

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

Михайловская Вероника Сергеевна

**БАКТЕРИОЦИН-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ *ESCHERICHIA COLI*:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ**

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор медицинских наук, профессор,
Кузнецова Марина Валентиновна

Пермь, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Бактерии <i>E. coli</i> : комменсальные и патогенные	15
1.2. Факторы <i>E. coli</i> , ассоциированные с патогенностью.....	17
1.3. Резистентность <i>E. coli</i> к антимикробным препаратам.....	19
1.4. Бактериоцины <i>E. coli</i> : классификация и механизмы действия	20
1.5. Стратегии биотехнологического применения бактериоцинов и бактериоцин-продуцирующих штаммов <i>E. coli</i>	23
1.6. Интегральная характеристика штаммов <i>E. coli</i> в отношении рисков и потенциала применения	24
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ	28
2.1. Бактериальные изоляты и штаммы	28
2.2. Выделение бактериальной ДНК.....	30
2.3. Детекция генов методом ПЦР	30
2.4. Секвенирование и сборка геномов штаммов <i>E. coli</i>	36
2.5. Аннотация и анализ геномов штаммов <i>E. coli</i>	36
2.6. Обнаружение продукции бактериоцинов методом отсроченного антагонизма на плотной питательной среде.....	38
2.7. Оценка антагонистической активности бесклеточных культуральных жидкостей бактериоцин-продуцирующих <i>E. coli</i>	38
2.8. Оценка антагонистической активности <i>Lactobacillus</i> spp. в отношении <i>E. coli</i> на плотной питательной среде методом штрихов	39
2.9. Оценка выживаемости бактерий в модельной среде желудка	39
2.10. Оценка гемолитической активности	40

2.11. Оценка лизогенной активности	40
2.12. Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом	41
2.13. Оценка неспецифической адгезии	41
2.14. Оценка специфической адгезии	42
2.15. Приготовление суспензий <i>E. coli</i> Q5, <i>E. coli</i> C41, <i>E. coli</i> C55 для перорального введения животным	43
2.16. Дизайн эксперимента <i>in vivo</i>	43
2.17. Анализ гематологических и биохимических показателей	45
2.18. Гистологический анализ	45
2.19. Бактериологический анализ микробиоты кишечника крыс	45
2.20. Статистический анализ и визуализация данных	46
ГЛАВА 3. БАКТЕРИОЦИНЫ ЭКСТРАИНТЕСТИНАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ И КОММЕНСАЛЬНЫХ <i>E. COLI</i> : РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ	47
3.1. Сравнение распространенности продукции и молекулярно-генетического разнообразия бактериоцинов экстраинтестинальных патогенных и комменсальных <i>E. coli</i>	47
3.2. Молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов уropатогенных <i>E.</i> <i>coli</i> , выделенных от пациентов стационаров и поликлиник	54
3.3. Распространенность продукции и молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов комменсальных <i>E. coli</i> , выделенных от здоровых животных	56
ГЛАВА 4. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ЭКСТРАИНТЕСТИНАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ И КОММЕНСАЛЬНЫХ <i>E. COLI</i> : МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, СВЯЗЬ С ПРОДУКЦИЕЙ И ГЕНАМИ БАКТЕРИОЦИНОВ ...	60

4.1. Распространенность островов патогенности и их ассоциация с бактериоциногенами экстраинтестинальных патогенных и комменсальных <i>E. coli</i>	60
4.2. Распространенность факторов патогенности и их ассоциация с бактериоциногенами экстраинтестинальных патогенных и комменсальных <i>E. coli</i>	62
4.2.1. Распространенность факторов патогенности и их ассоциация с генами биосинтеза бактериоцинов уropатогенных <i>E. coli</i>	62
4.2.2. Распространенность факторов патогенности и их ассоциация с фенотипом и генотипом бактериоциногении патогенных для птиц <i>E. coli</i>	67
4.2.3. Распространенность факторов патогенности среди комменсальных штаммов <i>E. coli</i> , выделенных от животных и птиц.....	69
4.2.4. Ассоциация факторов патогенности с фенотипом и генотипом бактериоциногении комменсальных штаммов <i>E. coli</i> , выделенных от животных и птиц	75
4.3. Фенотип устойчивости к антибиотикам, распространенность генов антибиотикорезистентности и мобильных генетических элементов среди комменсальных <i>E. coli</i>	79
4.4. Ассоциация устойчивости к антибиотикам, генов устойчивости к антибиотикам, мобильных генетических элементов с фенотипом и генотипом бактериоциногении патогенных для птиц и комменсальных <i>E. coli</i>	85
ГЛАВА 5. БАКТЕРИОЦИН-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ КОММЕНСАЛЬНЫЕ <i>E. COLI</i> : АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, СПОСОБНОСТЬ К АДГЕЗИИ <i>IN VITRO</i> И ЭФФЕКТ <i>IN VIVO</i>	91
5.1. Антагонистическая активность бесклеточных культуральных жидкостей бактериоцин-продуцирующих штаммов <i>E. coli</i> в отношении условно-патогенных тест-штаммов <i>in vitro</i>	91

5.2. Характеристика профилей биобезопасности бактериоцин-продуцирующих штаммов <i>E. coli</i>	94
5.3. Характеристика генетических локусов бактериоцинов штаммов <i>E. coli</i> Q5 и <i>E. coli</i> C41	98
5.4. Оценка антагонистической активности бесклеточных культуральных жидкостей <i>E. coli</i> Q5 и <i>E. coli</i> C41 в отношении условно-патогенных тест-штаммов <i>in vitro</i>	100
5.5. Оценка взаимодействия штаммов <i>E. coli</i> Q5 и <i>E. coli</i> C41 с представителями <i>Lactobacillus</i> spp. <i>in vitro</i>	104
5.6. Оценка свойств клеточной поверхности и способности к адгезии <i>in vitro</i> штаммов <i>E. coli</i> Q5 и <i>E. coli</i> C41	106
5.7. Оценка безопасности и эффективности штаммов <i>E. coli</i> Q5 и <i>E. coli</i> C41 <i>in vivo</i>	110
5.7.1. Влияние <i>E. coli</i> Q5 и <i>E. coli</i> C41 на физиологические, биохимические и гематологические параметры крыс в норме и в модели экспериментальной инфекции	110
5.7.2. Влияние <i>E. coli</i> Q5 и <i>E. coli</i> C41 на морфологию кишечника и печени в модели экспериментальной инфекции	114
5.7.3. Влияние <i>E. coli</i> Q5 и <i>E. coli</i> C41 на состав кишечной микробиоты крыс в норме и в модели экспериментальной инфекции	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	127
БЛАГОДАРНОСТИ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Вид бактерий *Escherichia coli* неоднороден и включает комменсальные, экстраинтестинальные и диареегенные варианты. Комменсальные *E. coli* являются субдоминантными представителями нормальной микробиоты кишечника животных и человека, составляя 1-2% филума *Pseudomonadota*. Экстраинтестинальные *E. coli* являются условно-патогенными, поскольку при транслокации в другие биотопы могут вызывать инфекционные заболевания, например, стать причиной гнойно-воспалительных процессов в мочевыделительной системе, желчных путях, органах дыхания. Диареегенные *E. coli* вызывают различные виды острых кишечных инфекций. Одним из ключевых факторов конкурентоспособности всех представителей вида *E. coli* считаются бактериоцины – белковые или пептидные токсины, подавляющие рост близкородственных бактерий. Многочисленные теоретические и экспериментальные исследования убедительно показали, что продуценты бактериоцинов имеют конкурентное преимущество в сравнении с непродуцентами при колонизации одной и той же экологической ниши (Dobson *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2025). Однако, несмотря на значительный объем исследований, посвященных бактериоцинам *E. coli*, ряд важных вопросов остается недостаточно изученным.

Распространенность отдельных генов бактериоцинов в коллекциях *E. coli* различного происхождения документирована в ряде исследований (Gordon, O'Brien, 2006; Smith *et al.*, 2019; Mazurek-Popczyk *et al.*, 2020), однако комплексные данные о молекулярно-генетическом разнообразии бактериоцинов с одновременной оценкой фенотипа продукции, факторов патогенности, устойчивости к антибиотикам и мобильных элементов представлены, преимущественно, для отдельных групп штаммов и часто без учета эколого-патотипического контекста. Ассоциации между бактериоциногенностью и генами вирулентности описаны в нескольких работах, однако результаты противоречивы:

в одних исследованиях бактериоцин-продуцирующие штаммы характеризуются повышенным патогенным потенциалом (Dobson *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2025), в других – такой связи не обнаружено (Ghazaryan *et al.*, 2019). Вопрос о том, являются ли бактериоцины самостоятельными факторами вирулентности или маркерами определенных генетических линий, остается дискуссионным.

В контексте разработки пробиотических препаратов бактериоцин-продуцирующие непатогенные *E. coli* привлекают внимание благодаря способности подавлять рост близкородственных патогенных бактерий и модулировать состав микробиоты (Sassone-Corsi *et al.*, 2016). С учетом глобальной проблемы роста устойчивости к антибиотикам среди представителей *Enterobacterales* и дефицита новых антибактериальных препаратов, такие штаммы рассматриваются как перспективная альтернатива или дополнение к традиционной антимикробной терапии. Однако их внедрение в клиническую и ветеринарную практику требует тщательной оценки биобезопасности. Растущий интерес к технологиям на основе живых микробных систем, сочетающих антагонизм к патогенам, способность формировать колонизационную резистентность и иммуномодулирующее действие, определяет актуальность исследований.

Целью настоящей работы являлось изучение молекулярно-генетического разнообразия бактериоцинов экстраинтестинальных патогенных и комменсальных *Escherichia coli*, а также обоснование возможности применения комменсальных бактериоцин-продуцирующих *E. coli* для контроля энтеробактериальных инфекций.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить распространенность продукции и молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов уропатогенных (UPEC), патогенных для птиц (APEC) и выделенных от здоровых животных и птиц комменсальных *E. coli*.
2. Проанализировать распространенность генетических детерминант факторов патогенности (токсинов, адгезинов, систем захвата железа, островов патогенности), генов устойчивости к антибиотикам, мобильных

генетических элементов у штаммов *E. coli* и связь перечисленных признаков с фенотипом и генотипом продукции бактериоцинов.

3. Дать комплексную характеристику перспективных для биотехнологического применения штаммов *E. coli*, включая анализ их геномов, оценку адгезивных свойств, гидрофобности клеточной поверхности, взаимодействия с представителями комменсальной микрофлоры (*Lactobacillus* spp.) и антагонистической активности в отношении условно-патогенных штаммов *in vitro*.
4. Оценить безопасность и защитный эффект отобранных штаммов *E. coli* в модели экспериментальной токсикоинфекции *in vivo*.

Научная новизна работы

Впервые проведено комплексное сравнение распространенности и молекулярно-генетического разнообразия бактериоцинов для исследованных коллекций штаммов *E. coli*: уропатогенных (UPEC), патогенных для птиц (APES) и комменсальных *E. coli*, выделенных от здоровых животных и птиц. Впервые показано, что профили бактериоцинов структурированы по эколого-патотипической принадлежности штаммов. APES характеризовались высокой продукцией и представленностью бактериоцинов с доминированием микроцина B17 и колицина М, тогда как комменсальные *E. coli* отличались доминированием пороформирующих бактериоцинов, а уропатогенные *E. coli* – микроцинов-сидерофоров М и Н47. Показано, что, несмотря на общую экстраинтестинальную природу UPEC и APES, последние формировали обособленную группу по профилям генов продукции бактериоцинов.

Впервые установлены региональные особенности распространенности генов патогенности, антибиотикорезистентности и мобильных генетических элементов у *E. coli* различного происхождения. Показано, что комменсальные штаммы, выделенные от здоровых животных, несли широкий и разнообразный набор генов патогенности и устойчивости к антибиотикам, включая гены β -лактамаз расширенного спектра. Данные подтверждают, что штаммы *E. coli* служат

маркером для оценки распространения β -лактамаз расширенного спектра среди людей, животных, а также в объектах окружающей среды. Это указывает на необходимость системного мониторинга штаммов *E. coli*.

Установлено, что бактериоцин-продуцирующие комменсальные штаммы обладают более выраженным набором факторов патогенности, чаще кодируют токсины, адгезины и системы захвата железа, что указывает на ассоциацию между бактериоциногенностью и высоким патогенным потенциалом, возможную ко-селекцию этих признаков. Выявлен штамм *E. coli* C51 с исключительным для исследованной коллекции профилем: девятью плазмидами и шестью локусами бактериоцинов, что демонстрирует сложную организацию генома и потенциальную роль плазмид в совместном распространении генов, повышающих адаптивный потенциал бактерий.

Впервые показано, что среди комменсальных *E. coli*, выделенных от клинически здоровых сельскохозяйственных животных, встречаются штаммы, несущие серологические маркеры, характерные для энтеропатогенных вариантов, но не содержащие генов энтеротоксинов, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных для создания «пробиотических вакцин». Впервые получены полные последовательности геномов штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41, продемонстрировавших высокий биотехнологический потенциал по результатам исследований *in vitro* и *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты настоящего исследования расширяют представление о роли бактериоцинов в экологии и эволюции *E. coli*. Получены новые данные о том, что репертуар бактериоцинов не является случайным признаком, а структурирован по эколого-патотипической принадлежности штаммов: UPEC, APEC и комменсальные штаммы характеризовались специфическими профилями бактериоцинов, что указывает на адаптивную роль этих факторов в разных нишах (мочевыводящие пути человека, органы птиц во время активной инфекции, желудочно-кишечный тракт животных). Полученные данные подчеркивают, что профили бактериоцинов

следует рассматривать не только как маркеры антагонистической активности, но и как индикаторы наличия у штаммов (в том числе патогенных) механизмов защиты от бактериоцинов. Такая информация имеет практическое значение и должна учитываться при конструировании новых препаратов на основе бактериоцинов и бактериоцин-продуцирующих бактерий. Полученные сведения о профилях бактериоцинов, генов токсинов, адгезинов, систем захвата железа, маркеров островов патогенности, генов антибиотикорезистентности и мобильных генетических элементов вносят вклад в понимание эволюционной динамики и меняющейся генетической архитектуры клинических и полевых штаммов *E. coli*, а также возможных механизмов ко-селекции признаков. Данные о связи между бактериоциногенностью и перечисленными признаками патогенности поддерживают концепцию о роли бактериоцинов в формировании общего конкурентного и патогенного потенциала штаммов. Дополнительную научную значимость представляют сформированные коллекции детально охарактеризованных комменсальных штаммов *E. coli*. Эти коллекции могут быть использованы для изучения межбактериальной конкуренции, механизмов колонизации, проведения сравнительных геномных и фенотипических исследований.

Практическая значимость работы заключается в том, что штаммы собранных коллекций представляют интерес как продуценты уникальных бактериоцинов и других биологически активных соединений, а отдельные изоляты с благоприятным профилем безопасности могут служить основой для дальнейшей разработки пробиотических препаратов и иных биотехнологических продуктов. Для штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 была проведена комплексная оценка биотехнологического потенциала как штаммов с высокой антагонистической активностью в отношении условно-патогенных бактерий *in vitro*, благоприятным профилем биобезопасности и защитным эффектом *in vivo*. Эти штаммы могут быть использованы в качестве основы для разработки отечественных пробиотических препаратов для ветеринарии и, потенциально, для медицины. Штаммы *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 были депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (Пушино, Россия) под номерами ВКМ В-3706Д и ВКМ В-3707Д соответственно; в базу данных

GenBank были депонированы геномы под номерами SAMN35637330 и SAMN35637331 соответственно. Получены патенты: «Штамм бактерий *Escherichia coli* C41 для получения пробиотического препарата для профилактики колибактериоза сельскохозяйственных животных» (Патент № 2807738 C1) и «Штамм бактерий *Escherichia coli* Q5, перспективный для получения пробиотического препарата для профилактики колибактериоза сельскохозяйственной птицы» (Патент № 2806907 C1).

Методология и методы исследования

Объектом исследования являлись штаммы *Escherichia coli* разных эколого-патотипических групп лабораторной коллекции Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН, Пермь), выделенные ранее из образцов мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей, органов птиц с признаками колибактериоза, содержимого кишечника здоровых животных и птиц сельскохозяйственных предприятий Пермского края.

Неклональность штаммов была установлена в системе двойного контроля с помощью гер-ПЦР. Способность штаммов к продукции бактериоцинов оценивалась методом отсроченного антагонизма в отношении тест-штамма *E. coli* DH5 α . Детекцию генов бактериоцинов, токсинов, адгезинов, факторов захвата железа, маркеров островов патогенности, мобильных генетических элементов, генов устойчивости к антибиотикам осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Фенотипическую устойчивость к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом. Для выбранных штаммов выполняли полногеномное секвенирование на платформе Oxford Nanopore MinION. Уровень неспецифической адгезии штаммов оценивали в отношении гидрофобной (пластик) и гидрофильной поверхности (стекло), уровень специфической адгезии – в отношении эритроцитов человека и животных. Гидрофобность клеточной стенки определяли методом разделения в двухфазной системе. Выживаемость штаммов в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт, оценивали при инкубации в средах с

различным рН, в присутствии желчных солей и пепсина. Антагонистическую активность бесклеточных супернатантов оценивали в отношении условно-патогенных бактерий. Оценку безопасности и протекторной активности отобранных штаммов проводили на лабораторных животных (крысы стока Wistar) в модели экспериментальной инфекции, вызванной энтеропатогенным штаммом *E. coli* C55. Оценивали выживаемость, динамику массы тела, изменение биохимических и гематологических показателей, морфологии ткани кишечника и количества основных представителей кишечной микробиоты. Протокол исследования на животных был одобрен этическим Комитетом Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (протокол №19/2, дата утверждения 22.02.23).

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность полученных данных подтверждается значительным количеством технических и биологических повторов. Используемые методики соответствуют общепризнанным международным стандартам и были реализованы на современном оборудовании и программном обеспечении. Выводы исследования сделаны на основании общепринятых методов статистической обработки данных по результатам постановки трех и более независимых экспериментов. Результаты работы опубликованы в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, представлены на всероссийских и международных конференциях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Распространенность и молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов *E. coli* зависят от эколого-патотипической принадлежности штаммов: патогенные для птиц *E. coli* (APEC) характеризуются высокой представленностью и специфическим профилем бактериоцинов, тогда как уропатогенные (UPEC) и комменсальные *E. coli* имеют более гетерогенные профили с доминированием микроцинов-сидерофоров и пороформирующих бактериоцинов соответственно.

2. Наличие генов и фенотипическая продукция бактериоцинов тесно ассоциированы с рядом факторов патогенности *E. coli*, а также генами устойчивости к антибиотикам и мобильными генетическими элементами, что важно учитывать для оценки биобезопасности бактериоцин-продуцирующих штаммов.
3. Бактериоцин-продуцирующие комменсальные штаммы *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 обладают комплексом значимых в биотехнологическом отношении признаков: их экзометаболиты проявляют антагонистическую активность в отношении устойчивых к антибиотикам штаммов АРЕС и диареегенных *E. coli*; штаммы обладают более высокой адгезией к эритроцитам животных, чем человека; благоприятным профилем биобезопасности *in silico*.
4. Бактериоцин-продуцирующие комменсальные штаммы *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 безопасны *in vivo* и обладают защитным эффектом от патогенного воздействия токсигенного штамма *E. coli* C55 в модели экспериментальной инфекции.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоял в анализе доступной литературы, планировании и постановке экспериментов, анализе и статистической обработке результатов, написании текста диссертации, патентов и публикаций. Основные результаты были получены автором, либо при его непосредственном участии. Полногеномное секвенирование штаммов было выполнено на базе и при участии сотрудников лаборатории анализа метагеномов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена Российской академии наук» (Москва). Эксперименты *in vivo* были проведены на базе и при участии сотрудников Центральной научно-исследовательской лаборатории «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» (Пермь).

Апробация результатов

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, включая 8 публикаций в сборниках материалов Международных и Всероссийских конференций, 8 экспериментальных статей, в том числе 7 статей в журналах, входящих в международные базы цитирования Web of Science, Scopus, 1 статья в журнале РИНЦ. Получено 2 патента на изобретение.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена в рамках НИОКТР «Биоразнообразие микроорганизмов антропогенно загрязненных экосистем и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды» (№124020500028-4); при поддержке РФФИ «Биопленкообразование *Escherichia coli* как триггер катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей» (№ 19-44-590014-р_а, 2019-2021); в рамках научного проекта, выполняемого международными исследовательскими группами ученых на базе государственных образовательных организаций высшего образования и (или) научных организаций Пермского края: «Усовершенствование методов антимикробной защиты на предприятиях молочного и мясного животноводства с целью контроля над распространением бактериальных инфекций» (№С-26/541, 2021-2023); при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фондом содействия инновациям) в рамках программы «Студенческий стартап» (№3755ГССС15-L/99785, 2024-2025).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 24 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 109 литературных источников, в том числе 4 отечественных и 105 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Бактерии *E. coli*: комменсальные и патогенные

Escherichia coli (кишечная палочка) – это микроорганизм, который является постоянным обитателем кишечника животных и человека. Бактерии *E. coli* обладают внутривидовой гетерогенностью, занимают различные биотопы и имеют разнородный профиль факторов патогенности. Вид *E. coli* не является однородным, с точки зрения влияния на здоровье животных и человека можно выделить 3 группы эшерихий: комменсальные, экстраинтестинальные и диареегенные (Vila *et al.*, 2016).

Экстраинтестинальные *E. coli* (ExPEC) являются условно-патогенными эшерихиями, поскольку при попадании в другую экологическую нишу они могут вызывать инфекционные заболевания, например, стать причиной гнойно-воспалительных процессов в мочевыводящей системе, желчных путях, органах дыхания. Экстраинтестинальные *E. coli* содержат гены, кодирующие факторы вирулентности, благодаря которым бактерии способны проникать во внекишечные участки (Dale, 2015; Riley, 2020). Уропатогенные (от англ. *uropathogenic E. coli*, UPEC) являются возбудителями воспалительных процессов мочевыводящей системы, таких как цистит, пиелонефрит и инфекции мочевыводящих путей (ИМВП), ассоциированные с катетером (Russo, Johnson, 2003; Vila *et al.*, 2016). Менингит-ассоциированные (от англ. *neonatal meningitis E. coli*, NMEC) вызывают менингиты новорожденных. *E. coli* является одной из основных причин неонатального менингита, вызывая 20-40% случаев. Сепсис-ассоциированные (от англ. *sepsis associated pathogenic E. coli*, SePEC) вызывают сепсис-синдром, тяжелый сепсис или септический шок (Russo, Johnson, 2003). Патогенные для птиц (от англ. *avian pathogenic E. coli*, APEC) эшерихии вызывают птичий колибактериоз, характеризующийся поражением многих органов.

Диареегенные штаммы *E. coli* (DEC) являются возбудителями острых кишечных инфекций, они различаются по своим вирулентным характеристикам и,

соответственно, вызывают разные клинические формы колибактериоза. К классу DEC относят следующие группы. Энтеротоксигенные (от англ. *enterotoxigenic E. coli*, ЕТЕС) поражают тонкий кишечник и вызывают холероподобные заболевания. Их патогенность связана с выработкой термолабильного (LT) и термостабильного (ST) токсинов, которые нарушают водно-солевой обмен в кишечнике, подавляется всасывание воды и электролитов (Kaper *et al.*, 2004; Croxen *et al.*, 2013). Энтероинвазивные (от англ. *enteroinvasive E. coli*, ЕІЕС) вызывают дизентериеподобные заболевания, они способны внедряться в эпителиальные клетки толстого кишечника, вызывая их деструкцию (Croxen *et al.*, 2013). Энтеропатогенные (от англ. *enteropathogenic E. coli*, ЕРЕС) поражают тонкий кишечник, разрушают микроворсинки и повреждают апикальную поверхность эпителия, что приводит к его дегенерации и, следовательно, уменьшению всасывающей поверхности кишечника (Russo, Johnson, 2003). Энтерогемморрагические (от англ. *enterohemorrhagic E. coli*, ЕНЕС) вызывают кровавую диарею с осложнениями. Энтерогемморрагические кишечные палочки, способные продуцировать шига-подобный токсин (веротоксин), обозначаются как STEC или VTEC. Шига-подобные токсины отличаются системным действием, они проникают в кровь и разрушают эндотелий кровеносных сосудов кишечника, в результате чего возникает кровотечение, развивается некроз клеточной стенки (Caldas *et al.*, 2024). Известно, что наиболее тяжелые заболевания сельскохозяйственных животных вызывают энтеротоксигенные (ЕТЕС) и шига-токсин-продуцирующие штаммы (STEC) (Hrálal *et al.*, 2021). Таким образом, крупный рогатый скот и овцы становятся источником инфекции для человека, заражение ЕНЕС происходит при употреблении плохо обработанного контаминированного мяса (Mainga *et al.*, 2018). Энтероаггративные (от англ. *enteroaggregative E. coli*, ЕАЕС) колонизируют тонкий и толстый кишечник и вызывают секреторную диарею. ЕАЕС прикрепляются к эпителиальным клеткам и формируют агрегаты и биопленки (Croxen *et al.*, 2013).

Комменсальные штаммы *E. coli* являются представителями нормальной микробиоты человека и животных и обеспечивают колонизационную

резистентность организма. Эти эшерихии, как правило, не вызывают заболеваний внутри или за пределами желудочно-кишечного тракта (Vila *et al.*, 2016). Тем не менее, многочисленные исследования подтверждают, что комменсальные штаммы могут нести факторы, ассоциированные с патогенностью. Здоровые сельскохозяйственные животные зачастую являются бессимптомными носителями патогенных и потенциально патогенных *E. coli*, которые могут представлять угрозу для здоровья человека (Chapman *et al.*, 2006; Ewers *et al.*, 2009; Bok *et al.*, 2015; Madoshi *et al.*, 2016).

1.2. Факторы *E. coli*, ассоциированные с патогенностью

Развитие инфекционного процесса определяется сочетанием факторов патогенности, которые обуславливают адгезивность, колонизацию, инвазивность, агрессивность, токсичность и устойчивость микроорганизма к действию механизмов защиты макроорганизма. Адгезия является одним из ключевых этапов колонизации организма хозяина и развития инфекции, поскольку обеспечивает прикрепление бактерий к клеткам эпителия, слизистым оболочкам и биологическим либо абиотическим поверхностям. У патогенных *E. coli* адгезия осуществляется с помощью разнообразных фимбриальных и афимбриальных адгезинов, а также белков наружной мембраны.

Фимбриальные адгезины являются структурными компонентами ворсинок бактерий. Особое место занимают пиелонефрит-ассоциированные пили (Р-фимбрии). Белок-адгезин PapG располагается терминально и отвечает за связывание с рецепторами эпителиальных клеток мочевыводящего тракта (Bien *et al.*, 2012). Другой вид ворсинок – это фимбрии 1 типа, которые имеют сложную структуру, с помощью адгезина FimH они способны специфически связываться с маннозосодержащими рецепторами клеток мочевого пузыря (Bien *et al.*, 2012). Также одним из белков, опосредующих адгезию к клеткам организма хозяина, является S-фимбриальный адгезин, ответственный за распознавание сиаловых кислот на поверхности клетки. *Афимбриальные адгезины* – это поверхностно-связанные белки, опосредующие колонизацию. Например, афимбриальный адгезин

Afa опосредует адгезию к уротелиальным клеткам. Белки наружной мембраны – это белки, встроенные во внешнюю мембрану клеток *E. coli*. Примером такого белка служит интимин, который способен связываться со своим рецептором (транслоцированный рецептор интимина – Tir). Tir выделяется в цитоплазму эпителиальных клеток кишечника, после чего встраивается в плазматическую мембрану, обеспечивая связывание интимина (Luo *et al.*, 2000).

Токсины участвуют в повреждении клеток хозяина, нарушении функций кишечного эпителия, изменении водно-электролитного обмена, развитии воспаления и системных осложнений. Порообразующие токсины семейства RTX (от англ. *repeats in toxin*), содержащие в молекулах большое количество аминокислотных повторов, формируют трансмембранные каналы, что приводит к лизису энтероцитов (Supotnitskiy, 2011). К RTX-семейству относится, например, гемолизин *E. coli* (HlyA), который принимает участие в порообразовании и разрушении мембран клеток (Alouf *et al.*, 2005). Токсины, ингибирующие синтез белка, воздействуют на рибосомную РНК (рРНК) и факторы элонгации трансляции (Supotnitskiy, 2011; Santos *et al.*, 2021). К данной группе относятся шига-подобные токсины Stx1 и Stx2, которые продуцируют STEC. Механизм действия этих токсинов заключается в том, что они взаимодействуют с 28S рРНК, отщепляя остаток аденина. В результате нарушается синтез белка, что приводит к гибели эукариотических клеток (Kavaliauskiene *et al.*, 2017). Токсины, генерирующие образование вторичных мессенджеров, влияют на функцию отдельных белков эукариотической клетки, они активируют вторичных посредников, способных нарушать ключевые метаболические пути (Supotnitskiy, 2011). Примером такого токсина является цитотоксический некротизирующий фактор первого типа (CNF-1), который влияет на процессы дезаминирования трансформирующего белка RhoA, что приводит к нарушению регуляции синтеза цитоскелета (Santos *et al.*, 2021). Термолабильные (LT) и термостабильные (STa и STb) энтеротоксины нарушают всасывание ионов Na^+ , при этом увеличивается экскреция ионов Cl^- , что приводит к выходу жидкости из пораженных клеток и развитию секреторной диареи (Santos *et al.*, 2021). Существуют еще две группы токсинов:

протеолитические, а также токсины-активаторы иммунного ответа, которые могут действовать непосредственно на Т-клетки (Santos *et al.*, 2021).

Факторы защиты и выживания помогают бактериям противостоять системе комплемента, фагоцитам и другим компонентам врожденного иммунитета. Особенно часто эти детерминанты выявляют у экстраинтестинальных патогенных *E. coli*, включая АРЕС, UPEC и NMES. Капсула представляет собой слой полисахаридов, расположенный на поверхности бактериальной клетки. Она может препятствовать связыванию компонентов комплемента и поглощению бактерий фагоцитами, тем самым повышая выживаемость *E. coli* в крови и тканях. Ген *iss* (от англ. *increased serum survival*) кодирует белок, связанный с повышенной выживаемостью бактерий в сыворотке крови. Предполагается, что Iss участвует в защите наружной мембраны от бактерицидного действия комплемента (Biran *et al.*, 2021). Ген *ompT* кодирует протеазу наружной мембраны OmpT, относящуюся к семейству омпинов. Это поверхностная сериновая протеаза, способная расщеплять ряд белков хозяина, в том числе антибактериальные пептиды (Sarowska *et al.*, 2019).

1.3. Резистентность *E. coli* к антимикробным препаратам

Гетерогенность штаммов *E. coli* отражает высокую степень генетической пластичности и адаптивности, которая обеспечивается горизонтальным переносом генов. Из-за распространения генов устойчивости к антибиотикам, расположенных на мобильных генетических элементах (плазмидах, в составе бактериофагов, транспозонах и интегронах), во всем мире регистрируется увеличение числа случаев инфекций, вызванных мультирезистентными *E. coli* (Andriukov *et al.*, 2022).

Наиболее значимыми являются гены устойчивости к β -лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, фениколам. Устойчивость к β -лактамам антибиотикам может быть обусловлена продукцией β -лактамаз, включая TEM, SHV, AmpC и CTX-M (Poirel *et al.*, 2018). Особое эпидемиологическое значение имеют гены семейства *bla*_{CTX-M}, кодирующие β -

лактамазы расширенного спектра (БЛРС). (Ewers *et al.*, 2012). Эти ферменты гидролизуют пенициллины, цефалоспорины, азтреонам.

Устойчивость к фторхинолонам у *E. coli* может возникать в результате мутаций в хромосомных генах *gyrA* и *parC*. Эти гены кодируют субъединицы ДНК-гиразы и топоизомеразы IV – основных мишеней фторхинолонов. Помимо хромосомных мутаций, у *E. coli* широко распространены плазмидные гены устойчивости к хинолонам – *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* и *qnrS* (Poirel *et al.*, 2018). Белки Qnr защищают ДНК-гиразу и топоизомеразу IV от действия фторхинолонов. Сами по себе *qnr* обычно обеспечивают невысокий уровень устойчивости, но способствуют выживанию бактерий при концентрациях антибиотика, недостаточных для полного подавления популяции (Strahilevitz *et al.*, 2009).

Устойчивость к тетрациклинам в основном связана с активным выведением препарата или защитой рибосом. Гены *tetA*, *tetB*, *tetC* и *tetD* кодируют белки эффлюксных насосов, снижающих внутриклеточную концентрацию тетрациклинов. Среди изолятов *E. coli* наиболее распространены *tetA* и *tetB* (Thaker *et al.*, 2010). К основным генам устойчивости к хлорамфениколу относятся *catA1*, *cmlA*, *floR* и *fexA*. Гены *cat* кодируют хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, инактивирующие препарат посредством ацетилирования. Гены *cmlA* и *floR* кодируют эффлюксные насосы, при этом *floR* особенно часто выявляют у изолятов животного происхождения. Он обеспечивает устойчивость к флорфениколу и может одновременно снижать чувствительность к хлорамфениколу и тиамфениколу (Li *et al.*, 2007). Таким образом, спектр генов антибиотикорезистентности *E. coli* отражает разнообразие механизмов защиты бактерии от антимикробных препаратов.

1.4. Бактериоцины *E. coli*: классификация и механизмы действия

Существует высокая потребность в разработке новых противомикробных препаратов и стратегий, эффективных против бактерий, устойчивых к современным антибиотикам. В этой связи, бактериоцины рассматриваются в качестве перспективных молекул. Бактериоцины – это специфические белки,

вырабатываемые бактериями и подавляющие жизнедеятельность бактерий того же вида или родственных видов, которые занимают ту же экологическую нишу (Заславская *et al.*, 2019). Действие бактериоцинов основано на связывании с рецепторными белками микроорганизмов, что обеспечивает проникновение в клетку-мишень. Бактериоцины обычно используют рецепторы, участвующие в поглощении питательных веществ, например, витаминов. Для транспорта через мембрану и высвобождения необходимы белки, образующие системы транслокации. Кроме того, у *E. coli* синтезируются белки иммунитета, защищающие клетки от собственных бактериоцинов. По присутствию рецепторов, систем транспорта, белков иммунитета выделяют чувствительные и устойчивые к бактериоцинам *E. coli*. Чувствительные к колицинам штаммы имеют на поверхности наружной мембраны рецепторные белки, а также систему транслокации. На такие бактерии колицины действуют летально. Устойчивые к колицинам штаммы включают иммунные штаммы (продуцируют белки иммунитета, инактивирующие колицины), резистентные (не содержат рецепторов к данному колицину), толерантные (бактерии с дефектами транслокационной системы) (Сао, Klebba, 2002).

По молекулярной массе бактериоцины разделяют на две группы: колицины (25-80 кДа) и микроцины (<10кДа). Синтез колицинов регулируется одним из механизмов репарации ДНК, таким как SOS-ответ, что является отличительной чертой колицинов. Большинство структурно изученных колицинов имеют модульную трехдоменную организацию. От N- к С-концу в молекуле выделяют: N-концевой домен транслокации (Т-домен), который обеспечивает прохождение колицина через наружную мембрану чувствительной клетки; центральный рецептор-связывающий домен (R-домен), который распознает специфический рецептор на поверхности клетки-мишени; С-концевой цитотоксический домен (С-домен), отвечает за непосредственную гибель клетки-мишени (Cascales *et al.*, 2007). В зависимости от рецептора колицины могут использовать: BtuB (рецептор транспорта витамина B12); Cir (рецептор транспорта железосодержащих соединений); FerA (рецептор энтеробактина); Fiu (рецептор катехолатных

сидерофоров); OmpF (неспецифический пориновый канал); другие белки наружной мембраны (Cascales *et al.*, 2007). Генетические системы колицинов обычно включают не только структурный ген токсина, но и ген иммунитета, который кодирует белок, защищающий клетку-продуцент от действия собственного колицина. У некоторых колицинов высвобождение из клетки связано с лизисом части продуцирующей популяции. В таких случаях в составе генетического кластера присутствует ген лизиса, кодирующий белок, нарушающий целостность оболочки. Другие колицины могут высвобождаться без обязательного лизиса клетки посредством специализированных транспортных механизмов (Cascales *et al.*, 2007).

Микроцины представляют собой класс рибосомально-синтезируемых антимикробных пептидов, играющих важную роль во внутривидовой бактериальной конкуренции. Микроцины – это бактериоцины с молекулярной массой 1–10 кДа, продуцируемые *E. coli*. Микроцины классифицируют на два типа, I и II, на основе природы и расположения посттрансляционных модификаций, организации их генных кластеров и последовательности лидерного пептида (Yang *et al.*, 2024). Молекулярная масса микроцинов класса I составляет менее 5 кДа, и они включают посттрансляционно модифицированные пептиды, такие как MccB17, Mcc7-C51 и MccJ25. Микроцины класса II имеют молекулярную массу 5–10 кДа и подразделяются на два подкласса, IIa и IIb. Класс IIa кодируется плазмидой и не имеет посттрансляционной модификации или дисульфидных связей (например, MccL, MccV и Mcc24), тогда как класс IIb кодируется хромосомным геном с посттрансляционной модификацией на С-конце (например, E492, M и H47) (Yang *et al.*, 2024).

Согласно литературным данным, существует несколько механизмов киллерного действия бактериоцинов. Некоторые колицины образуют каналы в мембране, через которые выходят ионы K^+ , H^+ (микроцины E492, V; колицины A, E1, K, Ia, Ib). Это приводит к уменьшению мембранного потенциала клетки и блокированию поглощения питательных веществ (Cascales *et al.*, 2007; Балко, 2012). Такие бактериоцины называют канал(поро)-формирующими. Колицины с

нуклеазной активностью обуславливают деградацию нуклеиновых кислот за счет образования одно- и двуцепочечных разрывов ДНК (колицины E2, E7, E9), блокирования включения тимина в молекулу нуклеиновой кислоты (колицин E2, микроцин B17), а также ингибирования синтеза ДНК (микроцины B17, J25). Существуют колицины как с ДНКазной (E2, E7, E8, E9), так и с РНКазной (E3, E5, E6, E4, DF13) активностью. Например, колицин E3 и микроцин C7 расщепляют 16S рибосомальную РНК, что приводит к угнетению белкового синтеза, колицины E5 и D разрушают тРНК (Балко, 2012). Группа ферментативных (энзимных) бактериоцинов включает вещества, способные ингибировать клеточные ферменты. Например, микроцин C15 связывает гомосерин-О-трансукцинат, необходимый для синтеза метионина (Балко, 2012). Другие колицины обуславливают деградацию пептидогликана, что приводит к разрушению клеточной стенки и вызывает лизис бактерий (колицин M) (Cascales *et al.*, 2007; Балко, 2012). Согласно другой классификации, в зависимости от особенностей строения домена транслокации, колицины дополнительно разделяются на две группы. К группе А относят бактериоцины, которым для проникновения в цитоплазму чувствительных микроорганизмов необходима клеточная Tol-система транспорта (колицины A, E1, E2, E3, K, L) (Балко, 2012). В группу В входят колицины, перемещающиеся через внешнюю мембрану с использованием транслокационной системы Ton (колицины B, Ia, Ib, V, D, M) (Braun *et al.*, 2002).

1.5. Стратегии биотехнологического применения бактериоцинов и бактериоцин-продуцирующих штаммов *E. coli*

Распространенность отдельных генов бактериоцинов и способность к их продукции изучались в коллекциях *E. coli* различного происхождения, включая фекальные изоляты человека, комменсальные штаммы, выделенные от животных, а также патогенные и зоонозные изоляты (Gordon, O'Brien, 2006; Micenková *et al.*, 2016; Micenková *et al.*, 2018). У комменсальных *E. coli* человека выявлено широкое разнообразие профилей бактериоцинов, включая ColE1, ColIb, ColIa, ColM, MscH47 и MscV. Показано, что отдельные продуценты бактериоцинов проявляли

активность против антибиотикорезистентных зоонозных штаммов в условиях *in vitro* (Mazurek-Porczyk *et al.*, 2020). Кроме этого, продукция бактериоцинов бактериями непосредственно в кишечнике хозяина может предотвращать колонизацию мультирезистентными патогенами без нарушения естественной микробиоты (Benítez-Chao *et al.*, 2021). В классическом представлении для пробиотических микроорганизмов наличие продукции бактериоцинов рассматривается как один из признаков конкурентного преимущества в кишечной экосистеме. Наиболее изученным примером является пробиотический штамм *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Показано, что микроцины, синтезируемые EcN, подавляют рост *Salmonella enterica* и адгезивно-инвазивных *E. coli*, в том числе при воспалительных заболеваниях кишечника (Sassone-Corsi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2023).

Вторым направлением является использование очищенных или рекомбинантных бактериоцинов (Kim *et al.*, 2010; Van Staden *et al.*, 2012; Campion *et al.*, 2013). Эти пептиды могут применяться как узкоспецифичные антимикробные агенты, особенно против близкородственных энтеробактерий, однако практическое использование бактериоцинов ограничивается их протеолитической деградацией в макроорганизме, формированием устойчивости бактерий к колицинам и микроцинам (Soltani *et al.*, 2021). Некоторые авторы отмечают, что бактериоцины, например, микроцин E492 могут оказывать цитотоксическое действие на эукариотические клетки, в частности опухолевые (Assega *et al.*, 2025).

1.6. Интегральная характеристика штаммов *E. coli* в отношении рисков и потенциала применения

Как обсуждалось выше, продукция антимикробных пептидов (бактериоцинов) лежит в основе пробиотической активности и конкурентоспособности *E. coli*. Пробиотический эффект бактериоцин-продуцирующих *E. coli* не ограничивается прямым подавлением патогенов. Некоторые бактериоцины способны влиять на состояние кишечного барьера, состав микробиоты и интенсивность воспалительного ответа. Бактериоцин-

продуцирующий штамм может воздействовать на организм хозяина одновременно через несколько механизмов: конкурентное исключение патогенов, изменение микробного сообщества и иммуномодуляцию. Показано, что известный пробиотический штамм *E. coli* Nissle 1917 оказывает не только антагонистическое действие за счет продукции микроцинов на патогенные энтеробактерии, но и иммуномодулирующий эффект, а также ослабляет воспаление кишечника у мышей (Sassone-Corsi *et al.*, 2016). Было доказано, что этот штамм эффективен для лечения воспалительных заболеваний кишечника, в частности язвенного колита у человека (Zhao *et al.*, 2022). В последние годы получены интересные данные об очищенных микроцинах (микроцин J25 и микроцин C7): для них показаны антибактериальные, противовоспалительные и усиливающие барьерную функцию кишечника эффекты, а также влияние на микробиоту и медиаторы воспаления (Yu *et al.*, 2022; Dai *et al.*, 2022; Dai *et al.*, 2023). В исследовании Dai *et al.* был продемонстрирован противовоспалительный эффект введения MccC7 цыплятам-бройлерам: добавление в рацион цыплят MccC7 повышало уровни сывороточного цитокина IL-10, иммуноглобулинов IgG и IgM, а также секрецию sIgA в подвздошной кишке и значительно снижало уровень сывороточного цитокина TNF (Dai *et al.*, 2022). Эта же научная группа продемонстрировала иммунорегуляторный эффект MccC7 в модели мышей с иммунодепрессией, вызванной циклофосфамидом (Dai *et al.*, 2023).

Другим важным компонентом конкурентоспособности штаммов являются *сидерофоры* – низкомолекулярные соединения, способные связывать железо Fe^{3+} с высокой аффинностью. В организме хозяина железо преимущественно связано с трансферрином, лактоферрином, гемоглобином и другими белками, поэтому доступность этого элемента для бактерий ограничена. Продукция сидерофоров позволяет *E. coli* извлекать железо из окружающей среды и поддерживать рост в условиях железодефицита. У комменсальных и пробиотических штаммов сидерофорные системы могут способствовать устойчивой колонизации кишечника и конкуренции с патогенными бактериями (Ahire *et al.*, 2011). Особый интерес представляют микроцины-сидерофоры, например MccM и MccH47. Они

используют рецепторы транспорта железосодержащих комплексов, поэтому могут эффективно действовать на бактерии, экспрессирующие соответствующие рецепторы в условиях воспаления и дефицита железа.

Адгезия к слизистому слою и эпителиальным клеткам является важным условием колонизации кишечника. Она позволяет бактериям удерживаться в кишечной нише, конкурировать за участки прикрепления и препятствовать контакту патогенов с эпителием, поэтому адгезивность часто рассматривают как один из критериев пробиотического потенциала (Kline *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2022). Функциональная адгезия определяется комплексом поверхностных структур, включая фимбрии 1-го типа, курли, F1C-подобные фимбрии, общие пили *E. coli* и афимбриальные адгезины. Экспериментальные исследования показывают, что более адгезивные штаммы могут эффективнее препятствовать закреплению энтеротоксигенных бактерий и обеспечивать защиту хозяина (Starkey *et al.*, 2012; Zawistowska-Rojek, Tyski, 2020). Однако выраженная адгезивность не всегда является безусловно благоприятным признаком. Слишком эффективное или длительное прикрепление может способствовать персистенции, вытеснению отдельных представителей нормальной микробиоты и, при наличии других факторов вирулентности, повышать риск оппортунистической инфекции. Перспективным является штамм, который способен временно взаимодействовать со слизью и эпителием, конкурировать с патогенами, но не демонстрирует признаков инвазии, выраженной персистенции или повреждения клеток хозяина.

Отсутствие токсинов и факторов патогенности является принципиальным условием применения комменсального штамма в качестве пробиотического. Особого внимания требуют геномные острова и плазмиды, способные объединять несколько факторов вирулентности. Показательным примером является штамм *E. coli* Nissle 1917, имеющий длительную историю применения, но содержащий остров *pks*, связанный с синтезом генотоксина колибактина (Nougayrède *et al.*, 2021). Это подчеркивает, что длительная история безопасного использования не заменяет современную геномную оценку. Данные о потенциальной генотоксичности EcN остаются предметом обсуждения: отдельные

исследования выявляли наличие *pks*-острова и возможные генотоксические эффекты, тогда как другие работы не обнаруживали измеримой генотоксичности в экспериментальных моделях (Nougayrède *et al.*, 2021).

Антигенная структура штаммов может иметь значение для их взаимодействия с иммунной системой хозяина и оценки возможности создания живых или клеточных вакцинных препаратов. О-антиген липополисахарида, К-антиген капсулы, фимбриальные белки определяют серологические свойства бактерии и могут формировать специфический иммунный ответ. Особый интерес представляют комменсальные штаммы, которые имеют серогруппы, характерные для энтеропатогенных вариантов *E. coli*, но не содержат соответствующих генов энтеротоксинов. Такие изоляты потенциально могут использоваться как носители антигенных структур или как основа для разработки живых профилактических препаратов. Однако сама по себе принадлежность к определенной серогруппе не подтверждает защитный эффект и не является достаточным основанием для создания вакцинного штамма.

Таким образом, бактериоцины, сидерофоры и адгезины формируют функциональное ядро колонизационного и пробиотического потенциала *E. coli*. Бактериоцины обеспечивают конкурентное подавление близкородственных патогенов, сидерофоры поддерживают выживание в условиях ограниченной доступности железа, а адгезины способствуют закреплению в кишечной нише и реализации колонизационной резистентности. Вместе с тем, эти же признаки могут присутствовать у патогенных штаммов, поэтому их оценка должна проводиться в контексте полного геномного и фенотипического профиля.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

2.1. Бактериальные изоляты и штаммы

Объектами исследования были изоляты уропатогенной *E. coli* (UPEC) (n=177), выделенные из мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей; штаммы птичьих патогенных *E. coli*, выделенные из органов цыплят-бройлеров с признаками колибактериоза (APEC) (n=28); штаммы *E. coli*, выделенные из фекалий сельскохозяйственных птиц (всего n=16), в том числе цыплят (n=2), кур (n=4), индюков (n=7), перепелов (n=3); а также сельскохозяйственных животных (всего n=56), в том числе коров (n=49), кроликов (n=4) и свиней (n=3).

В экспериментах по оценке антагонистической активности бесклеточных культуральных жидкостей (супернатантов) бактериоцин-продуцирующих штаммов *E. coli* в качестве тест-штаммов использовали полевые и референс-культуры: патогенные для птиц *E. coli* (*E. coli* BR4, *E. coli* BR35, *E. coli* BR37), диареегенные *E. coli* (*E. coli* CA29, *E. coli*, CA43, *E. coli* CA46), *E. coli* O157, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (далее *Salmonella* Typhimurium), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* (Таблица 1). Референс-штаммы патогенных микроорганизмов получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им Л.А. Тарасевича (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва). Патогенные для птиц штаммы, депонированные в Ех коллекции культур (the Ех culture collection) кафедры биологии биотехнологического факультета Университета Любляны (Univerza v Ljubljani, Словения), были предоставлены из лабораторной коллекции ИЭГМ УрО РАН. Диареегенные штаммы были получены от крупного рогатого скота на сельскохозяйственных предприятиях Пермского края (Михайловская и др., 2022). Принадлежность штаммов к диареегенным патотипам определяли детекцией маркерных генов STEC и ETEC: *stx1* (*E. coli* CA29), *est1* (*E. coli* CA43), *stx2+est1* (*E. coli* CA46).

Таблица 1 – Тест-штаммы, использованные в исследовании

Тест-штамм	Коллекция/ источник	Номер в коллекции
Штаммы, использованные для оценки антагонистической активности		
<i>Escherichia coli</i> BR4	«Ex culture collection», Университет Любляны, Словения	L-5838
<i>Escherichia coli</i> BR35		L-5865
<i>Escherichia coli</i> BR37		L-5868
<i>Escherichia coli</i> CA29	Фекалии крупного рогатого скота предприятий Пермского края, Россия (Михайловская и др., 2022)	—
<i>Escherichia coli</i> CA43		
<i>Escherichia coli</i> CA46		
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Университет Любляны, Словения	—
<i>Escherichia coli</i> O157	Государственная коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им Л.А. Тарасевича (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава, Москва, Россия	240329
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 700603		B-7474
<i>Proteus mirabilis</i> №Н-237		160120
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		41501
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (FDA 209P)		201108
<i>Shigella flexneri</i> №170		232151
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium №1135	Фекалии пациента с острым энтеритом в медицинском учреждении, Пермь, Россия	—
Коммерческие штаммы, использованные для оценки биосовместимости и контроля		
<i>Escherichia coli</i> M-17	Коммерческий препарат «Колибактерин»	—
<i>L. fermentum</i> 90T-C4	Предоставлены НПО «Биомед»	—
<i>L. plantarum</i> 8P-A3		—
<i>L. acidophilus</i> КЗШ24		—
Штамм, использованный для моделирования инфекции <i>in vivo</i>		
<i>Escherichia coli</i> C55	Фекалии крупного рогатого скота предприятий Пермского края, Россия	—

Штамм *E. coli* M-17 был получен из пробиотического препарата «Колибактерин» (АО «НПО «МИКРОГЕН», Россия) и использовался в качестве контроля сравнения. Культуры *L. fermentum* 90T-C4, *L. plantarum* 8P-A3 и *L. acidophilus* КЗШ24 были предоставлены НПО «Биомед» (Пермь, Россия) Несчислаевым В.А. и использовались в настоящей работе для оценки биосовместимости и антагонистической активности. Энтеротоксигенный штамм *E. coli* C55 был выделен от теленка с диареей. *E. coli* C55 продуцировал кишечные токсины (Stx1, East1, EhxA) и был устойчив к бета-лактамам антибиотикам

(ампициллин, цефтриаксон, цефепим, цефоперазон). Этот штамм был использован в настоящей работе для моделирования экспериментальной токсикоинфекции.

Все штаммы, за исключением *Lactobacillus* spp., выращивали в богатой питательной среде Лурия-Бертани (LB-среда, «Amresco», США) при 37°C. Контроль роста культуры осуществляли по измерению оптической плотности на планшетном ридере Tecan Infinite M1000 (Австрия) при длине волны 600 нм (OD₆₀₀). Штаммы *Lactobacillus* spp. выращивали в жидкой питательной среде MPC-5 (НИЦФ, Санкт-Петербург, Россия) или LART в течение 4 суток при 37°C в анаэробных условиях.

2.2. Выделение бактериальной ДНК

Для выделения ДНК клетки разрушали методом термолизиса: бактериальную биомассу в сверхчистой воде прогревали 15 мин при 97°C в твердотельном термостате «Термит» (Россия), пробы охлаждали, центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин. Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-2000. Супернатанты переносили в чистые эппендорфы и хранили при -20°C до использования.

2.3. Детекция генов методом ПЦР

Принадлежность штаммов к виду *E. coli* подтверждали путем детекции фрагмента гена β-глюкуронидазы методом ПЦР с использованием праймеров uidA-F/uidA-R. Неклональность изолятов была подтверждена с помощью rep-ПЦР с праймерами ERIC1/2.

Методом ПЦР по конечной точке детектировали 30 генов бактериоцинов (микроцинов B17, H47, J25, V, M, C7, L; колицинов – A, B, D, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, Ia, Ib, Js, K, M, N, S4, U, Y, 5, 10); 24 гена патогенности, кодирующих адгезины (*afa/draBC*, *fimH*, *papC*, *sfaDE*, *upaG*, *flu*), токсины (*hlyA*, *hlyF*, *eastI*, *eltA*, *estI*, *estII*, *stx1*, *stx2*, *ehxA*, *cnf1*, *clbA*), протектины (*iss*, *ompT*, *kpsMTII*), белки систем поглощения железа (*iha*, *chuA*, *iroN*, *iutA*); 15 генов устойчивости к антибиотикам, обуславливающих резистентность к β-лактамным антибиотикам (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV},

*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}), тетрациклинам (*tetA*, *tetB*, *tetM*, *tet(X)*), хлорамфениколу (*cmlA*, *catA1*, *floR*) и фторхинолонам (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*); гена-регулятора конъюгативного переноса (*traJ*) и интегронов класса I. Штаммы *E. coli* были проверены на наличие островов патогенности, а именно: HPI, SHI-2, Tia, EspC, She, LEE, O-island. Перечисленные PAI были детектированы по следующим маркерным генам: *irp2* (маркер HPI, кодирующий иерсиниабактин), *iutA* (ген SHI-2, кодирующий рецептор аэробактина), *tia* (ген Tia, кодирующий инвазин), *espC* (ген EspC, кодирующий энтеротоксин), *pic* (ген She, кодирующий сериновую протеазу); *eaeA* (ген LEE, кодирующий интимин), *lifA/efal* (ген O-island, кодирующий фактор адгезии и ингибирования лимфоцитов ЕНЕС). Праймеры были синтезированы согласно рекомендациям авторов (ООО «Евроген», Россия) (Таблица 2). Амплификацию проводили в реакционных смесях объемом 20 мкл, содержащих 3 мкл матричной ДНК, по 2,5 мкл прямого и обратного праймеров с концентрацией 10 мкМ, а также готовую к использованию реакционную смесь 5X ScreenMix (Евроген, Россия). После амплификации 10 мкл каждой ПЦР-смеси разделяли методом электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле с использованием агарозы Е («ДиаГен», Россия). Гели окрашивали бромистым этидием в концентрации 0,5 мг/мл. Амплифицированные продукты визуализировали и документировали с помощью системы для документирования гелей Gel-DocXR (Bio-Rad, США). В качестве положительного контроля для каждого исследуемого гена использовали штаммы с подтвержденным генотипом из локальной лабораторной коллекции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (Пермь, Россия). В качестве отрицательного контроля использовали воду, свободную от нуклеаз.

Таблица 2 – Последовательности праймеров, температуры отжига (T_m) и размеры продукта амплификации ряда генов *E. coli*

Ген/ мишень	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	T _m , °C	Размер, п.н.	Источник
Гены биосинтеза бактериоцинов				
ColE1	F: TGTGGCATCGGGCGAGAATA R: CTGCTTCCTGAAAAGCCTTTT	55	650	Gordon <i>et al.</i> , 1998
ColE7	F: CCCTCCCTGACTTGACAGAGAAAATAATGGCG R: GCCTCTGTGTAATCACTAATACTATTTTTCAG	55	1894	
ColK	F: GGTGATGTGAATAAACAGAAAGG R: CAGCGTGACAAACAAAGG	55	792	Schamberger <i>et al.</i> , 2004
ColIa	F: GCATGCAAATGACGCTCTTA R: GAGGACGCCAGTTCTCTGTC	55	473	
ColIb	F: AACGAGTGGGTGCGATGATTC R: CCTTTTCTGCGCTCGTATTC	55	464	
ColB	F: AAGAAAATGACGAGAAGACG R: GAAAGACCAAAGGCTATAAGG	55	493	
ColM	F: CATCACCATCAACTAACTTACC R: CTCTTTACCAGAAAACATCG	55	737	Šmajs <i>et al.</i> , 2010
Col10	GGTTACCGGATTTTCTGGAT TTCTAGATGCTTGGCCCACT	60	448	
Col5	CATTGGCAAAAGCGAAATCT TGCAACTCTGGAAACAATCG	60	443	
ColD	CTGGACTGCTGCTGGTGATA GAAGGTGCGCCTACTACTGC	60	420	
ColE2	TGATGCTGCTGCAAAAGAG TTCAAAGCGTTCCCTACCAC	60	409	
ColE3	TAAGCAGGCTGCATTTGATG TCGGATCTGGACCTTTCAAC	60	413	
ColE4	GAAGGCTGCATTTGATGCT CGGATCCGGACCTTTAATTT	60	409	
ColE5	TAAGCAGGCTGCATTTGATG TTGAATTCTCGAATCGTCCA	60	430	
ColE6	ACCGAACGTCCAGGTGTT TTAGCCTGTCGCTCCTGAT	60	399	
ColE8	TAAGCAGGCTGCATTTGATG GACTGATTGGCTTGTCGTGA	60	449	
ColE9	TAAGCAGGCTGCATTTGATG GACTTTTCTCCCTCCGACCT	60	418	
ColJs	TCAAAATGTTTGGGCTCCTC TAATCTGCCCTGTCCCACTG	60	254	
ColN	AGCTTGCGAGTATCTTGGA CAACACAGCCCCGAATAAAC	60	401	

Продолжение таблицы 2

ColS4	TATATGGCCCAACTGCTGGT CGTAAGGACGGACACCTGTT	60	456	Šmajs <i>et al.</i> , 2010
ColU	TGATTGCTGCGAGAAAAATG TCTGACAGCCTCTCCCTGTT	60	485	
ColY	GCAGGCAGAAAAGAACAAGG CGGACGTTATTTGCCTTCAT	60	477	
ColA	CGTGGGGAAAAGTCATCATC GCTTTGCTCTTTCCTGATGC	60	475	
MccL	F: GGTAATGATATATGAGAGAAATAACGTTA R: TTTCGCTGAGTTGGAATTCCTGCTGCATC	60	233	
MccC7	F: CGTTCAACTGTTGCAATGCT R: AGTTGAGGGGCGTGTAATTG	60	134	
MccV	F: CACACACAAACGGGAGCTGTT R: CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	55	680	Johnson, Stell, 2000
MccJ25	F: TCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTACCAAT R: TGATTAAAGCATTTTCATTTTAATAAAGTGT	55	175	Gordon, O'Brien, 2006
MccB17	F: TCACGCCAGTCTCCATTAGGTGTTGGCATT R: TTCCGCCGCTGCCACCGTTTCCACCACTAC	55	135	
MccH47	F: CACTTTCATCCCTTCGGATTG R: AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC	55	227	
MccM	F: CGTTTATTATTTTATGCATA R: AAACGGAAGAATGGATGATCTCGCAAA	55	456	
Гены патогенности				
<i>fimH</i>	F: CAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG R: TGC GTACCAGCATTAGCAATGTCC	64	461	Guiral <i>et al.</i> , 2011
<i>afa/</i> <i>draBC</i>	F: GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC R: CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	63	592	Johnson, Stell, 2000
<i>papC</i>	F: GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG R: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	65	328	Nowrouzian <i>et al.</i> , 2003
<i>sfaDE</i>	F: CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC R: CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	65	410	
<i>upaG</i>	F: GATAGGCAAGGACGCAAGA R: GGTCGCAATATCCGTAGT	58	1218	O'Hara <i>et al.</i> , 2018
<i>usp</i>	F: ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTSTGT R: CATCRTGTAGTCKGGGSGTAACAAT	68	1017	Nakano <i>et al.</i> , 2001
<i>iha</i>	F: CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA R: TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	63	827	Chapman <i>et al.</i> , 2006
<i>hlyA</i>	F: GTCTGCAAAGCAATCCGCTGCAAATAAA R: CTGTGTCCACGAGTTGGTTGATTAG	58	561	Kerényi <i>et al.</i> , 2005
<i>hlyF</i>	F: TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAAC R: TTTGGCGGTTTAGGCATTCC	51	444	Moulin- Schouleur <i>et al.</i> , 2007

Продолжение таблицы 2

<i>eltA</i>	F: GGCACAGATTATACCGTGC R: CCGAATTCTGTTATATATGTC	58	696	Chapman <i>et al.</i> , 2006
<i>estI</i>	F: TCTTTCCCCTCTTTAGTCAG R: ACAGGCAGGATTACAACAAAG	58	166	Chapman <i>et al.</i> , 2006
<i>estII</i>	F: ATCGCATTTCTTCTTGCATC R: GGGCGCCAAAGCATGCTCC	58	172	
<i>stx1</i>	F: ATAAATCGCCTATCGTTGACTAC R: AGAACGCCCCACTGAGATCATC	60	180	
<i>stx2</i>	F: GGCAGTGTCTGAACTGCTCC R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	60	255	
<i>eastI</i>	F: CCATCAACACAGTATATCCGA R: GGTGCGGAGTGACGGCTTTGT	45	111	
<i>ehxA</i>	F: GCATCATCAAGCGTACGTTCC R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	60	534	
<i>cnfI</i>	F: CTGACTTGCCGTGGTTTAGTCGG R: TACACTATTGACATGCTGCCCCGGA	59	1295	Kuhar <i>et al.</i> , 1998
<i>iroN</i>	F: AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG R: GACGCCGACATTAAGACGCAG	64	925	Johnson, Stell, 2000
<i>iutA</i>	F: GGCTGGACATCATGGGAACTGG R: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	65	301	Nowrouzian <i>et al.</i> , 2003
<i>iss</i>	F: CAGCAACCCGAACCACTTGATG R: AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	63	323	Jonson e <i>et al.</i> , 2008
<i>ompT</i>	F: TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT R: TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	63	469	
<i>kpsMTII</i>	F: GCGCATTTGCTGATACTGTTG R: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	60	270	Jonson, Stell, 2000
<i>clbA</i>	F: ATGAGGATTGATATATTAATTGGACA R: TCAATTCTGCCCATTTGACG	50	735	Eklöf <i>et al.</i> , 2017
<i>chuA</i>	F: ATGGTACCGGACGAACCAAC R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	59	288	Clermont <i>et al.</i> , 2013
Острова патогенности				
She	F: ATTCTTCTGGCTGGCATTCC R: CGGGATTAGAGACTATTGTTGC	57	606	Naderi <i>et al.</i> , 2016
HPI	F: AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R: TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	61	287	
Tia	F: CGGGATCCGATGAGAGCAAAACAGGCTT R: GGGGTACCGAAATGATAAGTTACCCC	45	756	
EspC	F: GCTCAACTAAATATTGATAATGTATG R: CCCAGCCCCAACCCTGAAAC	54	453	
O-islands	F: GAACAAAGAACATTTTCACCAGTTC R: CTTTCAGGTGGGGAACCCG	58	521	
LEE	F: GACCCGGCACAAGCATAAGC R: CCACCTGCAGCAACAAGAGG	60	384	

Продолжение таблицы 2

SHI-2	F: AATCAATGGCTATTCCCGCTG R: CGCTTCACTTCTTTCACTGACAGG	59	239	Naderi <i>et al.</i> , 2016
Гены устойчивости к антибиотикам				
<i>bla_{TEM}</i>	F: ATCAGCAATAAACCAGC R: CCCCGAAGAACGTTTTTC	56	516	Aleisa, 2013
<i>bla_{CTX-M}</i>	F: CGCTTTGCGATGTGCAG R: ACCGCGATATCGTTGGT	52	551	Ahmed <i>et al.</i> , 2007
<i>bla_{SHV}</i>	F: TCGCCTGTGTATTATCTCCC R: CGCAGATAAATCACCACAATG	52	768	Aleisa, 2013
<i>bla_{CMY}</i>	F: GCAGGCYATTCCGGGTATG R: GCYACGTAGCTGCCAAAYCC	55	915	Koo and Woo, 2012
<i>tetA</i>	F: TTTCGGGTTTCGGGATGGT R: CAGGCAGAGCAAGTAGAGGG	56	915	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>tetM</i>	F: ATCCTTTCTGGGCTTCCATTG R: CCGAGCAGGGATTCTCCAC	58	436	Allen <i>et al.</i> , 2011
<i>tet(X)</i>	F: CCGTTGGA CTGACTATGGC R: TCAACTTGCGTGTCGGTAA	56	475	Sun <i>et al.</i> , 2020
<i>catA1</i>	F: CGCCTGATGAATGCTCATCCG R: CCTGCCACTCATCGCAGTAC	51	457	Saeed <i>et al.</i> , 2009
<i>cmlA</i>	F: TACTCGGATCCATGCTGGCC R: TCCTCGAAGAGCGCCATTGG	65	578	Hendriksen <i>et al.</i> , 2008
<i>floR</i>	F: GAACACGACGCCCCGCTAT R: TTCCGCTTGGCCTATGAG	54	601	Yu <i>et al.</i> , 2021
<i>qnrA</i>	F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG R: GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	51	516	Firoozeh <i>et al.</i> , 2014
<i>qnrB</i>	F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	51	469	Firoozeh <i>et al.</i> , 2014
<i>qnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAACTGCAA R: TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	57	417	Moawad <i>et al.</i> , 2017
<i>qepA</i>	F: CGTGTTGCTGGAGTTCTTC R: CTGCAGGTA CTGCGTCATG	60	403	Cattoir <i>et al.</i> , 2008
<i>aacC2</i>	F: TAGAGGAGATATCGCGATGC R: ATTATCATTGTCGACGGCCT	56	896	Aleisa, A. M., 2013
Прочие				
<i>traJ</i>	F: TCCAAAAAATGATGATGAAT R: ATAGGAACCTCCTCACAAAG	55	226	Čitar <i>et al.</i> , 2010
Интегроны класса 1	F: GGCATCCAAGCAGCAAG R: AAGCAGACTTGACCTGA	55	-	Lévesque <i>et al.</i> , 1995
<i>uidA</i>	F: TATGGAATTTTCGCCGATTTT R: TGTTTGCCTCCCTGCTGCGG	55	166	Godambe <i>et al.</i> , 2017
ERIC1	CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA	40	-	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	40	-	

2.4. Секвенирование и сборка геномов штаммов *E. coli*

Полногеномное секвенирование штаммов было выполнено на базе и при участии сотрудников лаборатории анализа метагеномов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена РАН» (Москва). Геномную ДНК штаммов *E. coli* выделяли из ночных культур, выращенных при температуре 37 °С, с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, США). Секвенирование ДНК проводили на платформе Oxford Nanopore Technologies (ONT). Библиотеки для секвенирования готовили из нефрагментированной ДНК с использованием набора Native Barcoding Kit (SQK-NBD114-24; ONT, Великобритания) с обогащением длинными фрагментами ДНК с помощью Long Fragment Buffer в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование выполняли на приборе MinION с использованием проточной ячейки R10.4.1 (FLO-MIN114; ONT, Великобритания) при скорости транслокации 400 п.о./с. Покрытие составило 132х-188х, качество прочтений всех последовательностей 99,9% (вероятность неправильного нуклеотида 0,1%). Бейс-коллинг проводили с помощью программы Guppy 6.0.1 в режиме «has». Черновые сборки геномов получали с использованием Flye версии 2.9.1. Затем сборки полировали с помощью Medaka версии 1.7.2 на основании ONT-ридов, а графы сборок вручную просматривали в программе Bandage версии 0.8.1.

2.5. Аннотация и анализ геномов штаммов *E. coli*

Сборки геномов, содержащие кольцевые репликоны, дополнительно аннотировали с использованием PGAP версии 6.1. Гены патогенности выявляли с помощью VirulenceFinder версии 2.0 и VRprofile2; гены антибиотикорезистентности – с помощью программы Abricate с использованием базы данных NCBI AMRFinderPlus. Поиск мутаций, обуславливающих устойчивость к антибиотикам, проводили с использованием ResFinder версии 4.1. Гены бактериоцинов предсказывали с помощью antiSMASH версии 7.0 в режиме «loose», PRISM4 и BAGEL4. Профаги выявляли с использованием PHASTEST. Группы несовместимости плазмид определяли с помощью PlasmidFinder-2.0.

Таблица 3 – Общие параметры геномов штаммов *E. coli*

Параметр	Штамм <i>E. coli</i>						
	Q5	C25	C51	Ch1	C41	APEC20/16	APEC37
Номер доступа BioSample	SAMN35637330	SAMN35637911	SAMN35637912	SAMN35637910	SAMN35637331	SAMN35637913	SAMN35637914
Номер доступа SRA	SRR24834173	SRR24837713	SRR24837712	SRR24837714	SRR24834172	SRR24837711	SRR24837710
Номер доступа GenBank	CP127255-CP127260	CP127314-CP127315	CP127304-CP127313	CP127316-CP127320	CP127252-CP127254	CP127297-CP127300	CP127301-CP127303
Длина прочтений (Mb)	868	987	935	831	684	837	816
Кол-во прочтений	88 676	137 852	107 766	83 046	62 481	93 032	97 363
N50 (kb)	16,4	10,5	13,6	18,2	19,1	15,6	14,1
Общая длина, п.н.	5 267 038	5 243 467	5 504 236	5 691 828	5 165 039	5 280 411	5 314 486
Длина хромосомы, п.н.	4 948 409	5 214 475	5 021 543	5 386 706	5 037 330	4 941 568	5 055 174
GC-состав, %	51,0	50,5	50,8	50,6	51,3	50,6	50,4
Количество плазмид	5	1	9	4	2	3	2
Количество CDS	4 945	4 907	5 213	5 390	4 878	5 099	4 975
Количество рРНК	22	22	22	22	22	22	22
Количество тРНК	89	89	92	93	89	96	90
Количество тмРНК	1	1	1	1	1	1	1

Необработанные чтения последовательностей геномов штаммов *E. coli* Q5, C25, C51, Ch1, C41, APEC20/16, APEC37 были депонированы в Sequence Read Archive (SRA). Аннотированные сборки геномов были депонированы в NCBI BioProject. Общие параметры и номера доступа указаны в Таблице 3.

2.6. Обнаружение продукции бактериоцинов методом отсроченного антагонизма на плотной питательной среде

Скрининг бактериоцин-продуцирующих штаммов проводили с помощью техники «двойного слоя» по методу отсроченного антагонизма (M. Budič *et al.*, 2011). В качестве тест-штамма использовали *E. coli* DH5α – референс-штамм, который не обладал устойчивостью к антибиотикам и бактериоцинам. Контрольным был рекомбинантный штамм *E. coli* ЖР, сконструированный на факультете биотехнологии университета Любляны на основе пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 с встроенным в плазмиду геном колицина ColE7 (Starčič Erjavec *et al.*, 2015; Кузнецова и др., 2017). На агаризованной LB-среде («Amresco», США) выращивали колонии каждого штамма *E. coli*. Выросшие колонии обрабатывали парами хлороформа в течение 15 мин. Поверх исследуемых культур наслаивали полужидкую агаризованную LB-среду (с добавлением агара в количестве 0,6%), содержащую 24-часовую культуру тест-штамма *E. coli* DH5α. Чашки инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. Измеряли диаметры зон лизиса *E. coli* DH5α.

2.7. Оценка антагонистической активности бесклеточных культуральных жидкостей бактериоцин-продуцирующих *E. coli*

Изучение влияния бесклеточных культуральных жидкостей (супернатантов) бактериоцин-продуцирующих *E. coli* и их комбинаций на рост патогенных и условно-патогенных тест-штаммов проводили согласно методу отсроченного антагонизма в жидкой питательной среде (Ирkitова, 2011) на базе кафедры микробиологии и вирусологии «ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера». Бактериоцин-продуцирующие штаммы культивировали в течение ночи в жидкой

среде LB («Amresco», США) при 37°C без аэрации. Выращенные бактериальные культуры переносили в центрифужные микропробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 13000 оборотах в минуту. Культуральную жидкость стерилизовали с использованием мембранных фильтров Millex®-GS («Merck Millipore Ltd», Ирландия) с диаметром пор 0,22 мкм. Антагонистический эффект определяли путем оценки роста тест-штаммов в присутствии бесклеточных культуральных жидкостей исследуемых штаммов *E. coli*. Ночные культуры тест-штаммов разводили до 10⁶ КОЕ/мл и добавляли по 100 мкл в лунки 96-луночных микропланшетов, содержащих 100 мкл культуральной жидкости из 24-часовых бактериоцин-продуцирующих *E. coli*. Планшеты инкубировали без встряхивания в течение 24 часов при температуре 37°C. Затем измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀) с помощью планшетного считывателя Power Wave X (Instrumentals Inc., США) и рассчитывали процент подавления роста после 6 и 22 часов совместного культивирования, принимая за 100% оптическую плотность культуры, выращенной в контрольных лунках.

2.8. Оценка антагонистической активности *Lactobacillus* spp. в отношении *E. coli* на плотной питательной среде методом штрихов

Оценивали антагонистическую активность *Lactobacillus* spp. в отношении *E. coli* методом штрихов. Исследуемые культуры *L. fermentum* 90T-C4, *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* K3Ш24 высевали штрихами на агаризованную среду MPC-5 или LART по диаметру чашки Петри. Инкубировали в течение 4 суток при 37 °C. Перпендикулярно зоне роста лактобактерий подсеивали культуры *E. coli*, инкубировали при температуре 37 °C в течение суток. Результаты оценивали путем измерения зоны задержки роста *E. coli*.

2.9. Оценка выживаемости бактерий в модельной среде желудка

Для оценки выживаемости использовали имитацию желудочного сока (HCl в концентрации 0,05 или 0,1%, пепсин – 0,5 г/л, pH 2,8±0,1). Культуры *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 выращивали в течение суток в среде LB, культуры *L. fermentum* 90T-C4, *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* K3Ш24 – в течение 4 суток в среде MPC-5.

Суспензии клеток разводили до концентрации 10^6 КОЕ/мл, использовали монокультуры и композиции штаммов в соотношении 1:1, инкубировали при 37 °С при добавлении имитированного желудочного сока в течение 30 мин. Контрольные образцы монокультур и композиций штаммов инкубировали в 0,9% растворе NaCl в течение 30 мин и 2 часа соответственно. Культуры разводили последовательно десятикратно, затем высевали на агаризованную среду Эндо и/или МРС-5 и инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Далее учитывали количество выросших колоний *E. coli* (на агаризованной среде Эндо) и *Lactobacillus* spp. (на агаризованной среде МРС-5), определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

2.10. Оценка гемолитической активности

Оценку гемолитической активности штаммов проводили путем посева штрихом на 5% кровяной агар («Биомед», филиал ФГУП «Микроген», Россия). Инкубировали в течение 24 часов при 37°С. О наличии гемолитической активности судили по просветлению среды вокруг штриха.

2.11. Оценка лизогенной активности

Лизогенную активность штаммов *E. coli* определяли методом индукции УФ-излучением, в качестве чувствительной тест-культуры использовали *E. coli* DH5α. Ночные культуры исследуемых *E. coli*, предварительно выращенных в среде LB, обрабатывали УФ в течение 70 сек, затем инкубировали 1 час при 37°С. Обработанные культуры центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин. В пробирку с растопленным полужидким 0,6% агаром, охлажденным до 46°С, добавляли 200 мкл ночной культуры *E. coli* DH5α и 200 мкл супернатанта исследуемого штамма, перемешивали и вносили в чашки Петри с заранее подготовленной агаризованной средой LB. Чашки инкубировали в течение 24 часа при 37°С. О лизогенной активности судили по появлению стерильных «бляшек».

2.12. Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом

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). Штаммы были проверены диско-диффузионным методом (с использованием дисков НИЦФ, Санкт-Петербург) на чувствительность к пенициллинам (ампициллину, 10 мкг), цефалоспорином (цефоперазону, 75 мкг; цефтриаксону, 30 мкг; цефепиму, 30 мкг), карбапенемам (меропенему, 10 мкг), монобактамам (азтреонаму, 30 мкг), аминогликозидам (амикацину, 30 мкг; гентамицину, 10 мкг), фторхинолонам (ципрофлоксацину, 5 мкг; левофлоксацину, 5 мкг; норфлоксацину, 10 мкг), тетрациклинам (тетрациклину, 30 мкг), фениколам (хлорамфениколу, 30 мкг). Ночные культуры разводили физиологическим раствором до 10^8 КОЕ/мл, затем суспензию наносили на агар. Диски с антибиотиками наносили на поверхность инокулированной исследуемой культурой агара, инкубировали при 37 °C в течение 24 часов. Оценивали диаметры зон подавления роста.

2.13. Оценка неспецифической адгезии

Определение уровня неспецифической адгезии проводили в стеклянных пенициллиновых флаконах (гидрофильная поверхность) и в полистироловых 96-луночных плоскодонных планшетах («Медполимер», Россия) (гидрофобная поверхность) (Николаев, 2000). Выращивали ночную культуру микроорганизмов, затем осаждали центрифугированием (10 мин при 8000 об/мин), дважды промывали в фосфатном буфере, стандартизовали до 0,150-0,200 ед. OD₆₀₀. Во флаконы вносили по 3 мл суспензии бактерии, в лунки полистиролового планшета – 200 мкл суспензии. Флаконы и планшеты помещали на 1 час в термостат при 37 °C с перемешиванием 150 об/мин. Измеряли OD₆₀₀ на планшетном ридере INFINITE M1000 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Австрия) до эксперимента и спустя

1 час инкубации. Под величиной (индексом) неспецифической адгезии понимали снижение оптической плотности суспензии клеток бактерий после инкубации ($OD_{\text{конечн}}$) от исходного значения оптической плотности ($OD_{\text{исх}}$) и рассчитывали по формуле:

$$\text{Индекс неспецифической адгезии} = \left(1 - \frac{OD_{\text{исх}}}{OD_{\text{конечн}}}\right) \times 100\%$$

2.14. Оценка специфической адгезии

Исследование специфической адгезии бактерий к эритроцитам человека и коров проводили по методу Брилиса в пробирках Эппендорф (Brilis *et al.*, 1986). Для оценки уровня адгезии бактерий использовали эритроциты человека О (I) группы крови Rh (+), а также эритроциты коров. Эритроциты осаждали центрифугированием (10 мин при 1000 об/мин), промывали фосфатным буфером, затем разбавляли до 10^8 клеток/мл. Бактерии выращивали в течение ночи, однократно промывали фосфатным буфером и разводили до концентрации 10^8 КОЕ/мл. Затем суспензию бактерий смешивали с эритроцитарной массой в соотношении 1:1 и инкубировали при 37°C с перемешиванием при 120 об/мин в течение 30 мин. Готовили мазки крови и окрашивали 0,5%-ным раствором генцианового фиолетового (Lenchenko *et al.*, 2020). При оптической микроскопии препаратов учитывались три показателя: средний индекс адгезии (от англ. *average adhesion index*, AAI), который рассчитывался как среднее количество микроорганизмов, прикрепленных к поверхности одного эритроцита; коэффициент адгезии (от англ. *adhesion coefficient*, AC) – процент эритроцитов, содержащих бактерии на поверхности; индекс адгезивности микроорганизмов к поверхности эритроцитов (от англ. *index adhesiveness of microorganisms*, IAM) – отношение AAI и AC. Подсчет проводили на 100 клетках, просматривая все предметное стекло. В зависимости от значений IAM микроорганизмы были классифицированы как: неадгезивные ($IAM < 1,75$), низкоадгезивные ($IAM = 1,76-2,49$), среднеадгезивные ($IAM = 2,50-3,99$) или высокоадгезивные ($IAM > 4,0$).

2.15. Приготовление суспензий *E. coli* Q5, *E. coli* C41, *E. coli* C55 для перорального введения животным

Для приготовления пробиотической суспензии *E. coli* Q5 и C41 выращивали в бульоне LB в течение 24 часов при температуре 37°C без аэрации. Затем суспензии микроорганизмов центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в физиологическом растворе, измеряли OD₆₀₀ и доводили до конечной концентрации 5×10^8 или 5×10^{10} КОЕ/мл. Аналогичным образом готовили инокулят *E. coli* C55 в концентрации 5×10^8 КОЕ/мл.

2.16. Дизайн эксперимента *in vivo*

Для экспериментов *in vivo* использовали 48 самцов белых крыс линии Wistar в возрасте 180 суток. Протокол исследования на животных был одобрен Институциональным наблюдательным советом (или Комитетом по этике) Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (протокол №19/2, дата утверждения 22.02.23). Содержание и уход за животными осуществляли в соответствии с ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Окружающая среда, помещения и организация содержания». Крыс содержали в виварии при температуре 23–26 °C. В течение всего эксперимента животные имели свободный доступ к корму в виде стандартных гранул и питьевой воде (*ad libitum*). Дизайн эксперимента *in vivo* представлен в Таблице 4.

Три крысы были использованы для определения фоновых гематологических и биохимических показателей, а также состава кишечной микробиоты до начала эксперимента. Остальных животных случайным образом распределили на шесть групп. В первую, контрольную, группу вошли интактные животные (n=10), которым на протяжении всего эксперимента перорально вводили физиологический раствор. Во вторую группу, служившую инфекционным контролем, включили крыс (n=5), которым в течение 5 суток вводили физиологический раствор, после чего однократно перорально инфицировали токсигенным штаммом *E. coli* C55 в дозе

5×10^8 КОЕ на животное. В третью и четвертую группы включили по 10 животных. Крысам третьей группы ежедневно в течение 5 суток перорально вводили штамм *E. coli* Q5, а крысам четвертой группы – штамм *E. coli* C41 в дозе 5×10^8 КОЕ на одно животное. После введения бактерий по пять животных из третьей, четвертой групп и группы интактного контроля выводили из эксперимента для анализа гематологических и биохимических показателей. Оставшихся животных перорально инфицировали штаммом *E. coli* C55 в дозе 5×10^8 КОЕ на одно животное. Через 3 суток после инфицирования всех крыс подвергали эвтаназии; у животных отбирали кровь и органы для последующего анализа. В пятую и шестую группы включили по 5 крыс. Животным пятой группы перорально вводили суспензию бактерий *E. coli* Q5, а животным шестой группы – *E. coli* C41 в дозе 5×10^{10} КОЕ/голову ежедневно в течение 5 суток.

Массу тела животных регистрировали до начала эксперимента, после введения пробиотических бактерий, а для второй, третьей и четвертой групп дополнительно после инфицирования штаммом *E. coli* C55. На протяжении всего исследования контролировали поведение и внешний вид животных, а также потребление воды и корма, чтобы выявить возможные отклонения от нормы.

Таблица 4 – Дизайн эксперимента *in vivo*

Время, дни	Экспериментальные группы крыс						
	Контроль (n=10)	Контроль инфекции (n=5)	<i>E. coli</i> Q5, 5×10 ⁸ КОЕ (n=10)	<i>E. coli</i> C41, 5×10 ⁸ КОЕ (n=10)	<i>E. coli</i> Q5, 5×10 ¹⁰ КОЕ (n=5)	<i>E. coli</i> C41, 5×10 ¹⁰ КОЕ (n=5)	
0	измерение массы тела						
1-4	введение физ. раствора		ведение <i>E. coli</i> Q5 или <i>E. coli</i> C41				
5	измерение массы тела						
	эвтаназия (n=5)	–	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)	
	ведение <i>E. coli</i> C55, 5×10 ⁸ КОЕ				–		
6-7	мониторинг состояния животных						
8	измерение массы тела						
	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)			

2.17. Анализ гематологических и биохимических показателей

Образцы крови были взяты непосредственно из сердца с помощью шприца. Анализ количества эритроцитов (RBC), концентрации гемоглобина ([Hb]), гематокрита (Ht), количества тромбоцитов (PLT), количества лейкоцитов (WBC) проводили с использованием автоматизированного гематологического анализатора (MINDRAY BS-3600, Шэньчжэнь, Китай). Используя RBC, Ht и [Hb], рассчитывали средний корпускулярный объем (MCV), средний корпускулярный гемоглобин (MCH) и среднюю концентрацию корпускулярного гемоглобина (MCHC) по стандартным формулам. Образцы крови центрифугировали при 1000 оборотах в минуту в течение 10 мин (Eppendorf 5415R, Германия) и анализировали на следующие биохимические показатели сыворотки: глюкозу, общий белок, креатинин, мочевины и уровни ферментов фосфатазы (ЩФ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) с помощью биохимического анализатора (MINDRAY BS-200, Шэньчжэнь, Китай).

2.18. Гистологический анализ

Образцы кишечника, пейеровых бляшек, селезенки и печени крыс фиксировали в 10% нейтральном формалине в фосфатном буфере (pH 7,2), заливали в парафин «Гистомикс» (BioVitrum, Санкт-Петербург, Россия). Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином (BioVitrum, Россия) и эозином (BioVitrum, Санкт-Петербург, Россия) для оценки морфологии тканей под световым микроскопом (Olympus, Токио, Япония).

2.19. Бактериологический анализ микробиоты кишечника крыс

Образцы фекалий случайно отобранных крыс из каждой группы использовали в качестве материала для бактериологического анализа. Бактериологический анализ микробиоты кишечника проводили методом прямого посева на селективные питательные среды: агар *Pseudomonas* CN (Laboratorios Conda S.A., Мадрид, Испания), Эндо-агар для *E. coli*, агар Плоскирева для протей, солевой агар для *Staphylococcus* spp., среда Блаурокка для *Bifidobacterium* spp., агар

МРС для *Lactobacillus* spp., модифицированный сульфитом железа агар №3 для клостридий и агар Сабуро №2 для *C. albicans* (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). После заражения крыс штаммом *E. coli* C55 (hem⁺, Amp^R) фекалии высевали на кровяной агар с ампициллином. Определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Полученные КОЕ пересчитывали на 1 г фекалий.

2.20. Статистический анализ и визуализация данных

Данные представлены в виде медианы (Me) с межквартильным диапазоном [Q1–Q3]. Сравнения двух независимых групп проводили с использованием t-критерия Стьюдента для данных с нормальным распределением и U-критерия Манна-Уитни для данных с ненормальным распределением. Сравнение трех и более независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) для данных с нормальным распределением и теста Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна на множественность для данных с ненормальным распределением. Для сравнения качественных характеристик использовали точный критерий Фишера или критерий χ^2 , а также рассчитывали отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (95% CI). Множественные попарные сравнения между бинарными переменными были проведены с использованием точного критерия Фишера с корректировкой *p*-значений по методу Бенджамини-Хохберга. Тест ранговой корреляции Спирмена был использован для оценки силы ассоциации между признаками или наличием генов. Сила связи была классифицирована по значению коэффициента *r_s* на очень слабую (0.00–0.19), слабую (0.20–0.39), среднюю (0.40–0.59), сильную (0.60–0.79) и очень сильную (0.80–1.0). Значение *p* менее 0,05 считалось значимым. Первичная обработка данных проводилась в программе Microsoft Excel 2021 (Microsoft Corporation, США). Статистический анализ и визуализация данных были выполнены с использованием GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США) и Python (v. 3.11).

ГЛАВА 3. БАКТЕРИОЦИНЫ ЭКСТРАИНТЕСТИНАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ И КОММЕНСАЛЬНЫХ *E. COLI*: РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

3.1. Сравнение распространенности продукции и молекулярно-генетического разнообразия бактериоцинов экстраинтестинальных патогенных и комменсальных *E. coli*

Была изучена распространенность продукции и молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов уропатогенных (UPEC), патогенных для птиц (APES) и выделенных от здоровых животных и птиц комменсальных *E. coli*¹. Количество штаммов, в геноме которых были обнаружены гены биосинтеза хотя бы одного бактериоцина, различалось между группами и составило: 44,1% (78 из 177), 89,3% (25 из 28), 35,7% (20 из 56) и 37,5% (6 из 16) соответственно. Было выявлено, что штаммы APES содержали больше генов бактериоцинов ($Me[Q1-Q3] = 2[1,0-2,0]$), чем комменсальные *E. coli* кишечника животных ($Me[Q1-Q3] = 0[0,0-1,0]$; $p < 0,001$; тест Крускала-Уоллеса) и человеческие UPEC ($Me[Q1-Q3] = 0[0,0-1,0]$; $p < 0,001$; тест Крускала-Уоллеса) (Рисунок 1А). Анализ количества генов микроцинов и колицинов показал, что большинство штаммов APES (82,1%) содержали гены одного или двух микроцинов. Штаммы прочих групп несли ген хотя бы одного микроцина менее чем в 30% случаев, однако только в группе UPEC встречались *E. coli* с тремя и четырьмя микроцинами одновременно (Рисунок 1Б). Распределение количества генов колицинов было аналогичным (Рисунок 1В). Штаммы, позитивные по фенотипу продукции бактериоцинов чаще обнаруживались в группе APES, чем в группах UPEC и комменсальных штаммов

¹ Результаты исследований, приведенных в пункте 3.1, частично опубликованы в статье: Kuznetsova M.V., Mihailovskaya V.S., Selivanova P.A., Kochergina D.A., Remezovskaya N.B., Starčič Erjavec M. Siderophore Production, Diversity of Siderophore Receptors and Associations with Virulence-Associated Genes, Phylogroups and Bacteriocin Production in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans, Animals and Organic Fertilizers. Microbiology Research. 2025; 16(2):50.

($p_{\text{BH}} < 0,001$; точный критерий Фишера с поправкой на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга) (Таблица 4). У некоторых штаммов были детектированы гены бактериоцинов при отсутствии продукции бактериоцинов *in vitro*. Наиболее часто такое несоответствие наблюдалось у АРЕС: из 8 штаммов, несущих гены биосинтеза бактериоцинов, 6 не проявляли активность в фенотипическом тесте. В группах комменсальных *E. coli* и UPEC такая особенность встречалась значительно реже: у 7 из 37 (18,9%) и 2 из 12 (16,7%) штаммов соответственно.

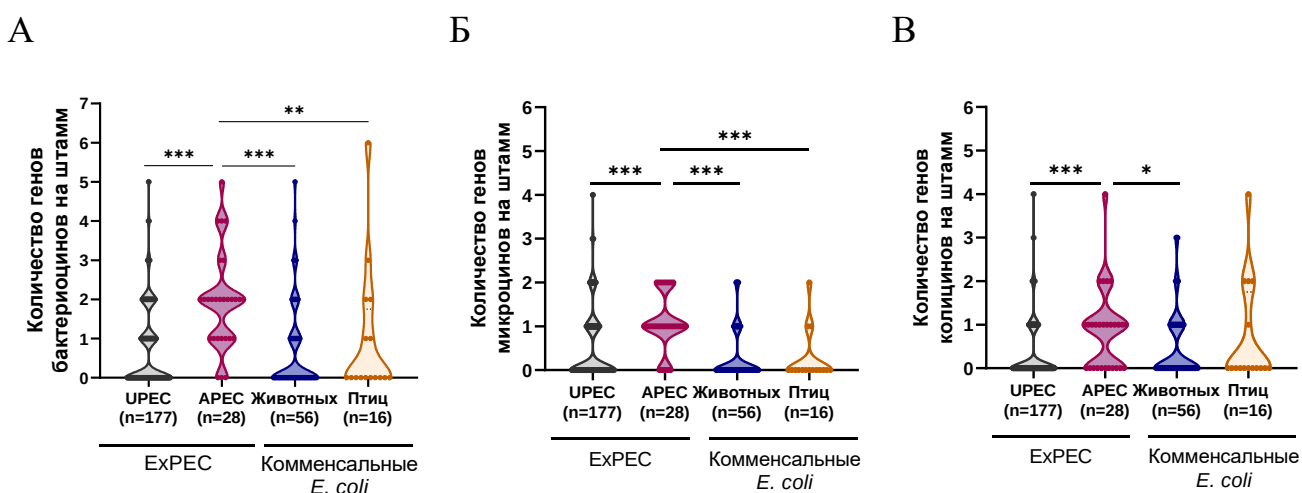


Рисунок 1 – Количество генов биосинтеза бактериоцинов, детектированных методом ПЦР, приходящееся на штаммы *E. coli* различных эколого-патотипических групп. А – Суммарное количество генов бактериоцинов, Б – Суммарное количество генов микроцинов, В – Суммарное количество генов колицинов. ExPEC – экстраинтестинальные патогенные *E. coli*, UPEC – уропатогенные *E. coli*, APES – патогенные для птиц *E. coli*. Статистический анализ проведен с помощью теста Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна на множественность; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Распространенность генов биосинтеза конкретных бактериоцинов различалась в группах *E. coli*. Доминирующим геном биосинтеза бактериоцина в группе UPEC был ген микроцина-сидерофора М (обнаружен у 18,6% штаммов); среди комменсальных штаммов животных – пороформирующего колицина E1 и микроцина-сидерофора М (по 14,3%); среди птичьих комменсальных *E. coli* – пороформирующего колицина Ib (25%); в группе APES – микроцина B17, ингибирующего ДНК-гиразу (75%). Сопоставление встречаемости генов бактериоцинов между четырьмя группами *E. coli* проводили с использованием точного критерия Фишера. Для контроля множественных сравнений применяли

поправку Бенджамини-Хохберга ко всем парным сравнениям. После введения поправки на множественное сравнение оказалось, что гены микроцина B17, микроцина J25 и колицина М встречались чаще у АРЕС по сравнению с UPEC и/или комменсальными штаммами животных и птиц ($p_{\text{BH}} < 0,05$). Штаммы, несущие ген колицина В, обнаруживались чаще среди АРЕС, чем UPEC ($p_{\text{BH}} = 0,03$); кодирующие колицин Ib, встречались с большей вероятностью в группе комменсальных штаммов птиц, чем UPEC ($p_{\text{BH}} = 0,03$). При этом пороформирующие колицины Ia и Ib, обнаруженные среди комменсальных и уропатогенных штаммов, не встречались в коллекции АРЕС (Таблица 5).

Таблица 5 – Распространенность генов биосинтеза бактериоцинов среди экстраинтестинальных патогенных и комменсальных штаммов *E. coli*

Бактериоцины	Механизм действия	Количество штаммов <i>E. coli</i> , несущих гены бактериоцинов, n (%)				
		Экстраинтестинальные патогенные <i>E. coli</i>		Комменсальные <i>E. coli</i>		Всего (n=277)
		UPEC (n=177)	APEC (n=28)	животных (n=56)	птиц (n=16)	
Микроцины						
МссВ17	ингибирование ДНК гиразы	10 (5,6)	21 (75,0)*	0	1 (6,3)	32 (11,6)
МссJ25	ингибирование РНК полимеразы	2 (1,1)	5 (17,9)*	0	0	7 (2,5)
МссV	пороформирующий	17 (9,6)	3 (10,7)	4 (7,1)	1 (6,3)	25 (9,0)
МссМ	микроцин-сидерофор	33 (18,6)	1 (3,6)	8 (14,3)	2 (12,5)	44 (15,9)
МссН47	микроцин-сидерофор	22 (12,4)	0	2 (3,6)	0	24 (8,7)
Колицины						
ColM	гидролиз липида I и II	8 (4,5)	14 (50,0)*	5 (8,9)	3 (18,8)	30 (10,8)
ColK	пороформирующий	3 (1,7)	2 (7,1)	1 (1,8)	0	6 (2,2)
ColB	пороформирующий	5 (2,8)	5 (17,9)*	3 (5,4)	1 (6,3)	14 (5,1)
ColE1	пороформирующий	14 (7,9)	3 (10,7)	8 (14,3)	1 (6,3)	26 (9,4)
ColIa	пороформирующий	18 (10,2)	0	5 (8,9)	2 (12,5)	25 (9,0)
ColIb	пороформирующий	6 (3,4)	0	3 (5,4)	4 (25,0)*	13 (4,7)
ColE7	разрушение ДНК	0	0	0	0	0
Фенотип продукции бактериоцинов		5/26 (19,2)	20 (71,4)*	13 (23,2)	4 (25,0)	42 (23,2)

Примечание. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера с поправкой на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга; «*» – разница для данной группы достоверна в сравнении с прочими группами, $p < 0,05$.

Микроцины-сидерофоры М и Н47 были более распространены среди УРЕС и комменсальных штаммов, чем среди АРЕС. Микроцин Н47 детектировали только у штаммов УРЕС и комменсальных *E. coli*, выделенных от животных, но не штаммов птичьего происхождения. При этом ингибирующий РНК-полимеразу микроцин J25 был обнаружен среди АРЕС и у двух штаммов УРЕС. Ген биосинтеза колицина Е7 не был обнаружен ни в одной группе.

В группах УРЕС, АРЕС, выделенных от здоровых животных и птиц комменсальных *E. coli* было обнаружено 20, 12, 9 и 3 индивидуальных (неповторяющихся) комбинаций нескольких генов бактериоцинов соответственно (Рисунок 2). В перечисленных группах встречались штаммы, несущие комбинации двух бактериоцинов (60%, 58,3%, 44,4% и 33,3% от всех обнаруженных комбинаций соответственно), трех (20%, 16,7%, 33,3% и 33,3%) или четырех и более бактериоцинов (20%, 25%, 22,2% и 33,3%).

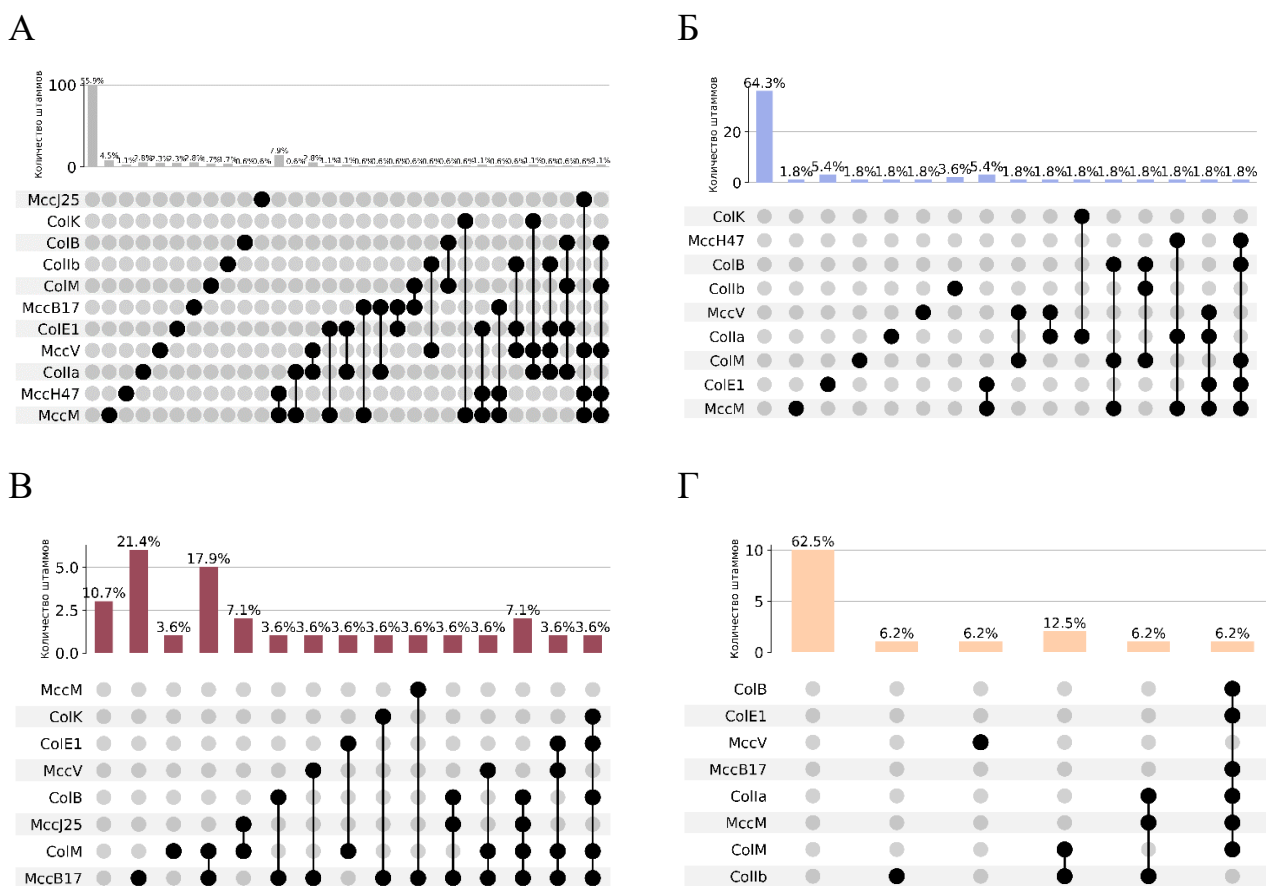


Рисунок 2 – Диаграммы UpSet, показывающие комбинации генов биосинтеза бактериоцинов, обнаруженных методом ПЦР, и количество штаммов *E. coli*, содержащих эти комбинации. Б – Штаммы группы УРЕС. В – Штаммы, выделенные от здоровых сельскохозяйственных животных. Д – Штаммы АРЕС. Е – Штаммы, выделенные от здоровых сельскохозяйственных

птиц. По оси ординат указано абсолютное количество штаммов, значения над гистограммами – долю штаммов от их общего количества (в %)

В группе штаммов UPEC наиболее часто встречалась комбинация генов микроцинов-сидерофоров M и H47 (Рисунок 2А); среди комменсальных штаммов животных – комбинация генов биосинтеза микроцина M и колицина E1 (Рисунок 2Б); комменсальных штаммов птиц – колицина M и Ib (Рисунок 2Г); в группе APES чаще обнаруживались штаммы с геном микроцина B17 в моноварианте или в комбинации с геном биосинтеза колицина M (Рисунок 2В).

Метод главных компонент (от англ. *principal component analysis*, PCA) был применен к бинарным данным для оценки сходства между штаммами четырех групп на основе профилей их генов бактериоцинов. Наблюдалось явное разделение группы APES от прочих групп, что указывало на специфичность профилей генов бактериоцинов (Рисунок 3). Наибольший вклад в разделение групп внесли гены, представленные стрелками на biplot: для группы APES – гены колицина M, микроцина J25, колицина B, для групп комменсальных и уропатогенных штаммов – гены микроцинов-сидерофоров.

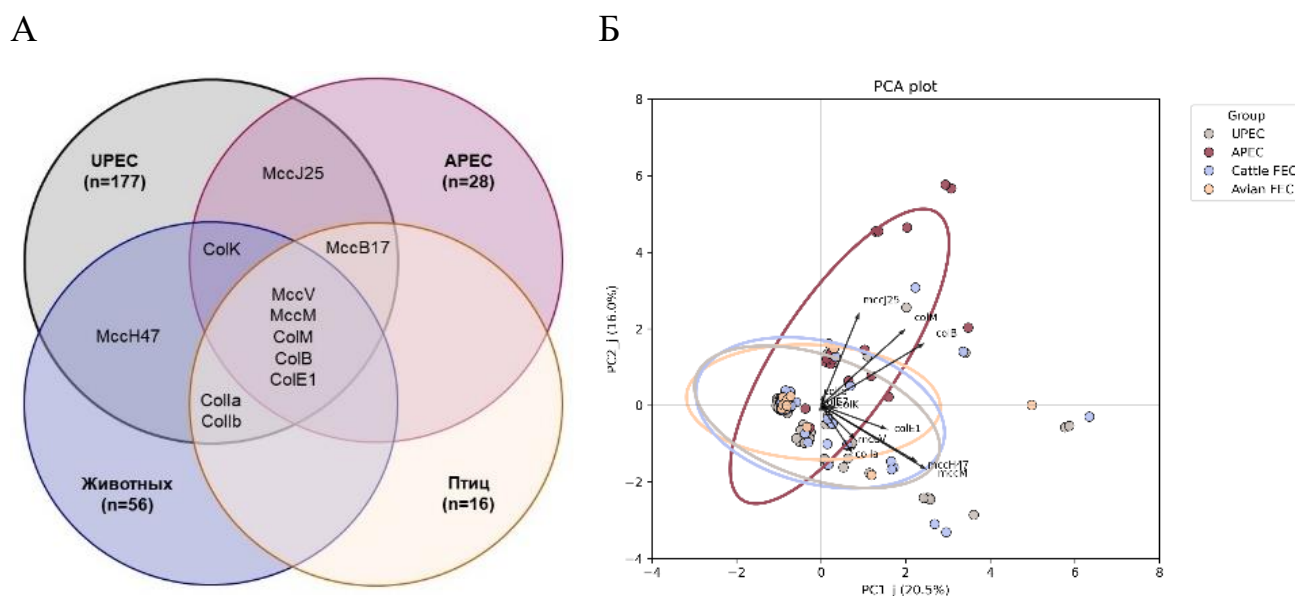


Рисунок 3 – Молекулярно-генетические профили бактериоцинов уропатогенных (UPEC), патогенных для птиц (APES), выделенных от здоровых животных и птиц комменсальных *E. coli*. А – Диаграмма Венна, показывающая встречаемость отдельных бактериоцинов среди *E. coli* различных эколого-патотипических групп. Б – Визуализация различий профилей бактериоцинов штаммов *E. coli* методом анализа главных компонент (PCA), точки соответствуют отдельным штаммам, цвет – эколого-патотипической группе, стрелки – вклад отдельных генов бактериоцинов в разделение групп

Далее был проведен более детальный анализ структуры локуса микроцина V в геномах *E. coli*, полученных из базы данных NCBI. В анализ были включены полные геномы штаммов следующих групп: UPEC (44 генома), APES (28 геномов), изолированных из фекалий здоровых птиц (21 геном), здоровых животных (35 геном) или человека (20 геномов). Известно, что полный оперон микроцина V включает следующие гены: *cvaC* (структурный ген колицина), *cvaA* и *cvaB* (кодируют белки экспорта), а также *cvi* (ген иммунитета, который защищает продуцирующую клетку от собственного микроцина) (Cameron *et al.*, 2019). Схематическое изображение канонического локуса микроцина V показано на Рисунке 4А. Важно отметить, что во всех проанализированных группах встречались штаммы, несущие как все три гена локуса (*cvaA*, *cvaB*, *cvaC*), так и с неполными локусами микроцина V. Сравнение геномов различных эколого-патотипических групп показало, что распространенность штаммов, несущих все три гена, убывала в ряду: APES (35,7%), комменсальные штаммы птиц (23,8%), комменсальные штаммы животных (17,1%), комменсальные штаммы человека (10%), UPEC (6,8%) (Рисунок 4Б). Анализ показал, что штаммы птичьего происхождения (комменсальные и APES) чаще содержали полноценные локусы микроцина V, у штаммов UPEC чаще наблюдалось отсутствие локуса, а у части комменсальных штаммов животного происхождения чаще обнаруживались неполноценные локусы с генами экспорта (Рисунок 4В). Эти данные отражают эволюцию и реорганизацию локуса микроцина V у разных патотипов *E. coli*, а также показывают, что одинаковая распространенность маркерного гена не отражает функциональную и геномную эквивалентность целого локуса.

Таким образом, проведенное сравнение показало, что распространенность и молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов *E. coli* существенно различались в зависимости от эколого-патотипической принадлежности штаммов. Штаммы APES характеризовались наибольшей частотой продукции и носительства генов бактериоцинов, специфическим профилем, обогащенным ColM, MccJ25 и ColB, что отличало их от UPEC и комменсальных штаммов, среди

которых преобладали носители генов микроцинов-сидерофоров МссМ и МссН47. РСА-анализ профилей бактериоцинов подтвердил обособленность группы АРЕС.

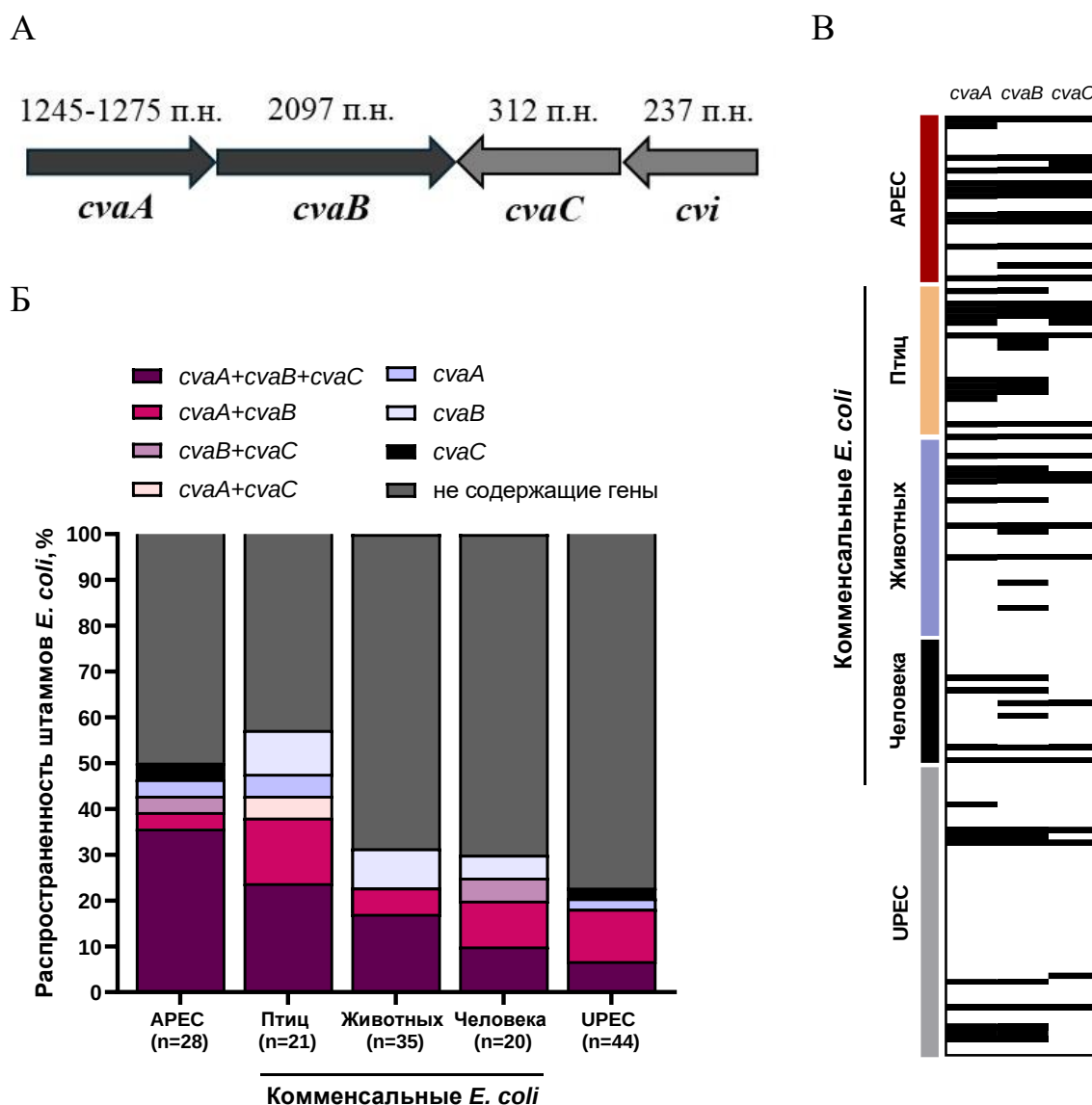


Рисунок 4 – Структурная организация локуса микроцина V в геномах *E. coli* различных эколого-патотипических групп. А – Схематическое изображение канонического локуса микроцина V: гены *cvaA* и *cvaB* кодируют белки экспорта, *cvaC* является структурным геном. Б – Диаграмма, показывающая присутствие комбинаций генов локуса микроцина V в геномах штаммов *E. coli* различных эколого-патотипических групп. В – Карта, показывающая встречаемость генов локуса микроцина V в геномах *E. coli* различных эколого-патотипических групп (черные ячейки указывают на наличие гена, белые – на его отсутствие)

3.2. Молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов уропатогенных *E. coli*, выделенных от пациентов стационаров и поликлиник

Интересно, что профили генов бактериоцинов уропатогенных *E. coli* оказались более близки к комменсальным *E. coli*, чем к другой группе экстраинтестинальных штаммов – АРЕС. Поэтому далее мы провели более детальный анализ молекулярно-генетического разнообразия бактериоцинов УРЕС, выделенных от двух групп пациентов: проходящих лечение в поликлиниках (n=89) и различных отделений стационаров (n=88) (Таблица 6). Среди генов колицинов УРЕС наиболее часто встречались гены пороформирующих колицинов Ia (18/177, 10,2%) и E1 (14/177, 7,9%), гены других колицинов встречались менее чем у 5% изолятов. Распространенность генов микроцинов с разными механизмами активности варьировала. Наиболее редкими были штаммы, кодирующие MscJ25. Интересно, что доминирующими оказались гены микроцинов-сидерофоров MscM (33/177, 18,6%) и MscH47 (22/177, 12,4%). Таким образом, распространенность генов бактериоцинов среди изолятов УРЕС была низкой и гетерогенной: в выборке преобладали изоляты, кодирующие пороформирующие колицины, а также микроцины-сидерофоры.

Сравнение штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов стационаров и поликлиник, показало, что общее количество бактериоцинов на изолят значимо не различалось ($p > 0,05$, U-критерий Манна-Уитни), однако штаммы, несущие гены 5 бактериоцинов одновременно, были выделены только у пациентов стационаров. В этой группе доминировали *E. coli*, кодирующие пороформирующие бактериоцины ColIa, MscV и микроцин-сидерофор MscM, ген которого значительно чаще встречался среди изолятов, выделенных от пациентов поликлиник (OR = 2,3, 95% CI 1,0-5,1, $p = 0,04$, критерий χ^2). Кроме того, среди штаммов, выделенных от пациентов поликлиник, часто встречался ген биосинтеза MscH47 (OR = 1,5, 95% CI 0,6-3,7), а также был обнаружен MscJ25 (Таблица 6). В штаммах обеих групп пациентов комбинация генов двух микроцинов-сидерофоров MscM и MscH47 была

доминирующей в сравнении со встречаемостью комбинаций прочих бактериоцинов.

Таблица 6 – Распространенность генов продукции бактериоцинов среди *E. coli*, выделенных от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей, проходивших амбулаторное или стационарное лечение

Бактериоцины	UPEC, изолированные от пациентов, n (%)		UPEC, выделенных от пациентов различных отделений стационара, n (%)			Всего (n=177)
	стационаров (n=88)	поликлиник (n=89)	терапии (n=33)	хирургии (n=34)	реанимации (n=21)	
Микроцины						
MccB17	4 (4,5)	6 (6,7)	3 (9,1)	1 (2,9)	0	10 (5,6)
MccJ25	0	2 (2,2)	0	0	0	2 (1,1)
MccV	11 (12,5)	6 (6,7)	1 (3,0)	8 (23,5)	2 (9,5)	17 (9,6)
MccM	11 (12,5)	22 (24,7)*	5 (15,2)	5 (14,7)	1 (4,8)	33 (18,6)
MccH47	9 (10,2)	13 (14,6)	4 (12,1)	4 (11,8)	1 (4,8)	22 (12,4)
Колицины						
ColM	7 (8,0)	1 (1,1)	5 (15,2)	2 (5,9)	0	8 (4,5)
ColK	1 (1,1)	2 (2,2)	0	1 (2,9)	0	3 (1,7)
ColB	5 (5,7)	0	3 (9,1)	2 (5,9)	0	5 (2,8)
ColE1	7 (8,0)	7 (7,9)	3 (9,1)	4 (11,8)	0	14 (7,9)
ColIa	12 (13,6)	6 (6,7)	2 (6,1)	5 (14,7)	5 (23,8)	18 (10,2)
ColIb	3 (3,4)	3 (3,4)	1 (3,0)	2 (5,9)	0	6 (3,4)
ColE7	0	0	0	0	0	0

Примечание. * $p < 0,05$, критерий χ^2

Изоляты *E. coli* были выделены от пациентов различных отделений стационаров, в том числе терапевтических (включая нефрологические отделения), хирургических (включая урологические и отделения диализа) и реанимации. Поскольку источник выделения может косвенно отражать тяжесть инфекций мочевыводящих путей пациентов, далее мы оценили молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов внутри этих групп. Общее количество генов бактериоцинов, приходящихся на один изолят, различалось между группами: *E. coli*, выделенные от пациентов отделений реанимации, неожиданно несли меньше бактериоцинов в сравнении с изолятами двух других групп. Распространенность конкретных колицинов и микроцинов также различалась в трех группах *E. coli*. В группе изолятов от пациентов из отделений реанимации

доминирующим колицином был пороформирующий колицин ColIa (обнаружен у 5/21, 23,8% изолятов), в группе изолятов от пациентов хирургических отделений – пороформирующий микроцин МссV (8/34, 23,5%), а в группе изолятов от пациентов терапевтических отделений – колицин ColM и микроцин-сидерофор МссМ (по 5/33, 15,2%). Интересно, что изоляты, кодирующие микроцины-сидерофоры МссМ и МссН47, встречались существенно чаще в группах пациентов из отделений терапии и хирургии, но не реанимации (Таблица 6).

Таким образом, анализ молекулярно-генетического разнообразия бактериоцинов UPEC показал, что профили уropатогенных штаммов были более близки к комменсальным *E. coli*, чем к APES, и характеризовались преобладанием пороформирующих колицинов ColIa и ColE1, а также микроцинов-сидерофоров МссМ и МссН47. Сравнение изолятов от пациентов стационаров и поликлиник не выявило значимых различий, однако штаммы с максимальным числом генов бактериоцинов (до 5 на изолят) обнаружены исключительно среди госпитальных изолятов. Среди изолятов отделений реанимации чаще встречались кодирующие ColIa штаммы, в то время как в терапевтических и хирургических отделениях чаще встречались микроцины-сидерофоры МссМ и МссН47.

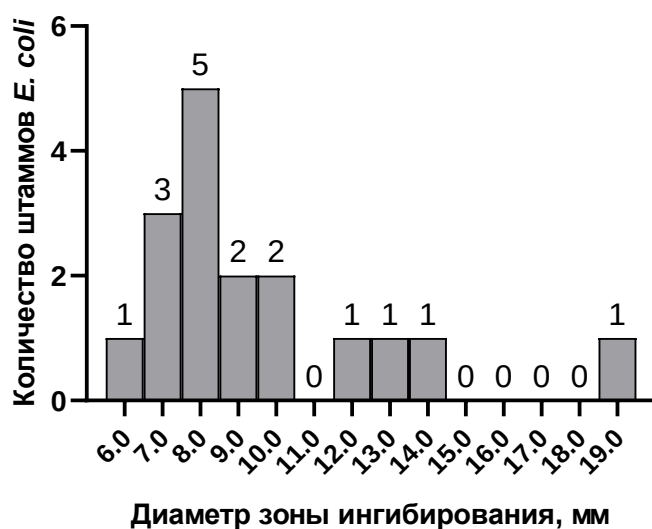
3.3. Распространенность продукции и молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов комменсальных *E. coli*, выделенных от здоровых животных

Была оценена способность к продукции бактериоцинов комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных из следующих источников: фекалий сельскохозяйственных птиц (всего n=16), в том числе цыплят (n=2), кур (n=4), индюков (n=7), перепелов (n=3), а также сельскохозяйственных животных (всего n=56), в том числе коров (n=49), кроликов (n=4) и свиней (n=3). Среди исследованных штаммов *E. coli* 23,6% (17/72) формировали зоны лизиса тест-штамма *E. coli* DH5α и были определены как бактериоцин-продуцирующие². Доля

² Данные, представленные в пункте 3.3, опубликованы в статье: Kuznetsova, M.V., Mihailovskaya, V.S., Remezovskaya, N.B., Starčič Erjavec, M. Bacteriocin-producing *Escherichia coli* isolated from the

таких штаммов среди комменсальных *E. coli* животных и птиц составила 23,2% (13/56) и 25% (4/16) соответственно. У 76,4% (55/72) штаммов продукция бактериоцинов не была обнаружена данным методом. У контрольного генно-инженерного штамма *E. coli* ЖР, продуцирующего колицин Е7, диаметр зоны лизиса составил $6,0 \pm 0,8$ мм. Большинство комменсальных штаммов имели диаметры зон, превышающие *E. coli* ЖР. Был проведен статистический анализ распределения штаммов *E. coli* в зависимости от величины диаметра зоны ингибирования роста *E. coli* DH5 α (Рисунок 5А). Диапазон диаметров зон ингибирования составлял 6,0 – 18,8 мм, Me[Q1–Q3] = 8,3[7,5–10,0] мм. Согласно значению третьего квартиля (Q3; 75-го перцентиля) штаммы *E. coli* были классифицированы на штаммы с высокой продукцией бактериоцинов (диаметр зоны ингибирования $\geq 10,0$ мм) и с низкой продукцией (диаметр $< 10,0$ мм). К категории высокопродуцентов были отнесены 35,3% (6/17) штаммов. Большинство из них были выделены из фекалий коров (5/6), один штамм – из фекалий перепела.

А



Б

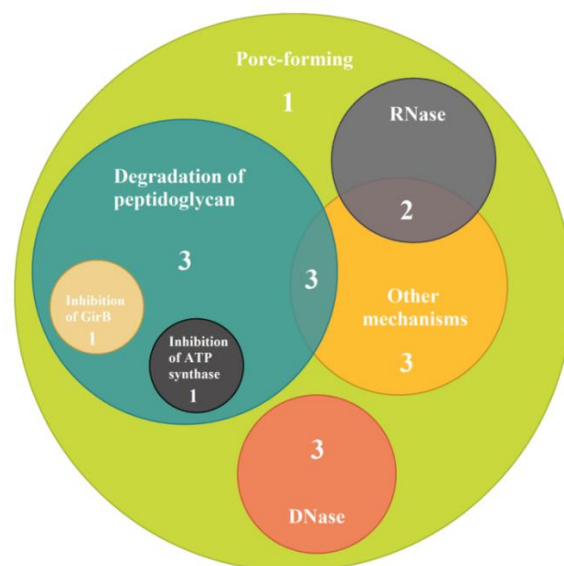


Рисунок 5 – Фенотип и молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов комменсальных *E. coli*, выделенных от здоровых животных. А – Гистограмма распределения количества штаммов *E. coli* в зависимости от образуемого ими диаметра зоны ингибирования тест-штамма *E. coli* DH5 α . Б – Диаграмма Вена, отражающая комбинации обнаруженных генов

бактериоцинов с различным механизмами действия (число указывает на количество штаммов с соответствующими комбинациями)

С помощью ПЦР был проведен скрининг на наличие 30 различных генов бактериоцинов. Среди выявленных 17 бактериоцин-продуцирующих штаммов *E. coli* было детектировано 18 из 30 генов продукции бактериоцинов. У всех 17 штаммов был обнаружен по крайней мере один ген, 47,1% штаммов обладали двумя генами, 17,7% – тремя генами и 29,4% штаммов обладали четырьмя или более генами (Рисунок 6). Штамм *E. coli* C25 содержал шесть, а *E. coli* Br1 – семь различных генов бактериоцинов.

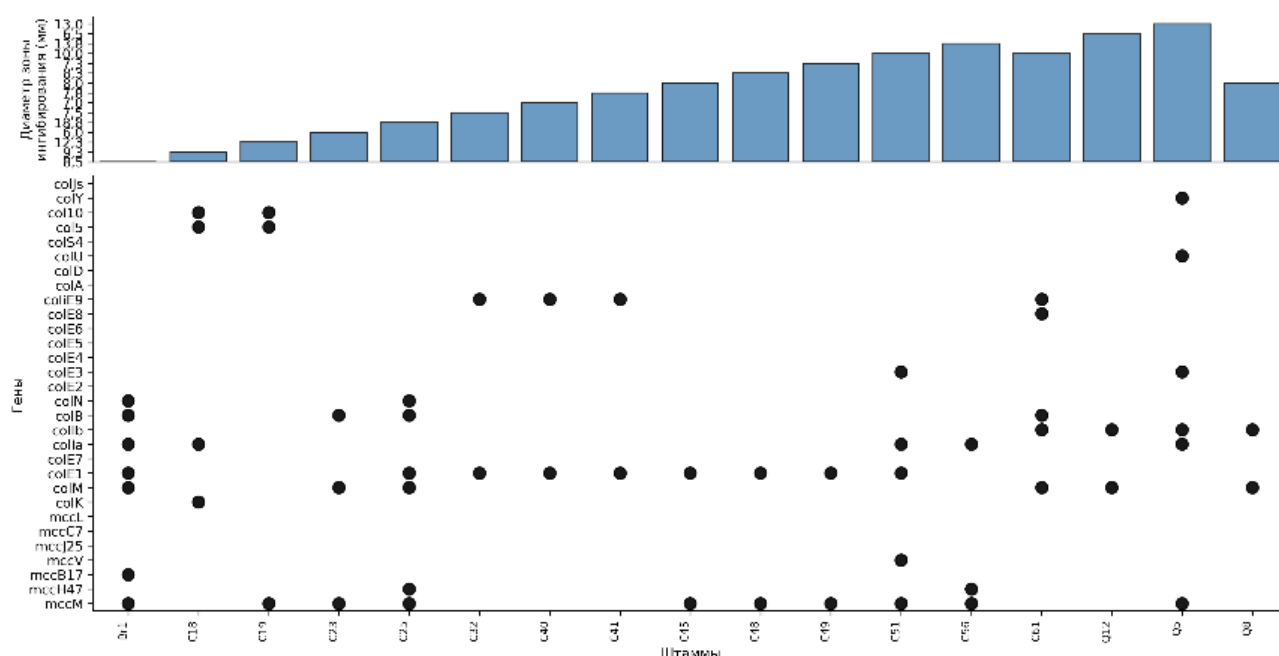


Рисунок 6 – UpSet plot, показывающий комбинации генов бактериоцинов, обнаруженные среди бактериоцин-продуцирующих комменсальных штаммов *E. coli*, а также величину диаметров зон лизиса тест-штамма (в мм)

В 41,2% случаев были обнаружены только гены колицинов, а в 58,8% – как колицинов, так и микроцинов. Среди изученных штаммов, продуцирующих бактериоцины, наиболее распространенными были гены, кодирующие MscM (58,8%) и ColE1 (52,9%), за которыми следовали гены, кодирующие ColE9, ColIb, ColB (все три были обнаружены у 23,5% штаммов), ген ColIa, обнаруженный у 29,4%, и ген ColE1 (52,9%). Ген MscM содержался у 35,3% штаммов, продуцирующих бактериоцины. Гены микроцинов B17, V и колицинов K, E8, U, Y были обнаружены только в одном штамме. Гены микроцинов J25, C7, L и колицинов

E2, E4, E5, E6, E7, A, D, S4, Js обнаружены не были. Из 17 штаммов 12 (70,6%) имели уникальные профили генов бактериоцина (не повторяющиеся ни в одном другом проанализированном штамме). Штаммы *E. coli* с комбинациями генов колицина E1 и E9, микроцина M и колицина E1 были обнаружены у 17,7% штаммов.

Все проанализированные штаммы, продуцирующие бактериоцины, несли, по крайней мере, один порообразующий бактериоцин (Рисунок 5Б). Колицин M, отвечающий за деградацию пептидогликанов, был обнаружен у 35,3% штаммов. Штаммы, у которых были обнаружены гены биосинтеза колицинов и микроцинов с двумя различными механизмами действия, были обнаружены в 58,8% случаев, реже с тремя (23,5%) и четырьмя (11,8%) различными механизмами действия. Вероятность обнаружения штаммов, содержащих гены нескольких бактериоцинов с одинаковым механизмом действия, составила всего 5,9%. При этом 35,3% штаммов одновременно содержали гены бактериоцинов с механизмами порообразования и деградации пептидогликана, а 29,4% штаммов одновременно – гены бактериоцинов с механизмом порообразования и бактериоцины, разрушающие нуклеиновые кислоты. Высокопродуцирующие бактериоцины штаммы, чаще содержали комбинации из 4 или более генов бактериоцинов ($p = 0,02$, точный критерий Фишера).

Таким образом, все изученные бактериоцин-продуцирующие комменсальные штаммы *E. coli* содержали гены биосинтеза как минимум одного пороформирующего бактериоцина, а большинство штаммов несли гены бактериоцинов с двумя и более различными механизмами действия. Штаммы с высоким уровнем фенотипической продукции чаще содержали 4 и более генов бактериоцинов, что может свидетельствовать о кумулятивном эффекте. Полученные данные подчеркивают, что комменсальные *E. coli* от животных представляют собой резервуар разнообразных бактериоцинов и могут служить источником перспективных штаммов для разработки пробиотических препаратов и поиска уникальных антибактериальных пептидов.

ГЛАВА 4. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ЭКСТРАИНТЕСТИНАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ И КОММЕНСАЛЬНЫХ *E. COLI*: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, СВЯЗЬ С ПРОДУКЦИЕЙ И ГЕНАМИ БАКТЕРИОЦИНОВ

Данные об ассоциации между бактериоциногенией и генами вирулентности остаются противоречивыми: в одних исследованиях бактериоцин-продуцирующие штаммы характеризуются повышенным патогенным потенциалом (Dobson *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2025), в других – такой связи не обнаруживается (Ghazaryan *et al.*, 2019). Таким образом, вопрос о том, являются ли бактериоцины самостоятельными факторами патогенности или маркерами определенных патогенетических групп, остается дискуссионным. В связи с этим, мы решили провести детальную оценку связи фенотипа и генотипа продукции бактериоцинов с факторами и островами патогенности *E. coli*.

4.1. Распространенность островов патогенности и их ассоциация с бактериоциногенией экстраинтестинальных патогенных и комменсальных *E. coli*

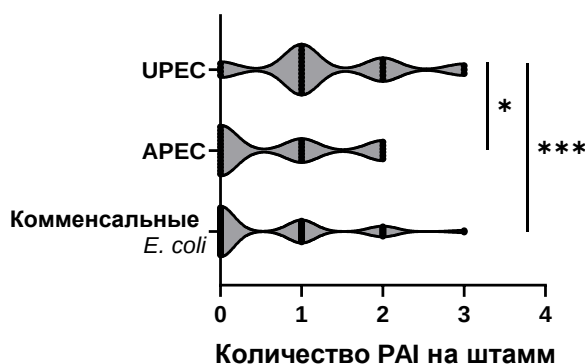
Гены и генетические кластеры, ассоциированные с вирулентностью, часто расположены на островах патогенности (от англ. *pathogenicity islands*, PAI), которые характеризуются тем, что занимают большие участки генома (10-200 Кб), имеют более низкий GC-состав в сравнении с основным геномом, располагаются рядом с генами тРНК, часто включают мобильные элементы или их фрагменты и фланкированы прямыми повторами. Штаммы APEC, UPEC и комменсальных *E. coli* были проверены на наличие островов патогенности HPI, SHI-2, Tia, EspC, She, LEE и O-island.

Распространенность маркеров островов патогенности зависела от эколого-патотипической принадлежности штаммов³. Маркеры PAI были обнаружены у 41,7% комменсальных штаммов, 46,4% – штаммов АРЕС и 84,6% – UPEC. Сравнение выборок по количеству PAI показало, что многие АРЕС, UPEC и комменсальные *E. coli* чаще несли только один маркер PAI (25, 50 и 12,5% соответственно), реже – два (21,4, 23,1 и 12,5% соответственно). Штаммы UPEC характеризовались наибольшей распространенностью маркеров островов патогенности (Рисунок 7А). У комменсальных штаммов маркеры островов встречались реже, однако их наличие подтверждает, что часть изолятов от здоровых животных несли фрагменты генетического репертуара, характерного для патогенных *E. coli*. В группе комменсальных *E. coli* среди всех островов патогенности чаще встречался HPI (27,8%), который включает гены, участвующие в синтезе, регуляции и транспорте сидерофора иерсиниабактина, тогда как АРЕС и UPEC чаще содержали остров SHI-2 (был обнаружен у 32,1 и 57,7% культур соответственно), который содержит ген, кодирующий белок ShiA (предполагаемую хинонредуктазу), ослабляющий ответ Т-клеток (Рисунок 7Б). Комбинация указанных PAI (HPI + SHI-2) встречалась наиболее часто во всех группах. Важно отметить, что у 30 из 177 штаммов UPEC (19,6%) обнаруживался ген *clbA*, ассоциированный с *pks*-островом и синтезом генотоксина колибактина.

Бактериоцин-продуцирующие комменсальные *E. coli* чаще содержали в геноме два и более острова патогенности, чем не продуцирующие бактериоцины штаммы (23,5% против 1,8%). Ассоциации конкретных маркеров островов патогенности и генов бактериоцинов штаммов АРЕС и комменсальных *E. coli* описаны в соответствующих разделах ниже.

³ Данные, представленные в разделе 4.1, опубликованы: Mihailovskaya, V.S., Selivanova, P.A., Kuznetsova, M.V. Prevalence of pathogenicity island markers among commensal, avian pathogenic, and uropathogenic *Escherichia coli* strains // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2025. – Vol. 179, No. 3. – P. 336–341

А



Б

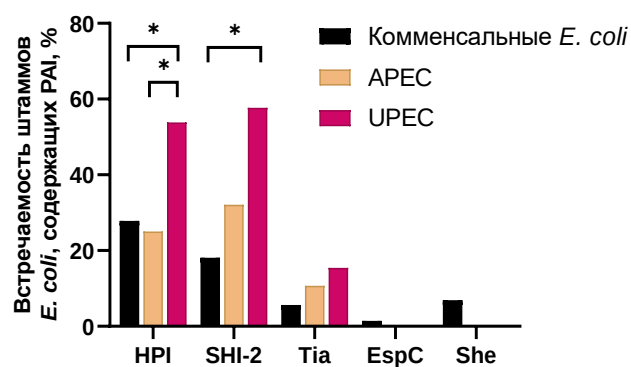


Рисунок 7 – Распространенность островов патогенности (PAI) в штаммах *E. coli*. А – Количество PAI на штамм. Б – Встречаемость PAI. UPEC – уropатогенные *E. coli*. APEC – патогенные для птиц *E. coli*. Статистический анализ проведен с помощью теста Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна на множественность; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

4.2. Распространенность факторов патогенности и их ассоциация с бактериоциногией экстраинтестинальных патогенных и комменсальных *E. coli*

Оценка распространенности генов адгезинов (*fimH*, *papC*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *flu*, *upaG*), токсинов (*cnf1*, *eastI*, *ehxA*, *estI*, *estII*, *eltA*, *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *hlyF*, *clbA*), систем захвата железа (*iroN*, *iutA*, *iha*, *chuA*) и факторов повышенной выживаемости в организме хозяина (*ompT*, *kpsMTII*, *iss*) показала, что они встречались как среди патогенных культур, так и среди комменсальных штаммов с разной частотой. Медианы количества генов патогенности на штамм для UPEC, APEC, выделенных от животных и птиц комменсальных *E. coli* составили 5[3,0–8,0], 9,0[7,0–10,0], 3,0[2,0–4,3] и 3,0[1,0–4,8] гена соответственно. Ген *fimH*, ответственный за прикрепление к уротелию посредством адгезина фимбрий 1 типа, во всех группах был наиболее распространенным. Распределение прочих факторов патогенности существенно различалось между исследованными группами *E. coli*.

4.2.1. Распространенность факторов патогенности и их ассоциация с генами биосинтеза бактериоцинов уropатогенных *E. coli*

У UPEC наиболее часто встречались следующие гены патогенности: *chuA* и *fimH* – у 145 из 177 штаммов (81,9%), *kpsMTII* – 96 (54,2%), *flu* – 95 (53,7%), *iutA* –

93 (52,5%), *iroN* – 59 (33,3%), *iha* – 59 (33,3%) и *usp* – 58 (32,8%). Такой профиль отражает сочетание факторов адгезии, железахвата, капсульной защиты и выживания во внекишечных биотопах, характерное для уropатогенных *E. coli*. Распространенность прочих генов составила: *papC* – 54 (30,5%), *sfaDE* – 39 (22%), *uraG* – 35 (19,8%), *cnf1* – 33 (18,6%), *clbA* – 30 (16,9%), *ompT* – 25 (14,1%), *hlyA* – 38 (12,5%), *afa/draBC* – 16 (9%) (Таблица 7).

Таблица 7 – Распространенность генов патогенности среди уropатогенных штаммов *E. coli*, содержащих два и более гена биосинтеза бактериоцинов в геноме

Ген	Кодируемый фактор	Встречаемость <i>E. coli</i> , позитивных на гены патогенности, n (%)		
		содержащих ≥2 генов бактериоцинов (n=42)	содержащих <2 генов бактериоцинов (n=136)	Всего (n=177)
Факторы патогенности				
<i>fimH</i>	фимбрии 1 типа	39 (92,9)	106 (78,5)	145 (81,9)
<i>papC</i>	P-фимбрии	16 (38,1)	38 (28,1)	54 (30,5)
<i>sfaDE</i>	S-фимбрии	20 (47,6)*	19 (14,1)	39 (22,0)
<i>afa/draBC</i>	антигенсвязывающий адгезин	4 (9,5)	12 (8,9)	16 (9,0)
<i>flu</i>	антиген Ag43a	29 (69,0)*	66 (48,9)	95 (53,7)
<i>uraG</i>	белок наружной мембраны	12 (28,6)	23 (17,0)	35 (19,8)
<i>usp</i>	уропатоген-специфичный белок	23 (54,8)*	35 (25,9)	58 (32,8)
<i>cnfI</i>	цитотоксический некротический фактор	14 (33,3)*	19 (14,1)	33 (18,6)
<i>hlyA</i>	гемолизин А	17 (40,5)*	21 (15,6)	38 (21,5)
<i>clbA</i>	колибактин	18 (42,9)*	12 (8,9)	30 (19,6)
<i>ompT</i>	протеаза наружной мембраны	13 (31,0)*	12 (8,9)	25 (14,1)
<i>kpsMTII</i>	капсульный антиген II группы	33 (78,6)	63 (46,7)	96 (54,2)
<i>iha</i>	бифункциональный адгезин-рецептор энтеробактина	12 (28,6)	47 (34,8)	59 (33,3)
<i>iutA</i>	рецептор аэробактина	24 (57,1)	69 (51,1)	93 (52,5)
<i>iroN</i>	рецептор сальмохелина	32 (76,2)*	27 (20,0)	59 (33,3)
<i>chuA</i>	рецептор к гему	34 (81,0)	111 (82,2)	145 (81,9)
Количество генов патогенности, Me[Q1–Q3]		8,0[6,0–10,8]	5,0[2,0–7,0]	–
Фенотип патогенности				
Гемолитическая активность		15 (35,7)	22 (16,3)	37 (20,9)

Примечание. Статистический анализ проведен с помощью критерия χ^2 , * – разница статистически достоверна, $p < 0,05$.

В группе UPEC штаммы-носители двух и более бактериоцинов чаще несли факторы патогенности, чем штаммы, содержащие один или не кодирующие ни одного бактериоцина. Разница была достоверна для следующих генов: *sfaDE* (OR = 5,6; 95% CI 2,6-12,2; $p < 0,001$; критерий χ^2), *flu* (OR = 2,4; 95% CI 1,1-4,9; $p = 0,02$), *usp* (OR = 3,5; 95% CI 1,7-7,2; $p < 0,001$), *cnf1* (OR = 3,1; 95% CI 1,4-6,9; $p = 0,006$), *hlyA* (OR = 3,7; 95% CI 1,7-8,1; $p < 0,001$), *clbA* (OR = 7,8; 95% CI 3,3-18,2; $p < 0,001$), *ompT* (OR = 4,6; 95% CI 1,9-11,2; $p < 0,001$), *iroN* (OR = 12,9; 95% CI 5,7-12,5; $p < 0,001$) (Таблица 6). Важно отметить, что гемолитические UPEC встречались в 2,9 раз чаще среди штаммов, кодирующих два и более бактериоцина (OR = 2,9, 95% CI 1,3-6,2). В сумме штаммы этой группы содержали больше генов патогенности в сравнении со штаммами, несущими 0-1 ген биосинтеза бактериоцинов (Me[Q1–Q3] составила 8,0[6,0–10,8] против 5,0[2,0–7,0]; $p < 0,05$; тест Крускала-Уоллеса).

Для оценки ассоциации конкретных генов биосинтеза бактериоцинов и генов патогенности была построена ассоциативная матрица бинарных переменных, в которой цветовой градиент представляет отношение шансов, полученное из 2×2 таблицы для каждой попарной ассоциации. Анализ группы UPEC выявил высокую частоту совместной встречаемости следующих бактериоцинов: микроцинов-сидерофоров М и Н47 (OR = 109,2; 95% CI 22,9-520,1; $p_{\text{ВН}} < 0,001$), колицинов В и М (OR = 168; 95% CI 15,2-1861,7; $p_{\text{ВН}} < 0,001$), микроцина V и колицинов Ia (OR = 13,3; 95% CI 4,2-42; $p_{\text{ВН}} < 0,001$) и Ib (OR = 11,2; 95% CI 2,1-60,8; $p_{\text{ВН}} = 0,05$). Была выявлена тесная ассоциация генов биосинтеза бактериоцинов с генами патогенности. Гены микроцинов-сидерофоров М и Н47 часто встречались совместно со следующими генами: *sfaDE* (OR = 29 и OR = 15,3 соответственно; $p_{\text{ВН}} < 0,001$), *usp* (OR = 5,1 и OR = 5,6 соответственно; $p_{\text{ВН}} < 0,01$), *clbA* (OR = 45 и OR = 26,9 соответственно; $p_{\text{ВН}} < 0,001$), *cnf1* (OR = 10,3 и OR = 7,7 соответственно; $p_{\text{ВН}} < 0,001$), *hlyA* (OR = 13,1 и OR = 7,5 соответственно; $p_{\text{ВН}} < 0,001$), *kpsMTIII* (OR = 3,2 и OR = 4,4 соответственно; $p_{\text{ВН}} = 0,03$), *iroN* (OR = 12,5 в обоих случаях; $p_{\text{ВН}} < 0,001$). Ген микроцина V был тесно ассоциирован с *ompT* (OR = 40,1; 95% CI 11,3-142,1; $p_{\text{ВН}} < 0,001$) и *iutA* (OR = 17,2; 95% CI 2,2-133,2; $p_{\text{ВН}} = 0,001$), а также *iroN*, который

встречался только среди штаммов, кодирующих микроцин V ($p_{\text{ВН}} < 0,001$). Наблюдалось множество значимых ассоциаций между генами патогенности, в том числе *iroN* с генами адгезинов (*fimH*, *papC*, *sfaDE*, *upaG*, *flu*, *usp*), токсинов (*clbA*, *cnf1*, *hlyA*) и факторов, обеспечивающих повышенную выживаемость (*ompT*, *kpsMTII*); гена *iutA* с генами *flu*, *usp*, *kpsMTII*, *iha*; гена *clbA* с генами *sfaDE*, *upaG*, *flu*, *usp*, *cnf1*, *hlyA*, *kpsMTII*, *iroN* и прочие ассоциации (Рисунок 8).

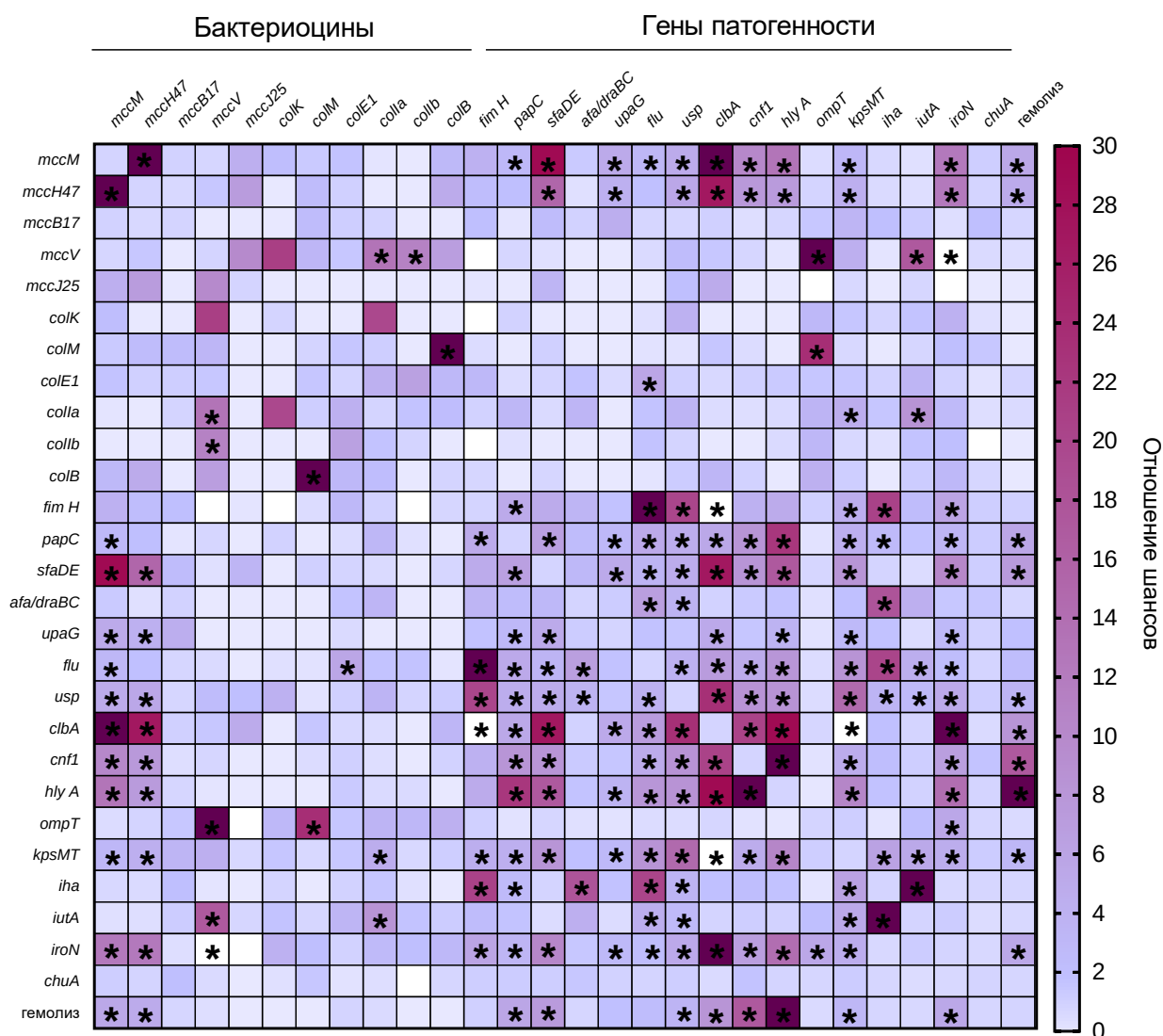
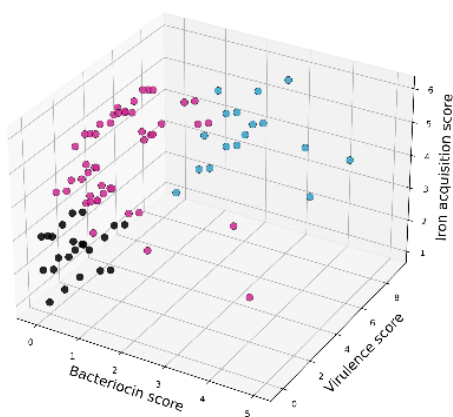


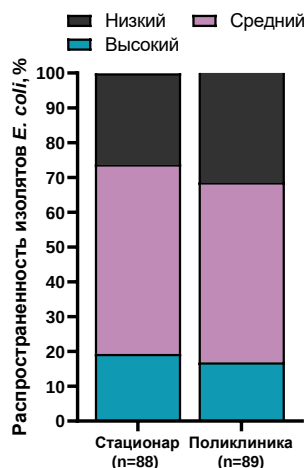
Рисунок 8 – Тепловая карта, отражающая шанс совместной встречаемости генов бактериоцинов и генов патогенности, детектированных методом ПЦР, у штаммов UPEC (n=177). Каждая ячейка представляет отношение шансов (OR), рассчитанное на основе таблицы 2×2 для соответствующей пары бинарных переменных. Цветовой градиент отражает величину и направление связи: положительная (OR > 1), отрицательная (OR < 1), отсутствие связи (OR = 1). Белые ячейки указывают на сравнения, для которых значение OR не могло быть рассчитано, поскольку одна или несколько ячеек в соответствующей таблице 2×2 содержали нулевые значения. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера с поправкой на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга; * – разница достоверна, $p_{\text{ВН}} < 0,05$

С целью оценки общего уропатогенного потенциала изолятов *E. coli* для каждого штамма рассчитывали индекс патогенности (от англ. *virulence score*, т.е. количество детектированных генов патогенности на штамм), индекс железахвата (от англ. *iron acquisition receptors score*, т.е. количество детектированных генов, кодирующих рецепторы систем захвата и транспорта железа) и индекс бактериоциногении (от англ. *bacteriocin score*, т.е. количество детектированных генов бактериоцинов на штамм). Изоляты классифицировали на 3 группы: у которых все три показателя превышали соответствующие пороговые значения (*virulence score* ≥ 3 , *iron acquisition receptors score* ≥ 4 , *bacteriocin score* ≥ 2), относили к группе с высоким уропатогенным потенциалом. Изоляты, у которых ни один показатель не превышал пороговые значения, относили к низкому потенциалу, остальные изоляты классифицировали как промежуточные. Всего было обнаружено 32/177 (18,1%) изолятов с высоким уропатогенным потенциалом, 51/177 (28,8%) – с низким, 94/177 (53,1%) были промежуточными (Рисунок 9А). Сравнение изолятов *E. coli*, выделенных от пациентов стационаров и поликлиник показало, что в обеих группах изоляты с высоким, средним и низким уропатогенным потенциалом были распределены равномерно (Рисунок 9Б). Среди пациентов стационаров, *E. coli* с высоким уропатогенным потенциалом встречались в 17/88 (19,3%) случаев, с промежуточным – в 48/88 (54,5%), с низким – в 23/88 (26,1%) случаев. В группе пациентов поликлиник соответствующие значения составили 15/89 (16,9%), 46/89 (51,7%) и 28/89 (31,5%). Распределение изолятов с различным уропатогенным потенциалом между отделениями стационаров показало, что доля *E. coli* со средним и/или высоким потенциалом была выше в отделениях реанимации, чем терапии или хирургии (Рисунок 9В). Важно отметить, что шанс встретить резистентные к цефалоспорином изоляты был выше в группе *E. coli* с низким уропатогенным потенциалом, чем с промежуточным или высоким (OR = 4,0, 95% CI 1,1-15,3).

А



Б



В

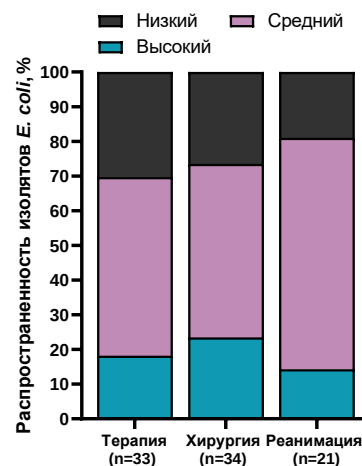


Рисунок 9 – Классификация UPEC на изоляты с низким, средним и высоким уропатогенным потенциалом на основе количества генов продукции бактериоцинов, генов патогенности и систем захвата железа. А – 3D-плот, отражающий распределение изолятов в пространстве, где оси x, y, z соответствуют индексам патогенности, бактериоциногенности и железахвата соответственно. Каждая точка на графике эквивалентна изоляту, а цвет точки соответствует низкому (черный), среднему (розовый) или высокому (синий) уропатогенному потенциалу. Б – Распределение изолятов с различным уропатогенным потенциалом в группах пациентов стационаров и поликлиник. В – Распределение изолятов с различным уропатогенным потенциалом в группах пациентов отделений стационаров (терапии, хирургии и реанимации)

4.2.2. Распространенность факторов патогенности и их ассоциация с фенотипом и генотипом бактериоциногенности патогенных для птиц *E. coli*

В группе АРЕС доминировали гены патогенности, связанные с защитой от иммунных механизмов хозяина и захватом железа: *fimH* – у 26 из 28 штаммов (92,9%), *kpsMTII* – 23 (82,1%), *ompT* – 22 (78,6%), *iha* – 21 (75,0%), *iroN* – 19 (67,9%), *iss* – 18 (64,3%), *chuA* – 15 (53,6%), *iutA* – 12 (42,9%), а также генов токсинов *hlyF* – 23 (82,1%), *estII* – 23 (82,1%), *eastI* – 17 (60,7%). Важно отметить, что штаммы группы АРЕС отличались высокой нагрузкой генами патогенности в сравнении с UPEC и комменсальными штаммами⁴.

⁴ Данные о распространенности генов патогенности опубликованы: Kuznetsova, M.V., Pospelova, Y.S., Mihailovskaya, V.S., Kochergina, D.A. Antibiotic resistance and zoonotic potential of *Escherichia coli* strains isolated from birds in the poultry agro-industrial complex // Russian Agricultural Sciences. – 2025. – Vol. 51. – P. 570–580

В группе АРЕС не было выявлено значимых различий в общем количестве генов патогенности между продуцирующими и не продуцирующими бактериоцины штаммами (Me[Q1–Q3] составила 8,0[7,0–9,3] против 9,0[6,8–9,5]; $p > 0,05$; тест Крускала-Уоллеса), а также распространенностью конкретных генов адгезинов (*fimH*), токсинов (*hlyF*, *eastI*, *estI*, *estII*, *eltA*), факторов общей выживаемости (*iha*, *ompT*, *kpsMTII*, *iss*), маркеров островов патогенности (*irp2*, *tia*). Единственным геном, который чаще детектировали в группе продуцентов бактериоцинов, был ген рецептора к сидерофору сальмохелину *iroN* (80% против 37,5%, OR = 6,7; 95% CI 1,1–40,4; однако разница не достигла статистической значимости, $p = 0,06$; точный критерий Фишера). Также фенотип продукции бактериоцинов был тесно ассоциирован с лизогенной активностью: лизогенные штаммы были обнаружены только в группе бактериоцин-продуцирующих АРЕС.

Оценка ассоциаций генов биосинтеза бактериоцинов, генов патогенности и маркеров островов патогенности не выявила статистически значимых связей после введения поправки на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга (Рисунок 10). Тем не менее, шанс встретить совместно гены следующих бактериоцинов был высоким: колицин В и микроцин J25 (OR = 15,8; 95% CI 1,5–157,6; $p = 0,03$; $p_{BH} = 0,6$), колицин Е1 и колицин К (OR = 12; 95% CI 0,5–273,1; $p = 0,2$). Были выявлены следующие ассоциации бактериоцинов и островов патогенности: микроцина J25 и микроцина V с островом HPI, маркируемым геном *irp2* (OR = 26,7; 95% CI 2,2–326,5 и OR = 8,0; 95% CI 0,6–106,9 соответственно), колицином К с островом Tia (OR = 12,0). Наблюдалось несколько ассоциаций между генами патогенности, в том числе *estII* с *kpsMTII* (OR = 15,8) и *iha* (OR = 26,7); *eastI* и *iha* (OR = 19,2), однако не была достигнута статистическая достоверность (во всех случаях $p > 0,05$).

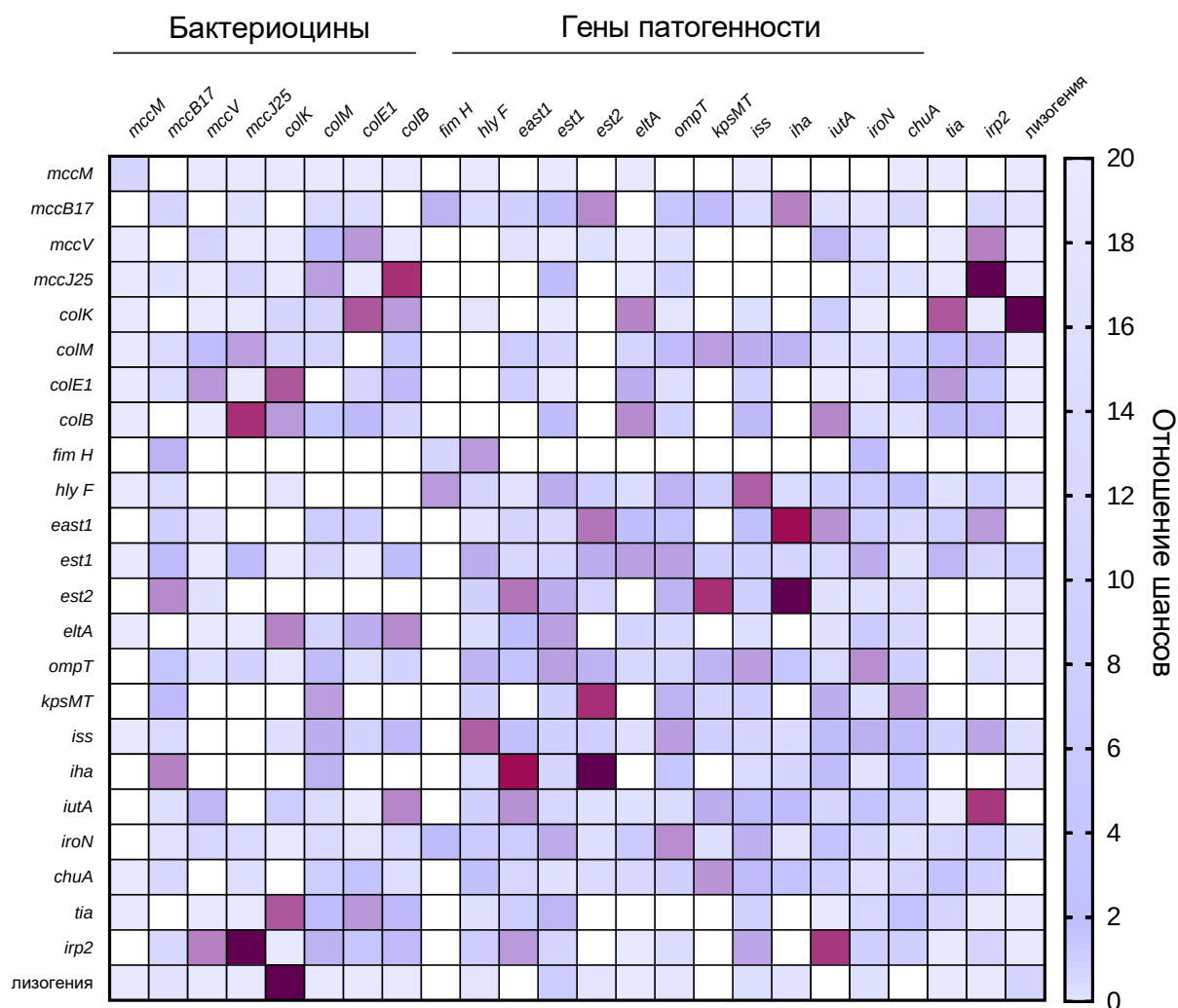


Рисунок 10 – Тепловая карта, отражающая шанс совместной встречаемости генов бактериоцинов и генов патогенности, детектированных методом ПЦР, у штаммов АРЕС (n=28). Каждая ячейка представляет отношение шансов (OR), рассчитанное на основе таблицы 2×2 для соответствующей пары бинарных переменных. Цветовой градиент отражает величину и направление связи: положительная (OR > 1), отрицательная (OR < 1), отсутствие связи (OR = 1). Белые ячейки указывают на сравнения, для которых значение OR не могло быть рассчитано, поскольку одна или несколько ячеек в соответствующей таблице 2×2 содержали нулевые значения. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера с поправкой на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга

4.2.3. Распространенность факторов патогенности среди комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных от животных и птиц

Анализ группы комменсальных *E. coli*, выделенных от здоровых животных и птиц (n=72), показал, что у всех штаммов был детектирован хотя бы один ген патогенности. Чаще всего встречались *E. coli*, содержащие три (20,4%), четыре (14,3%), пять (20,4%) и шесть (16,3%) генов, в то время как доля эшерихий, имеющих семь и более генов, не превышала 10%. Оценка встречаемости генов,

кодирующих системы захвата железа, показала, что *iha*, кодирующий бифункциональный адгезин-рецептор энтеробактина, встречался только среди экстраинтестинальных патогенных, но не комменсальных *E. coli*. Комменсальные штаммы характеризовались меньшей нагрузкой генами патогенности, в сравнении с АРЕС и UРЕС, однако несли эпидемиологически-значимые детерминанты патогенности, включая гены шига-токсинов (*stx1* и *stx2*) и энтеротоксинов (*eastI*, *estI*, *eltA*, *ehxA*). Комменсальные штаммы здоровых сельскохозяйственных птиц (всего $n=16$) несли меньше генов патогенности в сравнении с АРЕС (7.9 ± 1.8 против 2.7 ± 1.7 , $p < 0.01$, U-критерий Манна-Уитни). Тем не менее, в данной группе были обнаружены следующие гены: *ehxA*, *eastI*, *stx2*, *eltA*, *hlyF* (Таблица 8). Комменсальные штаммы животных (всего $n=56$) были получены от крупного рогатого скота ($n=49$), кроликов ($n=4$) и свиней ($n=3$). Среди штаммов *E. coli*, выделенных от здорового крупного рогатого скота ($n=49$) семнадцать штаммов (34,7%) содержали гены, связанные с патотипами интестинальных патогенных *E. coli* (InРЕС)⁵. Среди детерминант, кодирующих токсины, наиболее распространенным был ген энтероаггративного термостабильного энтеротоксина *eastI* (12/49, 24,5%), который обычно, но не исключительно, ассоциирован с ЕАЕС. Семь штаммов (14,3%) несли гены, связанные с ЕТЕС (*estI*, *estII*, *eltA*), четыре культуры содержали гены-маркеры STEC *stx1* (2,0%) и *stx2* (6,1%)⁶. Обнаружен гетеропатогенный штамм, содержащий одновременно гены-маркеры патотипов STEC и ЕТЕС. Более половины штаммов (55,1%) соответствовали критерию классификации ExРЕС согласно Johnson и Russo (2005), то есть содержали два и более из следующих генов: *papC*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *kpsMTII*, *iutA*. Интересно, что восемь штаммов включали хотя бы три из пяти генов (*hlyF*, *iroN*, *ompT*, *iss*, *iutA*),

⁵ Данные опубликованы: Михайловская, В.С., Ремезовская, Н.Б., Жданова, И.Н., Starčič Erjavec, M., Кузнецова, М.В. Патогенный потенциал интестинальных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от здоровых коров и телят в хозяйствах Пермского края // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26, № 5. – С. 486–494.

⁶ Данные представлены: Михайловская В.С., Артамонова О.А., Кузнецова М.В. Мониторинг шига-токсинпродуцирующих штаммов *Escherichia coli* в популяции здоровых животных // Материалы научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования» в рамках Пермского международного форума “Наука и глобальные вызовы XXI века”. – 2021. – С. 72-74.

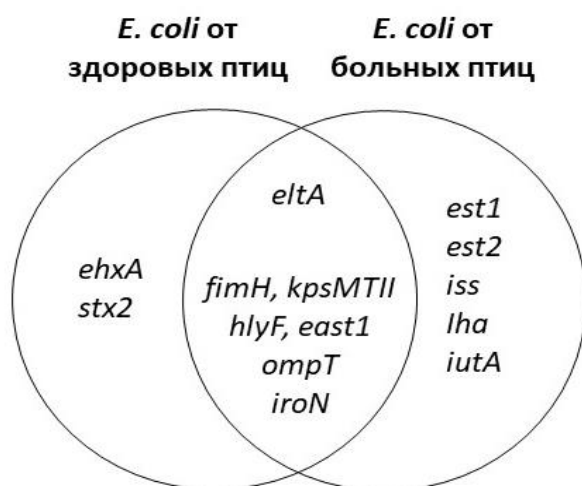
которые были предложены Johnson *et al.* (2008) для определения патотипа АРЕС. Молекулярные методы позволили идентифицировать не только «классические», но и гибридные штаммы. Выявлено одиннадцать (22,5%) культур, которые соответствовали критерию ExPEC и включали гены, ассоциированные с патотипами DEC (*estI*, *stx2*, *eastI*, *ehxA*). Среди них обнаружены гибридные патотипы ExPEC/STEC и ExPEC/ETEC, однако они встречались не более чем в 4,1% случаев.

Таблица 8 – Распространенность генов патогенности среди комменсальных штаммов *E. coli* и АРЕС

Патотип	Ген	Кодируемый фактор	Распространенность <i>E. coli</i> , кодирующих факторы патогенности, n (%)		
			Животных (n=56)	Птиц (n=16)	Всего (n=72)
ExPEC	<i>cnf1</i>	цитотоксический некротический фактор	0	0	0
	<i>hlyA</i>	гемолизин А	9 (16,1)*	0	9 (12,5)
	<i>fimH</i>	фимбрии 1 типа	51 (91,1)	13 (81,3)	64 (88,8)
	<i>kpsMTII</i>	капсульный антиген II группы	10 (17,9)	1 (6,3)	11 (15,3)
InPEC	<i>stx1</i>	шига-подобный токсин 1 типа	1 (1,8)*	0	1 (1,4)
	<i>stx2</i>	шига-подобный токсин 2 типа	3 (5,4)	2 (12,5)	5 (6,9)
	<i>ehxA</i>	энтерогемолизин	5 (8,9)	4 (25,0)*	9 (12,5)
	<i>eastI</i>	энтероаггративный термостабильный энтеротоксин	12 (21,4)	5 (31,3)	17 (23,6)
	<i>estI</i>	термостабильный энтеротоксин а	5 (8,9)*	0	5 (6,9)
	<i>estII</i>	термостабильный энтеротоксин b	0	0	0
	<i>eltA</i>	термолабильный энтеротоксин	4 (7,1)	3 (18,8)*	7 (9,7)
	<i>iha</i>	бифункциональный адгезин-рецептор энтеробактина	0	0	0
АРЕС	<i>hlyF</i>	регулятор образования везикул наружной мембраны	15 (26,8)	5 (31,3)	20 (27,8)
	<i>iroN</i>	рецептор сальмохелина	11 (19,6)	2 (12,5)	13 (18,1)
	<i>ompT</i>	протеаза наружной мембраны	10 (17,9)	6 (37,5)*	16 (22,2)
	<i>iss</i>	белок резистентности к сыворотке	7 (12,5)*	0	7 (9,7)
	<i>iutA</i>	рецептор аэробактина	22 (39,3)*	0	22 (30,6)
Количество генов патогенности, Me[Q1–Q3]			3,0[2,0–4,3]	3,0[1,0–4,8]	–

Примечание. ExPEC – экстраинтестинальные (внекишечные) патогенные *E. coli*, InPEC – интестинальные (диареогенные) *E. coli*, АРЕС – патогенные для птиц *E. coli*. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера, «*» – разница достоверна, $p < 0,05$.

А



Б

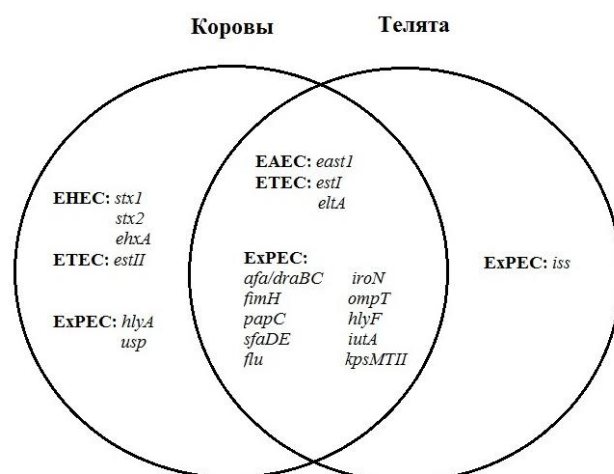


Рисунок 11 – Распределение генов патогенности между группами. А – комменсальных *E. coli*, выделенных от здоровых птиц и АРЕС. Б – комменсальных *E. coli*, выделенных от здорового крупного рогатого скота (коров и телят)

Большинство всех проанализированных *E. coli* несли комбинации генов трех патотипов АРЕС, InРЕС/ДЕС, ExРЕС одновременно (Рисунок 12)⁷. Среди *E. coli*, полученных от больных птиц, 75% (21/28) штаммов включали хотя бы три из пяти генов (*hlyF*, *iroN*, *ompT*, *iss*, *iutA*), маркирующих патотип АРЕС, связанный с системным колибактериозом птиц. Большинство (20/21, 95,2%) АРЕС-штаммов, выделенных из органов птиц с признаками колибактериоза, содержали гены-маркеры InРЕС: *iha*, *eastI*, *estI*, *estII*, *eltA*. Один штамм, классифицированный как АРЕС, был найден среди *E. coli*, изолированных от здоровых птиц.

⁷ Данные опубликованы: Kuznetsova, M.V., Pospelova, Y.S., Mihailovskaya, V.S., Kochergina, D.A. Antibiotic resistance and zoonotic potential of *Escherichia coli* strains isolated from birds in the poultry agro-industrial complex // Russian Agricultural Sciences. – 2025. – Vol. 51. – P. 570–580

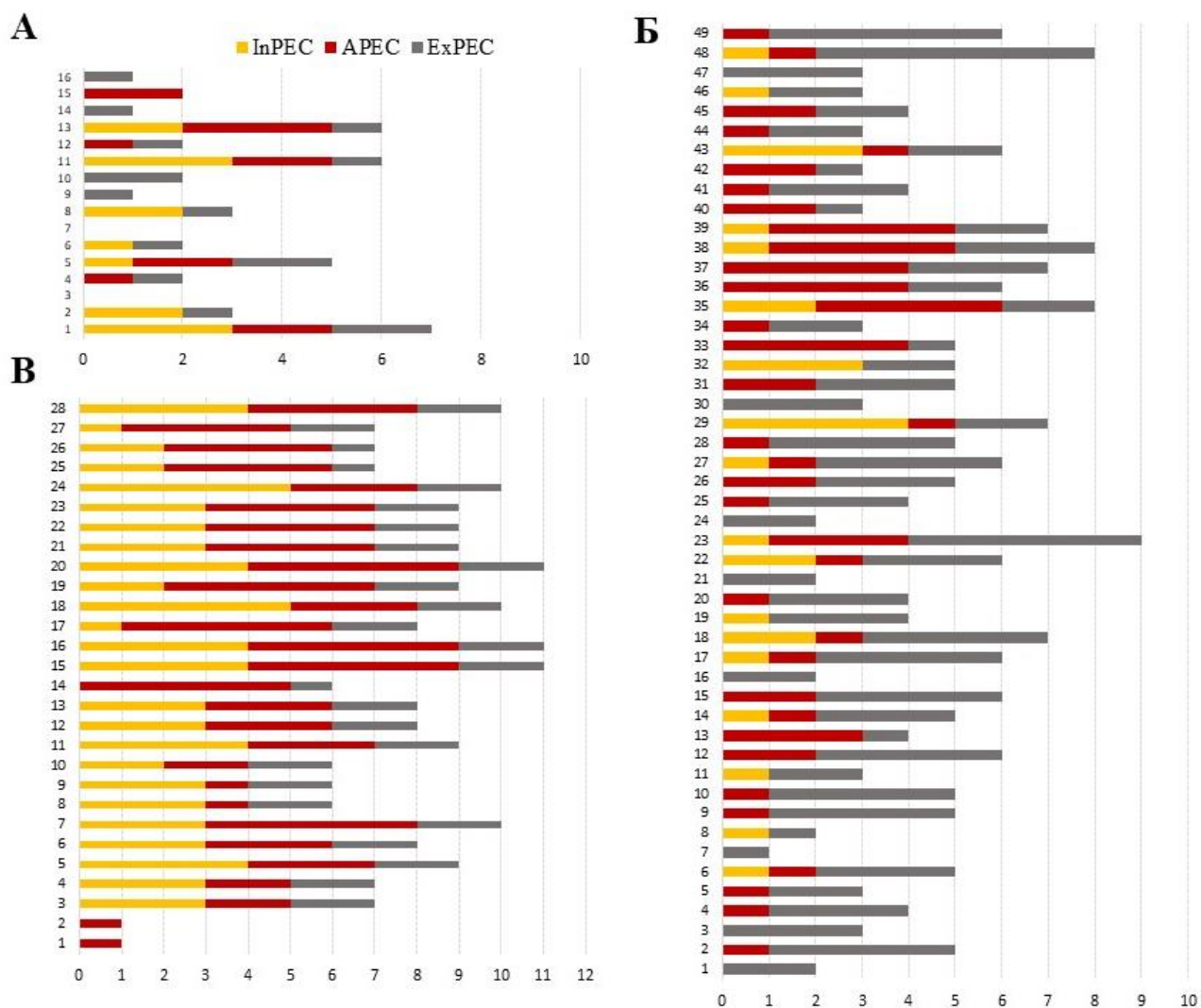


Рисунок 12 – Распределение генов, ассоциированных с патотипами ExPEC, InPEC и APEC, в штаммах *E. coli*, выделенных от: А – здоровых птиц, Б – здорового крупного рогатого скота, В – птиц с признаками колибактериоза. Число по оси абсцисс отражает количество детектированных генов

Для детального исследования факторов патогенности геномы пяти штаммов *E. coli* были секвенированы. Были выбраны три штамма, полученные из образцов фекалий здоровых птиц (Ch1) и коров (C25, C51), а два штамма (APEC20/16, APEC37) – из внутренних органов птиц с типичными поражениями при колисептицемии. По результатам анализа данных полногеномного секвенирования оказалось, что как штаммы APEC, так и комменсальные *E. coli* характеризовались высоким разнообразием генов патогенности (Таблица 9)⁸.

⁸ Данные опубликованы: Sutormin, D.A., Mihailovskaya, V.S.*, Trofimova, A.B., Mamontov, V.A., Kuznetsova, M.V., Severinov, K. Complete genome sequences of three commensal and two avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from farm animals in Russia // Microbiology Resource Announcements. – 2023. – Article e0065423. Advance online publication. * – равный вклад авторов.

Таблица 9 – Гены патогенности, предсказанные в геномах *E. coli* с помощью VirulenceFinder 2.0

Штамм <i>E. coli</i>	Гены патогенности (chr – на хромосоме, p – на плазмиде)				
	Токсины	Белки адгезии	Системы выживания и защиты	Системы приобретения железа	Прочие гены
Штаммы <i>E. coli</i> от здоровых животных					
C25	<i>pic</i> (chr), <i>hlyA</i> (chr), <i>sat</i> (chr), <i>usp</i> (chr), <i>vat</i> (chr)	<i>fimH</i> (chr), <i>focCsfA</i> (chr), <i>focG</i> (chr), <i>papC</i> (chr), <i>yeh</i> (chr), <i>iha</i> (chr), <i>papA</i> F7-2 (chr)	<i>iss</i> (chr), <i>kpsE</i> (chr), <i>kpsMTII</i> (chr), <i>ompT</i> (chr)	<i>chuA</i> (chr), <i>fyuA</i> (chr), <i>iroN</i> (chr), <i>irp2</i> (chr), <i>iucC</i> (chr), <i>iutA</i> (chr), <i>sitA</i> (chr)	<i>gad</i> (chr), <i>clbB</i> (chr), <i>tcpC</i> (chr)
C51	<i>hlyF</i> (p), <i>hlyE</i> (chr)	<i>csgA</i> (chr), <i>fdeC</i> (chr), <i>fimH</i> (chr), <i>lpfA</i> (chr), <i>papA</i> F11 (chr), <i>papC</i> (chr), <i>yeh</i> (chr)	<i>hra</i> (chr), <i>iss</i> (chr), <i>ompT</i> (chr), <i>terC</i> (chr), <i>traT</i> (p)	<i>ireA</i> (chr), <i>iroN</i> (chr), <i>iucC</i> (p), <i>iutA</i> (p), <i>sitA</i> (p)	<i>etsC</i> (p), <i>gad</i> (chr), <i>shiB</i> (chr), <i>traJ</i> (p)
Ch1	<i>eastI</i> (chr), <i>hlyE</i> (chr)	<i>fimH</i> (chr), <i>iha</i> (chr), <i>yeh</i> (chr)	<i>hra</i> (chr), <i>iss</i> (chr), <i>kpsE</i> (chr), <i>kpsMTII_K5</i> (chr), <i>ompT</i> (chr), <i>terC</i> (chr), <i>traT</i> (p)	<i>chuA</i> (chr), <i>iucC</i> (chr), <i>iutA</i> (chr), <i>sitA</i> (chr)	<i>air</i> (chr), <i>eilA</i> (chr), <i>gad</i> (chr), <i>shiB</i> (chr), <i>traJ</i> (p)
Штаммы <i>E. coli</i> от больных птиц					
АРЕС20/16	<i>hlyF</i> (p), <i>hlyE</i> (chr)	<i>fimH</i> (chr), <i>csgA</i> (chr), <i>fdeC</i> (chr), <i>lpfA</i> (chr), <i>yeh</i> (chr)	<i>iss</i> (chr), <i>ompT</i> (chr), <i>terC</i> (chr), <i>traT</i> (p)	<i>iroN</i> (p), <i>sitA</i> (p)	<i>gad</i> (chr), <i>shiB</i> (chr), <i>traJ</i> (p)
АРЕС37	<i>hlyF</i> (p), <i>hlyE</i> (chr), <i>tsh</i> (p)	<i>fdeC</i> (chr), <i>fimH</i> (chr), <i>yeh</i> (chr)	<i>iss</i> (p), <i>ompT</i> (p), <i>terC</i> (chr), <i>traT</i> (p)	<i>chuA</i> (chr), <i>iroN</i> (p), <i>iucC</i> (p), <i>iutA</i> (p), <i>sitA</i> (p)	<i>etsC</i> (p), <i>gad</i> (chr), <i>traJ</i> (p)

Примечание. *pic*, *sat*, *vat* – сериновые аутотранспортные протеазы энтеробактерий (SPATE), *tsh* – SPATE-белок Tsh: термочувствительный гемагглютинин с активностью протеазы иммуноглобулина A1, *hlyA* – гемолизин A, *hlyF* – регулятор образования везикул, *hlyE* – гемолизин птичьих *E. coli*, *usp* – специфический белок уропатогенных *E. coli*, *eastI* – термостабильный энтеротоксин EASTI, *fimH* – адгезин фимбрий 1-го типа, *papC* – белок наружной мембраны Р-фимбрий, *papA* F7-2 – основная субъединица пилей F7-2, *yeh* кластер – липопротеин наружной мембраны, *focC/sfaDE* – малая субъединица S-фимбрий/F1C-фимбрий; *focG* – адгезин F1C-фимбрий; *iha* – белок адгезии; *csgA* – основная субъединица курли-фимбрий CsgA; *fdeC* – интиминоподобный адгезин FdeC; *lpfA* – длинные полярные фимбрии; *hra* – термоустойчивый агглютинин; *iss* – белок повышенной выживаемости в сыворотке; *ompT* – протеаза наружной мембраны; *terC* – белок устойчивости к ионам теллура; *traT* – белок наружной мембраны, обеспечивающий устойчивость к комплементу; *kpsE* – белок внутренней мембраны, участвующий в экспорте капсульного полисахарида; *kpsMTII* – транспортный белок капсулы 2-й группы, участвующий в транспорте полисиаловой кислоты; *chuA* – рецептор гема наружной мембраны; *fyuA*, *ireA*, *iroN* – рецепторы сидерофоров; *irp2* – ген, кодирующий нерибосомальную пептидсинтазу; *iucC* – синтаза аэробактина; *iutA* – рецептор аэробактина; *sitA* – белок транспорта железа; *gad* – глутаматдекарбоксилаза; *clbB* – гибридная мегасинтаза, сочетающая функции нерибосомальной пептидсинтазы и поликетидсинтазы; *tcpC* – белок, содержащий TIR-домен; *shiB* – гомолог гена *shiA*, входящего в состав острова патогенности SHI-2 *Shigella flexneri*; *traJ* – положительный регулятор оперона конъюгативного переноса; *etsC* – предполагаемый белок наружной мембраны системы секреции I типа; *air* – белок энтероаггративных *E. coli*; *ibeA* – инвазин эндотелиальных клеток; *eilA* – гомолог белка HilA *Salmonella*.

4.2.4. Ассоциация факторов патогенности с фенотипом и генотипом бактериоциногении комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных от животных и птиц

Анализ генов патогенности комменсальных штаммов животных и птиц (n=72) показал, что комменсальные бактериоцин-продуцирующие *E. coli* содержали больше генов патогенности в сравнении со штаммами, не продуцирующими бактериоцины (Me[Q1–Q3] составила 3,0[2,0–6,0] против 2,0[1,0–3,0]; $p < 0,05$; тест Крускала-Уоллеса)⁹. В группе бактериоциногенных штаммов чаще встречались следующие гены: *ehxA* (OR = 5,3; 95% CI 1,2–22,8; $p = 0,03$; точный критерий Фишера), *iss* (OR = 5,3; 95% CI 1,0–26,8; $p = 0,05$), *ompT* (OR = 3,6; 95% CI 1,1–11,9; $p = 0,05$), *iutA* (OR = 4,9; 95% CI 1,5–15,6; $p = 0,008$), *iroN* (OR = 5,2; 95% CI 1,6–17,6; $p = 0,008$) (Таблица 10). Кроме того, *hlyF* (OR = 2,3; 95% CI 0,7–7,1), *estI* (OR = 2,3; 95% CI 0,3–15,1), *stx2* (OR = 2,3; 95% CI 0,3–15,1) были более распространены среди бактерий, продуцирующих бактериоцины, хотя различия не достигли статистической значимости (во всех случаях $p > 0,05$). Островок патогенности HPI, маркируемый геном *irp2*, и островок She, маркируемый геном *pic*, достоверно чаще встречались среди бактериоциногенных штаммов (OR = 16,6 и OR = 2,8 соответственно, $p < 0,05$). Важно отметить, что *E. coli* с лизогенным фенотипом встречались в 3,8 раз чаще среди штаммов-продуцентов бактериоцинов (OR = 3,8, 95% CI 1,2–11,8; $p = 0,02$, точный критерий Фишера).

⁹ Данные представлены: Mihailovskaya V.S., Kuznetsova M.V., Starčič Erjavec M. Association of bacteriocin and virulence-associated genes with bacteriocin production among faecal *Escherichia coli* strains from healthy farm animals. GENETIKA 2022, Slovenia.

Таблица 10 – Распространенность генов патогенности среди комменсальных штаммов *E. coli*, продуцирующих и не продуцирующих бактериоцины

Ген	Кодируемый фактор	Встречаемость <i>E. coli</i> , позитивных на гены патогенности, n (%)		
		продуцирующие бактериоцины (n=17)	не продуцирующие бактериоцины (n=55)	Всего (n=72)
Факторы патогенности				
<i>fimH</i>	фимбрии 1 типа	16 (94,1)	48 (87,3)	64 (88,8)
<i>cnfI</i>	цитотоксический некротический фактор	0	0	0
<i>hlyA</i>	гемолизин А	2 (11,8)	7 (12,7)	9 (12,5)
<i>hlyF</i>	гемолизин F	7 (41,2)	13 (23,6)	20 (27,8)
<i>ehxA</i>	энтерогемолизин	5 (29,4)*	4 (7,3)	9 (12,5)
<i>stx1</i>	шига-подобный токсин 1 типа	0	1 (1,8)	1 (1,4)
<i>stx2</i>	шига-подобный токсин 2 типа	2 (11,8)	3 (5,5)	5 (6,9)
<i>eaeA</i>	энтероаггегативный термостабильный энтеротоксин	5 (29,4)	12 (21,8)	17 (23,6)
<i>estI</i>	термостабильный энтеротоксин а	2 (11,8)	3 (5,5)	5 (6,9)
<i>estII</i>	термостабильный энтеротоксин b	0	0	0
<i>eltA</i>	термолабильный энтеротоксин	1 (5,9)	6 (10,9)	7 (9,7)
<i>ompT</i>	протеаза наружной мембраны	7 (41,2)*	9 (16,4)	16 (22,2)
<i>kpsMTII</i>	капсульный антиген II группы	2 (11,8)	9 (16,4)	11 (15,3)
<i>iss</i>	белок резистентности к сыворотке	4 (23,5)*	3 (5,5)	7 (9,7)
<i>iha</i>	бифункциональный адгезин-рецептор энтеробактина	0	0	0
<i>iutA</i>	рецептор аэробактина	11 (64,7)*	15 (23,7)	26 (36,1)
<i>iroN</i>	рецептор сальмохелина	8 (47,1)*	8 (14,5)	16 (22,2)
<i>chuA</i>	рецептор к гему	13 (76,5)	31 (56,4)	44 (61,1)
Количество генов патогенности, Me[Q1–Q3]		3,0[2,0–6,0]	2,0[1,0–3,0]	–
Маркеры островов патогенности				
<i>pic</i>	сериновая протеаза, маркирующая остров She	4 (23,5)*	1 (1,8)	5 (6,9)
<i>tia</i>	инвазин, маркирующий остров Tia	7 (41,2)*	11 (20)	18 (25)
<i>irp2</i>	иерсиниабактин, маркирующий остров HPI	2 (11,8)	4 (7,3)	6 (8,3)
<i>eaeA</i>	интимин, маркирующий остров LEE	0	0	0
<i>espC</i>	энтеротоксин, маркирующий остров EspC	1 (5,9)	0	1 (1,4)
<i>lifA/efaI</i>	фактор адгезии и ингибирования лимфоцитов, маркирующий O-остров	0	0	0
Фенотип патогенности				
Гемолитическая активнность		1 (5,9)	10 (18,2)	11 (15,3)
Лизогенная активность		10 (58,8)*	15 (27,3)	25 (34,7)

Примечание. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера, «*» – разница статистически достоверна, $p < 0,05$.

Оценка ассоциаций генов биосинтеза бактериоцинов, генов патогенности и маркеров островов патогенности среди комменсальных штаммов *E. coli* показала высокую частоту совместной встречаемости ряда признаков (Рисунок 13). Шанс детектировать совместно колицин E1 и микроцин M (OR = 29,5; 95% CI 5,3-164,2; $p_{BH} = 0,006$), а также колицин B и колицин M ($p_{BH} = 0,005$) был достоверно выше, чем шанс обнаружить их у разных штаммов *E. coli*. Частая совместная встречаемость наблюдалась для колицина B и микроцинов-сидерофоров M и H47 (OR = 26,1 и OR = 22,3 соответственно), а также микроцина V и колицина Ia (OR = 8,3) однако после введения поправки Бенджамини-Хохберга на множественное сравнение различия не достигли статистической значимости. Наблюдалась ассоциация микроцина V со следующими генами патогенности: *hlyF* (OR = 12,8; 95% CI 1,3-122,5; $p = 0,02$; $p_{BH} = 0,2$), *ompT* (OR = 18,3; 95% CI 1,9-179; $p = 0,01$; $p_{BH} = 0,1$), *iss* (OR = 23,6; 95% CI 3-184,4; $p = 0,005$; $p_{BH} = 0,1$), *iroN* (OR = 18,3; 95% CI 1,9-179; $p = 0,008$; $p_{BH} = 0,1$). Колицин M часто присутствовал у *iutA*-позитивных штаммов (OR = 16,6; 95% CI 1,9-144,2; $p = 0,003$; $p_{BH} = 0,1$), а колицин E1 – у *iss*-позитивных (OR = 16; 95% CI 2,8-92,4; $p = 0,004$; $p_{BH} = 0,1$). Острова патогенности также часто присутствовали совместно с некоторыми генами бактериоцинов. Часто детектировали совместно: микроцин H47 с островом патогенности HPI, маркируемым геном *irp2* (OR = 13), и островом She, маркируемым геном *pilC* (OR = 16,5), а также колицин Ia с островом She (OR = 23,6), однако статистическая достоверность не была достигнута (во всех случаях $p > 0,05$).

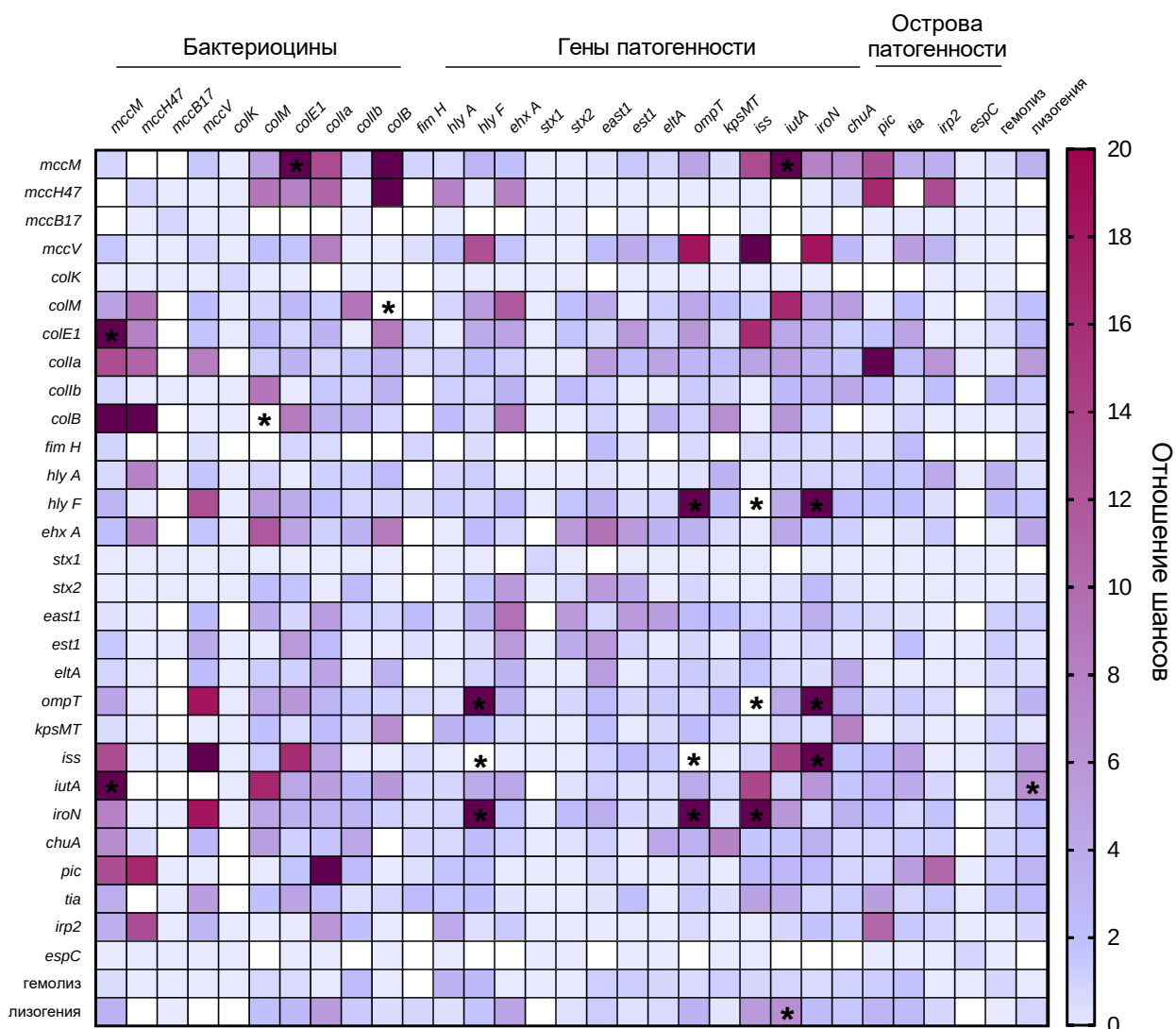


Рисунок 13 – Тепловая карта, отражающая шанс совместной встречаемости генов бактериоцинов, генов патогенности и маркеров островов патогенности, детектированных методом ПЦР, у комменсальных штаммов *E. coli* животных и птиц ($n=56$). Каждая ячейка представляет отношение шансов (OR), рассчитанное на основе таблицы 2×2 для соответствующей пары бинарных переменных. Цветовой градиент отражает величину и направление связи: положительная ($OR > 1$), отрицательная ($OR < 1$), отсутствие связи ($OR = 1$). Белые ячейки указывают на сравнения, для которых значение OR не могло быть рассчитано, поскольку одна или несколько ячеек в соответствующей таблице 2×2 содержали нулевые значения. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера с поправкой на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга; * – разница достоверна, $p_{\text{BH}} < 0,05$

Таким образом, связь между бактериоциногенностью и факторами патогенности *E. coli* определялась эколого-патотипической принадлежностью штаммов. В отличие от APES, у которых бактериоцин-продуцирующие и непродуцирующие штаммы существенно не различались по набору генов вирулентности, среди UPES и комменсальных *E. coli* бактериоцин-продуценты характеризовались значимо более высоким патогенным потенциалом: они чаще несли гены адгезинов,

токсинов, систем захвата железа и маркеры островов патогенности. Особенно тесная ассоциация была выявлена между микроцинами-сидерофорами (МссМ, МссН47) и генами захвата железа, что может указывать на их совместную локализацию и ко-селекцию в рамках одних и тех же мобильных генетических элементов. Эти данные свидетельствуют о том, что бактериоцины у *E. coli* не являются независимыми факторами вирулентности, а, скорее, выступают маркерами определенных клонов с расширенным патогенным потенциалом.

4.3. Фенотип устойчивости к антибиотикам, распространенность генов антибиотикорезистентности и мобильных генетических элементов среди комменсальных *E. coli*

Было проведено исследование устойчивости к антибиотикам комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных от здоровых сельскохозяйственных животных и птиц (n=72)¹⁰. Устойчивость *E. coli* варьировала от 0% (к меропенему) до 59,7% (к ампициллину) (Таблица 11). Высокий уровень резистентности был выявлен к ампициллину и тетрациклину, в то время как устойчивость к фторхинолонам и аминогликозидам не превышала 10%. Из всех проанализированных штаммов 22,2% были чувствительны ко всем протестированным антибиотикам. Штаммы, резистентные к одному или двум антибиотикам, встречались с частотой 37,5 и 13,9% соответственно. У 19 штаммов (26,4%) был обнаружен фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Из них 3 штамма были устойчивы одновременно к 8 протестированным антибиотикам. Количество антибиотиков, к которым одновременно был устойчив штамм, варьировало от 0,0 до 8,0. Хотя штаммы *E. coli* с фенотипом МЛУ чаще встречались среди крупного рогатого скота, чем среди птиц (32,7% против 18,6%), разница не была статистически значимой ($p > 0,05$; точный критерий Фишера).

¹⁰ Данные, представленные в разделе 4.3, опубликованы: Mihailovskaya, V.S., Starčić Erjavec, M., Kuznetsova, M.V. *Escherichia coli* from healthy farm animals: antimicrobial resistance, resistance genes and mobile genetic elements // Acta Veterinaria Hungarica. – 2024. – Vol. 72, No. 4. – P. 225–234

Таблица 11 – Распространенность устойчивости к антибиотикам среди комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных от здоровых животных и птиц

Антибиотик	Распространенность <i>E. coli</i> , устойчивых к антибиотикам, n (%)		
	Животных (n=56)	Птиц (n=16)	Всего (n=72)
Ампициллин	38 (67,9)*	5 (31,3)	43 (59,7)
Тетрациклин	26 (46,4)	9 (56,3)	35 (48,6)
Хлорамфеникол	10 (17,9)	2 (12,5)	12 (16,7)
Цефоперазон	8 (14,3)	2 (12,5)	10 (13,9)
Цефтриаксон	8 (14,3)	2 (12,5)	10 (13,9)
Цефепим	7 (12,5)	2 (12,5)	9 (12,5)
Азтреонам	8 (14,3)	1 (6,3)	9 (12,5)
Ципрофлоксацин	5 (8,9)	1 (6,3)	6 (8,3)
Норфлоксацин	5 (8,9)	1 (6,3)	6 (8,3)
Левифлоксацин	3 (5,4)	2 (12,5)	5 (6,9)
Амикацин	0	2 (12,5)	2 (2,8)
Гентамицин	1 (1,8)	1 (6,3)	2 (2,8)
Меропенем	0	0	0

Примечание. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера, «*» – разница статистически достоверна, $p < 0,05$.

В геномах комменсальных *E. coli*, выделенных от сельскохозяйственных животных, было обнаружено от 0 до 5 генов устойчивости к антибиотикам. Культуры, несущие 1 ген (40,3%), были наиболее распространены в группе. Штаммы, содержащие комбинации из 2, 3, 4 и 5 генов антибиотикорезистентности, были обнаружены в 15,3, 8,3, 5,6 и 2,8% случаев соответственно. Распространенность *bla*_{TEM} была самой высокой (59,7% от всех штаммов), затем следовали *tetA*, *bla*_{CTX-M}, *catA1*, встречаемость других генов составила менее 5% (Таблица 12).

Таблица 12 – Распространенность комменсальных штаммов *E. coli*, несущих гены устойчивости к антибиотикам

Ген	Функция	Распространенность <i>E. coli</i> , содержащих гены устойчивости к антибиотикам, n (%)		
		Животных (n=56)	Птиц (n=16)	Всего (n=72)
<i>bla</i> _{TEM}	β-лактамаза класса А	38 (67,9)*	5 (31,3)	43 (59,7)
<i>tetA</i>	тетрациклин-специфичный эффлюкс-насос	15 (26,8)	7 (43,8)	22 (30,6)
<i>bla</i> _{CTX-M}	β-лактамаза расширенного спектра класса А	8 (14,3)	0	8 (11,1)
<i>catA1</i>	хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	7 (12,5)	0	7 (9,7)
<i>bla</i> _{SHV}	β-лактамаза класса А	3 (5,4)	0	3 (4,2)
<i>cmiA</i>	хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	3 (5,4)	0	3 (4,2)
<i>floR</i>	транспортер хлорамфеникола	3 (5,4)	0	3 (4,2)
<i>qnrB</i>	белок защиты ДНК-гиразы	2 (3,6)	1 (6,3)	3 (4,2)
<i>qnrS</i>	белок защиты ДНК-гиразы	2 (3,6)	0	2 (2,8)
<i>tetM</i>	белок защиты рибосом	0	1 (6,3)	1 (1,4)
<i>bla</i> _{CMY}	β-лактамаза класса С	0	0	0
<i>tet(X)</i>	флаavin-зависимая монооксигеназа, модифицирующая тетрациклины	0	0	0
<i>qnrA</i>	белок защиты ДНК-гиразы	0	0	0
<i>qepA</i>	хинолон-специфичный эффлюкс-насос	0	0	0
<i>aacC2</i>	аминогликозид-ацетилтрансфераза	0	0	0

Примечание. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера, «*» – разница статистически достоверна, $p < 0,05$.

Ампициллинорезистентные штаммы (43/72) содержали следующие гены β-лактамаз: *bla*_{TEM} (100% ампициллинорезистентных штаммов), *bla*_{CTX-M} (18,6%), *bla*_{SHV} (7,0%). Ген β-лактамазы *bla*_{CMY} обнаружен не был. Устойчивость к β-лактамам антибиотикам чаще всего была обусловлена продукцией одного типа β-лактамаз (76,7%), реже встречались *E. coli*, содержащие комбинации двух (20,9%) и трех (2,3%) *bla*-генов. Комбинация *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} была обнаружена с частотой 18,6%. В группе штаммов, устойчивых к тетрациклину (35/72), ген системы эффлюкса *tetA* был обнаружен в 62,9% случаев, ген *tetM*, кодирующий защитные белки рибосом, был амплифицирован только у одного штамма. Важно отметить, что в ходе исследования не был обнаружен ген устойчивости к тигециклину,

опосредованный плазмидой *tet(X)*. Ни один из изученных *tet*-генов не был обнаружен у 10 штаммов *E. coli*, устойчивых к тетрациклину. Устойчивость к хлорамфениколу (12/72) в основном была обусловлена выработкой хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (58,3%), ответственной за большую часть плазмидно-опосредованной устойчивости к хлорамфениколу, реже – наличием системы эффлюкса, кодируемой геном *cmlA* или геном *floR* устойчивости к фторированному производному хлорамфеникола (по 25% каждый). Для двух штаммов, устойчивых к хлорамфениколу, механизм резистентности оставался неясным. Штаммы, устойчивые к фторхинолонам (6/72), в 37,5% случаев несли ген, кодирующий белок защиты ДНК-гиразы *QnrB*, а в одном штамме был детектирован ген, кодирующий *QnrS*. Штаммов, кодирующих белки *QnrA* и *QerA*, обнаружено не было. Ген *aacC2* не детектирован среди штаммов, устойчивых к аминогликозидам (2/72). Гены *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *catA1*, *cmlA*, *floR* и *qnrS* были выявлены только среди штаммов, выделенных от животных (крупного рогатого скота). Кроме того, в этой субпопуляции штаммы *E. coli* содержали большее количество генов устойчивости к антибиотикам, чем культуры, выделенные от птиц (1,59 против 0,88 генов на штамм).

Было идентифицировано 14 фенотипических профилей МЛУ, большинство из которых (12 профилей) были обнаружены однократно (Таблица 13). Наиболее распространенными были штаммы *E. coli* с МЛУ и профилем АМР ТЕТ СНЛ (частота составила 26,3% от штаммов МЛУ). Большинство штаммов *E. coli* с МЛУ (13 из 19) несли комбинации из 3 или более генов антибиотикорезистентности. Стоит отметить, что 94,4% штаммов с МЛУ содержали комбинацию генов устойчивости к β -лактамным антибиотикам и не- β -лактамам одновременно. Была обнаружена умеренно положительная взаимосвязь между *qnrB* и *bla_{CTX-M}* ($rs = 0,37$; тест ранговой корреляции Спирмена), *tetA* ($rs = 0,31$) и *qnrS* ($rs = 0,39$), а также *floR* с *bla_{CTX-M}* ($rs = 0,39$), *tetA* ($rs = 0,31$) и *cmlA* ($rs = 0,30$). В то же время, *cmlA* часто встречался совместно с *bla_{SHV}* ($rs = 0,30$) и *catA1* ($rs = 0,40$).

Таблица 13 – Профили устойчивости к антибиотикам и генов устойчивости к антибиотикам мультирезистентных комменсальных штаммов *E. coli*

Штамм	Профиль множественной устойчивости	Обнаруженные гены устойчивости
C19	AMP TET CHL	<i>bla</i> _{TEM} <i>catA1</i>
C21	AMP TET CHL	<i>bla</i> _{TEM} <i>catA1</i>
C23	AMP TET CHL	<i>bla</i> _{TEM} <i>catA1 cmlA</i>
C52	AMP TET CHL	<i>bla</i> _{TEM} <i>tetA catA1</i>
C54	AMP TET CHL	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} <i>cmlA</i>
C15	AMP CFO CFT CFP AZT	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M}
C55	AMP CFO CFT CFP AZT	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M}
C58	AMP CFO CFT AZT TET	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{SHV}
C16	AMP TET CHL NOR CIP	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>catA1 qnrS</i>
C47	AMP TET NOR CIP LEV	<i>bla</i> _{TEM} <i>tetA</i>
C49	AMP CFO CFT CFP AZT TET	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>tetA</i>
C50	AMP TET CHL NOR CIP LEV	<i>bla</i> _{TEM} <i>tetA catA1 cmlA floR</i>
Ch5	AMP CFO CFT CFP AZT CHL	<i>bla</i> _{TEM}
Q3	TET NOR CIP LEV GEN AMK	<i>tetA qnrB</i>
C25	AMP CFO CFT CFP AZT TET CHL	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>tetA floR</i>
C45	AMP CFO CFT CFP AZT TET NOR	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>tetA qnrB</i>
Br2	AMP CFO CFT CFP TET CHL LEV AMK	<i>bla</i> _{TEM} <i>tetA tetM</i>
C51	AMP CFO CFT CFP AZT TET CHL GEN	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>tetA floR</i>
C48	AMP CFO CFT CFP AZT TET NOR CIP	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>tetA qnrB qnrS</i>

Примечание. AMP – ампициллин, CFO – цефоперазон, CFT – цефтриаксон, CFP – цефепим, MER – меропенем, AZT – азтреонам, TET – тетрациклин, NOR – норфлоксацин, CIP – ципрофлоксацин, LEV – левофлоксацин, AMK – амикацин, GEN – гентамицин, CHL – хлорамфеникол.

Хорошо известно, что гены устойчивости к антибиотикам часто ассоциируются с мобильными генетическими элементами, включая конъюгативные F-подобные плазмиды, интегроны и бактериофаги. Большинство проанализированных штаммов (55,6%) содержали ген *traJ*, кодирующий регулятор конъюгативного переноса, у 12,5% были амплифицированы интегроны длиной 1000-3000 п.н., а 34,7% культур содержали бактериофаги. Более высокий уровень устойчивости к некоторым антибиотикам (ампициллину, цефтриаксону, азтреонаму) наблюдался среди интегрон-положительных изолятов по сравнению с интегрон-отрицательными изолятами. Устойчивость к цефалоспорином достоверно коррелировала с наличием конъюгативных F-подобных плазмид ($p = 0,04$, точный критерий Фишера). Корреляционный анализ показал, что наличие *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} и *bla*_{SHV} положительно коррелировало с наличием интегронов ($r_s = 0,31$, $r_s = 0,27$ и $r_s = 0,34$ соответственно), а для *bla*_{CTX-M} – с наличием конъюгативных F-подобных

плазмид ($rs = 0,32$). Распространенность мобильных генетических элементов существенно не отличалась у штаммов, выделенных от животных и птиц. Штаммы с фенотипом МЛУ чаще содержали интегроны (31,6% против 5,7%, $p = 0,007$, точный критерий Фишера), бактериофаги (57,9% против 26,4%, $p = 0,015$) и конъюгативные F-подобные плазмиды (73,7% против 49,1%, $p = 0,059$), чем штаммы без фенотипа МЛУ. Стоит отметить, что штаммы, содержащие интегроны, бактериофаги и конъюгативные F-подобные плазмиды, продемонстрировали более высокий уровень резистентности (они были устойчивы как минимум к 5 антибиотикам) по сравнению со штаммами, лишенными таких элементов (они чаще были устойчивы к 2 антибиотикам).

Для более детального исследования геномы пяти штаммов *E. coli* были секвенированы. Были выбраны три штамма, полученные из образцов фекалий здоровых птиц (*E. coli* Ch1) и коров (*E. coli* C25, C51), а два штамма (APEC20/16, APEC37) – из внутренних органов птиц с типичными поражениями при колисептицемии. Поиск генов устойчивости к антибиотикам показал, что штаммы содержали от двух до 16 генов. В хромосомах всех штаммов были обнаружены различные аллельные варианты гена видоспецифической AmpC-подобной β -лактамазы *blaEC*. Большинство прочих эпидемиологически значимых генов резистентности располагались на плазмидах. В геномах исследованных штаммов выявлены аллельные варианты генов β -лактамаз *bla*_{TEM-235} и *bla*_{TEM-1}, ассоциированные преимущественно с устойчивостью к пенициллинам. В геноме *E. coli* C51 был обнаружен плазмидный ген *bla*_{CTX-M-15}, кодирующий β -лактамазу расширенного спектра класса А, что указывает на наличие механизма устойчивости к цефалоспорином третьего поколения и азтреонаму. Важно отметить, что в геноме штамма APEC37 был выявлен ген *mcr-1.1*, кодирующий фосфотрансферазу MCR-1.1, модифицирующую липид А наружной мембраны. Наличие данного гена связано с потенциальной плазмидно-опосредованной устойчивостью к колистину. В геномах APEC были идентифицированы хромосомные мутации в генах *gyrA/parC/parE*, которые связаны с устойчивостью к ципрофлоксацину и налидиксовой кислоте.

Таблица 14 – Молекулярно-генетическая характеристика устойчивости к антибиотикам штаммов *E. coli* по данным полногеномного секвенирования

Антибиотик	Гены устойчивости к антибиотикам (chr – на хромосоме, p – на плазмиде)				
	C25	C51	Ch1	APEC20/16	APEC37
Цефалоспорины	<i>bla_{EC-5}</i> (chr)	<i>bla_{EC-18}</i> (chr), <i>bla_{CTX-M-15}</i> (p)	<i>bla_{EC-8}</i> (chr)	<i>bla_{EC-18}</i> (chr)	<i>bla_{EC-15}</i> (chr)
β-лактамы	<i>bla_{TEM-235}</i> (p)	<i>bla_{TEM-1}</i> (p)	не выявлено	<i>bla_{TEM-1}</i> (p)	не выявлено
Тетрациклин	не выявлено	<i>tetA</i> (p)	<i>tetA</i> (p)	<i>tetA</i> (p)	не выявлено
Хлорамфеникол	не выявлено	не выявлено	не выявлено	не выявлено	<i>catA1</i> (chr)
Гентамицин	не выявлено	<i>aac(3)-IVa</i> (p)	не выявлено	не выявлено	<i>aac(3)-IId</i> , (chr)
Стрептомицин	не выявлено	<i>aph(3'')-Ib</i> (p), <i>aph(6)-Id</i> (p), <i>aadA5</i> (p)	не выявлено	<i>aadA1</i> (p), <i>aph(3'')-Ib</i> (p), <i>aph(6)-Id</i> (p)	<i>aadA2</i> (chr)
Макролиды	не выявлено	<i>mph(A)</i> (p), <i>erm(B)</i> (p)	не выявлено	<i>mph(A)</i> (p)	не выявлено
Сульфаниламид	не выявлено	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> (p)	<i>sul2</i> (p)	<i>sul1</i> (p)	<i>sul1</i> (chr)
Триметоприм	не выявлено	<i>dfrA5</i> , <i>dfrA17</i> (p)	<i>dfrA17</i> (p)	<i>dfrA1</i> (p)	<i>dfrA12</i> (chr)
Гигромицин	не выявлено	<i>aph(4)-Ia</i> (p)	не выявлено	не выявлено	не выявлено
Хинолоны	не выявлено	<i>qnrS1</i> (p)	не выявлено	не выявлено	не выявлено
Фосфомицин	не выявлено	не выявлено	не выявлено	<i>fosA7.5</i> , chr	не выявлено
Колистин	не выявлено	не выявлено	не выявлено	не выявлено	<i>mcr-1.1</i> (p)
Мутации	не выявлено	не выявлено	не выявлено	<i>gyrA</i> :p.S83L, <i>parC</i> :p.S80R	<i>gyrA</i> :p.D87N, <i>gyrA</i> :p.S83L <i>parC</i> :p.S80I,

4.4. Ассоциация устойчивости к антибиотикам, генов устойчивости к антибиотикам, мобильных генетических элементов с фенотипом и генотипом бактериоциногении патогенных для птиц и комменсальных *E. coli*

Устойчивость к антибиотикам и бактериоцин-продуцирующая активность представляют собой два ключевых фактора конкурентоспособности *E. coli* в сложных микробных сообществах. Оба признака часто ассоциированы с мобильными генетическими элементами, такими как плазмиды, интегроны, бактериофаги, что создает предпосылки для их совместного распространения и ко-селекции. В связи с этим, далее была проведена оценка связи продукции бактериоцинов с профилем устойчивости к антибиотикам, наличием генов антибиотикорезистентности и мобильных генетических элементов. Фенотип

устойчивости к цефалоспорином (цефоперазону, цефепиму) и азтреонаму был тесно ассоциирован с бактериоцин-продуцирующими АРЕС и комменсальными *E. coli*. Для прочих антибиотиков не было обнаружено значимых различий в группах продуцирующих и не продуцирующих бактериоцины культур (Таблица 15).

Таблица 15 – Распространенность устойчивости к антибиотикам среди комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных от здоровых животных и птиц

Антибиотик	Распространенность <i>E. coli</i> , устойчивых к антибиотикам, n (%)			
	АРЕС (n=28)		Комменсальные <i>E. coli</i>	
	продуцирующие бактериоцины (n=20)	не продуцирующие бактериоцины (n=8)	продуцирующие бактериоцины (n=17)	не продуцирующие бактериоцины (n=55)
Ампициллин	16 (80)	6 (75)	12 (70,6)	31 (56,4)
Тетрациклин	15 (75)	7 (87,5)	11 (64,7)	24 (43,6)
Хлорамфеникол	6 (30)	5 (62,5)	4 (23,5)	8 (14,5)
Цефоперазон	5 (25)*	0	5 (29,4)*	5 (9,1)
Цефтриаксон	не определяли	не определяли	5 (29,4)*	5 (9,1)
Цефепим	5 (25)*	0	5 (29,4)*	4 (7,3)
Азтреонам	5 (25)*	0	5 (29,4)*	4 (7,3)
Ципрофлоксацин	7 (35)	3 (37,5)	1 (5,9)	5 (9,1)
Норфлоксацин	не определяли	не определяли	2 (11,8)	4 (7,3)
Левифлоксацин	4 (20)	2 (25)	0	5 (9,1)
Амикацин	2 (10)	0	0	2 (3,6)
Гентамицин	10 (50)	2 (25)	1 (5,9)	1 (1,8)
Меропенем	0	0	0	0

Примечание. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера, «*» – разница статистически достоверна, $p < 0,05$.

Шанс детектировать гены *bla*_{CTX-M} (OR = 7,2; 95% CI 1,5-34,5; $p = 0,02$), *tetA* (OR = 3,6; 95% CI 1,2-11,3; $p = 0,03$), *qnrB* и *floR* (OR = 7,2; 95% CI 0,6-84,9; $p > 0,05$) в группе бактериоцин-продуцирующих комменсальных *E. coli* был выше, чем среди не продуцирующих бактериоцины штаммов. У штаммов АРЕС различия в распространенности генов антибиотикорезистентности между подгруппами не достигли статистической значимости, однако шанс детектировать гены *aacC2* (OR = 3,8; 95% CI 0,4-37,1) и *qnrB* (OR = 2,3; 95% CI 0,2-23,9) был выше у продуцентов бактериоцинов (Таблица 16). Важно отметить, что как в группе АРЕС, так и в группе комменсальных *E. coli*, бактериоцин-продуцирующие штаммы чаще содержали маркер конъюгативной плазмиды (ген-регулятор конъюгативного

переноса *traJ*), чем не продуцирующие. Для группы АРЕС: 65% *traJ*-позитивных среди продуцентов бактериоцины против 25% среди не продуцирующих штаммов; OR = 5,6; 95% CI 0,8-35,3; $p > 0,05$. Для группы комменсальных *E. coli*: 88,2% против 45,5%; OR = 16,8; 95% CI 3,4-81,6; $p < 0,001$. Для интегров такой закономерности не обнаружено.

Таблица 16 – Распространенность устойчивости к антибиотикам среди комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных от здоровых животных и птиц

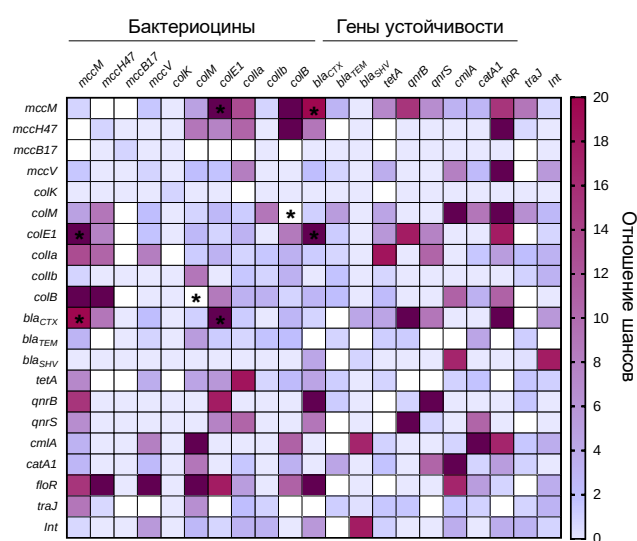
Ген	Распространенность <i>E. coli</i> , несущих гены устойчивости, n (%)			
	АРЕС (n=28)		Комменсальные <i>E. coli</i> (n=72)	
	продуцирующие бактериоцины (n=20)	не продуцирующие бактериоцины (n=8)	продуцирующие бактериоцины (n=17)	не продуцирующие бактериоцины (n=55)
<i>bla</i> _{TEM}	15 (75)	5 (62,5)	12 (70,6)	31 (56,4)
<i>tetA</i>	5 (25)	3 (37,5)	9 (52,9)*	13 (23,6)
<i>bla</i> _{CTX-M}	11 (55)	4 (50)	5 (29,4)*	3 (5,5)
<i>catA1</i>	не определяли	не определяли	2 (11,8)	5 (9,1)
<i>bla</i> _{SHV}	0	1 (12,5)	0	3 (5,5)
<i>cmlA</i>	не определяли	не определяли	1 (5,9)	2 (3,6)
<i>floR</i>	не определяли	не определяли	2 (11,8)	1 (1,8)
<i>qnrB</i>	5 (25)	1 (12,5)	2 (11,8)	1 (1,8)
<i>qnrS</i>	1 (5)	0	1 (5,9)	1 (1,8)
<i>tetM</i>	не определяли	не определяли	0	1 (5,9)
<i>bla</i> _{CMY}	0	0	0	0
<i>tet(X)</i>	не определяли	не определяли	0	0
<i>qnrA</i>	0	0	0	0
<i>qepA</i>	0	0	0	0
<i>aacC2</i>	7 (35)	1 (12,5)	0	0
Количество генов, Me[Q1–Q3]	2,0[1,0-3,0]	2,0[0,8-3,0]	2,0[1,0-4,0]	1,0[0-1,5]

Примечание. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера, «*» – разница статистически достоверна, $p < 0,05$.

Для оценки ассоциации конкретных генов продукции бактериоцинов, фенотипа антибиотикорезистентности и генов устойчивости к антибиотикам были построены ассоциативные матрицы бинарных переменных аналогично описанным выше. Анализ выявил значимые ассоциации между присутствием гена *bla*_{CTX-M} и гена биосинтеза микроцина М (OR = 19,7; 95% CI 3,6-107,4; $p_{\text{вн}} = 0,04$), колицина E1 (OR = 25; 95% CI 4,3-144,3; $p_{\text{вн}} < 0,001$) среди комменсальных *E. coli*. В этой группе также часто детектировали совместно следующие гены: ген транспортера

хлорамфеникола *floR* и гены микроцинов М (OR = 15,3; $p = 0,05$; $p_{\text{ВН}} = 0,3$), V (OR = 44; $p = 0,01$; $p_{\text{ВН}} = 0,2$), колицинов М (OR = 21; $p = 0,03$; $p_{\text{ВН}} = 0,3$), E1 (OR = 17,7; $p = 0,04$; $p_{\text{ВН}} = 0,3$); ген *cmlA* и колицин М (OR = 21; $p = 0,03$; $p_{\text{ВН}} = 0,3$); *qnrB* и микроцин М (OR = 15,3; $p = 0,05$; $p_{\text{ВН}} = 0,3$), колицин E1 (OR = 17,7; $p = 0,04$; $p_{\text{ВН}} = 0,3$); *tetA* и колицин Ia (OR = 18,4; $p = 0,002$; $p_{\text{ВН}} = 0,1$), однако после введения поправки на множественное сравнение статистическая достоверность не была достигнута. Выявлена частая совместная встречаемость ряда генов антибиотикорезистентности, например, *qnrB* и *qnrS* (OR = 34), *catA1* и *cmlA* (OR = 25,6), *cmlA* и *floR* (OR = 16,8), *cmlA* и *bla_{SHV}* (OR = 16,8) (Рисунок 14А). В группе АРЕС статистически значимых ассоциаций не было обнаружено. Стоит подчеркнуть, что, как и в группе комменсальных штаммов, среди АРЕС часто детектировали совместно гены колицина E1 и *qnrB* (OR = 10,5; $p = 0,1$; $p_{\text{ВН}} = 0,9$), а также колицина М и *bla_{CTX-M}* (OR = 9,2; $p = 0,02$; $p_{\text{ВН}} = 0,9$) (Рисунок 14Б).

А



Б

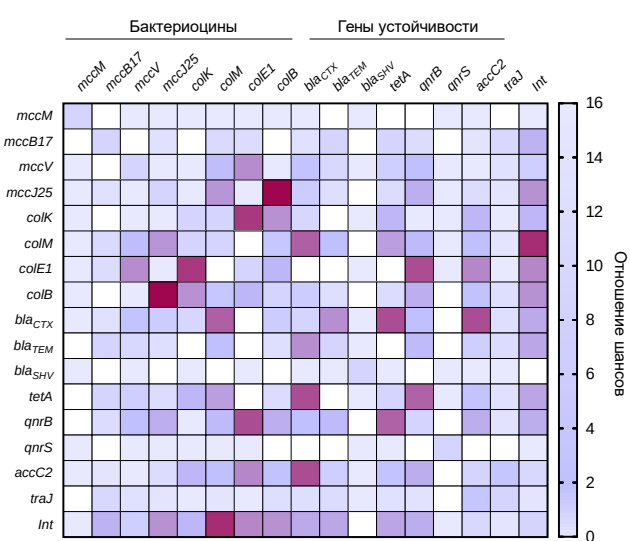


Рисунок 14 – Матрица связи между наличием генов бактериоцинов и генов устойчивости к антибиотикам штаммов комменсальных *E. coli* (А) и АРЕС (Б). Каждая ячейка представляет собой отношение шансов (OR), рассчитанное на основе таблицы 2×2 для соответствующей пары бинарных переменных. Цветовой градиент отражает величину и направление связи: положительная (OR > 1), отрицательная (OR < 1), отсутствие связи (OR = 1). Белые ячейки указывают на сравнения, для которых значение OR не могло быть рассчитано, поскольку одна или несколько ячеек в соответствующей таблице 2×2 содержали нулевые наблюдения. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера с поправкой на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга; * – разница достоверна, $p_{\text{ВН}} < 0,05$

Ярким примером накопления генов устойчивости к антибиотикам и локусов бактериоцинов в составе мобильных генетических элементов (плазмид) служит геном секвенированного штамма *E. coli* C51 из нашей коллекции (номер доступа в GenBank: SRR24837712). Анализ показал, что *E. coli* C51 содержал 9 плазмид: pC5101 (136371 п.н.), pC5102 (102372 п.н.), pC5103 (97376 п.н.), pC5104 (93338 п.н.), pC5105 (13351 п.н.), pC5106 (13293 п.н.), pC5107 (11304 п.н.), pC5108 (10798 п.н.) и pC5109 (4644 п.н.). Из 6 детектированных кластеров бактериоцинов 5 располагались на перечисленных плазмидах¹¹. Были обнаружены кластеры микроцина V и колицин Ia (на плазмиде pC5101), колицина D (pC5105), колицина E9 (pC5106), колицина 10 (pC5108), а также микроцина M (на хромосоме). Были обнаружены плазмидные гены, ассоциированные с устойчивостью к β -лактамам (*bla*_{TEM-1} на плазмиде pC5101), цефалоспорином (*bla*_{CTX-M-15}, pC5103), гентамицину (*aac*(3)-IVa, pC5102), гигромицину (*aph*(4)-Ia, pC5102), макролидам (*mph*(A), *erm*(B), pC5103), стрептомицину (*aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id, *aadA5*, pC5102), сульфаниламиду (*sul1*, *sul2*, pC5101), тетрациклину (*tetA*, pC5101), триметоприму (*dfrA5*, *dfrA17*, pC5101), фторхинолонам (*qnrS1*, pC5103). Карта генома штамма *E. coli* C51 представлена на Рисунке 15. Таким образом, полученные результаты подчеркивают, что бактериоциногенность у *E. coli* часто сопряжена с генами устойчивости к антибиотикам в рамках общих мобильных генетических платформ, в первую очередь плазмид.

¹¹ Данные опубликованы: Sutormin, D.A., Mihailovskaya, V.S.*, Trofimova, A.B., Mamontov, V.A., Kuznetsova, M.V., Severinov, K. Complete genome sequences of three commensal and two avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from farm animals in Russia // Microbiology Resource Announcements. – 2023. – Article e0065423. Advance online publication. * – равный вклад авторов.

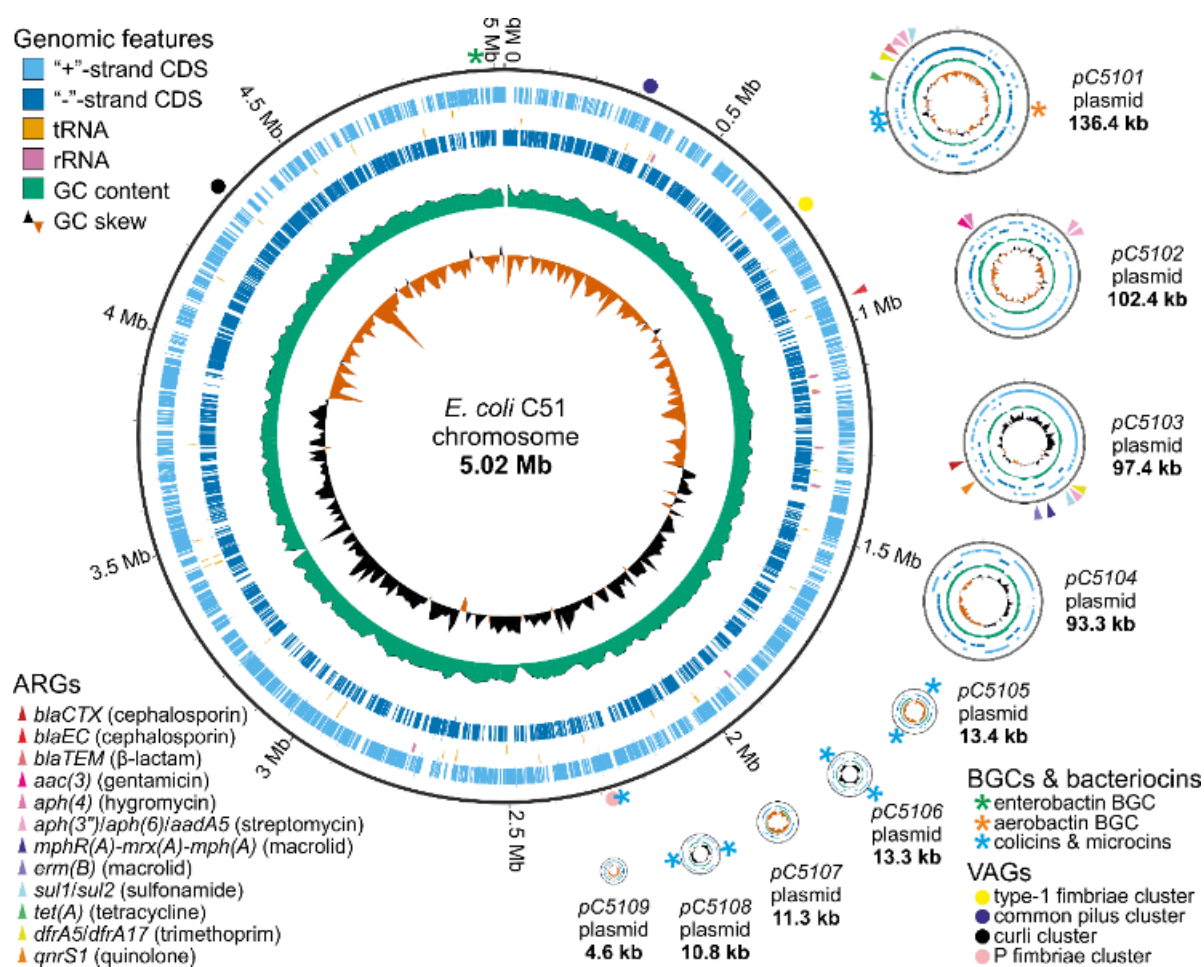


Рисунок 15 – Организация генома штамма *E. coli* C51, визуализированного с помощью GenoVi (10) (<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010998>). Плазмиды и хромосомы представлены без соблюдения масштаба. Цветные треугольники, звездочки и кружки указывают местоположение, соответственно, генов устойчивости к антибиотикам (ARG), кластеров биосинтетических генов (BGC) и генов, связанных с вирулентностью (VAG). CDS – кодирующая последовательность

ГЛАВА 5. БАКТЕРИОЦИН-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ КОММЕНСАЛЬНЫЕ *E. COLI*: АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, СПОСОБНОСТЬ К АДГЕЗИИ *IN VITRO* И ЭФФЕКТ *IN VIVO*

5.1. Антагонистическая активность бесклеточных культуральных жидкостей бактериоцин-продуцирующих штаммов *E. coli* в отношении условно-патогенных тест-штаммов *in vitro*

Одним из ключевых критериев отбора штаммов для пробиотического применения является их способность подавлять рост патогенных бактерий. Наличие генов бактериоцинов не всегда гарантирует высокую антагонистическую активность, в связи с этим, далее мы оценили функциональную значимость бактериоцин-продуцирующих штаммов, определив спектр и эффективность действия их бесклеточных культуральных жидкостей в отношении патогенных *E. coli* различного происхождения, включая штаммы с множественной лекарственной устойчивостью.

Результаты показали, что все бесклеточные культуральные жидкости, полученные при культивировании 17 описанных выше комменсальных штаммов-продуцентов бактериоцинов, подавляли рост патогенных *E. coli* с разной эффективностью¹². Следует отметить, что антагонистический эффект наблюдался как в отношении АРЕС, так и в отношении InРЕС, включая штаммы с МЛУ. Однако уровень ингибирования роста АРЕС в среднем был выше, чем InРЕС. Максимальное значение индекса ингибирования роста наблюдалось через 22 часа культивирования в присутствии экзометаболитов и составило 58,6% (для штамма *E. coli* BR4 при культивировании с бесклеточными культуральными жидкостями, полученном от *E. coli* C23). Для протестированных InРЕС максимальный индекс

¹² Данные опубликованы: Kuznetsova, M.V., Mihailovskaya, V.S., Remezovskaya, N.B., Starčić Erjavec, M. Bacteriocin-producing *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract of farm animals: prevalence, molecular characterization and potential for application // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10, No. 8. – Article 1558

ингибирования роста составил 42,1% (для штамма *E. coli* C46 при культивировании с культуральными жидкостями, полученном от *E. coli* C61).

Таким образом, все бесклеточные культуральные жидкости бактериоцин-продуцирующих комменсальных *E. coli* демонстрировали антагонистическую активность в отношении патогенных *E. coli* (в том числе – устойчивых к антибиотикам), однако эффективность ингибирования варьировала в широких пределах и зависела от тест-штамма. Более высокая чувствительность АРЕС к бесклеточным культуральным жидкостям комменсальных бактериоцин-продуцирующих *E. coli* по сравнению с InРЕС, вероятно, отражает различия в профилях генов бактериоцинов и, соответственно, систем иммунитета к ним. Так, InРЕС, происходящие из той же экологической ниши (кишечник животных), могут быть адаптированы к локальному «ландшафту бактериоцинов». В частности, колицин E1, широко распространенный среди комменсальных и диареегенных InРЕС, как было показано выше, редко встречался у АРЕС. Таким образом, полученные данные подчеркивают важность учета профилей бактериоцинов как при подборе продуцентов для пробиотических препаратов, так и при прогнозировании спектра их активности: штаммы, происходящие из иной экологической ниши, могут оказаться более эффективными против патогенов именно благодаря отсутствию у последних специфического иммунитета к их бактериоцинам.

Таблица 17 – Ингибирование роста тест-штаммов *E. coli* после 22 часов инкубации с бесклеточными культуральными жидкостями бактериоцин-продуцирующих комменсальных штаммов *E. coli*, %

Штамм-продуцент	Профиль генов бактериоцинов	Индекс ингибирования роста тест-штаммов, %					
		APEC			InPEC		
		BR4	BR35	BR37	CA29	CA43	CA46
Ch1	ColIa-ColE1-ColB-ColN-MccB17-ColM-MccM	31,5±15,8	46,1±9,0*	37,2±6,0	17,2±0,4	19,8±6,6	20,8±6,7
Q5	ColIa-ColIb-ColY-MccV-ColM	38,3±11,0	49,9±7,3*	41,3±8,3*	22,8±4,5	29,9±3,2	31,0±3,7
Q8	ColIb-ColM	47,1±8,8*	55,0±7,8*	47,6±3,6*	20,0±5,9	23,4±4,7	24,1±4,2
Q12	ColIb-ColM	28,4±6,3	38,9±3,8	42,7±5,1*	24,8±3,2	17,0±6,0	17,0±5,3
C18	ColIa-ColK-Col5-Col10	41,3±11,8*	44,8±3,1*	35,5±9,3	22,7±1,5	11,4±2,1	12,7±1,4
C19	Col5-Col10-MccM	30,6±7,5	44,2±3,9*	31,5±5,7	24,1±3,1	14,8±3,0	15,7±1,6
C23	ColB-ColM-MccM	58,6±11,5*	51,7±11,2*	43,8±3,9*	10,4±1,7	2,7±2,7	3,6±2,3
C25	ColE1-ColB-ColN-ColM-mccH47-mccM	34,4±7,5	35,6±4,1	36,9±5,6	7,8±2,9	6,3±2,6	7,1±1,2
C32	ColE1-ColE9	42,8±10,4*	51,6±1,9*	42,1±4,6*	20,2±2,6	33,9±7,8	32,5±8,6
C40	ColE1-ColE9	45,4±5,7*	51,8±3,5*	40,0±4,2*	19,8±0,7	11,8±4,6	12,3±4,7
C41	ColE1-ColE9	46,9±17,6*	58,6±6,9*	43,2±6,9*	24,3±5,9	38,5±5,7	36,8±5,9
C45	ColE1-MccM	27,6±3,7	34,6±2,9	38,2±2,8	15,4±1,7	3,6±3,1	4,5±3,4
C48	ColE1-MccM	14,8±16,0	31,0±6,0	42,3±5,3*	17,4±2,6	1,4±2,4	3,0±2,6
C49	ColE1-MccM	40,9±12,2*	47,4±3,6*	34,3±6,0	16,6±2,4	0	0
C51	MccV-ColIa-ColE1-MccM	33,7±10,6	41,1±3,8*	34,8±5,1	18,5±3,1	7,4±6,6	7,8±6,1
C56	ColIa-MccH47-MccM	42,4±4,9*	48,8±4,1*	38,1±2,7	25,7±4,0	21,2±3,5	21,4±3,2
C61	ColIb-ColB	19,1±2,6	38,3±3,2	31,9±6,9	36,6±7,6	42,0±3,6*	42,1±6,4*

Примечание. В качестве тест-штаммов использовались патогенные для птиц *E. coli* (APEC) и кишечные патогенные *E. coli* (InPEC), различающиеся по профилям патогенности и устойчивости к антибиотикам: *E. coli* BR4 (*hlyF*; TET^R), *E. coli* BR35 (*fimH*, *iha*, *hlyF*, *ompT*, *kpsMTII*, *iss*; AMP^R, CPF^R, LEV^R, GEN^R, TET^R), *E. coli* BR37 (*fimH*, *hlyF*, *eastI*, *estI*, *ompT*, *kpsMTII*, *iss*; AMP^R, CPF^R, CFO^R, CFT^R, AMK^R, GEN^R, TET^R), *E. coli* CA29 (*fimH*, *eastI*, *estI*; чувствительный к антибиотикам), *E. coli* CA43 (*fimH*, *eastI*, *estI*, *ehxA*; AMP^R, CPF^R, CFO^R, CFR^R, AZT^R), *E. coli* CA46 (*fimH*; AMP^R, CPF^R, CFR^R, AZT^R, TET^R). «*» – индекс ингибирования роста > 40%.

5.2. Характеристика профилей биобезопасности бактериоцин-продуцирующих штаммов *E. coli*

Как было показано выше, бактериоциногенность тесно связана с факторами патогенности, устойчивости к антибиотикам и мобильными генетическими элементами, однако присутствие этих факторов исключает рассмотрение штаммов как перспективных для использования в технологиях на основе живых бактерий. Среди бактериоцин-продуцирующих комменсальных *E. coli* гемолитическим оказался только штамм *E. coli* C45. Около половины штаммов (47,1%) обладали профагами, которые могли активироваться под воздействием ультрафиолета. Гены, кодирующие токсины, были обнаружены у 58,8% бактериоцин-продуцирующих штаммов. Скрининг показал, что два штамма (*E. coli* Q5 и *E. coli* C41) не содержали генов, связанных с вирулентностью, оказались чувствительны к антибиотикам, не были лизогенными или гемолитическими и, следовательно, могут быть перспективными кандидатами для биотехнологического применения (Таблица 18). Эти штаммы относились к серотипам O8:H10 и O149:H2 и принадлежали к сиквенс-типам ST1257 и ST388 соответственно. Различие серотипов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 отражает неодинаковую антигенную структуру поверхности этих штаммов. Еще один штамм *E. coli* C23 нес только адгезины *afa/draBC* и *papC*, имеющие тропность к уроэпителию, однако генов токсинов данный штамм не содержал, поэтому может считаться условно перспективным.

Таблица 18 – Факторы патогенности и устойчивость к антибиотикам бактериоцин-продуцирующих комменсальных штаммов *E. coli*

Ген/фактор патогенности	Бактериоцин-продуцирующий штамм <i>E. coli</i>																	Распространенность, %
	Ch1	Q5	Q8	Q12	C18	C19	C23	C25	C32	C40	C41	C45	C48	C49	C51	C56	C61	
<i>afa/draBC</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	23,5
<i>papC</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	17,6
<i>cnfI</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>hlyA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	11,8
<i>hlyF</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	41,2
<i>eastI</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	29,4
<i>ehxA</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	29,4
<i>estI</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	5,9
<i>estII</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>eltA</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9
<i>stx1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>stx2</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	11,8
<i>kpsMTII</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	11,8
<i>ompT</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	41,2
<i>iss</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	23,5
Лизогения	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	47,1
Гемолиз	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	5,9
Количество антибиотиков, к которым штамм устойчив	1	0	2	1	1	3	3	7	1	0	0	7	8	6	8	2	1	
Серотип	O86:H11	O8:H10	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	O6:H1	н.о.	н.о.	O149:H2	н.о.	н.о.	н.о.	O9a:H9	н.о.	н.о.	
Сиквенс-тип	ST12673	ST1257	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	#	н.о.	н.о.	ST388	н.о.	н.о.	н.о.	ST58	н.о.	н.о.	
Перспективность	нет	да	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	да	нет	нет	нет	нет	нет	нет	

Примечание. «+» – ген/признак присутствует, «-» – ген/признак отсутствует, «н.о.» – не определяли, «#» – неизвестный сиквенс-тип.

Полные геномы перспективных штаммов *E. coli* Q5 и C41 были получены методом секвенирования с длинными прочтениями с использованием технологии Oxford Nanopore (MinION). Полный геном штамма *E. coli* Q5 состоял из хромосомы длиной 4 948 409 п.н. с GC-составом 51%, а также 5 плазмид, названных pQ501 (137 557 п.н., содержание GC 48%), pQ502 (98 317 п.н., содержание GC 48,0%), pQ503 (58 014 п.н., содержание GC 42%), pQ504 (17 107 п.н., содержание GC 48,0%) и pQ505 (7 791 п.н., содержание GC 51%) (Рисунок 16). Полный геном *E. coli* C41 состоял из хромосомы длиной 5 037 330 п.н. с GC-составом 51,3% и двух плазмид, названных pC4101 (114 534 п.н., содержание GC 48%) и pC4102 (13 295 п.н., содержание GC 49%). Всего было идентифицировано 4945 последовательностей, кодирующей белок (CDS) в геноме *E. coli* Q5 и 4878 CDS в геноме *E. coli* C41. Оба штамма содержали 22 рРНК, 89 тРНК, 1 tmРНК. Геном Q5 на 96,2% был идентичен геному C41 (PMID: 26585518).

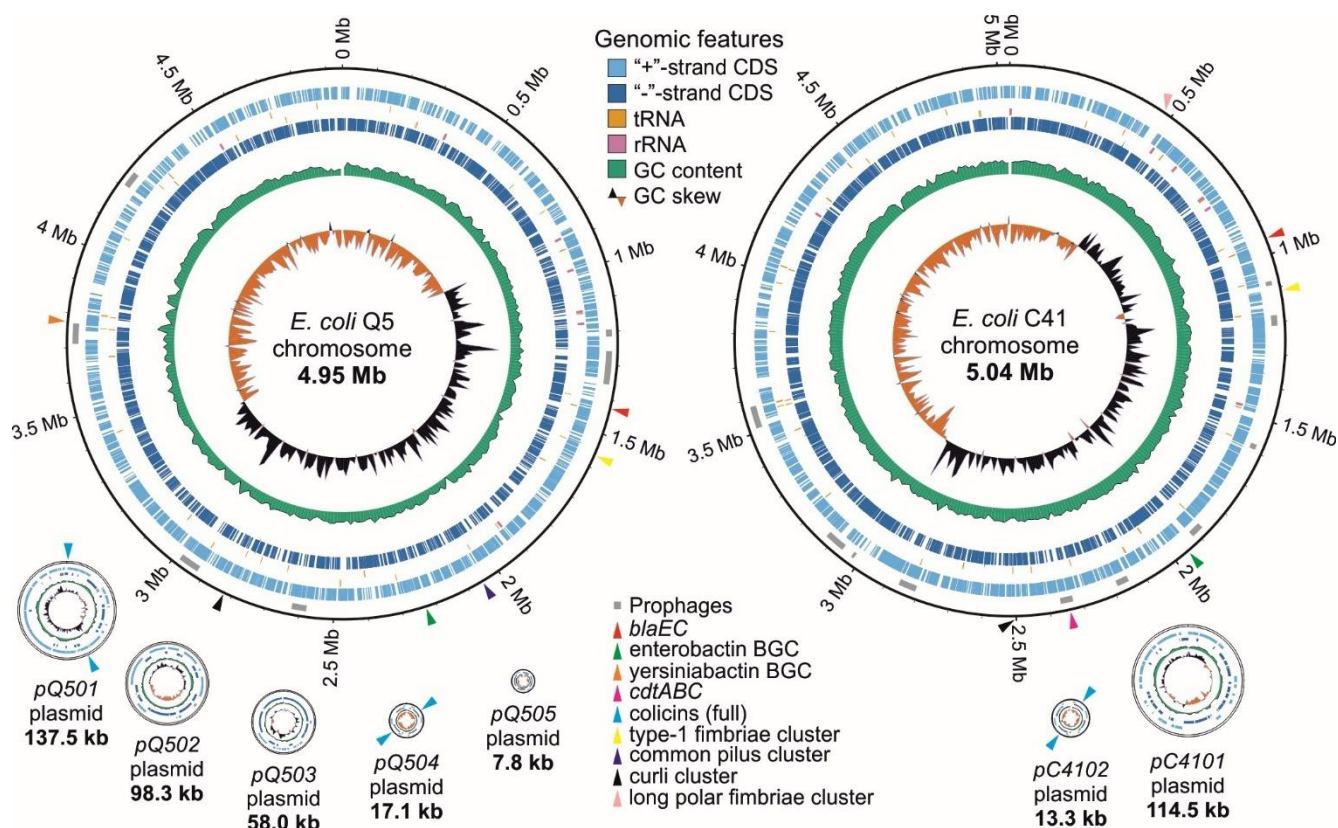


Рисунок 16 – Организация геномов штаммов *E. coli* Q5 и C41, визуализированная с использованием программы GenoVi (<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010998>). Плазмиды и хромосомы представлены без соблюдения масштаба. Серые прямоугольники обозначают профаги, цветные треугольники – геномные признаки, связанные с пробиотическими свойствами штаммов

Плазмиды pQ501, pQ502, pQ503 и pQ504 имели низкое (~ 1–2) число копий, тогда как pQ505 – высокое число копий (~ 90). Плазмиды pQ501 и pQ503 содержали системы конъюгации, принадлежащие к F- и Р-типам соответственно. Плазмиды pQ504 и pQ505 кодировали мобилизационные системы. Плазмида pQ502 была распознана как пунавирус (Uroviricota) методом BLAST (охват 89% и идентичность 99% с последовательностью Punavirus P1 MH422554.1). За исключением pQ505, который не был отнесен ни к одной известной группе несовместимости, все плазмиды штамма *E. coli* Q5 принадлежали к разным группам несовместимости. Эти результаты подтверждают, что полученные последовательности плазмид не являются результатом неправильной сборки. Обе плазмиды штамма *E. coli* C41 были однокопийны и относились к разным группам несовместимости. Плазмида pC4101 содержала систему конъюгации F-типа, а плазмида pC4102 имеет систему мобилизации. Из прочих мобильных генетических элементов, по данным PHASTEST, геном *E. coli* Q5 содержал семь интактных профагов, тогда как геном *E. coli* C41 содержал 10 интактных и один неполный профаг, однако лизогенный фенотип штаммы не проявляли.

Таблица 19 – Описание плазмид, обнаруженных у *E. coli* Q5 and C41

Плазмида	Длина, п.н.	Число копий	Лучшее совпадение	Группа несовместимости	Система переноса плазмиды
pQ501	137,557	2	pH22_122286 (CP120564.1)	IncFIB, IncFII	Система конъюгации F-типа (<i>tra</i>)
pQ502	98,317	1	Punavirus P1 (MH422554.1)	p0111	-
pQ503	58,014	2	pNMBU-W12E19_04 (CP042888.1)	IncI2	Система конъюгации Р-типа (<i>virB</i>)
pQ504	17,107	1	pNGF1_pCol_let_like (CP016009.1)	ColE1	Система мобилизации (MobC)
pQ505	7,791	89	unnamed plasmid 1 CP077681.1		Система мобилизации (MobA/MobL)
pC4101	114,534	1	p1 (CP083264.1)	IncFIB, IncFIC	Система конъюгации F-типа (<i>tra</i>)
pC4102	13,295	1	pFF2-1h-4 (CP097202.1)	ColE1	Система мобилизации (MobC-подобная)

Наличие мобильных генов устойчивости к антибиотикам и генов, ассоциированных с вирулентностью, нежелательно в пробиотических штаммах.

Предсказание генов антибиотикорезистентности с помощью Abricate и VRprofile2 в геномах *E. coli* Q5 и C41 выявило, соответственно, хромосомные гены *bla*_{EC-5} и *bla*_{EC-18}, кодирующие β-лактамазы (отмечены красными треугольниками на Рисунке 17). На плазмидах или внутри мобильных генетических элементов секвенированных штаммов не было обнаружено генов устойчивости к антибиотикам, также не выявлено мутаций в локусах *gyrA/parC/parE*, придающих устойчивость к фторхинолоновым антибиотикам. В геноме *E. coli* Q5 не было обнаружено генов энтеротоксинов, цитотоксинов, гемолизина. Однако штамм *E. coli* C41 нес хромосомный кластер генов *cdtABC*, кодирующий цитолетальный расширяющий токсин (CDT). В обоих геномах было обнаружено несколько кластеров биосинтетических генов (BGC) хелатирующих железо соединений (сидерофоров). BGC энтеробактина и иерсиниабактина были обнаружены в хромосоме *E. coli* Q5 (отмечены зеленым и оранжевым треугольниками на рисунке). Энтеробактин BGC был также обнаружен в хромосоме *E. coli* C41.

5.3. Характеристика генетических локусов бактериоцинов штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41

Чтобы оценить антимикробный потенциал двух штаммов, их геномы были проверены с помощью antiSMASH, PRISM4 и BAGEL4. Геном *E. coli* Q5 содержал три полных набора функциональных генов, необходимых для производства, экспорта и иммунитета к колицинам Ia и Ib (оба на плазмиде pQ501) и колицина Y (на плазмиде pQ504) (отмечены синими треугольниками на рисунке). Кроме того, хромосома и плазида pQ501 содержали несколько генов, отвечающих за выработку микроцина V (*cypA*, *cvi*). Однако структурный ген этого колицина (*cvaC*, плазида pQ501) был изменен (наблюдался сдвиг рамки считывания), а гены *cvaA* и *cvaB*, необходимые для его процессинга и экспорта, отсутствовали. Кроме того, в хромосоме *E. coli* Q5 был обнаружен ген *cbrA*, обеспечивающий устойчивость к колицину M.

Плазмида *E. coli* C41 pC4102 содержала полный набор функциональных генов для продуцирования и экспорта порообразующего колицина E1 (*cea*, *cei*, *cel*). Кроме того, в хромосоме *E. coli* C41 содержался ген *cvpA* (продуцирующий белок микроцина V) и гены *cbrA* и *cbrC*, придающие устойчивость соответственно к колицинам M и E2.

Таблица 20 – Гены бактериоцинов, обнаруженные в геномах *E. coli* Q5 и *E. coli* C41

Бактериоцин	Ген	Функция гена	Расположение гена
<i>E. coli</i> Q5 (BioSample accession no. SAMN35637330)			
ColIa*	<i>cia</i>	структурный ген колицина Ia	pQ501
	<i>iia</i>	иммунитет к колицину Ia	pQ501
ColIb*	<i>cib</i>	структурный ген колицина Ib	pQ501
	<i>iib</i>	иммунитет к колицину Ib	pQ501
ColY*	<i>crl</i>	ген, кодирующий белок лизиса	pQ504
	<i>cui</i>	иммунитет к колицину Y	pQ504
	<i>cya</i>	структурный ген колицина Y	pQ504
MccV	<i>cvaC[#]</i>	структурный ген микроцина V	pQ501
	<i>cvi</i>	иммунитет к микроцину V	chr
	<i>cvpA</i>	экспорт и продукция микроцина V	chr
MccM	<i>cbrA</i>	устойчивость к колицину M	chr
<i>E. coli</i> C41 (BioSample accession no. SAMN35637331)			
ColE1*	<i>cei</i>	иммунитет к колицину E1	pC4102
	<i>cea</i>	структурный ген колицина E1	pC4102
	<i>cel</i>	ген, кодирующий белок лизиса	pC4102
MccV	<i>cvpA</i>	экспорт и продукция микроцина V	chr
ColM	<i>cbrA</i>	устойчивость к колицину M	chr
ColE2	<i>cbrC</i>	продукция и токсическая функция колицина E2	chr

Примечание. «*» – полный набор функциональных генов локуса бактериоцина, «#» – сдвиг рамки считывания, chr – хромосомный ген.

5.4. Оценка антагонистической активности бесклеточных культуральных жидкостей *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 в отношении условно-патогенных тест-штаммов *in vitro*

Исследование антагонистической активности бесклеточных культуральных жидкостей штаммов *E. coli* Q5, C41 и M-17 показало, что они оказывали бактериостатическое действие на следующие тест-штаммы: патогенные для птиц *E. coli* (BR4, BR35, BR37), диареогенные *E. coli* (CA29, CA43, CA46, O157), *K. pneumoniae*, в меньшей степени на *S. flexneri* и *S. aureus*. Ни в одном случае не было обнаружено эффекта в отношении *S. Typhimurium*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*. Индекс ингибирования роста был максимальным после 22 часов совместного культивирования в большинстве случаев, однако снижение скорости роста наблюдалось уже после 6 часов инкубации (Таблица 21, Рисунок 17). Следует отметить, что только супернатанты, полученные при культивировании *E. coli* Q5, ингибировали рост *S. flexneri* после 22 часов. Был зафиксирован высокий ингибирующий эффект (сопоставимый с уровнем ингибирования эшерихий) культуральными жидкостями *E. coli* C41 в отношении *K. pneumoniae*: 73,7% и 55,1% после 6 и 22 часов культивирования соответственно. Сравнение с коммерческим штаммом *E. coli* M-17 показало, что после 22 часов культивирования экзометаболиты *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 ингибировали рост патогенной для птиц *E. coli* BR35 более эффективно, чем *E. coli* M-17 ($p = 0,03$ и $p = 0,02$ соответственно), а также энтеротоксигенного штамма *E. coli* CA46 ($p = 0,02$ и $p = 0,02$ соответственно). Бесклеточные культуральные жидкости *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 снижали прирост биомассы *E. coli* BR35 в 1,8 и 2,3 раза соответственно, удельную скорость роста *E. coli* CA46 в 1,7 раз. Однако шига-токсин продуцирующий штамм *E. coli* O157 эффективнее подавляли культуральные жидкости *E. coli* M-17. Таким образом, экзометаболиты *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 обладали антагонистической активностью *in vitro* в отношении ряда тест-штаммов, включая возбудителей колибактериоза сельскохозяйственных животных.

Исследовали влияние комбинаций бесклеточных культуральных жидкостей *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 на рост тест-штаммов при 6 и 22 часов совместного культивирования. Синергидным эффектом считали достоверное увеличение антагонистической активности при добавлении комбинации, чем при добавлении каждого из индивидуальных супернатантов. Поскольку штаммы *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 обладали наибольшим антагонистическим действием, предполагалось, что их комбинирование может оказывать синергидное действие на тест-штаммы, однако использование комбинации *E. coli* Q5 + *E. coli* C41 не привело к существенному увеличению антагонистического эффекта в отношении большинства штаммов. При действии комбинации в течение 22 часов совместного культивирования достигалось достоверное увеличение антагонистического эффекта только в отношении двух штаммов: *E. coli* CA43 ($p = 0,01$ в сравнении с действием индивидуального супернатанта *E. coli* Q5, $p = 0,05$ при добавлении *E. coli* C41) и *S. aureus* ($p = 0,05$ для обоих штаммов). После 6 часов культивирования наблюдался синергидный эффект комбинации культуральных жидкостей *E. coli* Q5 + *E. coli* C41 в отношении *E. coli* BR37, однако после 22 часов этот эффект не обнаруживался. Таким образом, комбинирование бесклеточных культуральных жидкостей не привело к значительному увеличению антагонистического эффекта. Тем не менее незначительный синергидный эффект супернатантов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 был зафиксирован в отношении *E. coli* CA43 и *S. aureus*.

Таблица 21 – Ингибирование роста тест-штаммов после 6 и 22 часов инкубации с бесклеточными культуральными жидкостями бактериоцин-продуцирующих комменсальных штаммов *E. coli*, %. В таблице представлены значения индекса ингибирования роста тест-штаммов, который отражает относительное снижение оптической плотности в конкретный момент времени в лунках, где были добавлены супернатанты, по сравнению с контрольными лунками

Тест-штамм	Индекс ингибирования роста тест-штаммов, %			
	<i>E. coli</i> M-17	<i>E. coli</i> Q5	<i>E. coli</i> C41	<i>E. coli</i> Q5 + C41
После 6 часов культивирования в присутствии бесклеточных супернатантов				
<i>E. coli</i> DH5α	22,0±3,8	68,3±8,3*	70,4±9,9*	72,9±1,1
<i>E. coli</i> BR4	24,4±2,1	29,3±3,0	29,8±3,4	37,3±9,4
<i>E. coli</i> BR35	27,1±3,3	28,3±6,1	30,2±2,0	29,6±10,2
<i>E. coli</i> BR37	25,5±0,4	25,2±3,6	31,9±10,2	35,1±7,4
<i>E. coli</i> CA29	29,8±1,4	46,0±7,9	36,8±8,8	34,6±6,0
<i>E. coli</i> CA43	21,3±3,7	35,3±2,2*	79,6±1,4*	32,3±7,1
<i>E. coli</i> CA46	23,4±3,8	30,3±0,4	33,2±4,0*	28,7±1,3
<i>E. coli</i> O157	11,6±3,3	9,7±1,7	0	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	20,1±0,9	27,8±2,4	73,7±0,7*	27,7±1,8
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	13,4±8,7	19,1±1,5	36,4±0,7*	19,8±9,0
<i>S. flexneri</i> №170	19,7±2,2	15,0±6,5	0	0
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium №1135	0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i> №H-237	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0	0	0	0
После 22 часов культивирования в присутствии бесклеточных супернатантов				
<i>E. coli</i> DH5α	44,1±11,2	91,9±0,2	46,8±6,7	78,9±3,8
<i>E. coli</i> BR4	42,1±9,5	38,3±7,9	46,9±13,3	21,8±6,3
<i>E. coli</i> BR35	31,9±8,2	46,6±5,4*	55,9±5,7*	49,6±22,8
<i>E. coli</i> BR37	25,7±11,3	41,3±5,6	43,2±2,6	23,2±2,3
<i>E. coli</i> CA29	38,4±5,3	21,0±3,5	22,4±4,6	26,9±0,9
<i>E. coli</i> CA43	32,4±5,2	24,6±2,6	33,9±4,5	44,2±2,0
<i>E. coli</i> CA46	10,2±1,5	31,3±2,8*	37,0±4,3*	24,0±7,9
<i>E. coli</i> O157	12,6±9,7	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	35,6±4,0	25,8±0,9	55,1±2,5*	23,2±2,1
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	18,8±7,3	15,2±2,8	14,2±3,8	37,8±13,6
<i>S. flexneri</i> №170	0	25,6±11,4*	0	nd
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium №1135	0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i> №H-237	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0	0	0	0

Примечание. «*» – ингибирование достоверно выше, чем при добавлении бесклеточных культуральных жидкостей *E. coli* M-17 (t-критерий Стьюдента; $p \leq 0,05$).

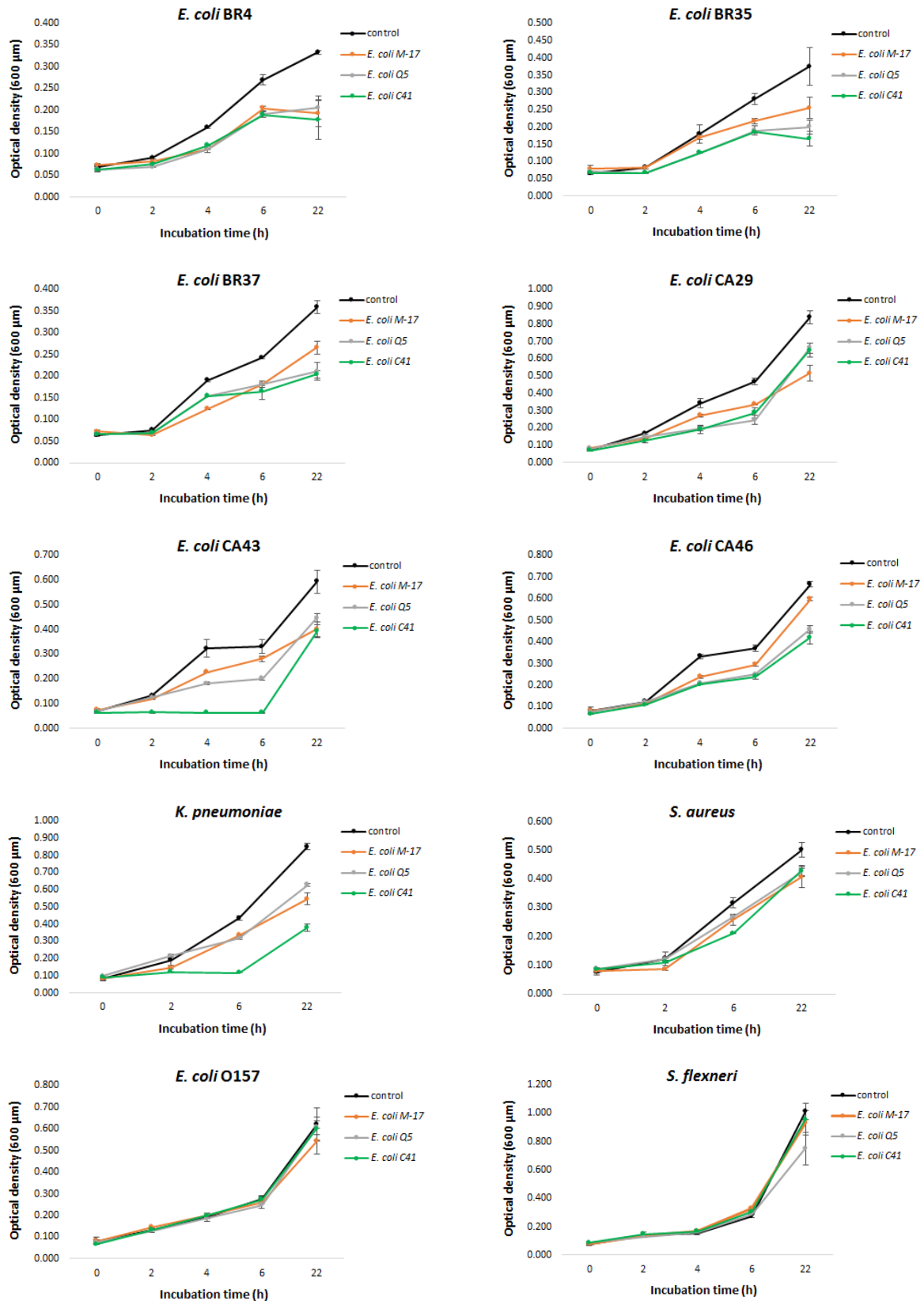


Рисунок 17 – Кривые роста тест-штаммов в присутствии бесклеточных культуральных жидкостей (супернатантов) штаммов *E. coli* Q5, C41 и M-17

5.5. Оценка взаимодействия штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 с представителями *Lactobacillus* spp. *in vitro*

Далее мы оценили антагонистическую активность пробиотических штаммов *E. coli* и *Lactobacillus* spp. в отношении друг друга методом штрихов классическим способом (на среде MPC-5) и альтернативным (на среде LART). На среде MPC-5 зоны ингибирования были больше, чем на среде LART, поскольку среда MPC-5 оптимальна для культивирования *Lactobacillus* spp. и поддерживает интенсивное образование органических кислот и других метаболитов. В связи с этим, MPC-5 менее пригодна для моделирования взаимодействия лактобактерий с *E. coli*, в то время как среда LART обеспечивает более сбалансированные условия для совместного роста *Lactobacillus* spp. и *E. coli*. Результаты показали, что наиболее чувствительным к действию лактобактерий был штамм *E. coli* Q5, тогда как штаммы C41 и M-17 характеризовались сходной чувствительностью (Таблица 22).

Таблица 22 – Зоны задержки роста (в мм) при оценке биосовместимости штаммов *E. coli* и *Lactobacillus* spp. методом штрихов на питательных средах LART и MPC-5

Подсеваемый тест-штамм	Штамм, высеваемый первым штрихом					
	<i>E. coli</i> M-17	<i>E. coli</i> Q5	<i>E. coli</i> C41	<i>L. acidophilus</i> КЗШ24	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	<i>L. fermentum</i> 90T-C4
<i>E. coli</i> M-17	5,5±0,7	6,5±2,1	8,0±1,4	12,0±0,0	12,0±0,0	9,0±2,1
<i>E. coli</i> Q5	6,0±0,0	8,0±1,4	9,0±1,4	14,0±1,0	13,0±1,2	11,5±2,5
<i>E. coli</i> C41	5,0±0,0	7,0±1,4	8,5±0,7	11,5±0,6	11,5±1,0	9,0±2,3
<i>L. acidophilus</i> КЗШ24	3,5±0,7	4,0±0,0	4,0±0,0	16,1±0,3#	7,8±0,2#	7,8±0,4#
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	3,5±0,7	4,5±0,7	4,0±1,4	16,9±0,4#	16,1±0,4#	16,5±0,9#
<i>L. fermentum</i> 90T-C4	4,0±0,0	3,5±0,7	4,0±0,0	17,6±0,6#	15,9±0,3#	15,6±0,2#

Примечание. «н.о.» – не определяли, «#» - для оценки антагонизма культуры выращивали на плотной среде MPC-5, прочие варианты выращивали на среде LART.

Воздействие модельной желудочной среды, содержащей 0,1% HCl и пепсин в концентрации 0,5 г/л, в течение 30 минут оказывало бактерицидное действие на исследованные штаммы *E. coli* (Рисунок 18А), тогда как лактобактерии сохраняли жизнеспособность в этих условиях (Рисунок 18Б). Среди протестированных культур наиболее устойчивым оказался штамм *L. acidophilus* КЗШ24. При

комбинировании *E. coli* C41 с *L. acidophilus* КЗШ24 (в соотношении 1:1 по биомассе) наблюдалось повышение выживаемости *E. coli* C41 в модельной среде желудка (Рисунок 18В). Анализ антагонистической активности методом отсроченного антагонизма на плотной среде LART показал, что комбинирование *L. acidophilus* КЗШ24 и *E. coli* C41 в соотношении 1:1 по биомассе усиливало подавление роста ряда условно-патогенных микроорганизмов, включая *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *E. faecalis* (Рисунок 18Г).

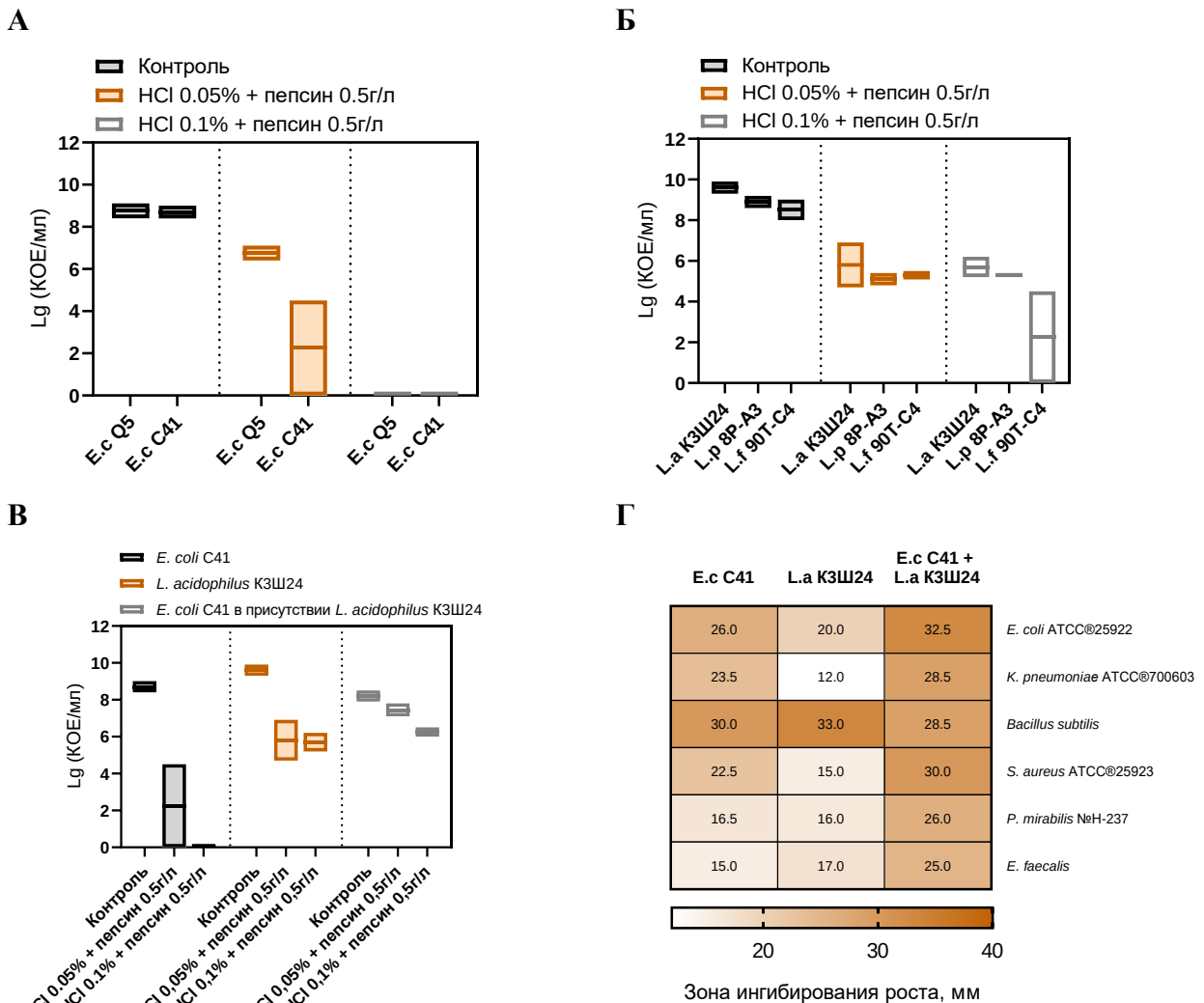


Рисунок 18 – Выживаемость штаммов *E. coli* и *Lactobacillus* spp. в модельной среде желудка и антагонистическая активность композиции *E. coli* C41 и *L. acidophilus* КЗШ24. А – Выживаемость штаммов *E. coli* в модельной среде желудка. Б – Выживаемость штаммов *Lactobacillus* spp. в модельной среде желудка. В – Выживаемость штаммов *E. coli* C41, *L. acidophilus* КЗШ24, а также *E. coli* C41 в присутствии *L. acidophilus* КЗШ24 в модельной среде желудка. Г – Зоны задержки роста тест-штаммов (в мм) на среде LART в присутствии *E. coli* C41, *L. acidophilus* КЗШ24, а также комбинации *E. coli* C41 и *L. acidophilus* КЗШ24 в соотношении 1:1 по биомассе

5.6. Оценка свойств клеточной поверхности и способности к адгезии *in vitro* штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41

Адгезия микроорганизмов является первым шагом к колонизации и представляет собой сложное явление, которое зависит от свойств как самих микроорганизмов, так и поверхностей. Способность бактерий к адгезии складывается из физико-химических свойств их клеточных стенок, а также присутствия специфических молекул адгезии на поверхности клеток микроорганизмов и кишечного эпителия, обуславливающих прикрепление посредством лиганд-рецепторных взаимодействий. Известно, что бактериальная адгезия к поверхностям кишечника может быть первоначально обусловлена неспецифическим связыванием за счет физико-химических и электростатических взаимодействий, за которым следует вторая стадия адгезии с помощью специфических компонентов клеточной стенки (Beloïn *et al.*, 2005). Физико-химические свойства включают гидрофобность, силы Ван-дер-Ваальса, электростатические и кислотно-основные взаимодействия (Elfazazi *et al.*, 2021). Одним из важных факторов является гидрофобность: гидрофильные штаммы обладают более низкой адгезией к биологическим тканям (включая кишечник).

Оценка гидрофобности клеточной поверхности показала, что из трех протестированных штаммов *E. coli* Q5, C41 и M-17 наименее гидрофобным оказался штамм *E. coli* Q5. Данная характеристика сохранялась независимо от условий культивирования: после роста на богатой среде LB и на минимальной среде M9 штамм *E. coli* Q5 демонстрировал меньшую гидрофобность клеточной поверхности по сравнению со штаммами *E. coli* C41 и M-17. Штамм C41 характеризовался уровнем гидрофобности, сопоставимым с коммерческим пробиотическим штаммом *E. coli* M-17 при культивировании на богатой среде LB (Рисунок 19А и Б). Уровень неспецифической адгезии *E. coli* Q5 к гидрофильной поверхности был сопоставим, а в случае адгезии к гидрофобной поверхности оказался значимо ниже, чем *E. coli* M-17 ($p < 0,01$). *E. coli* C41 имел уровень адгезии к гидрофобной поверхности, сравнимый с *E. coli* M-17, а к гидрофильной

поверхности продемонстрировал адгезионную способность на уровне $22,8 \pm 1,2\%$, что оказалось значимо выше, чем у контрольного штамма *E. coli* M-17 ($p < 0,01$) (Рисунок 19В и Г). Близость показателей гидрофобности и неспецифической адгезии *E. coli* C41 к *E. coli* M-17 позволяет предположить, что этот штамм может обладать схожими адгезивными свойствами и способностью к колонизации, что является желательной характеристикой для пробиотического кандидата. В то же время большая гидрофильность клеточной стенки штамма *E. coli* Q5 может снижать его склонность к неспецифической адгезии и взаимодействию с эпителиальными клетками хозяина.

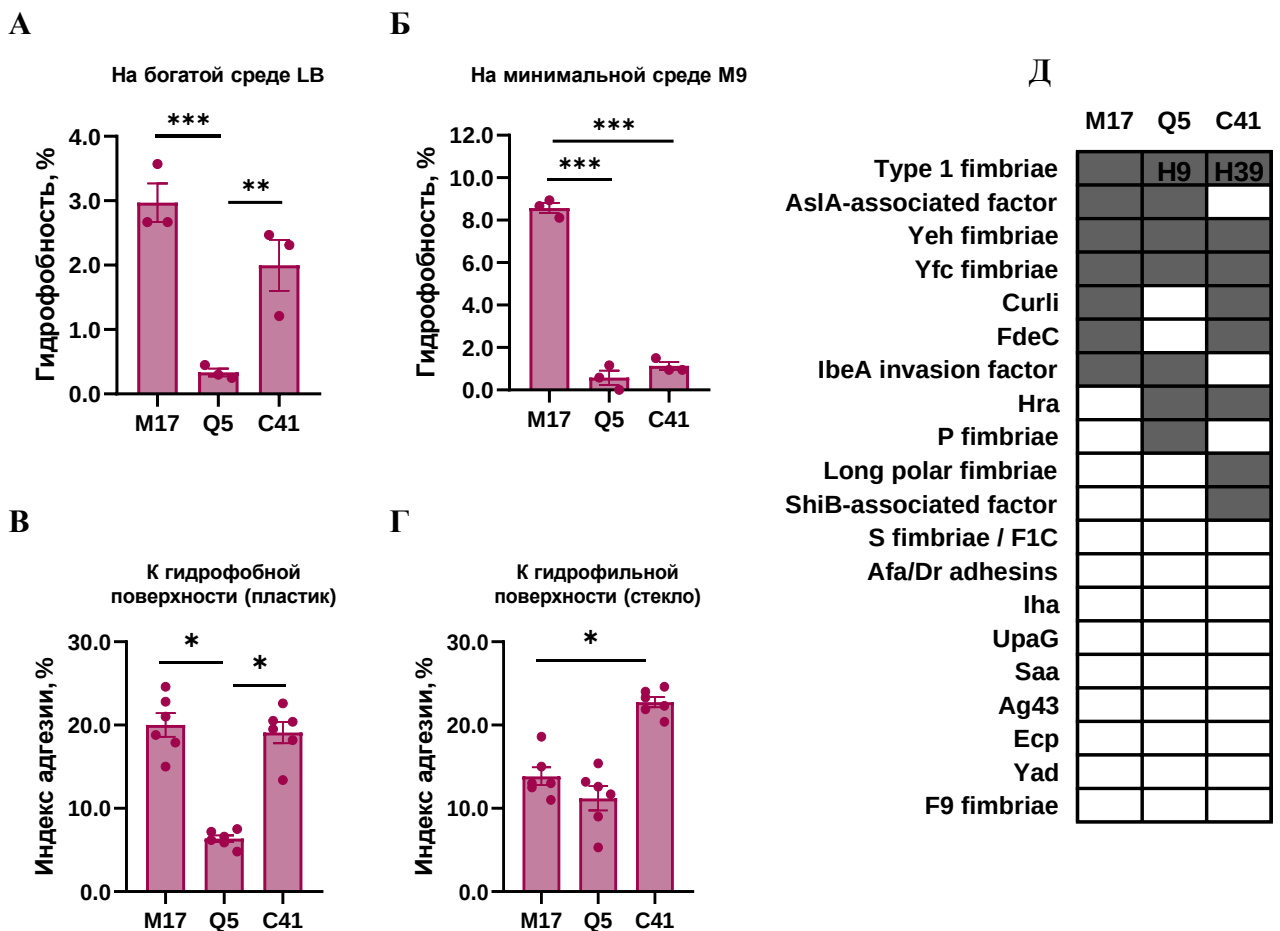


Рисунок 19 – Оценка гидрофобности, неспецифической адгезии и профилей генов адгезинов показала сходство адгезивного потенциала штаммов *E. coli* C41 и M-17. А – Гидрофобность клеток *E. coli* Q5, C41 и M-17, выращенных на богатой питательной среде LB. Б – Гидрофобность клеток *E. coli* Q5, C41 и M-17, выращенных на минимальной питательной среде M9. В – Индекс адгезии штаммов *E. coli* Q5, C41 и M-17 к гидрофобной поверхности (пластику). Г – Индекс адгезии штаммов *E. coli* Q5, C41 и M-17 к гидрофильной поверхности (стеклу). Д – Типы адгезивных систем, обнаруженных в геномах штаммов *E. coli* M-17, *E. coli* Q5 и *E. coli* C41. В строке «Type 1 fimbriae» указан аллельный вариант адгезина FimH. Темными ячейками обозначено присутствие гена, белыми – отсутствие

Способность к специфической адгезии была оценена в модели *in vitro* с использованием эритроцитов (Рисунок 20). Эритроциты содержат на поверхности вещество гликофорин, которое идентично гликокаликсу эпителиальных клеток, что позволяет оценить адгезивную способность пробиотических штаммов к тканям кишечника по результатам исследований адгезии в модели эритроцитов (Eskova *et al.*, 2022). Оценка специфической адгезии позволила установить, что *E. coli* Q5 обладал низкой адгезивностью к человеческим эритроцитам: $AAI=0,83\pm0,12$, $AC=0,47\pm0,07$ и $IAM=1,78\pm0,09$ (Таблица 23). Однако этот штамм показал наибольший уровень адгезии к эритроцитам коров, и, согласно рассчитанному индексу адгезивности микроорганизмов (IAM), был среднеадгезивным ($AAI=2,08\pm0,18$, $AC=0,76\pm0,02$ и $IAM=2,73\pm0,16$). *E. coli* C41 был отнесен к группе среднеадгезивных и хорошо адгезировался как на эритроцитах коров ($AAI=1,65\pm0,08$, $AC=0,65\pm0,08$ и $IAM=2,56\pm0,05$), так и на эритроцитах человека ($AAI=1,21\pm0,04$, $AC=0,48\pm0,01$ и $IAM=2,53\pm0,09$). Стоит отметить, что оба штамма имели большее сродство к эритроцитам коров, в отличие от *E. coli* M-17, что, вероятно, связано с происхождением *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 и может позволить более эффективно колонизировать кишечник животных.

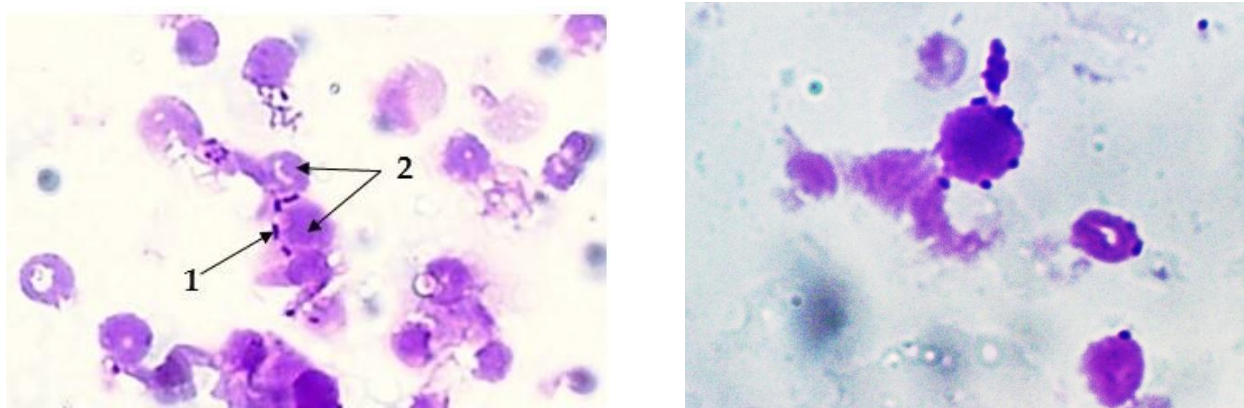


Рисунок 20 – Пример специфической адгезии *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 к эритроцитам человека, адгезия 30 мин, окраска генцианвиолетом (ув. $\times 1000$): 1 – клетки бактерий, 2 – эритроциты

Таблица 23 – Специфическая адгезия пробиотических штаммов *E. coli* к эритроцитам человека и крупного рогатого скота

Уровень адгезии	Штамм <i>E. coli</i>		
	<i>E. coli</i> M-17	<i>E. coli</i> Q5	<i>E. coli</i> C41
к эритроцитам человека			
AAI	1,60±0,04	0,83±0,12	1,21±0,04
АС	0,58±0,06	0,47±0,07	0,48±0,00
IAM	2,80±0,36	1,78±0,09*	2,53±0,09
характеристика	среднеадгезивный	низкоадгезивный	среднеадгезивный
к эритроцитам коровы			
AAI	1,35±0,17	2,08±0,18	1,65±0,08
АС	0,59±0,07	0,76±0,02	0,65±0,05
IAM	2,30±0,03	2,73±0,16	2,56±0,05
характеристика	низкоадгезивный	среднеадгезивный	среднеадгезивный

Примечание. AAI – средний индекс адгезии, АС – коэффициент адгезии, IAM – индекс адгезивности микроорганизмов к эритроцитам. «*» – разница достоверна по отношению к штамму *E. coli* M-17 (t-критерий Стьюдента; $p \leq 0,05$).

Специфические механизмы прикрепления бактерий включают присутствие молекул адгезии. Анализ генов адгезии у трех штаммов *E. coli* Q5, C41 и M-17 выявил как общие, так и штаммоспецифичные факторы (Рисунок 19Д). Все три штамма несли гены фимбрий 1 типа (*fimH*), а также гены, кодирующие факторы Yeh и Yfc, функции которых до конца не охарактеризованы, но считаются факторами адгезии и биопленкообразования. Штамм *E. coli* M-17 помимо *fimH* нес гены AslA-ассоциированного фактора, курли (*curli*), FdeC (внеклеточный матрикс-связывающий адгезин) и IbeA (инвазин, ассоциированный с проникновением через эндотелий). Штамм *E. coli* Q5 характеризовался наличием *fimH*, AslA-ассоциированного фактора, Yeh, Yfc, IbeA, а также генов Hra (термостабильный адгезин) и Р-фимбрий (*pap*-оперон). Наличие Р-фимбрий, известных как факторы специфической адгезии к эпителию почек и мочевыводящих путей, может указывать на его потенциальную тропность к уроэпителию. Отсутствие курлей (амилоидных фимбрий, существенно повышающих гидрофобность поверхности) у *E. coli* Q5 может способствовать большей гидрофильности клеточной поверхности. У штамма *E. coli* C41 отсутствовали гены IbeA, Р-фимбрий, однако были детектированы курли, FdeC и Lpf, что может свидетельствовать о

преимущественной ориентации *E. coli* C41 на кишечную колонизацию и неспецифическую адгезию через биопленкообразование. Сопоставимая гидрофобность *E. coli* C41 и *E. coli* M-17 согласуется с наличием у обоих штаммов курлей и FdeC, которые ассоциированы с гидрофобной поверхностью и способностью к образованию биопленок. У *E. coli* C41 дополнительный вклад могут вносить Lpf и Hra, которые также участвуют в адгезии к кишечному эпителию.

5.7. Оценка безопасности и эффективности штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 *in vivo*

5.7.1. Влияние *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 на физиологические, биохимические и гематологические параметры крыс в норме и в модели экспериментальной инфекции

Кроме отсутствия генетических маркеров патогенности, антагонистической активности и способности к адгезии *in vitro*, важное значение имеет переносимость бактериального штамма макроорганизмом, отсутствие клинических признаков заболеваний и неблагоприятного влияния на физиологическое состояние животных¹³. В эксперименте по оценке безопасности штаммы *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 вводили перорально крысам стока Wistar в течение 5 дней в дозах 5×10^8 и 5×10^{10} КОЕ/голову в день. Выживаемость крыс составила 100%. Не было обнаружено каких-либо симптомов заболеваний, отклонений в поведении, все животные были активны, активно потребляли пищу и воду, не наблюдалось признаков боли и дистресса. Однако различные дозы исследуемых штаммов оказывали неодинаковое влияние на прибавку в весе. При введении *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову в день средняя живая масса превышала контрольную на 2,7% и 0,5% соответственно. При увеличении дозы *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 до 5×10^{10} средняя масса тела крыс была ниже, чем в контроле. Таким

¹³ Данные пункта 5.7. опубликованы: Mihailovskaya, V.S., Sutormin, D.A., Karipova, M.O., Trofimova, A.B., Mamontov, V.A., Severinov, K., Kuznetsova, M.V. Bacteriocin-producing *Escherichia coli* Q5 and C41 with potential probiotic properties: *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – Article 12636

образом, в низкой дозе введение *E. coli* Q5 и C41 не оказывало негативного эффекта и сопровождалось сохранением или небольшим превышением прироста массы относительно контроля, тогда как при высокой дозе средняя масса животных была ниже контрольной.

Таблица 24 – Изменение массы тела крыс после введения штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 в разных дозах

Параметр	Контроль	<i>E. coli</i> Q5 КОЕ/голову в день		<i>E. coli</i> C41 КОЕ/голову в день	
		5×10^8	5×10^{10}	5×10^8	5×10^{10}
Выживаемость, %	100	100	100	100	100
Масса тела до приема пробиотиков, г	372 ± 35	358 ± 14	372 ± 26	349 ± 28	358 ± 14
Масса тела после приема пробиотиков, г	392 ± 39	387 ± 22	371 ± 28	369 ± 27	372 ± 16
Привес, г	20 ± 5	29 ± 13	-1 ± 5	20 ± 8	14 ± 6
Привес, %	$5,3 \pm 1,1$	$8,0 \pm 4,6$	$-0,3 \pm 1,4^*$	$5,8 \pm 2,4$	$4,0 \pm 4,3$

Примечание. «*» – разница статистически достоверна в сравнении с контролем (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$).

Показатели концентрации глюкозы в крови, общего белка и мочевины соответствовали норме (Рисунок 21Б, В, Г). Наблюдалось снижение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) после введения бактерий *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову в день по сравнению с интактным контролем, однако показатель находился в пределах нормы – 35-80 ед/л (Рисунок 21Д). В крови крыс группы контроля инфекции энтеротоксигенным *E. coli* C55 концентрация щелочной фосфатазы увеличилась в 1,7 раза, в то время как значения в группах после приема пробиотиков остались на уровне интактного контроля (Рисунок 21Е). Наблюдалось снижение концентрации креатинина при введении *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 по сравнению с интактным контролем, концентрация креатинина также была ниже в модели инфекции по сравнению с инфекционным контролем без предварительного введения исследуемых штаммов (Рисунок 21Ж).

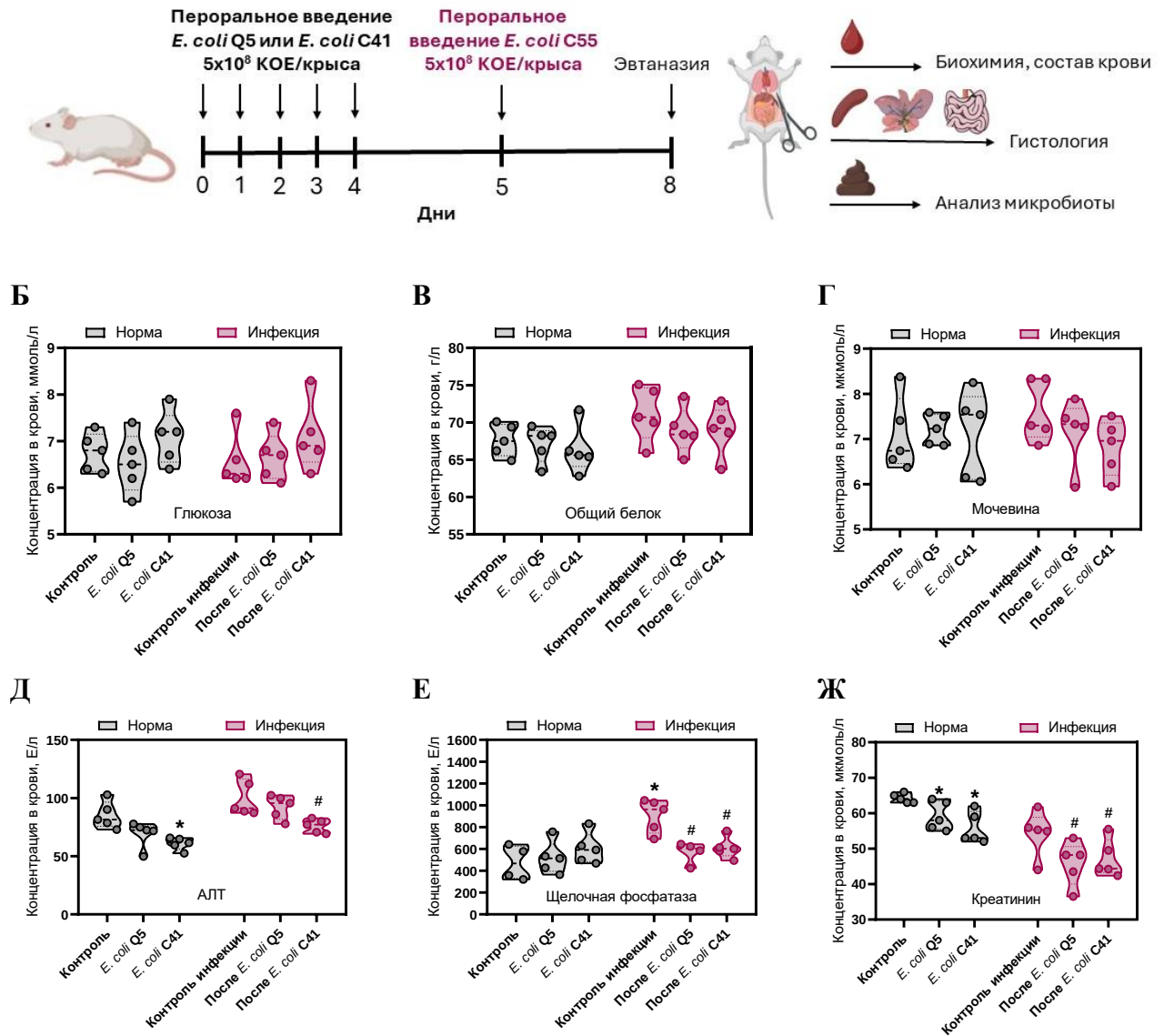


Рисунок 21 – Влияние бактерий *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 на биохимические показатели крыс в модели экспериментальной инфекции. А – Схема эксперимента *in vivo*. Эксперименты были проведены на крысах стока Wistar, каждая экспериментальная группа включала не менее 5 животных. Б-Ж – Общие биохимические показатели крови крыс, получавших перорально *E. coli* Q5 или *E. coli* C41 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову в день в течение 5 дней с последующим однократным заражением *E. coli* C55 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову или без заражения. АЛТ – аланинаминотрансфераза. «*» или «#» – разница статистически достоверна в сравнении с интактным контролем или контролем инфекции соответственно. Статистический анализ проведен с помощью теста Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна на множественность; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии неблагоприятного системного воздействия штаммов *E. coli* Q5 и C41: концентрации глюкозы, общего белка и мочевины не отличались от контрольных значений, что указывает на сохранение углеводного обмена, отсутствие заметных нарушений белкового обмена и метаболизма азота животных. При инфекции, вызванной энтеротоксигенным *E. coli* C55, предварительное введение исследуемых штаммов предотвращало повышение активности щелочной фосфатазы и сопровождалось более низкой концентрацией креатинина по сравнению с инфекционным контролем. Поскольку щелочная фосфатаза может изменяться при нарушениях гепатобилиарной функции, воспалительных процессах и поражении кишечника, этот результат отражает воздействие инфекции *E. coli* C55. Сохранение показателя на уровне контроля у животных, предварительно получавших *E. coli* Q5 или C41, указывает на возможное снижение выраженности метаболических нарушений, связанных с инфекцией.

Количество эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, концентрация гемоглобина, корпускулярного гемоглобина, гематокрит ни в одной из групп значимо не отличались от интактного контроля и были в пределах нормы (Рисунок 22А, Б, В, Г). Наблюдалось незначительное увеличение доли нейтрофилов в периферической крови крыс группы инфекционного контроля и после введения *E. coli* Q5 (Рисунок 22Д). После введения *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 значимо увеличилась доля моноцитов ($p < 0,05$), что отражало активацию моноцитарно-макрофагального звена иммунной системы (Рисунок 22Е). Таким образом, пероральное введение *E. coli* Q5 и C41 не приводило к существенным изменениям показателей периферической крови и не вызывало выраженной системной воспалительной реакции. Умеренные изменения относительного содержания нейтрофилов и моноцитов указывают на возможную активацию отдельных компонентов врожденного иммунитета.

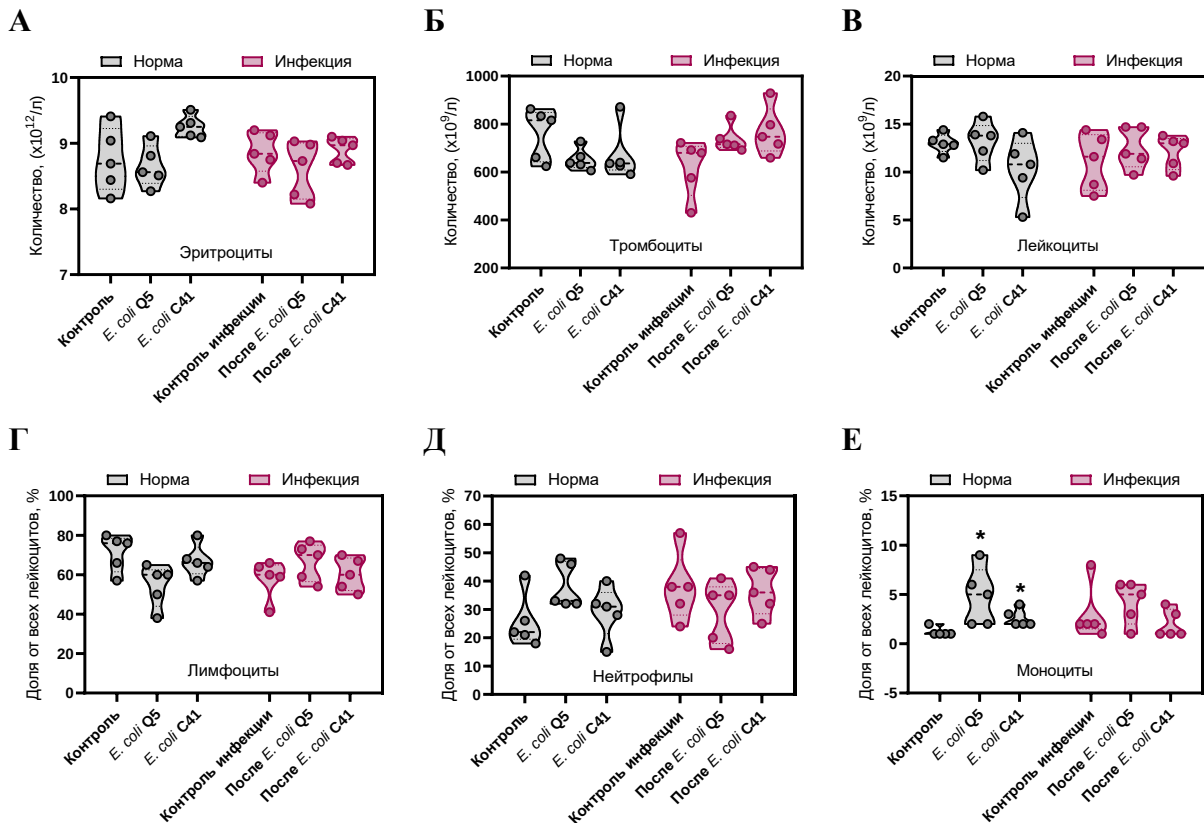


Рисунок 22 – Влияние бактерий *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 на показатели периферической крови крыс. А-Е – Состав форменных элементов периферической крови крыс, получавших перорально *E. coli* Q5 или *E. coli* C41 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову в день в течение 5 дней с последующим однократным заражением *E. coli* C55 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову или без заражения. «*» или «#» – разница статистически достоверна в сравнении с интактным контролем или контролем инфекции соответственно. Статистический анализ проведен с помощью теста Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна на множественность; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.7.2. Влияние *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 на морфологию кишечника и печени в модели экспериментальной инфекции

Введение токсигенного штамма *E. coli* C55 не вызывало летальных эффектов, однако привело к появлению гистопатологических изменений в органах, в отличие от контрольной группы (Рисунок 23). В печеночных дольках были обнаружены лимфоцитарно-клеточные инфильтраты. Гепатоциты демонстрировали дегенеративные изменения: наблюдалась вакуоляризация и дистрофическое воспаление в печени. Рассеянные участки кровоизлияний были выявлены в печеночной паренхиме инфицированных животных. В тонком кишечнике отмечался отек стромы и субэпителиальной части ворсин, в слизистом и подслизистом слоях зафиксировано расширение кровеносных и лимфатических

капилляров. Отмечалось обилие лимфоцитов и гранулоцитов в строме ворсин и между криптами. На поверхности слизистой тонкой кишки наблюдалась десквамация эпителия.

Между тем, заметное улучшение состояния органов наблюдалось в группе инфицированных крыс после предварительного введения *E. coli* Q5 и *E. coli* C41. В этих группах, в отличие от группы контроля инфекции, изменений в печени выявлено не было. В тонкой кишке крыс обеих групп эпителиальные клетки были представлены в виде ровного монослоя, без очагов десквамации эпителия. По сравнению с контрольной группой, визуально отмечено увеличение числа активных бокаловидных клеток, усиление митотической активности клеток в криптах, кроме того, видна умеренная диффузная инфильтрация лимфоцитами слизистой оболочки. Эти данные указывают на способность штаммов положительно влиять на стабильность плотных контактов эпителиоцитов и выработку слизи бокаловидными клетками кишечника, что приводит к усилению целостности эпителиального барьера, и, тем самым, потенциально защищает внутреннюю среду организма от вторичной колонизации.

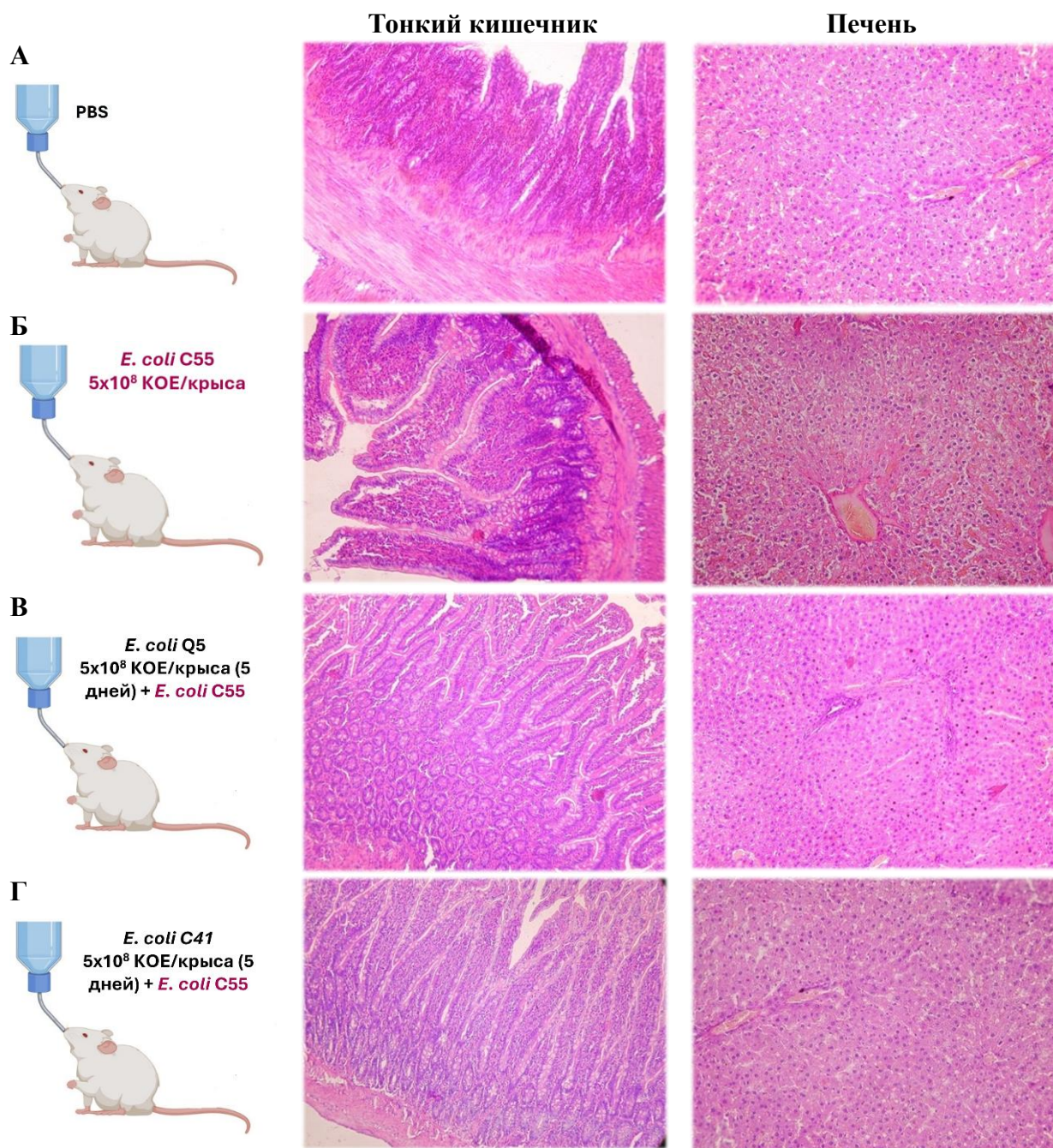


Рисунок 23 – Влияние бактерий *E. coli* Q5 и C41 на выраженность гистопатологических изменений печени и тонкого кишечника крыс при экспериментальной токсикоинфекции, вызванной *E. coli* C55. А-Г – Срезы тонкого кишечника и печени, окрашенные гематоксилином и эозином, взятые у крыс контрольной группы, получавших *E. coli* Q5 или *E. coli* C41 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову в день в течение 5 дней с последующим однократным заражением *E. coli* C55 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову или без заражения, ув. $\times 200$

5.7.3. Влияние *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 на состав кишечной микробиоты крыс в норме и в модели экспериментальной инфекции

Фоновые показатели содержания микроорганизмов кишечной микробиоты крыс до эксперимента составляли: $8,0 \pm 0,0$ lg(КОЕ/г) *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp., $6,1 \pm 0,2$ lg(КОЕ/г) *Enterococcus* spp., $5,4 \pm 0,2$ lg(КОЕ/г) *E. coli*, $7,8 \pm 0,1$ lg(КОЕ/г) *Staphylococcus* spp., $4,3 \pm 0,3$ lg(КОЕ/г) *Candida albicans*. Сравнение содержания основных представителей микробиоты показало, что после введения *E. coli* C41 количество бифидобактерий и лактобактерий увеличилось по сравнению с контрольной группой, хотя разница не достигла статистической значимости (Рисунок 24). Содержание типичной *E. coli* значительно увеличилось с $5,4 \pm 0,2$ до $6,3 \pm 0,1$ lg(КОЕ/г) после введения *E. coli* Q5 ($p = 0,003$), до $6,8 \pm 0,4$ lg(КОЕ/г) после введения *E. coli* C41 ($p = 0,002$), что свидетельствует о способности штаммов сохраняться в кишечнике. Следовательно, введение *E. coli* Q5 и C41 не нарушало структуру основных представителей кишечной микробиоты и сопровождалось увеличением количества типичной *E. coli*.

В результате введения токсигенного штамма *E. coli* C55 в кишечной микробиоте крыс появилась гемолитическая кишечная палочка (*E. coli* hem⁺) в количестве $4,6 \pm 1,2$ lg(КОЕ/г). Стоит отметить, что количество *E. coli* hem⁺ после предварительного введения *E. coli* Q5 было значительно ниже, чем у крыс группы инфекционного контроля ($p = 0,04$), а после предварительного введения *E. coli* C41 не была обнаружена. Полученные данные могут указывать на способность исследуемых штаммов препятствовать кишечной колонизации или персистенции токсигенного энтеропатогена. В группе инфекционного контроля увеличилось количество *C. albicans* и *K. pneumoniae* по сравнению с группой интактных животных, что может отражать нарушение микробиологического равновесия кишечника на фоне инфекции. Поскольку штамм *E. coli* C55 был устойчив к ампициллину, мы определили изменение его содержания в кишечнике в динамике (в течение 3 дней после его введения). В группах с предварительным введением *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 на 3 день наблюдалось снижение количества *E. coli* Amp^R на

два порядка, тогда как в группе инфекционного контроля содержание *E. coli* Amp^R незначительно отличалось от исходно введенного количества.

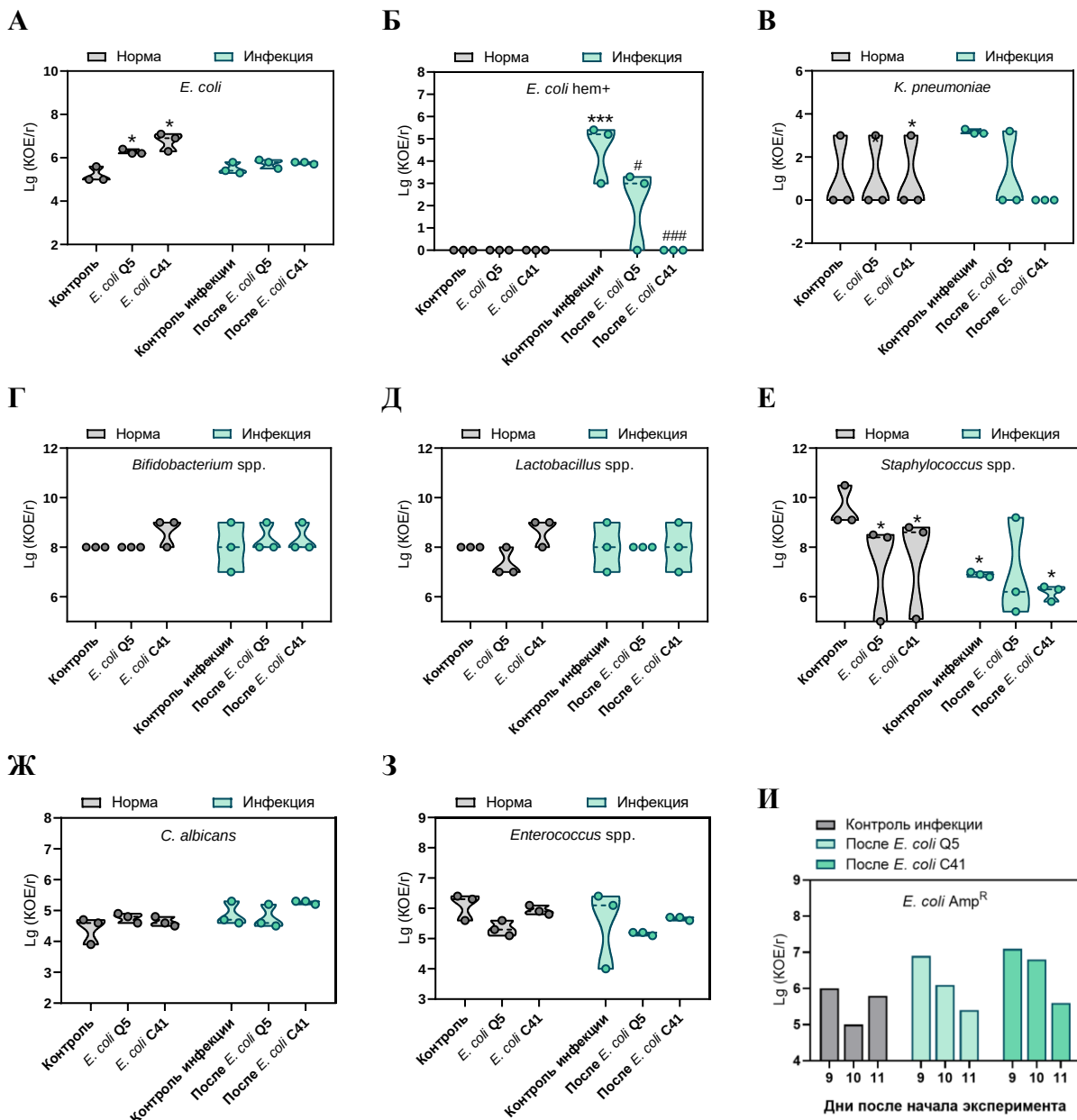


Рисунок 24 – Влияние бактерий *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 на состав основных представителей микробиоты кишечника крыс в норме и в модели экспериментальной инфекции. А-З – Количественное содержание представителей кишечной микробиоты крыс, получавших перорально *E. coli* Q5 или *E. coli* C41 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову в день в течение 5 дней с последующим однократным заражением *E. coli* C55 в дозе 5×10^8 КОЕ/голову или без заражения. И – Динамика содержания устойчивых к ампициллину *E. coli* Amp^R, отражающая изменение количества бактерий *E. coli* C55 в кишечнике крыс после их введения на 8 день эксперимента. «*» или «#» – разница статистически достоверна в сравнении с интактным контролем или контролем инфекции соответственно. Статистический анализ проведен с помощью теста Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна на множественность; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проведено комплексное исследование молекулярно-генетического разнообразия бактериоцин-продуцирующих штаммов *E. coli* различных эколого-патотипических групп. Показано, что бактериоциногенность может одновременно выступать фактором конкурентоспособности, высокой антагонистической активности и потенциальным маркером сложного адаптивного генотипа, включающего признаки, ассоциированные с патогенностью.

Было выявлено, что штаммы АРЕС имели специфичные профили генов бактериоцинов и отчетливо обособлялись от UPEC и комменсальных *E. coli*. Наибольший вклад в это разделение вносили гены бактериоцинов MccB17, MccJ25, ColB, ColM с различными механизмами действия: повреждением ДНК-гиразы, ингибированием РНК-полимеразы, нарушением целостности цитоплазматической мембраны и гидролизом липида II (предшественника пептидогликана) соответственно (Parker *et al.*, 2022). Анализ ассоциаций показал частое совместное присутствие ColM и ColB в штаммах АРЕС. Полученные результаты согласуются с данными о распространении среди АРЕС ColBM-плазмид (например, pAREC-O1-ColBM), генетически родственных ColV-плазмидам вирулентности и способных одновременно нести гены бактериоцинов и патогенности (Johnson *et al.*, 2006; Mellata *et al.*, 2009). Следовательно, полученные результаты могут отражать не только эколого-патотипическую специализацию, но и генетическую структуру исследованной коллекции АРЕС.

Настоящее исследование продемонстрировало различия в организации локуса микроцина V между штаммами *E. coli* различных групп. Высокая частота встречаемости *E. coli* с полноценными локусами у АРЕС и комменсальных штаммов птиц по сравнению с комменсальными штаммами животных и человека может отражать особенности кишечной микробиоты птиц и распространение ColV-подобных плазмид. Выявленные различия *sva*-локусов также может отражать эволюцию плазмид, включая сохранение полного кластера, утрату или

реорганизацию отдельных генов. Примером частично редуцированного *cva*-локуса является плаزمида p1ColV5155, описанная у птичьего патогенного штамма *E. coli* IMT5155. Эта плазмида включает гены экспорта *cvaA* и *cvaB*, но не содержит структурного гена *cvaC* и гена иммунитета *cvi* (Zhu Ge *et al.*, 2014).

Профили бактериоцинов UPEC были ближе к комменсальным *E. coli*, чем к APES, хотя оба патотипа относятся к группе ExPEC. Вероятно, это связано с генетическим разнообразием штаммов ExPEC и их адаптацией к разным хозяевам и экологическим нишам. Сходство профилей UPEC и комменсальных *E. coli* можно объяснить тесной экологической и эволюционной связью этих групп. Кишечник рассматривается как основной резервуар UPEC, откуда отдельные клоны могут попадать в мочевыводящие пути. Настоящая работа продемонстрировала, что штаммы UPEC характеризуются доминированием генов микроцинов-сидерофоров MccM и MccH47. Аналогично в работе Šmajš *et al.* изоляты, выделенные при инфекциях мочевыводящих путей, часто содержали гены бактериоцинов MccH47 и ColE1 (Šmajš *et al.*, 2010). Сходный профиль был описан Abraham *et al.* при сравнении штаммов, вызывающих симптоматические и бессимптомные инфекции мочевыводящих путей: среди 159 изолятов наиболее распространенными были *E. coli*, кодирующие MccM (31%), MccH47 (30%), ColIa/ColIb (14%), ColE1 (12%) и MccV (11%) (Abraham *et al.*, 2012). При этом обнаруженное нами сочетанное присутствие микроцинов-сидерофоров MccM и MccH47 также подтверждалось в этом исследовании: MccM и MccH47 встречались совместно у 43 из 49 штаммов. В условиях мочевыводящих путей и воспаления доступность железа ограничена, поэтому наличие систем захвата железа может одновременно обеспечивать питание бактерии и конкурентное преимущество. В работе Abraham *et al.*, носительство MccM/MccH47 ассоциировалось с большим числом факторов вирулентности, включая *hlyA*, *cnf1*, *focG* и *iroN*. Авторы связали этот комплекс признаков с высокой способностью UPEC к колонизации мочевыводящих путей (Abraham *et al.*, 2012).

Комменсальные *E. coli* отличались разнообразием профилей бактериоцинов, у всех продуцентов присутствовал хотя бы один пороформирующий бактериоцин, а большинство штаммов содержали гены бактериоцинов с двумя и более

механизмами действия. Полученный результат соответствует современным представлениям о высокой вариабельности бактериоциновых систем *E. coli*. В классическом исследовании Gordon и O'Brien из 102 бактериоцин-продуцирующих фекальных штаммов человека 42% продуцировали один тип бактериоцина, 41% – два типа, 16% – три типа, то есть, более половины продуцентов в этой коллекции были мультипродуцентами, что согласуется с результатами настоящего исследования (Gordon, O'Brien, 2006). Множественная бактериоциногенность повышает конкурентноспособность и приспособленность микроорганизма в разных биотопах. Синтез бактериоцинов, белков транспорта и белков иммунитета требует ресурсов, а продукция некоторых колицинов может быть связана с повреждением или лизисом части продуцирующей популяции (Gillor *et al.*, 2008). Поэтому сохранение нескольких функциональных локусов бактериоцинов, вероятно, поддерживается в тех условиях, где преимущество от подавления конкурентов с помощью бактериоцинов компенсирует метаболические/энергетические затраты на их синтез. Важно отметить, что наличие генетических локусов нескольких бактериоцинов не свидетельствует об их одновременной продукции. Разные локусы могут активироваться под влиянием разных условий. Примером служит воспалительная среда кишечника, где одновременно изменяются доступность железа, концентрация активных форм кислорода, концентрация метаболитов и состав микробного сообщества. Окислительный стресс вызывает повреждение бактериальной ДНК и активирует SOS-ответ, регулируемый системами RecA–LexA, тогда как дефицит железа влияет на Fur-зависимую регуляцию (Stecher *et al.*, 2015; Sassone-Corsi *et al.*, 2016). Эти сигналы способны изменять экспрессию генов бактериоцинов (Nedialkova *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2017). В экспериментальной модели показано, что провоспалительная среда усиливала конкуренцию энтеробактерий в кишечнике, что было связано с продукцией ColIb. У продуцирующего штамма *Salmonella enterica* serovar Typhimurium повышалась экспрессия генов продукции ColIb, а у чувствительных комменсальных *E. coli* – экспрессия рецептора CirA. При этом конкурентное преимущество ColIb-продуцирующего штамма наблюдалось именно в условиях

воспаления и практически отсутствовало в невоспалённом кишечнике (Nedialkova *et al.*, 2014).

В литературе были описаны как положительные (Dobson *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2025), так и слабые либо отсутствующие связи между бактериоциногенией и вирулентностью (Ghazaryan *et al.*, 2019). Результаты проведенных исследований впервые показали, что связь бактериоциногении с факторами патогенности имеет эколого-патотипическую специфику: у АРЕС значимых различий между продуцентами и непродуцентами не выявлено, тогда как у UPEC и комменсальных штаммов продуценты характеризовались большим числом и распространенностью генов патогенности. Полученные результаты согласуются с данными о связи бактериоциногении с вирулентными свойствами человеческих ExPEC. Micenková *et al.* показали, что среди 407 ExPEC частота бактериоциногении была выше, чем среди фекальных комменсальных *E. coli*: 63,1 против 54,2% (Micenková *et al.*, 2016; Micenková *et al.*, 2018). Данные настоящей работы расширяют эти наблюдения. Если в объединенной группе ExPEC бактериоциногения, в среднем, связана с более высоким патогенным потенциалом, то при отдельном анализе АРЕС и UPEC выявляются различия: у UPEC бактериоцин-продуцирующие штаммы характеризовались большим числом генов патогенности, в то же время у АРЕС такой зависимости не обнаружено. Подобное расхождение может объясняться тем, что у АРЕС гены бактериоцинов и патогенности уже широко распространены в исследованной популяции. В условиях высокой распространенности ColV- и ColBM-ассоциированных плазмид большинство АРЕС может одновременно нести детерминанты бактериоцинов, гены захвата железа, устойчивости к сыворотке (*iss*), протеазы наружной мембраны (*ompT*), гемолизина (*hlyF*) и другие факторы.

Была обнаружена ассоциация микроцинов-сидерофоров MscM и MscH47 с генами захвата железа; особенно тесная связь выявлена с *iroN*, кодирующим рецептор к сидерофору сальмохелину. В работе Patzer *et al.* рецепторы FerA, Cir, Fiu и IroN были рассмотрены как потенциальные рецепторы микроцинов MscM и MscH47 (Patzer, 2003). Следовательно, наличие *iroN* может иметь двойное значение: обеспечивать захват железа в составе сальмохелина и при этом быть

мишенью для микроцинов-сидерофоров. Авторы показали, что локусы MccM/MccH47 могут быть генетически связаны с системами синтеза сальмохелинов, что подтверждает функциональную сопряженность микроциновых и сидерофорных систем. Полученные результаты особенно согласуются с данными по распространенности факторов в группе UPEC. Микроцины-сидерофоры MccM и MccH47 широко распространены среди UPEC и часто встречаются в сочетании с системами захвата железа (Patzner, 2003). В обзоре Massip и Oswald показано, что у UPEC кластеры MccH47/MccM часто входят в состав небольших геномных островов и функционально взаимодействуют с островами *iroA* и *pks*. Авторы описали «триаду» генетических систем (микроцины, сальмохелин и колибактин), которая может обеспечивать кишечную колонизацию, выживание в условиях дефицита железа и последующее развитие внекишечной инфекции (Massip, Oswald, 2020).

В настоящем исследовании показано, что бактериоциногенная была связана с наличием *traJ* — маркера конъюгативных плазмид. Полученные данные согласуются с общими представлениями о генетической организации колицинов. Большинство колицинов кодируется плазмидами, которые содержат не только структурный ген токсина, но и гены иммунитета, экспорта или лизиса. Такие плазмиды могут быть небольшими автономными, либо крупными мобилизуемыми или конъюгативными плазмидами. Важное подтверждение этому получено в работе Jeziorowski и Gordon, где было показано, что ColIa и MccV часто встречаются совместно (Jeziorowski, Gordon, 2007). Локусы этих бактериоцинов были локализованы на одной конъюгативной плазмиде, более того, перенос оперона микроцина V сопровождался переносом *iroNEDCB* и *iss* — генов, связанных с захватом железа и устойчивостью к сыворотке.

Бактериоцин-продуцирующие комменсальные *E. coli* представляют интерес как потенциальные пробиотические микроорганизмы благодаря способности одновременно ограничивать рост и колонизацию близкородственных патогенов, влиять на структуру кишечного микробного сообщества и взаимодействовать с эпителиальными и иммунными клетками хозяина (Sassone-Corsi *et al.*, 2016;

Sonnenborn, 2016; Ma *et al.*, 2023; Mihailovskaya *et al.*, 2023). Наиболее изученным примером является пробиотический штамм *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Показано, что микроцины EcN подавляли рост конкурирующих представителей *Enterobacterales*, включая *Salmonella enterica* и адгезивно-инвазивные *E. coli* (Sassone-Corsi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2023). В модели воспаления кишечника микроцины помогали EcN ограничивать распространение энтеробактерий и сохранять конкурентоспособность в условиях, при которых состав микробиоты изменяется в пользу факультативных анаэробов. Как было отмечено выше, при воспалении кишечника доступность железа снижается, а экспрессия генов, кодирующих системы захвата железа, у энтеробактерий возрастает, поэтому именно в воспаленной нише микроцины-сидерофоры могут приобретать особое конкурентное значение (Schaible, Kaufmann, 2004; Winter *et al.*, 2013).

Наиболее тяжелые кишечные инфекции вызывают энтерогеморрагические (продуцирующие шига-токсины Stx1 и/или Stx2) и энтеротоксигенные (продуцирующие энтеротоксин EAST1 и/или энтерогемолизин EhxA) штаммы *E. coli* (Melton-Celsa, 2014; Veilleux, Dubreuil, 2004; Lorenz *et al.*, 2018). В нашем исследовании эти токсины, вырабатываемые резистентными к β -лактамным антибиотикам бактериями *E. coli* C55, приводили к патологическим изменениям в кишечнике инфицированных крыс (воспалению, десквамации эпителия, очаговой лимфоцитарной инфильтрации) и повышению уровня щелочной фосфатазы. В настоящем исследовании было показано, что предварительное введение штаммов *E. coli* Q5 и C41 в течение 5 дней в дозе 5×10^8 КОЕ/голову защищало крыс от колонизации и патогенного воздействия *E. coli* C55. Если доля гемолитических *E. coli* в группе инфекционного контроля составляла более половины всех эшерихий, то после предварительного введения *E. coli* Q5 гемолитические *E. coli* были обнаружены только у одного животного, а после введения *E. coli* C41, не были обнаружены. Эти результаты указывают на выраженное защитное действие штаммов, причем *E. coli* C41 проявил более сильный эффект, вероятно, за счет своей антигенной структуры (O149:H2), имитирующей энтеропатогенные *E. coli*, и более высокой колонизационной активности, чем *E. coli* Q5. Таким образом, новые

штаммы могут быть перспективными кандидатами и, после дополнительной генетической и функциональной оценки, использованы для создания живых бактериальных препаратов для профилактики кишечных инфекций.

Перспективы разработки темы связаны с изучением способности исследованных штаммов модулировать иммунный ответ, микробиоту и барьерную функцию кишечника в условиях нормы и воспаления. Полученные данные формируют основу для биотехнологической разработки новых ветеринарных и, в перспективе, медицинских пробиотических препаратов на основе бактериоцин-продуцирующих бактерий.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что профили генов бактериоцинов *E. coli* зависели от эколого-патотипической принадлежности штаммов. АРЕС чаще были позитивны по фенотипу продукции, имели наибольшее количество генов бактериоцинов среди всех групп с доминированием MscB17, ColM, ColB. UPEC характеризовались доминированием микроцинов-сидерофоров MscM и MscH47. Комменсальные штаммы отличались доминированием пороформирующих бактериоцинов ColE1, ColB, ColIa, ColIb, MscV.
2. Выявлено, что изоляты UPEC с несколькими бактериоцинами в геноме, а также бактериоцин-продуцирующие комменсальные штаммы *E. coli* имели более выраженные профили патогенности. В группе АРЕС бактериоциногенность не была связана с более высокой частотой встречаемости детерминант патогенности.
3. Обнаружено, что бактериоцин-продуцирующие АРЕС и комменсальные *E. coli* чаще имели фенотип множественной устойчивости к антибиотикам и несли ген-маркер конъюгативных плазмид *traJ*.
4. Выделены и детально охарактеризованы два биотехнологически перспективных штамма *E. coli* Q5 и *E. coli* C41. Показано, что их бесклеточные культуральные жидкости ингибировали рост условно-патогенных штаммов эффективнее, чем *E. coli* M-17; бактерии обладали большим сродством к эритроцитам животных, чем к эритроцитам человека; обладали совместимостью с представителями комменсальной микробиоты (*Lactobacillus* spp.) и приемлемыми профилями безопасности *in silico*.
5. Установлено, что предварительное пероральное введение *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 крысам до экспериментальной инфекции приводило: к нормализации концентрации щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы и креатинина в крови; снижению выраженности гистопатологических изменений печени и кишечника; а также способствовало снижению количества гемолитических *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus* spp. в кишечнике крыс.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЛРС	– β -лактамазы расширенного спектра
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИМВП	– инфекции мочевыводящих путей
КОЕ	– колониеобразующие единицы
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ААИ	– средний индекс адгезии (от англ. <i>average adhesion index</i>)
АС	– коэффициент адгезии (от англ. <i>adhesion coefficient</i>)
ADP	– аденозиндифосфат
AMP	– аденозинмонофосфат
АРЕС	– патогенные для птиц <i>E. coli</i> (от англ. <i>avian pathogenic E. coli</i>)
ARG	– гены устойчивости к антибиотикам (от англ. <i>antimicrobial resistance genes</i>)
АТСС	– американская коллекция типовых культур (от англ. <i>American type culture collection</i>)
BGC	– кластер биосинтетических генов (от англ. <i>biosynthetic gene cluster</i>)
CDS	– кодирующая последовательность (от англ. <i>coding DNA sequence</i>)
ЕАЕС	– энтероаггративные <i>E. coli</i> (от англ. <i>enteroaggregative E. coli</i>)
EcN	– <i>E. coli</i> Nissle 1917
ЕНЕС	– энтерогеморрагические <i>E. coli</i> (от англ. <i>enterohemorrhagic E. coli</i>)
ЕІЕС	– энтероинвазивные <i>E. coli</i> (от англ. <i>enteroinvasive E. coli</i>)
ЕРЕС	– энтеропатогенные <i>E. coli</i> (от англ. <i>enteropathogenic E. coli</i>)
ERIC-PCR	– полимеразная цепная реакция с праймерами к межгенным повторяющимся последовательностям (от англ. <i>enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR</i>)
ЕТЕС	– энтеротоксигенные <i>E. coli</i> (от англ. <i>enterotoxigenic E. coli</i>)

ExPEC	– экстраинтестинальные патогенные <i>E. coli</i> (от англ. <i>extraintestinal pathogenic E. coli</i>)
IAM	– индекс адгезивности микроорганизмов (от англ. <i>index of adhesiveness of microorganisms</i>)
InPEC	– интестинальные патогенные <i>E. coli</i>
LB	– питательная среда Лурия-Бертани (от англ. <i>Luria-Bertani medium</i>)
LT	– термолабильный энтеротоксин (от англ. <i>heat-labile enterotoxin</i>)
NMEC	– <i>E. coli</i> , ассоциированные с неонатальным менингитом (от англ. <i>neonatal meningitis E. coli</i>)
OD	– оптическая плотность (от англ. <i>optical density</i>)
OR	– отношение шансов
PAI	– острова патогенности (от англ. <i>pathogenicity islands</i>)
PCA	– анализ главных компонент (от англ. <i>principal component analysis</i>)
STEC	– <i>E. coli</i> , продуцирующие шига-токсин (от англ. <i>shiga toxin-producing E. coli</i>)
UPEC	– уропатогенные <i>Escherichia coli</i> (от англ. <i>uropathogenic E. coli</i>)
95% CI	– 95%-ный доверительный интервал

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю – д.м.н., проф., в.н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии ИЭГМ УрО РАН, зав. кафедрой микробиологии и клинической лабораторной диагностики ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Марине Валентиновне Кузнецовой. Благодарю за возможность учиться, работать над актуальными научными вопросами современной микробиологии, мудрое руководство и плодотворное сотрудничество на протяжении многих лет. Выражаю огромную благодарность за мои первые шаги в науке, внимание, терпеливое отношение к моим стремлениям, поддержку самых амбициозных идей и ценные жизненные советы. Ваша забота, научный талант и неиссякаемая энергия стали источником личного и профессионального вдохновения.

Я благодарна нашим студентам – Полине Селивановой, Дарье Кочергиной, Виктории Кадыко за взаимопомощь, поддержку, создание прекрасной атмосферы в команде, обсуждение научных результатов. Благодарю коллег, которые помогали на разных этапах работы над темой исследований. Мы благодарим профессора биотехнологического факультета университета Любляны Marjanca Starcic Erjavec за содействие в работе и сотрудничество. Выражаем благодарность сотрудникам кафедры микробиологии и клинической лабораторной диагностики, кафедры гистологии, а также центральной научно-исследовательской лаборатории ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера за помощь в выделении культур и проведении экспериментов *in vivo*. Выражаю благодарность инженеру лаборатории молекулярной биотехнологии ИЭГМ УрО РАН Наталье Борисовне Ремезовской за обучение бактериологическим методам.

Мы очень признательны д.м.н., проф. Валерию Александровичу Несчисляеву за предоставленные культуры *L. fermentum* 90T-C4, *L. plantarum* 8P-A3 и *L. acidophilus* K3Ш24, консультацию и ценные методологические советы. Я благодарна Валентине Грушиной за консультационную поддержку по анализу общедоступных геномных данных и коллегам лаборатории анализа метагеномов Института биологии гена РАН – Дмитрию Сутормину, Артему Исаеву и д.б.н., проф. Константину Викторовичу Северинову – за помощь в проведении полногеномного секвенирования штаммов и вдохновляющее сотрудничество. Выражаю благодарность преподавателям и коллегам направления магистратуры «Иммунобиология и биомедицина» НТУ «Сириус» за обучение современным иммунологическим методам исследований и высоким научным стандартам.

Я искренне благодарна моей семье за невероятное терпение, веру, опору в трудные моменты и бесконечную поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балко, А.Б. Характеристика, свойства, перспектива применения бактериоцинов / А.Б. Балко // Микробиологический журнал. – 2012. – Т. 74, № 6. – С. 99–106.
2. Заславская, М.И. Перспективы использования бактериоцинов нормальной микробиоты в антибактериальной терапии: обзор / М.И. Заславская, Т.В. Махрова, Н.А. Александрова, Н.И. Игнатова, И.В. Белова, А.Г. Точилина, И.В. Соловьева // Современные технологии в медицине. – 2019. – Т. 11, № 3. – С. 136–145.
3. Михайловская, В.С. Патогенный потенциал интестинальных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от здоровых коров и телят в хозяйствах Пермского края / В.С. Михайловская, Н.Б. Ремезовская, И.Н. Жданова, М. Starčič Erjavec, М.В. Кузнецова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26, № 5. – С. 486–494.
4. Онищенко, Г.Г. Молекулярно-генетическая характеристика шигатоксинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году / Г.Г. Онищенко, И.А. Дятлов, Э.А. Светоч, Н.В. Воложанцев, В.А. Баннов, Н.Н. Карцев // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70, № 1. – С. 70–81.
5. Abraham, S. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections / S. Abraham, T.A. Chapman, R. Zhang, J. Chin, A.N. Mabbett, M. Totsika // Journal of Clinical Microbiology. – 2012. – Vol. 50, No. 3. – P. 1027–1030.
6. Ahire, J.J. A potential probiotic culture ST2 produces siderophore 2,3-dihydroxybenzoylserine under intestinal conditions / J.J. Ahire, K.P. Patil, B.L. Chaudhari, S.B. Chincholkar // Food Chemistry. – 2011. – Vol. 127, No. 2. – P. 387–393.
7. 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. Shimamoto // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73. – P. 6686–6690.
8. Aleisa, A.M. Molecular detection of β -lactamases and aminoglycoside resistance genes among *Escherichia coli* isolates recovered from medicinal plant / A.M. Aleisa // African Journal of Microbiology Research. – 2013. – Vol. 7. – P. 2305–2310.
9. Allen, V.G. Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ontario, Canada / V.G. Allen, D.J. Farrell, A. Rebbapragada, J. Tan, N. Tijet, S.J. Perusini, L. Towns, S. Lo, D.E. Low, R.G. Melano // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2011. – Vol. 55, No. 2. – P. 703–712.

10. Alouf, J. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins / J. Alouf, D. Ladant, M. Popoff. – 3rd ed. – France: Elsevier, 2005. – 956 p.
11. Andriukov, B.G. Mobile genetic elements of prokaryotes and their role in the formation of antibiotic resistance in pathogenic bacteria / B.G. Andriukov, N.N. Besednova, T.S. Zaporozhets // Antibiotics and Chemotherapy. – 2022. – Vol. 67. – P. 62–74.
12. Assega, B.G. Bacteriocins as natural weapon against cancer: *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* perspectives / B.G. Assega, K.N. Tsegaye, T. Mitiku // Discover Applied Sciences. – 2025. – Vol. 7. – Article 940.
13. Bélanger, L. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli* / L. Bélanger, A. Garenaux, J. Harel, M. Boulianne, E. Nadeau, C.M. Dozois // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2011. – Vol. 62, No. 1. – P. 1–10.
14. Benítez-Chao, D.F. Bacteriocins: an overview of antimicrobial, toxicity, and biosafety assessment by *in vivo* models / D.F. Benítez-Chao, A. León-Buitimea, J.A. Lerma-Escalera, J.R. Morones-Ramírez // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12. – Article 630695.
15. Bien, J. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage / J. Bien, O. Sokolova, P. Bozko // International Journal of Nephrology. – 2012. – Vol. 2012. – Article 681473.
16. Biran, D. Surviving serum: the *Escherichia coli iss* gene of extraintestinal pathogenic *E. coli* is required for the synthesis of group 4 capsule / D. Biran, T. Sura, A. Otto, Y. Yair, D. Becher, E.Z. Ron // Infection and Immunity. – 2021. – Vol. 89, No. 10. – Article e00316-21.
17. Bok, E. Prevalence of virulence determinants and antimicrobial resistance among commensal *Escherichia coli* derived from dairy and beef cattle / E. Bok, J. Mazurek, M. Stosik, M. Wojciech, K. Baldy-Chudzik // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2015. – Vol. 12, No. 1. – P. 970–985.
18. Bosák, J. Porcine pathogenic *Escherichia coli* strains differ from human fecal strains in occurrence of bacteriocin types / J. Bosák, M. Hrala, V. Pirková, L. Micenková, A. Čížek, J. Smola, D. Kučerová, Z. Vacková, E. Budinská, I. Kolářková, Š. Šmajš // Veterinary Microbiology. – 2019. – Vol. 232. – P. 121–127.
19. Braun, V. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution / V. Braun, S.I. Patzer, K. Hantke // Biochimie. – 2002. – Vol. 84, No. 5–6. – P. 365–380.
20. Brilis, V.I. Metodika izucheniya adgezivnogo processa mikroorganizmov / V.I. Brilis, T.A. Brilene, K.P. Lentsner, A.A. Lentsner // Laboratornoe delo. – 1986. – № 4. – P. 210–215.

21. Caldas, V.E.A. Shiga toxin-producing *E. coli* and hemolytic uremic syndrome / V.E.A. Caldas // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, No. 23. – Article 13130.
22. Cameron, A. Bacteriocin occurrence and activity in *Escherichia coli* isolated from bovines and wastewater / A. Cameron, R. Zaheer, E.H. Adator, R. Barbieri, T. Reuter, T.A. McAllister // Toxins. – 2019. – Vol. 11, No. 8. – Article 475.
23. Campion, A. *In vivo* activity of nisin A and nisin V against *Listeria monocytogenes* in mice / A. Campion, P.G. Casey, D. Field // BMC Microbiology. – 2013. – Vol. 13. – Article 23.
24. Cao, Z. Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins / Z. Cao, P.E. Klebba // Biochimie. – 2002. – Vol. 84. – P. 399–412.
25. Cascales, E. Colicin biology / E. Cascales, S.K. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Lloubès, K. Postle, M. Riley, S. Slatin, D. Cavard // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2007. – Vol. 71, No. 1. – P. 158–229.
26. Cattoir, V. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France / V. Cattoir, L. Poirel, P. Nordmann // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2008. – Vol. 52. – P. 3801–3804.
27. 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. Chin // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, No. 7. – P. 4782–4795.
28. 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 // Environmental Microbiology Reports. – 2013. – Vol. 5, No. 1. – P. 58–65.
29. Croxen, M.A. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* / M.A. Croxen, R.J. Law, R. Scholz, K.M. Keeney, M. Wlodarska, B.B. Finlay // Clinical Microbiology Reviews. – 2013. – Vol. 26, No. 4. – P. 822–880.
30. Dai, Z. Effects of antimicrobial peptide microcin C7 on growth performance, immune and intestinal barrier functions, and cecal microbiota of broilers / Z. Dai, L. Shang, F. Wang, X. Zeng, H. Yu, L. Liu, J. Zhou, S. Qiao // Frontiers in Veterinary Science. – 2022. – Vol. 8. – Article 813629.
31. Dai, Z.Q. Immunomodulatory effects of microcin C7 in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice / Z.Q. Dai, L.J. Shang, Y.S. Wei, Z.Q. Li, X.F. Zeng, M.X. Chen, X.Y. Wang, S.Y. Li, S.Y. Qiao, H.T. Yu // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2023. – Vol. 71. – P. 12700–12714.

32. Dale, A.P. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones / A.P. Dale, N. Woodford // *Journal of Infection*. – 2015. – Vol. 71, No. 6. – P. 615–626.
33. Dobson, A. Bacteriocin production: a probiotic trait? / A. Dobson, P.D. Cotter, R.P. Ross, C. Hill // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – Vol. 78, No. 1. – P. 1–6.
34. Eklöf, V. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection / V. Eklöf, A. Löfgren-Burström, C. Zingmark, S. Edin, P. Larsson, P. Karling, O. Alexeyev, J. Rutegård, M.L. Wikberg, R. Palmqvist // *International Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 141, No. 12. – P. 2528–2536.
35. Elfazazi, K. Adhesion behavior of *Escherichia coli* strains on glass: role of cell surface qualitative and quantitative hydrophobicity in their attachment ability / K. Elfazazi, H. Zahir, S. Tankiouine, B. Mayoussi, C. Zanane, S. Lekchiri, M. Ellouali, E.M. Mliji, H. Latrache // *International Journal of Microbiology*. – 2021. – Vol. 2021. – Article 5580274.
36. Ewers, C. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) / C. Ewers, T. Janssen, L.H. Wieler // *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. – 2003. – Vol. 116, No. 9–10. – P. 381–395.
37. Ewers, C. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective / C. Ewers, A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther, L.H. Wieler // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2012. – Vol. 18. – P. 646–655.
38. Firoozeh, F. Detection of plasmid-mediated qnr genes among the quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates in Iran / F. Firoozeh, M. Zibaei, Y. Soleimani-Asl // *Journal of Infection in Developing Countries*. – 2014. – Vol. 8. – P. 818–822.
39. Ghazaryan, L. The effects of colicin production rates on allelopathic interactions in *Escherichia coli* populations / L. Ghazaryan, I. Giladi, O. Gillor // *Microorganisms*. – 2019. – Vol. 7, No. 11. – Article 564.
40. Gillor, O. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation / O. Gillor, J.A.C. Vriezen, M.A. Riley // *Microbiology*. – 2008. – Vol. 154, No. 6. – P. 1783–1792.
41. Godambe, L.P. Species-specific PCR-based detection of *Escherichia coli* from Indian foods / L.P. Godambe, J. Bandekar, R. Shashidhar // *3 Biotech*. – 2017. – Vol. 7, No. 2. – Article 130.
42. Gordon, D.M. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli* / D.M. Gordon, C.L. O'Brien // *Microbiology*. – 2006. – Vol. 152. – P. 3239–3244.

43. 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 Microbiology Letters. – 2011. – Vol. 314, No. 2. – P. 170–173.
44. Hendriksen, R.S. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of Salmonella Rissen from animals, food products and patients in Thailand and Denmark / R.S. Hendriksen, A. Bangtrakulnonth, C. Pulsrikarn, S. Pornreongwong, H. Hasman, S.W. Song, F.M. Aarestrup // Foodborne Pathogens and Disease. – 2008. – Vol. 5, No. 5.
45. Hrala, M. *Escherichia coli* strains producing selected bacteriocins inhibit porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* under both in vitro and in vivo conditions / M. Hrala, J. Bosák, L. Micenková, J. Křenová, M. Lexa, V. Pirková, Z. Tomáščíková, I. Koláčková, D. Šmajš // Applied and Environmental Microbiology. – 2021. – Vol. 87, No. 14. – Article e03121-20.
46. Jeziorowski, A. Evolution of Microcin V and Colicin Ia plasmids in *Escherichia coli* / A. Jeziorowski, D.M. Gordon // Journal of Bacteriology. – 2007. – Vol. 189, No. 19. – P. 7045–7052.
47. 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 // Journal of Infectious Diseases. – 2000. – Vol. 181, No. 1. – P. 261–272.
48. Johnson, T.J. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens / T.J. Johnson, Y. Wannemuehler, S.J. Johnson, A.L. Stell, C. Doetkott, J.R. Johnson, K.S. Kim, L. Spanjaard, L.K. Nolan // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 74, No. 22. – P. 7043–7050.
49. Johnson, T.J. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids / T.J. Johnson, S.J. Johnson, L.K. Nolan // Journal of Bacteriology. – 2006. – Vol. 188, No. 16. – P. 5975–5983.
50. Kaper, J.B. Pathogenic *Escherichia coli* / J.B. Kaper, J.P. Nataro, H.L.T. Mobley // Nature Reviews Microbiology. – 2004. – Vol. 2. – P. 123–140.
51. Kavaliauskiene, S. Protection against Shiga toxins / S. Kavaliauskiene, A.B.D. Lingelem, T. Skotland, K. Sandvig // Toxins. – 2017. – Vol. 9, No. 2. – Article 1–25.
52. Kerényi, M. Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains / M. Kerényi, H.E. Allison, I. Bátai, A. Sonnevend, L. Emödy, N. Plaveczyk, T. Pál // Journal of Clinical Microbiology. – 1998. – Vol. 36, No. 6. – P. 2965–2968.

53. Kim, S. *In vitro* antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lacticin NK34 against infection by *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis / S. Kim, S. Shin, H. Koo // Journal of Dairy Science. – 2010. – Vol. 93, No. 8. – P. 3610–3615.
54. 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 // Journal of Food Protection. – 2012. – Vol. 75. – P. 966–972.
55. Kuhar, I. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals / I. Kuhar, M. Grabnar, D. Žgur-Bertok // FEMS Microbiology Letters. – 1998. – Vol. 164, No. 2. – P. 243–248.
56. Lévesque, C. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes / C. Lévesque, L. Piché, C. Larose, P.H. Roy // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1995. – Vol. 39. – P. 185–191.
57. Li, X.S. Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from diseased chickens / X.S. Li, G.Q. Wang, X.D. Du, B.A. Cui, S.M. Zhang, J.Z. Shen // Journal of Veterinary Science. – 2007. – Vol. 8, No. 3. – P. 243–247.
58. Lorenz, S.C. Prevalence of hemolysin genes and comparison of ehxA subtype patterns in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and non-STEC strains from clinical, food, and animal sources / S.C. Lorenz, I. Son, A. Maounounen-Laasri, A. Lin, M. Fischer, J.A. Kase // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – Vol. 79. – P. 6301–6311.
59. Ma, Y. Antibacterial MccM as the major microcin in *Escherichia coli* Nissle 1917 against pathogenic enterobacteria / Y. Ma, W. Fu, B. Hong, X. Wang, S. Jiang, J. Wang // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, No. 14. – Article 11688.
60. Madoshi, B.P. Characterisation of commensal *Escherichia coli* isolated from apparently healthy cattle and their attendants in Tanzania / B.P. Madoshi, E. Kudirkiene, M.M. Mtambo, A.P. Muhairwa, A.M. Lupindu, J.E. Olsen // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, No. 12. – Article e0168160.
61. Mainga, A.O. Occurrence and characterization of seven major Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes from healthy cattle on cow–calf operations in South Africa / A.O. Mainga, B.T. Cenci-Goga, M.N. Malahlela, T. Tshuma, A. Kalake // Zoonoses and Public Health. – 2018. – Vol. 65, No. 7. – P. 777–789.
62. Manges, A.R. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry meat / A.R. Manges // Clinical Microbiology and Infection. – 2016. – Vol. 22, No. 2. – P. 122–129.

63. Massip, C. Siderophore-microcins in *Escherichia coli*: determinants of digestive colonization, the first step toward virulence / C. Massip, E. Oswald // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – Article 381.
64. Mellata, M. Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* chi7122 (O78:K80:H9) / M. Mellata, J.W. Touchman, R. Curtiss // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4, No. 1. – Article e4232.
65. Melton-Celsa, A.R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function / A.R. Melton-Celsa // *Microbiology Spectrum*. – 2014. – Vol. 2. – Article EHEC-0024-2013.
66. Micenková, L. *Escherichia coli* isolates from patients with inflammatory bowel disease: ExPEC virulence- and colicin-determinants are more frequent compared to healthy controls / L. Micenková, S. Březina, B. Jamborová, M. Doležalová, D. Šmajš // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2018. – Vol. 308, No. 5. – P. 498–503.
67. Micenková, L. Human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants / L. Micenková, J. Bosák, B. Štaudová, L. Mikalová, D. Čejková, V. Woznicová, M. Vrba, D. Šmajš // *BMC Microbiology*. – 2016. – Vol. 16. – Article 218.
68. Mihailovskaya, V.S. Bacteriocin-producing *Escherichia coli* Q5 and C41 with potential probiotic properties: in silico, in vitro, and in vivo studies / V.S. Mihailovskaya, D.A. Sutormin, M.O. Karipova, A.B. Trofimova, V.A. Mamontov, K. Severinov, M.V. Kuznetsova // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – Article 12636.
69. Mills, E.G. Bacteriocin production facilitates nosocomial emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* / E.G. Mills, K. Hewlett, A.B. Smith // *Nature Microbiology*. – 2025. – Vol. 10. – P. 871–881.
70. Moawad, A.A. Occurrence of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in raw chicken and beef meat in northern Egypt and dissemination of their antibiotic resistance markers / A.A. Moawad, H. Hotzel, O. Awad, H. Tomaso, H. Neubauer, H.M. Hafez, H. El-Adawy // *Gut Pathogens*. – 2017. – Vol. 9. – Article 57.
71. 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. Réperant, S. Laurent, A. Brée, S. Mignon-Grasteau, P. Germon, D. Rasschaert, C. Schouler // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2007. – Vol. 45, No. 10. – P. 3366–3376.
72. Naderi, G. Distribution of pathogenicity island (PAI) markers and phylogenetic groups in diarrheagenic and commensal *Escherichia coli* from young children / G. Naderi, F. Haghi, H. Zeighami, F. Hemati, N. Masoumian //

Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench. – 2016. – Vol. 9, No. 4. – P. 316–324.

73. 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 Microbiology Letters. – 2001. – Vol. 205, No. 1. – P. 71–76.

74. Nedialkova, L.P. Inflammation fuels colicin Ib-dependent competition of *Salmonella* serovar Typhimurium and *E. coli* in enterobacterial blooms / L.P. Nedialkova, R. Denzler, M.B. Koeppel, M. Diehl, D. Ring, T. Wille, R.G. Gerlach, B. Stecher // PLoS Pathogens. – 2014. – Vol. 10, No. 1. – Article e1003844.

75. Nougayrède, J.P. A toxic friend: genotoxic and mutagenic activity of the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 / J.P. Nougayrède, C.V. Chagneau, J.P. Motta, N. Bossuet-Greif, M. Belloy, F. Taieb, J.J. Gratadoux, M. Thomas, P. Langella, E. Nougayrède // mSphere. – 2021. – Vol. 6, No. 4. – Article e00624-21.

76. 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 // Pediatric Research. – 2003. – Vol. 54, No. 1. – P. 8–14.

77. O'Hara, R.W. Rapid detection of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* multi-locus sequence type 127 using a specific PCR assay / R.W. O'Hara, P.J. Jenks, M. Emery, M. Upton // Journal of Medical Microbiology. – 2019. – Vol. 68, No. 2. – P. 188–196.

78. Parker, J.K. Microcins reveal natural mechanisms of bacterial manipulation to inform therapeutic development / J.K. Parker, B.W. Davies // Microbiology. – 2022. – Vol. 168, No. 4. – Article 001175.

79. Patzer, S.I. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN / S.I. Patzer, W. Rabsch, A. Meinhart // Microbiology. – 2003. – Vol. 149. – P. 2557–2570.

80. Poirel, L. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* / L. Poirel, J.-Y. Madec, A. Lupo, A.K. Schink, N. Kieffer, P. Nordmann, S. Schwarz // Microbiology Spectrum. – 2018. – Vol. 6, No. 4.

81. Riley, L.W. Distinguishing pathovars from nonpathovars: *Escherichia coli* / L.W. Riley // Clinical Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 71, No. 6. – P. 1533–1538.

82. Russo, T.A. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem / T.A. Russo, J.R. Johnson // Microbes and Infection. – 2003. – Vol. 5, No. 5. – P. 449–456.

83. Saeed, M. A profile of drug resistance genes and integrons in *E. coli* causing surgical wound infections in the Faisalabad region of Pakistan / M. Saeed, A. Haque, A. Ali // Journal of Antibiotics. – 2009. – Vol. 62. – P. 319–323.
84. Santos, A.C.M. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: a review / A.C.M. Santos // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, No. 18. – Article 9922.
85. Sarowska, J. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports / J. Sarowska, B. Futoma-Kołoch, A. Jama-Kmiecik // Gut Pathogens. – 2019. – Vol. 11. – Article 10.
86. Sassone-Corsi, M. Microcins mediate competition among *Enterobacteriaceae* in the inflamed gut / M. Sassone-Corsi, S.P. Nuccio, H. Liu, D. Hernandez, C.T. Vu, A.A. Takahashi, R.A. Edwards, M. Raffatellu // Nature. – 2016. – Vol. 540, No. 7632. – P. 280–283.
87. Schaible, U.E. Iron and microbial infection / U.E. Schaible, S.H.E. Kaufmann // Nature Reviews Microbiology. – 2004. – Vol. 2. – P. 946–953.
88. Schamberger, G.P. Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli* / G.P. Schamberger, F. Diez-Gonzalez // Journal of Food Protection. – 2004. – Vol. 67, No. 3. – P. 486–492.
89. Shang, L. Recombinant antimicrobial peptide microcin J25 alleviates DSS-induced colitis via regulating intestinal barrier function and modifying gut microbiota / L. Shang, H. Yu, H. Liu, M. Chen, X. Zeng, S. Qiao // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 139. – Article 111127.
90. Šmajš, D. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor / D. Šmajš, L. Mícenková, J. Šmarda, M. Vrba, M. Ševčíková, I. Vagnerová // BMC Microbiology. – 2010. – Vol. 10. – Article 288.
91. Soltani, S. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations / S. Soltani, R. Hammami, P.D. Cotter, S. Rebuffat, L. Ben Said, H. Gaudreau, F. Bédard, E. Biron, D. Drider, I. Fliss // FEMS Microbiology Reviews. – 2021. – Vol. 45, No. 1. – Article fuaa039.
92. Sonnenborn, U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties / U. Sonnenborn // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – Vol. 363. – Article fnw212.
93. Starkey, M.A. A new zebrafish model of oro-intestinal pathogen colonization reveals a key role for probiotic adhesion factors / M.A. Starkey, A. Power // PLoS Pathogens. – 2012. – Vol. 8, No. 7. – Article e1002815.

94. Stecher, B. The roles of inflammation, nutrient availability and the commensal microbiota in enteric pathogen infection / B. Stecher // *Microbiology Spectrum*. – 2015. – Vol. 3, No. 3. – Article 10.1128/microbiolspec.MBP-0008-2014.
95. Strahilevitz, J. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat / J. Strahilevitz, G.A. Jacoby, D.C. Hooper, A. Robicsek // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2009. – Vol. 22. – P. 664–689.
96. Supotnitskiy, M.V. Bacterial toxins: their nature, modes of action, and opportunities for creating hybrid and modified toxins / M.V. Supotnitskiy // *Biopreparations*. – 2011. – No. 1. – P. 6–17.
97. Thaker, M. The tetracycline resistome / M. Thaker, P. Spanogiannopoulos, G.D. Wright // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2010. – Vol. 67. – P. 419–431.
98. Van Staden, A. Nisin F-loaded brushite bone cement prevented the growth of *Staphylococcus aureus in vivo* / A. Van Staden, A. Brand, L. Dicks // *Journal of Applied Microbiology*. – 2012. – Vol. 112, No. 4. – P. 831–840.
99. Veilleux, S. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals / S. Veilleux, J.D. Dubreuil // *Veterinary Research*. – 2006. – Vol. 37. – P. 3–13.
100. 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 Research*. – 1991. – Vol. 19, No. 24. – P. 6823–6831.
101. Vila, J. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings / J. Vila, E. Sáez-López, J.R. Johnson, U. Römling, U. Dobrindt, R. Cantón, C.G. Giske, T. Naas, A. Carattoli, M. Martínez-Medina // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2016. – Vol. 40, No. 4. – P. 437–463.
102. Winter, S.E. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut / S.E. Winter, M.G. Winter, M.N. Xavier // *Science*. – 2013. – Vol. 339, No. 6120. – P. 708–711.
103. Yang, F. Microcin C7 as a potential antibacterial-immunomodulatory agent in the postantibiotic era: overview of its bioactivity aspects and applications / F. Yang, J. Huang, H. Yu, S. Qiao // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, No. 13. – Article 7213.
104. Yu, H. Biosynthetic microcin J25 exerts strong antibacterial, anti-inflammatory activities, low cytotoxicity without increasing drug-resistance to bacteria target / H. Yu, L. Shang, G. Yang, Z. Dai, X. Zeng, S. Qiao // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – Article 811378.
105. Zawistowska-Rojek, A. Adhesion of probiotic bacteria to the human intestinal mucosa and their role in pathogen exclusion / A. Zawistowska-Rojek, S. Tyski // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8, No. 11.

106. Zeng, M.Y. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut / M.Y. Zeng, N. Inohara, G. Nuñez // *Mucosal Immunology*. – 2017. – Vol. 10, No. 1. – P. 18–26.
107. Zhang, T. Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian *Escherichia coli* in North China / T. Zhang, C.G. Wang, J.C. Lv, R.S. Wang, X.H. Zhong // *Poultry Science*. – 2012. – Vol. 91. – P. 2774–2777.
108. Zhao, Z. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 for inflammatory bowel disease applications / Z. Zhao, S. Xu, W. Zhang, D. Wu, G. Yang // *Food & Function*. – 2022. – Vol. 13, No. 11. – P. 5914–5924.
109. Zhu Ge, X. Comparative genomic analysis shows that avian pathogenic *Escherichia coli* isolate IMT5155 (O2:K1:H5; ST complex 95, ST140) shares close relationship with ST95 APEC O1:K1 and human ExPEC O18:K1 strains / X. Zhu Ge, J. Jiang, Z. Pan, L. Hu, S. Wang, H. Wang, F.C. Leung, J. Dai, H. Fan // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, No. 11. – Article e112048.