

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА УРОПАТОГЕННОГО ШТАММА
KLEBSIELLA PNEUMONIAE:
АННОТАЦИЯ И АНАЛИЗ ГЕНОМА,
АДГЕЗИВНЫЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Обучающийся 2 курса
группы 01-940-2



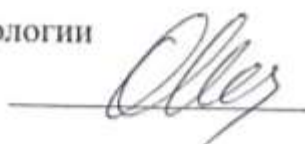
М.С. Родионова

Научный руководитель
д-р биол. наук, доцент



А.М. Марданова

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2021

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции мочевых путей (ИМП) вызываются бактериями, которые проникают в органы мочеполовой системы, вызывая воспаление и инфекцию. Хотя ИМП обычно возникает в уретре и мочевом пузыре, бактерии также могут перемещаться по мочеточникам и в дальнейшем привести к инфекции почек, одним из примеров которых является пиелонефрит. Женщины в 4 раза чаще мужчин страдают ИМП. Обычно эти инфекции впервые возникают в возрасте от 16 до 35 лет, при этом 10% женщин заражаются ежегодно, а более 40–60% страдают инфекцией хотя бы один раз в жизни. Рецидивы в случае ИМП считаются обычным явлением, и почти половина выздоровевших пациентов в течение года переносят повторную инфекцию [Bono, Reugaert, 2020]. Также к серьезным последствиям ИМП относятся повреждение почек у маленьких детей и преждевременные роды. В настоящее время среди уропатогенных бактерий, ставших причиной осложненного цистита, уросепсиса, пиелонефрита, чаще всего обнаруживают *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* [Wagenlehner *et al.*, 2020], поэтому в первую очередь исследователей интересуют механизмы патогенеза данных распространенных бактерий-возбудителей ИМП.

В медицинских учреждениях США с симптомами ИМП ежегодно регистрируется 10.5 миллионов обращений, кроме того, 2–3 миллионов случаев представляют собой острые ИМП, обращенные в отделения неотложной помощи. Предположительно 150 миллионов человек в мире ежегодно заболевают ИМП. В настоящее время затраты в США из-за ИМП составляют около 3.5 млрд долларов в год [Flores-Mireles *et al.*, 2015]. Согласно данным, опубликованным всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), 40% ИМП являются последствием внутрибольничных инфекций [WHO, 2009]. Пациенты с ослабленным иммунитетом подвергаются высокому риску развития оппортунистических инфекций. Раньше считалось, что данные инфекции возникают в результате

рецидива ранее приобретенных латентных инфекций, и поэтому нозокомиальная инфекция считалась настолько маловероятной, что не существовало никаких специальных мер контроля [Furuya, Yamaguchi, 1996]. Современная медицина не придерживается данной точки зрения, и сейчас известно, что условно-патогенные микроорганизмы передаются от одного пациента с ослабленным иммунитетом к другому воздушно-капельным путем, через медицинское оборудование или контакт с медицинским персоналом [Monegro *et al.*, 2020]. Результаты исследований показывают, что среди нозокомиальных инфекций ИМП являются вторыми по распространенности и составляют 15% случаев [Durando *et al.*, 2010; Custovic *et al.*, 2014].

По данным ВОЗ более 40% уропатогенных нозокомиальных инфекций составляют катетер-ассоциированные ИМП [WHO, 2009]. Вводимые катетеры позволяют микроорганизмам напрямую проникать в органы мочеполовой системы. Колонизация катетеров обеспечивается бактериальной адгезией и образованием биопленок. [Brusch, 2021]. По оценкам экспертов в настоящее время биопленки ответственны за более 65% внутрибольничных инфекций и 80% всех микробных инфекций. Бактерии в составе биопленок становятся более устойчивыми к пагубным воздействиям внешней среды [Soto, 2014]. Благодаря способности образовывать биопленки *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* оказались частыми причинами катетер-ассоциированных ИМП, при этом зачастую демонстрируя мультирезистентность [Vuotto *et al.*, 2014]. Кроме того, антибиотикорезистентность *K. pneumoniae* привела к распространению этого патогена среди больниц по всему миру [Vuotto *et al.*, 2014]. Так, *K. pneumoniae* выделяется у 77% госпитализированных пациентов [Podschun, Ullmann, 1998]. С каждым годом обнаруживается все больше гипервирулентных и мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* [Aleo *et al.*, 2017].

Распространенность возбудителей, сложности в лечении и опасные для здоровья последствия ИМП подчеркивают важность всестороннего изучения уропатогенных бактерий, в том числе и *K. pneumoniae*.

Целью настоящей работы являлась аннотация и анализ генома уропатогенного штамма *Klebsiella pneumoniae* RSC-2, а также характеристика его адгезивных и цитотоксических свойств.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1) Секвенирование генома *K. pneumoniae* RSC-2 и последующая сборка прочтений.

2) Функциональное аннотирование генома штамма RSC-2. Идентификация профагов внутри генома *K. pneumoniae*.

3) Биоинформатический анализ гомологии генома *K. pneumoniae* RSC-2 с геномами других штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из различных источников.

4) Характеристика морфологии бактерий, анализ влияния мочевины на рост бактерий при 30°C и 37°C и характеристика влияния температуры на адгезию штамма RSC-2 к абиотической поверхности.

5) Определение гемолитической активности и цитотоксичности *K. pneumoniae* RSC-2 в отношении клеточных линий A549 и Caco-2.

ВЫВОДЫ

1) Геном уропатогенного штамма *K. pneumoniae* RSC-2 секвенирован и собран в 91 контиг. Размер генома составляет 5491089 п.н. и его GC-состав равен 57.1%.

2) Аннотирование генома *K. pneumoniae* RSC-2 позволило идентифицировать 5406 генов, из которых 5285 кодируют белки, 22 гена рРНК, 87 генов тРНК и 91 псевдогенов. 58% генов отнесены к определенным функциональным группам. В геноме обнаружено 5 фаговых регионов, которые составляют 2.3% генома *K. pneumoniae* RSC-2.

3) Сравнительный анализ гомологии генома штамма *K. pneumoniae* RSC-2 с другими штаммами *K. pneumoniae* выявил различие менее чем 1%. Геном штамма RSC-2 имеет более высокую гомологию с геномами изолятов, выделенных от пациентов с ИМП, чем с геномами штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из биоматериалов здоровых людей

4) В экспоненциальной фазе роста культура *K. pneumoniae* RSC-2 представлена палочками, но с возрастом морфология клеток приближается к коккобациллярной. Оптимальной температурой роста бактерий является 37 °С. Присутствие 1.5% мочевины в среде LB слабо подавляет рост бактерий.

5) *K. pneumoniae* RSC-2 не синтезирует гемолизины и не проявляет гемолитической активности на кровяном агаре. Бактерии проявляют слабую цитотоксичность в отношении клеток линии A549 (карцинома легких) и не проявляют цитотоксичности в отношении клеток Caco-2 (аденокарцинома ободочной кишки).