Wieser, M. Yadav,

- S. Duerr, S. Schubert, H. Fischer, D. Stappert, N. Wantia, N. Rodriguez, H. Wagner, C. Svanborg, T. Miethke // *Nat. Med.* – 2008. – V. 14(4). – P. 399-406.
60. Čitar, M. Virulentni dejavniki izolatov bakterije *Escherichia coli* iz blata zdravih ljudi / M. Čitar // Biotehniška fakulteta. – 2010. Ljubljana, pp. 97.
61. Clark, D.P. *Molecular biology*, / D.P. Clark, J.N. Pazdernik, M.R. McGehee // 3th ed. Academic Cell, USA; 2019.
62. Clermont, O. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups / O. Clermont, J.K. Christenson, E. Denamur, D.M. Gordon // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2013. – V. 1. – P. 58-61.
63. Conlan, S. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae / S. Conlan, P.J. Thomas, C. Deming, M. Park, A.F. Lau, J.P. Dekker // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – V. 6: 254ra126.
64. Cristea, V.C. Snap-shot of phylogenetic groups, virulence, and resistance markers in *Escherichia coli* uropathogenic strains isolated from outpatients with urinary tract infections in Bucharest, Romania / V.C. Cristea, I. Gheorghe, I.C. Barbu, L.I. Popa, B. Ispas, G.A. Grigore, I. Bucatariu, G.L. Popa, M. Angelescu, A. Velican, L. Marutescu, M. Popa, M.C. Chifiriuc, I.M. Popa // *Biomed. Res. Int.* – 2019. – V. 2019: 5712371.
65. CSCRA. Gouvernement du Canada; 2016. Système canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens – rapport De 2016.
66. Cunha, M.P.V. Pandemic extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil / A.B. Saidenberg, A.M. Moreno, A.J.P. Ferreira, M.A.M. Vieira, T.A.T. Gomes, T. Knobl // *PLoS ONE.* – 2017. – V. 12: e0178970.
67. Donnenberg, M. *Escherichia coli*: Pathotypes and principles of pathogenesis / M. Donnenberg // 2nd ed. Academic press, Elsevier, UK; 2013.
68. Dziva, F. Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts / F. Dziva, M.P. Stevens // *Avian Pathol.* – 2008. – V. 37. – P. 355-366.

69. Dziva, F. Sequencing and functional annotation of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O78 strains reveal the evolution of *E. coli* lineages pathogenic for poultry via distinct mechanisms / F. Dziva, H. Hauser, T.R. Connor, P.M. van Diemen, G. Prescott, G.C. Langridge, S. Eckert, R.R. Chaudhuri, C. Ewers, M. Mellata, S. Mukhopadhyay, R. Curtiss, G. Dougan, L.H. Wieler, N.R. Thomson, D.J. Pickard, M.P. Stevens // *Infect. Immun.* – 2013. – V. 81(3). – P. 838-849.
70. Erb, S. Basic patient characteristics predict antimicrobial resistance in *E. coli* from urinary tract specimens: a retrospective cohort analysis of 5246 urine samples / S. Erb, R. Frei, S. Tschudin Sutter, A. Egli, M. Dangel, G. Bonkat, A.F. Widmer // *Swiss. Med. Wkly.* – 2018. – V. 148: w14660.
71. Ewers, C. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? / C. Ewers, G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E.M. Antao, C. Lanturnus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. Philipp, L.H. Weiler // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2007. – V. 297. – P. 163-176.
72. Fattahi, S. Comparison of virulence factors *fimA*, *papC*, and *hly* among uropathogenic *Escherichia coli* isolates producing and nonproducing extended spectrum beta-lactamases / S. Fattahi, M. Aghazadeh, M.R. Nahaei, M. Asgharzadeh, H.S. Kafil // *Ann. Trop. Med. Pub. Health.* – 2017. – V. 10. – P. 404-408.
73. Ferrières, L. *Escherichia coli* strains during catheter-associated biofilm formation / L. Ferrières // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2007. – V. 51(1). – P. 212-219.
74. Filutowicz M. Bacterial conjugation-based antimicrobial agents / M. Filutowicz, R. Burgess, R.L. Gamelli, J.A. Heinemann, B. Kurenbach, S.A. Rakowski, R. Shankar // *Plasmid.* – 2008. – V. 60(1). – P. 38-44.
75. Firth, N. Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation / N. Firth, K. Ippen-ihler, R. Skurray // *Cel. Mol. Biol.* – 1996. – V. 3. – P. 2377-2401.
76. Flores-Mireles, A.L. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options / A.L. Flores-Mireles, J.N. Walker, M. Caparon, S.J. Hultgren // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2015. – V. 13(5). – P. 269-284.

77. Foxman, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2014. – V. 28. – P. 1-13.
78. Gao, J. Emerging of a highly pathogenic and multidrug resistant strain of *Escherichia coli* causing an outbreak of colibacillosis in chickens / J. Gao, X. Duan, X. Li, H. Cao, Y. Wang, S.J. Zheng // *Infect. Genet. Evol.* – 2018. – V. 65. – P. 392-398.
79. Gardete, S. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* / S. Gardete, A.J. Tomasz // *Clin. Invest.* – 2014. – V. 124. – P. 2836-2840.
80. Ghigo, J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development / J.M. Ghigo // *Nature.* – 2001. – V. 412. – P. 442-445.
81. Gordon, D.M. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli* / D.M. Gordon, C.L. O'Brien // *Microbiology.* – 2006. – V. 152. – P. 3239-3244.
82. Gotlib, O. Investigation of an improved electricidal coating for inhibiting biofilm formation on urinary catheters / O. Gotlib, S. Vaitkus, R.S. Torigoe, K. Morris, A.B. Frederick, E.S. Madhu, A.F.E. Talke // *J. Mat. Res.Tech.* – 2021. – V. 10. – P. 339-348.
83. Grabe, M. Guidelines on urological infections. European Association of urology / M. Grabe, R. Bartoletti, T.E. Bjerklund Johansen, T. Cai, M. Çek, B. Köves // 2015.
84. Guabiraba, R. Avian colibacillosis: Still many black holes / R. Guabiraba, C. Schouler // *FEMS Microbiol. Let.* – 2015. – V. 362(15): fnv118.
85. Guglielmetti, S. Study of the adhesion of *Bifidobacterim bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines / S. Guglielmetti, I. Tamagnini, M. Minuzzo, S. Arioli, C. Parini, E. Comelli, D. Mora // *Curr. Microboil.* – 2009. – V. 59(2). – P. 167-172.
86. Guiral, E. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: relationship with virulence / E. Guiral, J. Bosch, J. Vila, S.M. Soto // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2011. – V. 314(2). – P. 170-173.
87. Hagan, E.C. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection / E.C. Hagan, A.L. Lloyd, D.A. Rasko, G.J. Faerber, H.L. Mobley // *PLoS Pathog.* – 2010. – V. 6(11): e1001187.

88. Halaji, M. Characterization of extended-spectrum β -Lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* among Iranian kidney transplant patients / M. Halaji, S. Shahidi, A. Atapour, B. Ataei, A. Feizi, S.A. Havaei // *Infect. Drug Resist.* – 2020. – V. 13. – P. 1429-1437.
89. Harrison, E. Parallel compensatory evolution stabilizes plasmids across the parasitism-mutualism continuum / E. Harrison, D. Guymer, A.J. Spiers, S. Paterson, M.A. Brockhurst // *Curr. Biol.* – 2015. – V. 25. – P. 2034-2039.
90. Headd, B. The conjugation window in an *Escherichia coli* K-12 strain with an IncFII Plasmid / B. Headd, S.A. Bradford // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2020: 86.
91. Hetrick, E.M., Reducing implant-related infections: active release strategies / M.A. Hetrick, M.H. Schoenfisch // *Chem. Soc. Rev.* – 2006 – V. 5. – P. 780-789.
92. Hoepers, P.G. The association between extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and ampicillin C (AmpC) beta-lactamase genes with multidrug resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from turkeys in Brazil / P.G. Hoepers, P.L. Silva, D.A. Rossi, E.C. Valadares Junior, B.C. Ferreira, J.P. Zuffo, P.K. Koerich, B.B. Fonseca / *Br. Poult. Sci.* – 2018. – V. 59. – P. 396-401.
93. Hola, V. The Formation of poly-microbial biofilmson urinary catheters / V. Hola, F. Ruzicka // *Urinary Tract Infection*, ed. Dr. Peter Tenke. – Croatia. – 2011. – P. 153-172.
94. Homjan, P. Antimicrobial resistance against avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colibacillosis in chicken, Tailand / P. Homjan, N. Awaiwanont, T. Meeyam, P. Ngamsanga, V. Punyapornwithaya, D. Pichpol // *The 5th food safety and zoonoses symposium for Asia Pacific*, 6-7 July 2018, Holiday Inn Chiang Mai Hotel, Chiang Mai, Thailand.
95. Huddleston, J.R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes / J.R. Huddleston // *Infect. Drug. Resist.* – 2014. – V. 7. – P. 167-176.
96. Huey, B. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13 / B. Huey, J. Hall // *J. Bacteriol.* – 1989. – V. 171(5). – P. 2528-2532.

97. Iranpour, D. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method / D. Iranpour, M. Hassanpour, H. Ansari, S. Tajbakhsh, G. Khamisipour, A. Najafi // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – V. 2015: 846219.
98. Ippen-Ihler, K. Deletion map of the *Escherichia coli* K-12 sex factor F: The order of eleven transfer cistrons / K. Ippen-Ihler, M. Achtman, N. Willetts // *J. Bacteriol.* – 1972. – V. 110. – P. 857-863.
99. Jeong, Y.W. Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea / Y.W. Jeong, T.E. Kim, J.H. Kim, H.J. Kwon // *J. Vet. Sci.* – 2012. – V. 13(2). – P. 145-152.
100. Johnson, J.R. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise / J.R. Johnson, A.L. Stell // *J. Infect. Dis.* – 2000. – V. 181(1). – P. 261-272.
101. Johnson, T.J. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains / T.J. Johnson, K.E. Siek, S.J. Johnson, L.K. Nolan // *J. Bacteriol.* – 2006. – V. 188. – P. 745-758.
102. Johnson, J.R. *In vitro* comparison of nitrofurazone- and silver alloy-coated Foley catheters for contact-depend and diffusible inhibition of urinary tract infection-associated microorganisms / J.R. Johnson, B. Johnston, M.A. Kuskowski // *Antimicrob. Agent Chemother.* – 2012. – V. 56(9). – P. 4969-4972.
103. Jorgensen, S.L. Diversity and population overlap between avian and human *Escherichia coli* belonging to sequence type 95 / S.L. Jorgensen, M. Stegger, E. Kudirkiene, B. Lilje, L.L. Poulsen, T. Ronco, T.P.D. Santos, K. Kiil, M. Bisgaard, K. Pedersen, L.K. Nolan, L.B. Price, R.H. Olsen, P.S. Andersen, H. Christensen // *mSphere.* – 2019. – V. 4(10): e00333-18.
104. Juarez, G.E. Role of nutrient limitation in the competition between uropathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in mixed biofilms / G.E. Juarez, E. Galván // *Biofouling.* – 2018. – V. 34(3). – P. 287-298.

105. Jukić, I. Frequency and antimicrobial susceptibility pattern of hospital isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in urine samples / I. Jukić, D. Topić, E. Đulić, A. Dedeić-Ljubović // *Acta Medica Saliniana*. – 2019. – V. 9(1). – P. 195-200.
106. Kart, D. Evaluation of antimicrobial durability and anti-biofilm effects in urinary catheters against *Enterococcus faecalis* clinical isolates and reference strains / D. Kart, A.S. Kustimur, M. Sađirođlu, A.K. Balkan // *Med. J.* – 2017. – V. 34(6). – P. 546-552.
107. Keogh, D. Enterococcal metabolite cues facilitate interspecies niche modulation and polymicrobial infection / D. Keogh, W.H. Tay, Y.Y. Ho, J.L. Dale, S. Chen, A. Umashankar, R.B.H. Williams, S.L. Chen, G.M. Dunny, K.A. Kline // *Cell Host Microbe*. – 2016. – V. 20(4). – P. 493-503.
108. Kerényi, M. Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains / M. Kerényi, H.E. Allison, I. Bártai, A. Sonnevend, L. Emödy, N. Plaveczyk, T. Pál // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – V. 43(6). – P. 2965-2968.
109. Kim, Y.B. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis / Y.B. Kim, M.Y. Yoon, J.S. Ha, K.W. Seo, E.B. Noh, S.H. Son, Y.J. Lee // *Pouly. Sci.* – 2020. – V. 99(2). – P. 1088-1095.
110. Klein, R.D. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies / R.D. Klein, S.J. Hultgren // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2020. – V. 18(4). – P. 211-226.
111. Koga, V.L. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Parana, Brazil / V.L. Koga, G.R. Rodrigues, S. Scandorieiro // *Foodborne Pathog. Dis.* – 2015. – V. 12(6). – P. 479-485.
112. Koo, H.J. Characterization of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* recovered from foods of animal and fish origin in Korea / H.J. Koo, G.J. Woo // *J. Food Prot.* – 2012. – V. 75(5). – P. 966-972.
113. Koraimann, G. Social behavior and decision making in bacterial conjugation / G. Koraimann, M.A. Wagner // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2014: 4.

114. Korea, C. *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone–usher fimbriae with distinct surface specificities / C. Korea, R. Badouraly, M. Prevost, J. Ghigo, C. Beloin // *Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 12(7). – P. 1957-1977.
115. Kot, B. Virulence factors and innovative strategies for the treatment and control of uropathogenic *Escherichia coli* / B. Kot // In: A. Samie. *Escherichia coli* – recent advances on physiology, pathogenesis and biotechnological applications. 1st ed. InTech, Rijeka, Croatia; 2017.
116. Kresken, M. Comparative *in vitro* activity of oral antimicrobial agents against Enterobacteriaceae from patients with community-acquired urinary tract infections in three European countries / M. Kresken, B. Körber-Irrgang, D.J. Biedenbach, N. Batista, V. Besard, R. Cantón, M. García-Castillo, W. Kalka-Moll, A. Pascual, R. Schwarz, B. Van Meensel, H. Wisplinghoff, H. Seifert // *Clin Microbiol Infect.* – 2016. – V. 22(1): 63.e1-63.e5.
117. Kumar, I. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in faecal strains from intestinal infections and healthy individuals / Kumar I., M. Grabnar, D. Zgur-Bertok // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1998. – V. 164. – P. 243-248.
118. Kumar, N. Association of virulence factors, phylogenetic groups and antimicrobial resistance markers in *Escherichia coli* from Badin city, Pakistan / N. Kumar, F. Nahid, R. Zahra // *J. Chemother.* – 2017. – V. 29(1). – P. 8-13.
119. Kuy, S.R. Incidence of catheter-associated urinary tract infections with compliance with preventive guidelines / S.R. Kuy, B.A.R. Gupta, B.S.C. Roy, S. Awad // *JAMA Surg.* – 2020. – V. 155(7). – P. 661-662.
120. Kuznetsova, M.V. Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* in predominant biofilm or planktonic forms of existence in mixed culture with *Escherichia coli in vitro* / M.V. Kuznetsova, I.L. Maslennikova, T.I. Karpunina, L.Yu. Nesterova, V.A. Demakov // *Can. J. Microbiol.* – 2013. – V. 59(9). – P. 604-610.
121. Landraud, L. Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein / L. Landraud, M. Gibert, M.R. Popoff, P. Boquet, M. Gauthier // *Mol. Microbiol.* – 2003. – V. 47. – P. 1653-1667.

122. Learman, B.S. A rare opportunist, *Morganella morganii*, decreases severity of polymicrobial catheter-associated urinary tract infection / B.S. Learman, A.L. Brauer, K.A. Eaton, C.E. Armbruster // *Infect. Immun.* – 2019. – V. 88(1): e00691-19.
123. Leungtongkam, U. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii* / U. Leungtongkam, R. Thummeepak, K. Tasanapak, S. Sitthisak // *PLoS One.* – 2018. – V. 13(12): e0208468.
124. Lévesque, C. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes / C. Lévesque, L. Piché, C. Larose, P.H. Roy // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1995. – V. 39(1). – P. 185-191.
125. Li, Q. The role of plasmids in the multiple antibiotic resistance transfer in ESBLs-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater treatment plants / Q. Li, C. Weishan, Z. Hongna, H. Dong, W. Xuepeng // *Front. Microbiol.* – 2019. – V. 10: 633.
126. Li, Y. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers / Y. Li, L. Chen, X. Wu, S. Huo // *Poult. Sci.* – 2015. – V. 94. – P. 601-611.
127. Loftie-Eaton, W. Compensatory mutations improve general permissiveness to antibiotic resistance plasmids / W. Loftie-Eaton, K. Bashford, H. Quinn, K. Dong, J. Millstein, S. Hunter, M.K. Thomason, H. Merrikh, J.M. Ponciano, E.M. Top // *Nat. Ecol. Evol.* – 2017. – V. 1. – P. 1354-1363.
128. Lopatkin, A.J. Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance / A.J. Lopatkin, H.R. Meredith, J.K. Srimani, C. Pfeiffer, R. Durrett, L. You // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8: 1689.
129. Lu, J. Cooperative function of TraJ and ArcA in regulating the F plasmid *tra* operon / J. Lu, Y. Peng, S. Wan, L.S. Frost, T. Raivio, J.N.M. Glover // *J. Bacteriol.* – 2019: 201.
130. Machado, A.M.D. Human intestinal cells modulate conjugational transfer of multidrug resistance plasmids between clinical *Escherichia coli* isolates / A.M.D. Machado, M.O.A. Sommer // *PloS One.* – 2014. – V. 9: e100739.

131. Maciel, J.F. Virulence factors and antimicrobial susceptibility profile of extraintestinal *Escherichia coli* isolated from an avian colisepticemia outbreak / J.F. Maciel, L.B. Matter, M.M. Trindade, G. Camillo, M. Lovato, S. de Avila Botton, A. Castagna de Vargas // *Microb. Pathog.* – 2017. – V. 103. – P. 119-122.
132. Magiorakos, A.P. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance / A.P. Magiorakos, A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Lijequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, D.L. Monnet // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – V. 18(3). – P. 268-281.
133. Mahmoud, M.T. Prevalence of some virulence factors and genotypes of hospital-acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates recovered from cancer patients / T.M. Mahmoud, R.A. Ibrahim, M.T. Salim, A. Garb, H.M. Hably // *J. Global Antimicrob. Resist.* – 2020. – V. 23. – P. 211-216.
134. Majumder, M.I. Microbiology of catheter associated urinary tract infection / M.I. Majumder, T. Ahmed, S. Ahmed, A.R. Khan // In book: *Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factors*. 2018.
135. Manges, A.R. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat / A.R. Manges // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2016. – V. 22(2). – P. 122-129.
136. Maslennikova, I.L. Estimation of the bacteriocin ColE7 conjugation-based «kill»-«anti-kill» antimicrobial system by real-time PCR, fluorescence staining and bioluminescence assays / I.L. Maslennikova, M.V. Kuznetsova, N. Toplak, I.V. Nekrasova, D. Zgur-Bertok, M. Starcic Erjavec // *Lett. App. Microbiol.* – 2018. – V. 67(1). – P. 47-53.
137. Mathers, A.J. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid / A.J. Mathers, H.L. Cox, B. Kitchel, H. Bonatti, A.K. Brassinga, J. Carroll // *MBio.* – 2011. – V. 2: e00204-11.

138. McCarron, M. Antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* via pheromone-induced conjugation / M. McCarron, J. Dooley, I. Banat, J. Arnscheidt, W. Snelling // *Acc. Microbiol.* – 2019. – V. 1(1A).
139. Meena, P.R. Poultry-origin extraintestinal *Escherichia coli* strains carrying the traits associated with urinary tract infection, sepsis, meningitis and avian colibacillosis in India / P.R. Meena, P. Yadav, H. Hemlata, K.K. Tejavath, A.P. Singh // *J. Appl. Microbiol.* – 2020. – V. 130(6). – P. 2087-2101.
140. Mellata, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends / M. Mellata // *Foodborne Pathog. Dis.* – 2013. – V. 10. – P. 916-932.
141. Merritt, J.H. Growing and analyzing static biofilm / J.H. Merritt, D.E. Kadouri, G.A. O'Toole // *Curr. Protoc. Microbiol.* – 2005. – V. 1: Unit-1B.1.
142. Micenkova, L. Bacteriocin-encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal *Escherichia coli* strains / L. Micenkova, B. Staudova, J. Bosak, L. Mikalova, S. Littnerova, M. Vrba, A. Sevacikova, V. Woznicova, D. Smajs // *BMC Microbiol.* – 2014. – V. 14: 109.
143. Michaud, J.E. Cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF1) does not promote *E. coli* infection in a murine model of ascending pyelonephritis / J.E. Michaud, K.S. Kim, W. Harty, M. Kasprenski, M. Wang // *BMC Microbiol.* – 2017. – V. 17: 127.
144. Mitchell, N.M. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs / N.M. Mitchell, J.R. Johnson, B. Johnston, R. Curtiss // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2015. – V. 81. – P. 1177-1187.
145. Morales-Espinosa, R. UPEC strain characterization isolated from Mexican patients with recurrent urinary infections / R. Morales-Espinosa, R. Hernandez-Castro, R. Delgado, J.L. Mendez, A. Navarro, A. Manjarrez, A. Cravioto // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2016. – V. 10(4). – P. 317-328.
146. Moreira da Silva, R.C.R. Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasília, Brazil / R.C.R. Moreira da Silva, P. de Oliveira Martins Júnior, L.F. Gonçalves, V. de Paulo Martins,

- A.B.F. de Melo, A. Pitondo-Silva, T.A. de Campos // J. Glob. Antimicrob. Resist. – 2017. – V. 9. – P. 61-67.
147. Moriguchi, K. Targeting antibiotic resistance genes is a better approach to block acquisition of antibiotic resistance than blocking conjugal transfer by recipient cells: a genome-wide screening in *Escherichia coli* / K. Moriguchi, F.I.R.M. Zoolkefli, M. Abe, K. Kiyokawa, S. Yamamoto, K. Suzuki // Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 10: 2939.
148. Moulin-Schouleur, M. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns / M. Moulin-Schouleur, M. Répérant, S. Laurent, A. Brée, S. Mignon-Grasteau, P. Germon, D. Rasschaert, C. Schouler // J. Clin. Microbiol. – 2007. – V. 45(10). – P. 3366-3376.
149. Munita, J.M. Mechanisms of antibiotic resistance / J.M. Munita, C.A. Arias // Microbiol. Spectr. – 2016. – V. 4(2): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
150. Murase, K. HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis / K. Murase, P. Martin, G. Porcheron, S. Houle, E. Helloin, M. Penary, J.P. Nougayrede, C.M. Dozois, T. Hayashi, E.J. Oswald // Infect. Dis. – 2016. – V. 213. – P. 856-865.
151. Naboka Y.L. Does *Escherichia coli* have pathogenic potential at a low level of bacteriuria in recurrent, uncomplicated urinary tract infection? / Y.L. Naboka, A.R. Mavzyiutov, M.I. Kogan, I.A. Gudima, S.N. Ivanov, K.G. Naber // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2020. – V. 56(1): 105983.
152. Najafi, A. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates / A. Najafi, M. Hasanpour, A. Askary, M. Aziemzadeh, N. Hashemi // Folia Microbiol. – 2017. – V. 63(3). – P. 335-343.
153. Najafi, S. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* from human and avian origin: Detection of the most common virulence-encoding genes / S. Najafi, M. Rahimi, Z. Nikousefat // Vet. Res. Forum. – 2019. – V. 10. – P. 43-49.

154. Nakano, M. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein / M. Nakano, S. Yamamoto, A. Terai, O. Ogawa, S.I. Makino, H. Hayashi, G.B. Nair, H. Kurazono // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – V. 205(1). – P. 71-76.
155. Nesta, B. FdeC, a novel broadly conserved *Escherichia coli* adhesin eliciting protection against urinary tract infections / B. Nesta, G. Spraggon, C. Alteri, D.G. Moriel, R. Rosini, D. Veggi, S. Smith, I. Bertoldi, I. Pastorello, I. Ferlenghi, M.R. Fontana, G. Frankel, H.L.T. Mobley, R. Rappuoli, M. Pizza, L. Se-rino, M. Soriani // Infect. Immun. – 2012. – V. 3(2): e00010-12.
156. Nguyen, M. Mobile genetic elements in the genus *Bacteroides*, and their mechanism(s) of dissemination / M. Nguyen, G. Vedantam // Mob. Genet. Elem. – 2011. – V. 1. – P. 187-196.
157. Nonaka, L. Interplay of a non-conjugative integrative element and a conjugative plasmid in the spread of antibiotic resistance via suicidal plasmid transfer from an aquaculture *Vibrio* isolate / L. Nonaka, T. Yamamoto, F. Maruyama, Y. Hirose, Y. Onishi, T. Kobayashi, S. Suzuki, N. Nomura, M. Masuda, H. Yano // PLoS One. – 2018. – V. 13: e0198613.
158. Nowrouzian, F. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage / F. Nowrouzian, B. Hesselmar, R. Saalman, I.L. Strannegard, N. Aberg, A.E. Wold, I. Adlerberth // Pediatr. Res. – 2003. – V. 54(1). – P. 8-14.
159. O'Hara, R.W. Rapid detection of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* multi-locus sequence type 127 using a specific pCR assay / R.W. O'Hara, P.J. Jenks, M. Emery, M. Upton // J. Med. Microbiol. – 2019. – V. 68. – P. 188-196.
160. Oliveira E.S. Highly pathogenic and multidrug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* in free-range chickens from Brazil / E.S. Oliveira, M.V. Cardozo, M.M. Borzi, C.A. Borges, E.A.L. Guastalli, F.A. Ávila // Braz. J. Poult. Sci. – 2021. – V. 21(1): 001-008.
161. Orden, J.A. Subtilase cytotoxin-coding genes in verotoxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and goats differ from those from cattle / J.A. Orden, P. Horcajo,

- R. de la Fuente, J.A. Ruiz-Santa-Quiteria, G. Domínguez-Bernal, J. Carrión // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77(23). – P. 8259-8264.
162. Ozaki, H. Characteristics of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis in commercial farms from a common hatchery / H. Ozaki, Y. Matsuoka, E. Nakagawa, T. Murase // *Poult. Sci.* – 2017. – V. 96. – P. 3717-3724.
163. Paixão, A.C. Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates / A.C. Paixão, A.C. Ferreira, M. Fontes, P. Themudo, T. Albuquerque, M.C. Soares, M. Fevereiro, L. Martins, M.I. Corrêa de Sá // *Poult. Sci.* – 2016. – V. 95(7). – P. 1646-1652.
164. Parreira, V.R. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin / V.R. Parreira, C.L. Gyles // *Infect. Immun.* – 2003. – V. 71(9). – P. 5087-5096.
165. Pelling, H. Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters / H. Pelling, J. Nzakizwanayo, S. Milo, E.L. Denham, W.M. MacFarlane, L.J. Bock, J.M. Sutton, B.V. Jones // *Let. App. Microbiol.* – 2019. – V. 68(4). – P. 277-293.
166. Penfold, S.S. Regulation of the expression of the *traM* gene of the F sex factor of *Escherichia coli* / S.S. Penfold, J. Simon, L.S. Frost // *Mol. Microbiol.* – 1996. – V. 20. – P. 549-558.
167. Pérez-Mendoza, D. *Escherichia coli* genes affecting recipient ability in plasmid conjugation: are there any? / D. Pérez-Mendoza, F. de la Cruz // *BMC Genomics.* – 2009. – V. 9(10): 71.
168. Prasada, S. Changing antibiotic susceptibility pattern in uropathogenic *Escherichia coli* over a period of 5 years in a tertiary care center / S. Prasada, A. Bhat, S. Bhat, S. Shenoy Mulki, S. Tulasidas // *Infect. Drug. Resist.* – 2019. – V. 12. – P. 1439-1443.
169. Prenskey, H. Conjugation dynamics depend on both the plasmid acquisition cost and the fitness cost / H. Prenskey, A. Gomez-Simmonds, A. Uhlemann, A.J. Lopatkin // *Mol. Syst. Biol.* – 2021. – V. 17: e9913.
170. Ragupathi, D. Horizontal transfer of antimicrobial resistance determinants among enteric pathogens through bacterial conjugation / D. Ragupathi, M. Sethuvel, R.

- Gajendran, S. Anandan, K. Walia B. Veeraraghavan // *Curr. Microbiol.* – 2019. – V. 76. – P. 666-672.
171. Ramadan, H. Detection of phenotypes, virulence genes and phylotypes of avian pathogenic and human diarrheagenic *Escherichia coli* in Egypt / H. Ramadan, A. Awad, A. Ateya // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2016. – V. 10(6): 7762.
172. Reisner, A. Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion / A. Reisner, B.M. Holler, S. Molin, E.L. Zechner // *J. Bacteriol.* – 2006. – V. 188. – P. 3582-3588.
173. Rezatofighi, S.E. Virulence genes and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infection and uninfected control subjects: a casecontrol study / S.E. Rezatofighi, M. Mirzarazi, M. Salehi // *BMC Infect. Dis.* – 2021. – V. 21: 361.
174. Rijavec, M. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups / M. Rijavec, M. Starcic Erjavec, J. Ambrozic Avgustin, R. Reissbrodt, A. Fruth, V. Krizan-Hergouth, D. Zgur-Bertok // *Curr. Microbiol.* – 2006. – V. 53. – P. 158-162.
175. Ristow, L.C. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? / L.C. Ristow, R.A. Welch // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2016. – V. 1858. – P. 538-545.
176. Saha, O. Multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* strains and association of their virulence genes in Bangladesh / O. Saha, M.N. Hoque, O.K. Islam, M.M. Rahaman, M. Sultana, M.A. Hossain // *Microorg.* – 2020. – V. 8(8): 1135.
177. San Millan, A. Integrative analysis of fitness and metabolic effects of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / M. Toll-Riera, Q. Qi, A. Betts, R.J. Hopkinson, J. McCullagh, R.C. MacLean // *ISME J.* – 2018. – V. 12. – P. 3014-3024.
178. Santos, A.C.M., Diversity of hybrid- and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases // A.C.M. Santos, F.F. Santos, R.M. Silva, T.A.T. Gomes // *Front Cell Infect. Microbiol.* – 2020. – V. 15(10): 339.
179. Sarowska, J. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent

- reports / J. Sarowska, B. Futoma-Koloch, A. Jama-Kmiecik, M. Frej-Madrzak, M. Ksiazczyk, G. Bugla-Ploskonska, I. Choroszy-Krol // Gut Pathog. – 2019. – V. 11: 10.
180. Schwan, W.R. Flagella allow uropathogenic *Escherichia coli* ascension into murine kidneys / W.R. Schwan // Int. J. Med. Microbiol. – 2008. – V. 298(5-6). – P. 441-447.
181. Sedeek, D.M. Molecular epidemiology and sequencing of avian pathogenic *Escherichia coli* APEC in Egypt / D.M. Sedeek, M.M. Rady, H.S. Fedawy, N.S. Rabie // Adv. Anim. Vet. Sci. – 2020. – V. 8(5). – P. 499-505
182. Sheikh, A.F. Virulence-associated genes and drug susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection / A.F. Sheikh, H. Goodarzi, M.J. Yadyad, S. Aslani, M. Amin, N. Jomehzadeh, R. Ranjbar, M. Moradzadeh, S. Azarpira, M.R. Akhond, M. Hashemzadeh // Infect. Drug Resist. – 2019. – V. 12. – P. 2039-2047.
183. Shi, H. Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial *Escherichia coli* infection in China / H. Shi, F. Sun, J. Chen, Q. Ou, W. Feng, X. Yong, P. Xia // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2015. – V. 14: 4.
184. Shintani, M. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy / M. Shintani, Z.K. Sanchez, K. Kimbara // Front Microbiol. – 2015. – V. 6: 242.
185. Smajs, D. Bacteriocins synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor / D. Smajs, L. Micenkova, J. Smarda, M. Vrba, A. Sevcikova, Z. Valisova, V. Woznicova // BMC Microbiol. – 2010. – V. 10: 288.
186. Smillie, C. Mobility of plasmids / C. Smillie, M.P. Garcillan-Barcia, M.V. Francia, E.P. Rocha, F. de la Cruz // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2010. – V. 74(3). – P. 434-452.
187. Song, X. Outer membrane proteins YbjX and PagP co-regulate motility in *Escherichia coli* via the bacterial chemotaxis pathway / X. Song, M. Hou, J. Tu, M. Xue,

- Y. Shao, H. Jiang, H. Liu, T. Xue, G. Wang, K. Qi // Res. Vet. Sci. – 2019. – V. 125. – P. 279-284.
188. Song, X. *ybjX* mutation regulated avian pathogenic *Escherichia coli* pathogenicity through stress-resistance pathway / X. Song, M. Qiu, H. Jiang, M. Xue, J. Hu, H. Liu, X. Zhou, J. Tu, K. Qi // Avian Pathol. – 2020. – V. 49. – P. 144-152.
189. Sota, M. Horizontal gene transfer mediated by plasmids // M. Sota, E. Top // Plasmids: Current Research and Future Trends, ed V.A Norfolk: Caister Academic Press; Horizon Scientific Press. – 2008. – P. 111-181.
190. Spindola, M.G. Genetic diversity, virulence genotype and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from sows / M.G. Spindola, M.P.V. Cunha, L.Z. Moreno, C.R. Amigo, A.P.S. Silva, B.M. Parra, A.P. Poor, C.H. de Oliveira, B.P. Perez, T. Knöbl, A.M. Moreno // Vet. Quart. – 2018. – V. 38(1). – P. 79-87.
191. Spurbeck, R.R., Isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract / R.R. Spurbeck, P.C. Dinh, S.T. Walk, A.E. Stapleton, T.M. Hooton, L.K. Nolan, K.S. Kim, J.R. Johnson, H.L.T. Mobley // Infect. Immun. – 2012. – V. 80(12). – P. 4115-4122.
192. Stalder, T. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities / T. Stalder, E. Top // NPJ Biofilms Microbiomes. – 2016. – V. 2: 16022.
193. Starčič Erjavec, M. Strain ŽP – the first bacterial conjugation-based «kill»–«anti-kill» antimicrobial system / M. Starčič Erjavec, Z. Petkovsek, M.V. Kuznetsova, I.L. Maslennikova, D. Zgur-Bertok // Plasmid. – 2015. – V. 82. – P. 28-34.
194. Subedi, M. Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal / M. Subedi, H. Luitel, B. Devkota, R.K. Bhattarai, S. Phuyal, P. Panthi, A. Shrestha, D.K. Chaudhary // BMC Vet. Res. – 2018. – V. 14: 113.
195. Sun, D. Editorial: Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance / D. Sun, K. Jeannot, Y. Xiao, C.W. Knapp // Front. Microbiol. – 2019. – V. 10: 1933.
196. Tabasi, M. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from patients with acute cystitis, pyelonephritis and asymptomatic bacteriuria /

- M. Tabasi, M.R. Karam, M. Habibi, E. Mostafavi, S. Bouzari // J. Clin. Diagn. Res. – 2016. – V. 10(12): DC01-DC07.
197. Talan, D.A. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* infections in patients with pyelonephritis, United States / D.A. Talan, S.S. Takhar, A. Krishnadasan, F.M. Abrahamian, W.R. Mower, G.J. Moran // Emerg. Infect Dis. – 2016. – V. 22(9). – P. 1594-1603.
198. Tan, C.W. Urinary tract infections in adults / C.W. Tan, M.P. Chlebicki // Singap. Med. J. – 2016. – V. 57(9). – P. 485-490.
199. Terlizzi, M.E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies / M.E. Terlizzi, G. Gribaudo, M.E. Maffei // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8: 1566.
200. Tewawong, N. Distribution of phylogenetic groups, adhesion genes, biofilmformation, and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Thailand / N. Tewawong, S. Kowaboot, Y. Pimainog, I.N. Watanagu, T. Thongmee, Y. Poovorawan // PeerJ. – 2020. – V. 8: e10453.
201. Thomrongsuwannakij, T. A comparison of virulence genes, antimicrobial resistance profiles and genetic diversity of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolates from broilers and broiler breeders in Thailand and Australia / T. Thomrongsuwannakij, P.J. Blackall, S.P. Djordjevic, M.L. Cummins, N. Chansiripornchai // Avian Pathol. – 2020. – V. 49. – P. 457-466.
202. Tiba, M.R. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis / M.R. Tiba, T. Yano, D.S. Leite // Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. – 2008. – V. 50(5). – P. 255-260.
203. Tofteland, S. A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* involving intergenus plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir / S. Tofteland, U. Naseer, J.H. Lislevand, A. Sundsfjord, Ø. Samuelsen // PLoS One. – 2013. – V. 8: e59015.
204. Traxler, B. Introduction and Early History. In: Brenner's encyclopedia of genetics. 2nd ed. Eds: S. Maloy, K. Hughes Academic Press, USA, 2013.

205. Tu, J. The *irp2* and *fyuA* genes in high pathogenicity islands are involved in the pathogenesis of infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) / J. Tu, T. Xue, K. Qi, Y. Shao, B. Huang, X. Wang, X. Zhou // Pol. J. Vet. Sci. – 2016. – V. 19. – P. 21-29.
206. Ugwu, I.C. *In vitro* assessment of pathogenicity and virulence encoding gene profiles of avian pathogenic *Escherichia coli* strains associated with colibacillosis in chickens / I.C. Ugwu, L. Lee-Ching, C.C. Ugwu, J.O.A. Okoye, K.F. Chah // Iran. J. Vet. Res. – 2020. – V. 21(3). – P. 180-187.
207. Ulett, G.C. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract / G.C. Ulett, J. Valle, C. Beloin, O. Sherlock, J. Ghigo, M.A. Schembri // Infect. Immun. – 2007. – V. 75(7). – P. 3233-3244.
208. Vaitkus, S. A comparative study of experimental urinary catheters containing silver and zinc for biofilm inhibition / S. Vaitkus, R. Simoes-Torigoe, N. Wong, K. Morris, F.E. Spada, M. Alagiri, F.E. Talke // J. Biomater. Appl. – 2021. – V. 35(8). – P. 1071-1081.
209. Valle, J. UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli* / J. Valle, A.N. Mabbett, G.C. Ulett, A. Toledo-Arana, K. Wecker, M. Totsika, M.A. Schembri, J.M. Ghigo, C. Beloin // J Bacteriol. – 2008. – V. 190. – P. 4147-4161.
210. Versalovic, J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes / J. Versalovic, T. Koeuth, J.R. Lupski // Nucleic Acids Res. – 1991. – V. 19(24). – P. 6823-6831.
211. Virolle, C. Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: From the cellular to the community level / C. Virolle, K. Goldlust, S. Djermoun, S. Bigot, C. Lesterlin // Genes. – 2020. – V. 11: 1239.
212. Wang, Z. Classification of plasmid vectors using replication origin, selection marker and promoter as criteria / Z. Wang, J. Li, Y. Zhenghong, W. Grzegorz, W. Alicja // Plasmid. – 2009. – V. 61(1). – P. 47-51.

213. Weiner, L.M. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2011-2014 / L.M. Weiner, A.K. Webb, B. Limbago, A.M. Dudeck, J. Patel, A.J. Kallen, J.R. Edwards, D.M. Sievert // *Infect. Control Hospital Epidemiol.* – 2016. – V. 37(11). – P. 1288-1301.
214. Will, W.R. Characterization of the opposing roles of H-NS and TraJ in transcriptional regulation of the F-plasmid *tra* operon / W.R. Will, L.S. Frost // *J. Bacteriol.* – 2006. – V. 188. – P. 507-514.
215. Woods, L.C. Horizontal gene transfer potentiates adaptation by reducing selective constraints on the spread of genetic variation / L.C. Woods, R.J. Gorrell, F. Taylor, T. Connallon, T. Kwok, M.J. McDonald // *PNAS.* – 2020. – V. 117(43): 26868-26875.
216. Xu, X. Virulence factors and antibiotic resistance of rvian pathogenic *Escherichia coli* in Eastern China / X. Xu, Q. Sun, L. Zhao // *J. Vet. Res.* – 2019. – V. 63. – P. 317-320.
217. Yahiaoui, M. Antibiotic resistance, virulence, and genetic background of community-acquired uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria / M. Yahiaoui, F. Robin, R. Bakour, M. Hamidi, R. Bonnet, Y. Messai // *Microb. Drug Resist.* – 2015. – V. 21. – P. 516-526.
218. Yamaji, R. Persistent pandemic lineages of uropathogenic *Escherichia coli* in a college community from 1999 to 2017 / R. Yamaji, J. Rubin, E. Thys, C.R. Friedman, L.W. Riley // *J. Clin. Microbiol.* – 2018. – V. 56(4): e01834-17.
219. Yamamoto, S. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction / S. Yamamoto, A. Terai, K. Yuri, H. Kurazono, Y. Takeda, O. Yoshida // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1995. – V. 12. – P. 85-90.
220. Yamanaka, M. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis / M. Yamanaka, K. Hara, J. Kudo // *AEM.* – 2005. – V. 71(11). – P. 7589-7593.
221. Yang, H. Cytotoxic necrotizing factor 1 downregulates CD36 transcription in macrophages to induce inflammation during acute urinary tract infections / H. Yang, Q.

- Li, C. Wang, J. Wang, J. Lv, L. Wang, Z. Zhang, Z. Yao, Q. Wang // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 31(9): 1987.
222. Yazdanpour, Z. Significant association between genes encoding virulence factors with antibiotic resistance and phylogenetic groups in community acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates / Z. Yazdanpour, O. Tadjrobehkar, M. Shahkhah // *BMC Microbiol.* – 2020. – V. 20: 241.
223. Yulistiani, R. Prevalence of antibiotic-resistance enterobacteriaceae strains isolated from chicken meat at traditional markets in Surabaya, Indonesia / R. Yulistiani, D. Praseptianga, D. Raharjo, T. Shirakawa // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* – 2017. – V. 193: 012007.
224. Yun, K.W. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children / K.W. Yun, H.Y. Kim, H.K. Park, W. Kim, I.S. Lim // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* – 2014. – V. 47(6). – P. 455-461.
225. Zhang, K. Novel selective inhibitors of nuclear export CRM1 antagonists for therapy in mantle cell lymphoma / K. Zhang, M. Wang, A.T. Tamayo, S. Shacham, M. Kauffman, J. Lee, L. Zhang, Z. Ou, C. Li, L. Sun, R.J. Ford, L.V. Pham // *Exp. Hematol.* – 2013. – V. 41(1). – P. 67-78.
226. Zhao, L. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model / L. Zhao, S. Gao, H. Huan, X. Xu, X. Zhu, W. Yang, Q. Gao, X. Liu // *Microbiol.* – 2009. – V. 155. – P. 1634-1644.
227. Zhao, R. Phylogenetic distribution of virulence genes among ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from long-term hospitalized patients / R. Zhao, J. Shi, Y. Shen, Y. Li, Q. Han, X. Zhang, G. Gu, J. Xu // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2015. – V. 9(7): DC01-DC04.
228. Zhuge, X. Chicken-source *Escherichia coli* within phylogroup F shares virulence genotypes and is closely related to extraintestinal pathogenic *E. coli* causing human infections / X. Zhuge, Z. Zhou, M. Jiang, Z. Wang, Y. Sun, F. Tang, F. Xue, J. Ren, J. Dai // *Transbound Emerg. Dis.* – 2020. – V. 68(2). – P. 880-895.