

**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
АНАЛИЗ ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ
ШТАММОВ *KLEBSIELLA OXYTOSA* И ИНАКТИВАЦИЯ
ГЕНА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ**

Обучающийся 2 курса
группы 01-940-2



П.С. Мишева

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 мочевыводящих путей (ИМП) занимают третье место по распространенности во всем мире, а в Европе ИМП являются вторым по распространенности типом инфекций у людей [Gajdacs *et al.*, 2019]. ИМП распространены как среди амбулаторных, так и среди госпитализированных пациентов [Gajdacs *et al.*, 2019]. Фактически, госпитальные инфекции мочевыводящих путей являются наиболее распространенными инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. На их долю приходится 25-50% внутрибольничных инфекций в целом, что представляет серьезную экономическую проблему и проблему общественного здравоохранения [Gajdacs *et al.*, 2019]. ИМП чаще всего вызываются членами порядка *Enterobacterales* (типичные патогены – *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.*). Однако все более актуальными возбудителями ИМП как во внебольничных, так и в нозокомиальных условиях становятся бактерии, которые ранее редко выделялись при таких инфекциях (например, клад *Proteus-Providencia-Morganella* и клад *Citrobacter-Enterobacter-Serratia*) [Gajdacs *et al.*, 2019].

Klebsiella oxytoca, грамотрицательная инкапсулированная неподвижная бактерия, была признана условно-патогенным микроорганизмом, вызывающим инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, такие как инфекции мочевыводящих и дыхательных путей и сепсис, в первую очередь у пациентов с ослабленным иммунитетом и ослабленных пациентов, поступающих в отделения интенсивной терапии [Simon *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; De Belder *et al.*, 2018]. В норме она встречается в желудочно-кишечном тракте, слизистой оболочке дыхательных путей и на коже человека.

Serratia grimesii – грамотрицательная, условно-патогенная, факультативно-анаэробная палочковидная бактерия. Серрации – подвижные (перитрихи) палочки с закругленными концами; некоторые штаммы способны образовывать капсулы [Mahlen, 2011]. В природе бактерии выделяют из воды, почвы и различных растений. Из природных источников

могут колонизировать кишечник почвенных нематод, различных членистоногих, рептилий, грызунов, птиц и человека [Mahlen, 2011].

К факторам патогенности серраций относятся капсулы, сидерофоры, гемолизины, протеолитические ферменты и эндотоксины, а также факторы подвижности и прикрепления, такие как фимбрии и пили [Paczosa *et al.*, 2016]. *S. grimesii* продуцирует гримелизин, новую металлопротеиназу, которая обладает специфической активностью по отношению к скелетно-мышечному актину и опосредует инвазию клеток HEp-2 [Bozhokina *et al.*, 2011].

Целью работы являлся анализ вирулентных свойств штаммов *Klebsiella oxytoca* и инактивация гена гипотетической внутриклеточной гримелизиноподобной металлопротеиназы.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Биоинформационный анализ локуса гена гримелизиноподобной протеиназы *K. oxytoca*.
- 2) Сравнительная характеристика внеклеточной протеолитической активности штаммов *S. grimesii* A2 и *K. oxytoca* НК-1.
- 3) Сравнительная характеристика общей и специфической внутриклеточной протеолитической активности *S. grimesii* и *K. oxytoca*.
- 4) Инактивация гена гипотетической гримелизиноподобной металлопротеиназы.
- 5) Сравнительная характеристика адгезивных свойств *S. grimesii* и штаммов *K. oxytoca*.

ВЫВОДЫ

1) Установили, что ген гримелизиноподобной металлопротеиназы *K. oxytoca* NK-1 находится в одном опероне с геном гипотетического белка подобно генам *S. grimesii* A2. Гомология аминокислотных последовательностей металлопротеиназ этих бактерий составляет 74.1%.

2) Установили, что уровень внеклеточной протеолитической активности зависит от температуры культивирования бактерий. Оптимальной температурой для накопления внеклеточных протеиназ *S. grimesii* A2 является 30°C и максимум достигается на 48 ч роста. *K. oxytoca* обладает слабой внеклеточной активностью, которая зависит от температуры культивирования.

3) Установили, что оптимальной температурой для биосинтеза внутриклеточной протеиназы гримелизина *S. grimesii* A2 является 37°C и максимум активности достигается на 24 ч роста бактерий. Биосинтез внутриклеточных протеиназ *K. oxytoca* максимален на среде LB при 37°C на 48 ч роста.

4) С помощью λ Red-опосредованной рекомбинации получили мутанты *S. grimesii* и *K. oxytoca* с инактивированными генами металлопротеиназ.

5) Установили, что бактерии *S. grimesii* A2 обладают способностью к агглютинации дрожжевых клеток и D-манноза ингибирует гемагглютинацию, что свойственно фимбриям 1-го типа. Сравнительный анализ агглютинации дрожжей штаммами *K. oxytoca* с инактивированными генами адгезинов *fimH*, *mrkD₁* и *mrkD₂* показал, что исследуемый штамм экспрессирует фимбрии 1 и 3 типа.