

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

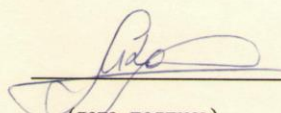
Кафедра биохимии и биофизики

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ
KLEBSIELLA PNEUMONIAE С МНОЖЕСТВЕННОЙ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Губанова Сергея Вячеславовича

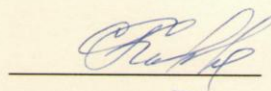
Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук



(дата, подпись)
30.05.2025

М.В. Каневский

Зав. кафедрой
биохимии и биофизики,
профессор, докт. биол. наук



(дата, подпись)
30.05.2025

С.А. Коннова

Саратов 2025

Актуальность. *Klebsiella pneumoniae* является широко распространенным в природе представителем семейства *Enterobacteriaceae*. Бактерии данного вида встречаются в поверхностных водах, на растениях, в почве, а также колонизируют слизистые оболочки тонкого кишечника, уrogenитальный тракт и верхние отделы респираторного тракта млекопитающих, в том числе и человека.

В России, как и во всем мире, *K. pneumoniae* занимает лидирующие позиции среди госпитальных патогенов, вызывая широкий спектр инфекционных заболеваний: от бактериемии, до инфекций дыхательных путей, варьирующих от легкой пневмонии до тяжелого сепсиса. Инфекции мочевыводящих путей, вызываемые *K. pneumoniae*, также достаточно распространены, приводят к циститу, пиелонефриту и другим осложнениям. Более того, эта бактерия способна поражать центральную нервную систему, вызывая менингит или абсцессы мозга, желудочно-кишечный тракт, глаза, кожу и даже печень, образуя первичные абсцессы. *K. pneumoniae* входит в группу «ESKAPE» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*), включающую актуальные антибиотико-устойчивые патогены.

Говоря о механизмах антибиотикорезистентности, сразу стоит назвать ферментативную инактивацию, то есть расщепление антибиотика при помощи ферментов. Этот механизм является самым распространенным: на его долю приходится более 80% от всех случаев бактериальной устойчивости. Классический пример – β -лактамазы, ферменты, разрушающие β -лактамы антибиотиков, такие как пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы. Данные антибиотики ранее были высокоэффективны против широкого спектра бактерий, но их частое применение привело к появлению и распространению β -лактамаз, сводя на нет терапевтический эффект. Кроме этого механизма известны и другие: структурные изменения мишени-субстрата для антибиотика, снижение проницаемости клеточных мембран,

эффлюкс (выброс) антибактериального препарата из бактериальной клетки. Производство β -лактамаз – широко распространенное явление среди различных видов бактерий, как грамположительных, так и грамотрицательных, как аэробных, так и анаэробных. β -лактамазы разрушают пептидную связь в β -лактамном кольце антибиотиков, и они становятся практически неэффективными.

Вирулентность — это степень болезнетворности инфекционного агента, штамма микроба или вируса. Проявления вирулентности можно оценивать по тяжести заболеваний, которые вызывает микроорганизм или вирус, а также по летальной дозе инфекционного агента. Важно отметить, что вирулентность определяется не только способностью микроорганизма проникать в организм размножаться, но и тем, что он способен производить вещества-токсины, которые также оказывают вредное воздействие. Таким образом, вирулентность – это комплексный показатель, отражающий как агрессивность самого возбудителя, так и взаимодействие его с организмом хозяина.

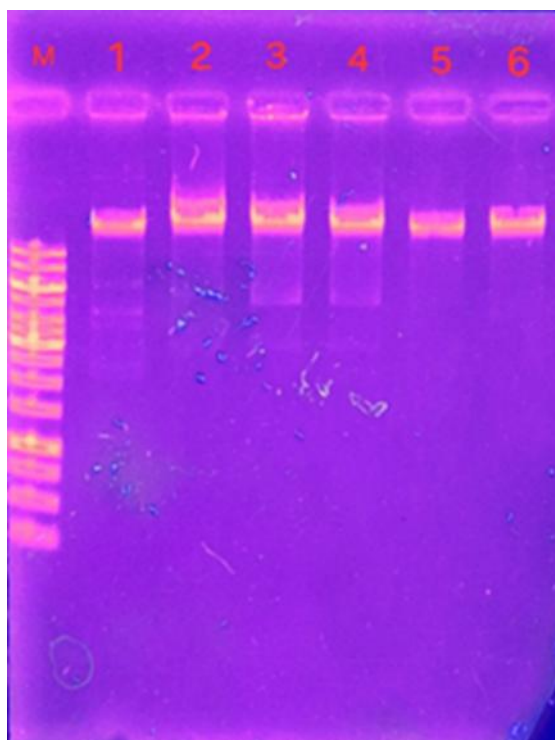
Целью работы является изучение молекулярно-генетических особенностей штаммов *K. pneumoniae*.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучить механизмы резистентности к антимикробным препаратам штаммов *K. pneumoniae*.
2. Выявить спектр генов вирулентности у штаммов *K. pneumoniae*.
3. Выявить детерминанты антибиотикорезистентности в структуре геномов штаммов *K. pneumoniae*.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 30 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 44 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 5 рисунками и 4 таблицами.

Основное содержание работы. В ходе проведенных экспериментов была проведена сравнительная оценка идентификация на устройстве MALDI-TOF Biotyper все изученные штаммы были классифицированы как вид *Klebsiella pneumoniae*. Оценка качества выделения бактериальной ДНК проводилась методом гель-электрофореза (рисунок 1).



М- маркёр (от 200 п.н. до 10000 п.н., Thermo Scientific),
1- B-14758; 2- B-14759; 3- B-14761; 4- B-14762; 5- B-14777; 6- B-14786

Рисунок 1 — Результаты гель-электрофореза штаммов
Klebsiella pneumoniae

Результаты гель-электрофореза свидетельствуют о высоком качестве выделенной ДНК.

Рассмотрено 16 генов, краткие их характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Изучаемые гены и их краткая характеристика

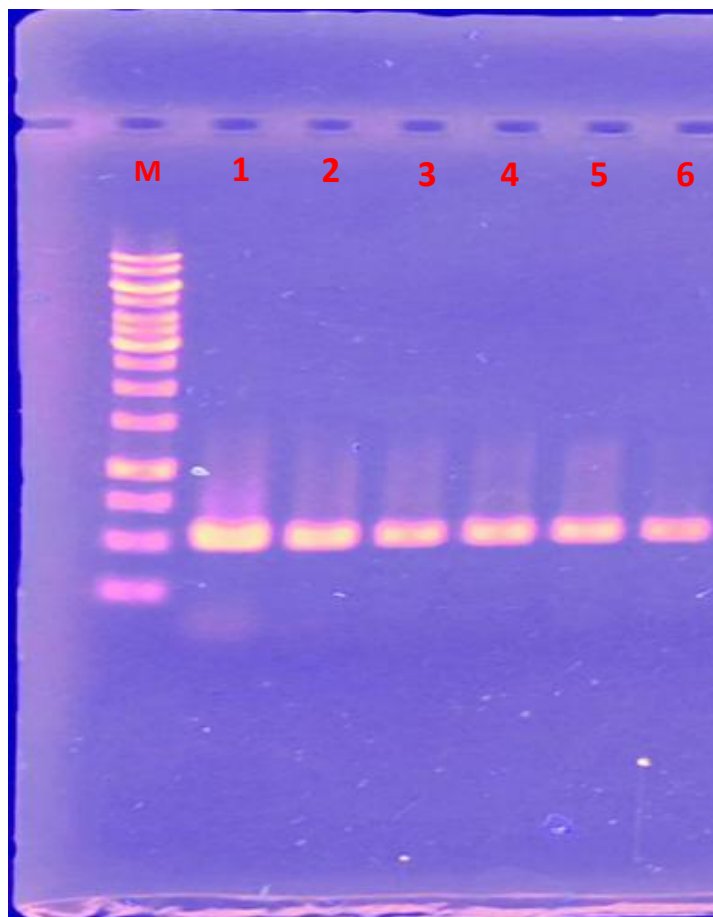
Ген	Характеристика гена	Класс фермента / механизм	устойчивость к антибиотикам
<i>bla_{NDM-1}</i>	Металло-β-лактамаза (MBL), гидролизует карбапенемы	Класс В (MBL)	Карбапенемы, пенициллины, цефалоспорины
<i>bla_{CMY-6}</i>	Плазмидная AmpC-β-лактамаза	Класс С (AmpC)	Цефалоспорины 3-го поколения, монобактамы
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	ESBL (β-лактамаза расширенного спектра)	Класс А (ESBL)	Пенициллины, цефалоспорины 3-4 поколения
<i>bla_{SHV-28}</i>	ESBL, мутантный вариант SHV-1	Класс А (ESBL)	Ампициллин, цефотаксим, цефтазидим
<i>fosA</i>	Фосфотрансфераза, инактивирует фосфомицин	Фосфомицин-модифицирующий фермент	Фосфомицин
<i>mphA</i>	Макролид-2'-фосфотрансфераза	Фосфотрансфераза	Макролиды (азитромицин, кларитромицин)
<i>aacA4</i>	Аминогликозид-ацетилтрансфераза	Аминогликозид-модифицирующий фермент	Гентамицин, тобрамицин
<i>rmtC</i>	16S рРНК метилтрансфераза	Метилтрансфераза	Аминогликозиды (амикацин, гентамицин)
<i>oqxA</i>	Эффлюксный насос (RND-семейство)	Эффлюксная помпа	Хинолоны, хлорамфеникол, триметоприм

Продолжение таблицы 1

Ген	Характеристика гена	Класс фермента / механизм	устойчивость к антибиотикам
<i>sul1</i>	Дигидроптероатсинтаза (устойчивый вариант)	Мутация целевого фермента	Сульфаниламиды
<i>mgrB</i>	Регулятор двухкомпонентной системы PhoPQ (мутации приводят к устойчивости к колистину)	Регуляторная мутация	Колистин
<i>gyrA</i>	ДНК-гираза (мутации в гене приводят к устойчивости к хинолонам)	Мутация целевого фермента	Ципрофлоксацин, левофлоксацин
<i>parC</i>	Топоизомераза IV (мутации усиливают устойчивость к хинолонам)	Мутация целевого фермента	Хинолоны, фторхинолоны
<i>SHV-11</i>	β -лактамаза узкого спектра (не ESBL)	Класс А (не ESBL)	Ампициллин, амоксициллин
<i>OXA-48</i>	Карбапенемаза (класс D), слабо гидролизует цефалоспорины	Класс D (OXA)	Карбапенемы, пенициллины

Для выявления генов резистентности к бета-лактамным антибиотикам у штаммов *Klebsiella pneumoniae* применяют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также полногеномное секвенирование MiSeq.

Результаты ПЦР определения генов резистентности к бета-лактамам штаммов *Klebsiella pneumoniae* представлены на рисунке 2 ниже.



М- маркёр (от 50 п.н. до 1500 п.н., Thermo Scientific),
1- B-14758; 2- B-14759; 3- B-14761; 4- B-14762; 5- B-14777; 6- B-14786

Рисунок 2 — Результаты ПЦР гена *oqxA*, *oqxB* у штаммов
Klebsiella pneumoniae

Результаты по выявлению генов резистентности в штаммах *K. pneumoniae* методом полногеномного секвенирование MiSeq. представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Результаты по выявлению генов резистентности в штаммах *K. pneumoniae*.

Ген	bla _{NDM-1}	bla _{CMY-6}	bla _{CTX-M-1}	bla _{SHV-28}	fosA	mphA	aacA4	rmtC	oqxA	oqxB	sul1	mgrB	gyrA	parC	SHV-11	OXA-48
B-14758					FosA6				oqxA	oqxB	sul1		gyrA	parC	SHV-11	OXA-48
B-14759					FosA6				oqxA	oqxB	sul1		gyrA	parC	SHV-11	OXA-48
B-14761	NDM-1				FosA6	mphA			oqxA	oqxB	sul1		gyrA	parC	SHV-11	OXA-48
B-14762					FosA6	mphA			oqxA	oqxB	sul1		gyrA	parC	SHV-11	OXA-48
B-14777	NDM-1		bla _{CTX-M-1}	bla _{SHV-28}	FosA6	mphA			oqxA	oqxB	sul1		gyrA	parC	SHV-11	OXA-48
B-14786					FosA6				oqxA	oqxB			gyrA	parC		

Установлена высокая распространенность механизмов приводящих к снижению проницаемости наружной мембраны для антибиотиков (*OqxB*, *OqxA*, *fosA*).

Результаты по выявлению генов вирулентности в штаммах *K. pneumoniae* методом полногеномного секвенирование MiSeq. представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Результаты по выявлению генов вирулентности в штаммах *K. pneumoniae*.

Ген	wabG	ureA	allS	rmpA	mrkD	kfu	uge2	wzx	iucA	iro	fimH	cellB
B-14758	wabG	ureA	allS	rmpA	mrkD	kfu	uge2	wzx	iucA	iro	fimH	cellB
B-14759	wabG	ureA	allS	rmpA	mrkD	kfu	uge2	wzx	iucA	iro	fimH	cellB
B-14761	wabG	ureA	allS	rmpA	mrkD	kfu	uge2	wzx	iucA	iro	fimH	cellB
B-14762	wabG	ureA	allS	rmpA	mrkD	kfu	uge2	wzx	iucA	iro	fimH	cellB
B-14777	wabG	ureA	allS	rmpA	mrkD	kfu	uge2	wzx	iucA	iro	fimH	cellB
B-14786	wabG	ureA	allS	rmpA	mrkD	kfu	uge2	wzx	iucA	iro	fimH	cellB

Проведя анализ клебсиелл на наличие генов вирулентности, выявлено, что гены *uge2*, *wabG* и *fimH* присутствуют у всех изолятов, ген регулятора гипермукоидного фенотипа (*rmpA*) присутствует у 3 изолятов, так же у всех 6 изолятов присутствует оперон метаболизма аллантаина.

Заключение: у 70% штаммов выявлена множественная лекарственная устойчивость (MDR) к трём и более классам антибиотиков. Обнаружены

гены, ответственные за устойчивость к β -лактамам (например, *blaNDM-1*, *blaCTX-M-15*), фосфомицину (*fosA*), макролидам (*mphA*) и другим группам антибиотиков. Гены *oqxA* и *oqxB*, связанные с эффлюксом антибиотиков, присутствовали у всех исследуемых штаммов, что подчеркивает их роль в формировании резистентности.

У всех штаммов обнаружены гены вирулентности (*wabG*, *fimH*, *uge2*), а у 50% — ген *rmpA*, ассоциированный с гипервирулентностью. Это свидетельствует о высокой патогенности штаммов и их способности вызывать тяжелые инфекции.

ПЦР в реальном времени и полногеномное секвенирование (MiSeq) подтвердили наличие генов резистентности и вирулентности, обеспечив высокую точность результатов.

Результаты исследования подчеркивают актуальность проблемы антибиотикорезистентности и гипервирулентности *K. pneumoniae*, что требует разработки новых стратегий диагностики и лечения. Полученные данные могут быть использованы для мониторинга циркуляции устойчивых штаммов и совершенствования терапевтических подходов.

Выводы: 1. В ходе проведенного исследования изучены механизмы резистентности к β -лактамам и другим классом антибиотиков штаммами *Klebsiella pneumoniae*. В 70% случаев выделенные штаммы относились к MDR-устойчивым к 3 и более классам антибиотиков.

2. У 100% штаммов *K. pneumoniae* выявлен спектр из 3 генов вирулентности (*uge2*, *wabG*, *fimH*). У 83% изученных штаммов выявлено 5 генов вирулентности, у 60% штаммов — 6. К гипервирулентным относятся 50 % штаммов *K. pneumoniae* (*fimH*, *rmpA*).

3. Поскольку в ходе полимеразной цепной реакции не было возможности точно установить присутствие генов *OqxB* и *OqxA*, в виду схожих молекулярных масс и отсутствия необходимых праймеров, был применён метод полногеномного секвенирование MiSeq. Подтверждающий наличие обоих генов у изолятов.

