

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: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И
АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ
БАКТЕРИИ

Обучающийся 4 курса
группы 01-904

"13" июня 2023 г.



Аристова А.О.

Научный руководитель

д-р биол. наук, профессор

"13" июня 2023 г.



Марданова А.М.

Заведующий кафедрой
микробиологии

д-р биол. наук, профессор

"13" июня 2023 г.



Ильинская О.Н.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Общая характеристика <i>M. morganii</i>	7
1.2 <i>M. morganii</i> как возбудитель заболеваний человека	9
1.3 Лекарственная устойчивость <i>M. morganii</i>	12
1.4 Факторы вирулентности <i>M. morganii</i>	15
1.4.1 Адгезивные свойства	16
1.4.2 Уреаза	17
1.4.3 RTX-токсины семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	19
Заключение	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	24
2.1 Объекты исследования	24
2.2 Питательные среды и условия культивирования	24
2.3 Окраска по Граму	24
2.4 Анализ гемолитической активности	24
2.5 Исследование адгезивных свойств <i>M. morganii</i>	25
2.5.1 Тест на агглютинацию суспензии дрожжей	25
2.5.2 Тест на гемагглютинацию (НА)	26
2.5.3 Характеристика адгезии бактерий к абиотическим поверхностям	26
2.6 Определение уреазной активности	26
2.7 Идентификация гена α -гемолизина	27
2.7.1 Выделение геномной ДНК изолята	27
2.7.2 ПЦР	28
2.7.3 Электрофорез ДНК	29

2.8 Биоинформатический анализ генома	30
2.9 Статистическая обработка результатов	30
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Исследование гемолитической активности штамма <i>M. morgani</i> 190	31
3.1.1 Качественное определение гемолитической активности	31
3.1.2 Количественное определение гемолитической активности в культуральной среде <i>M. morgani</i> 190	32
3.2 Характеристика адгезивных свойств штамма <i>M. morgani</i> 190	34
3.2.1 Влияние маннозы на агглютинацию дрожжей штаммом 190	34
3.2.2 Определение способности к гемагглютинации штамма 190	35
3.2.3 Определение адгезии бактерий к абиотическим поверхностям	37
3.2.4 Биоинформатический анализ кластеров генов фимбриальных белков	38
3.3 Влияние мочевины на гемолитическую активность штамма 190	45
3.3.1 Определение уреазной активности	45
3.3.2 Определение гемолитической активности	46
3.4 Идентификация генов α -гемолизина в геноме штамма <i>M. morgani</i> 190	48
3.4.1 Биоинформатический анализ кластеров гемолизинов	49
ВЫВОДЫ	52
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	53

ВВЕДЕНИЕ

Morganella morganii является обычным обитателем окружающей среды, кишечного тракта человека, млекопитающих и рептилий. Их можно обнаружить в загрязненной воде, почве, пищевых продуктах. Однако под воздействием различных неблагоприятных факторов концентрация микробов становится недопустимо высокой, и бактерии приобретают патогенные свойства. Поэтому *M. morganii* является также и частой причиной оппортунистических ИМП, сепсиса и раневых инфекций. Заболевания, вызываемые *M. morganii*, разнообразны. Бактерии могут вызывать инфекции мочевыделительной, пищеварительной и нервной систем, инфекции органов дыхания, а также септические состояния у пациентов любых возрастов [Zaric *et al.*, 2021]. Патогенность микроорганизмов обусловлена наличием ряда факторов вирулентности. В патогенности *M. morganii* адгезия является начальным этапом, на котором патоген взаимодействует с хозяином. Основным фактором вирулентности уропатогенных микроорганизмов является синтез уреазы [Jones and Mobley, 1987]. Кроме того, патогенность *M. morganii* объясняется наличием гемолизинов, протеаз IgA, липополисахаридов (LPS), а также некоторых других факторов вирулентности.

Долгое время *M. morganii* не воспринимали как клинически значимый патоген из-за редкой встречаемости данного микроорганизма. Но в последние годы лекарственная устойчивость бактерий *M. morganii* начала активно расти. Особенно важно клиницистам принимать во внимание *M. morganii* в условиях стационара, где происходит активное развитие множественной лекарственной устойчивости. Резистентность бактерий к антибиотикам приводит к неэффективности клинического лечения, а следовательно, и к большому проценту смертности среди больных [Zaric *et al.*, 2021]. *M. morganii* следует признать клинически значимым патогеном и включить эту бактерию в список возможных возбудителей заболеваний во время ухода за пациентами [Bandy,

2020]. Поэтому очень важно изучать вирулентные свойства *M. morganii*, чтобы научиться правильно и эффективно бороться с инфекциями, вызываемыми этим микроорганизмом.

Целью работы является характеристика вирулентных свойств *M. morganii* 190.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Характеристика гемолитической активности *Morganella morganii* 190 при 37 °С и 28 °С.
- 2) Анализ адгезивных свойств ММ 190 и биоинформатический поиск генетических детерминант фимбриальных белков.
- 3) Исследование влияния мочевины на рост бактерий *Morganella morganii* 190 и гемолитическую активность. Анализ уреазного оперона.
- 4) Идентификация генов α -гемолизина и кальций-независимого гемолизина HrmA в геноме штамма *M. morganii* 190. Биоинформатический анализ оперонов этих гемолизинов.

ВЫВОДЫ

1) Штамм *M. morganii* 190 обладает гемолитической активностью, проявляет β-гемолиз, как при 37 °С, так и при 28 °С. Продуктивность по гемолитической активности максимальна на 2-й час роста, а к 3-ему и 4-му часам роста снижается в 1.8 и 2.8 раз соответственно.

2) Штамм ММ190 обладает способностью к агглютинации дрожжей и эритроцитов как в отсутствии, так и присутствии маннозы, что свидетельствует об экспрессии бактериями фимбрий 1 и 3 типов. Биоинформатический анализ генома штамма ММ 190 позволил выявить, по меньшей мере, 9 генетических локусов, кодирующих гены синтеза и сборки фимбрий разных типов, что свидетельствует о высоком адгезивном потенциале бактерий.

3) *M. morganii* 190 обладает выраженной уреазной активностью. В геноме идентифицировали уреазный оперон с высокой гомологией с последовательностями *Providencia*, *Pseudomonas* и *Yersinia*. Мочевина оказывает влияние на гемолитическую активность: с увеличением концентрации мочевины уменьшается эффективность гемолитической активности *M. morganii*. Продуктивность культуры в среде с 0.5-1.5% мочевины примерно на одном уровне с контролем. 2% мочевины в среде культивирования полностью подавляют гемолитическую активность штамма.

4) Результаты, полученные при качественном определении гемолитической активности, и данные, полученные молекулярно-биологическим методом, коррелируют. В геноме штамма *M. morganii* 190 методом ПЦР-амплификации идентифицированы гены гемолизина *hlyA* и *hpm*. В геноме обнаружены 2 оперона, кодирующие гемолизины: *hlyCABD* имеет гомологию с *Escherichia coli*, *Proteus penneri* и *Shigella sonnei*, а *hpmBA* – с *Edwardsiella* и *Serratia*.