

Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция

Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Маянский Н.А.

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:

Игорь Викторович Чеботарь
Эл. почта: nizarnn@yandex.ru

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, антибиотики, резистентность, бета-лактамазы, проницаемость, эффлюкс.

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) является опасным оппортунистическим патогеном. Одно из самых отрицательных клинически значимых свойств *P. aeruginosa* связано со способностью быстро приобретать устойчивость к антимикробным препаратам. Данный обзор представляет собой анализ современной научной литературы о молекулярно-генетических механизмах резистентности *P. aeruginosa* к антибиотикам. Рассмотрены вопросы приобретения и регуляции антибиотикорезистентности. Знание механизмов и регуляции резистентности является важной теоретической базой для выбора оптимальной антибиотикотерапии и планирования противоэпидемических мероприятий при синегнойной инфекции.

Mechanisms and regulation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Mayansky N.A.

National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russia

Contacts:

Igor V. Chebotar
E-mail: nizarnn@yandex.ru

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotics, resistance, beta-lactamases, permeability, efflux.

Pseudomonas aeruginosa is a dangerous opportunistic pathogen. One of the most negative clinically significant features of *P. aeruginosa* is associated with the rapid acquisition of antimicrobial resistance. This review provides an analysis of current literature data on genetic mechanisms of resistance of *P. aeruginosa* to antibiotics. Acquisition of resistance and its regulation are considered. Understanding of resistance mechanisms and regulation is an important basis to ensure appropriate antimicrobial therapy and infection control measures in patients with pseudomonas infections.

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) является одним из самых опасных оппортунистических патогенов. Частота её выделения из крови при сепсисе составляет примерно 20%, из мокроты при муковисцидозе – 70%, при нозокомиальных пневмониях – 45-70%, при интраабдоминальных инфекциях – 28%, при нозокомиальных инфекциях мочевых путей – 10% [1-7]. В общей этиологической структуре внутрибольничных инфекций доля *P. aeruginosa* варьирует в пределах 20-30% [8, 9].

Опасность *P. aeruginosa* определяется несколькими уникальными характеристиками, к которым относятся: способность вызывать прямые повреждения тканей, выраженная генетическая пластичность и прогрессирующая резистентность к антимикробным препаратам (АМП). Прямое повреждение *P. aeruginosa* осуществляет при помощи богатого патогенетического арсенала, включающего адгезины, ферменты, токсины, факторы ускользания от иммунных эффекторов и агрессии в адрес последних [10]. Генетическая пластичность реализуется за счёт дополнения соге-генома большим количеством добавочного генетического материала и наличия необычно большого для бактерий количества регуляторных генов – до 8,4% от общего объема хромосомы [11]. Следствием генетической пластичности является быстрая утрата либо приобретение признаков, что позволяет бактериям адаптироваться к внешним воздействиям в короткие сроки. Распространение

резистентных к антибиотикам штаммов синегнойной палочки достигло глобальных масштабов. Нозокомиальные штаммы *P. aeruginosa*, выделенные в России в 2013-2014 гг., в 52-60% случаев были нечувствительны к антисинегнойным цефалоспорином (цефепим, цефтазидим), в 66% и 60% случаев – к имипенему и меропенему соответственно, в 58% случаев – к пиперациллину/тазобактаму, более чем в 60% случаев к фторхинолонам и более чем в 50% случаев – к аминогликозидам [8]. В зависимости от локальных условий внутрибольничная резистентность *P. aeruginosa* к отдельным группам антибиотиков может достигать почти 100%. Например, в 2015 г. в одном из иранских госпиталей (Исфахан) 95% изолятов от ожоговых больных были резистентны к амикацину, 96% из них проявляли полирезистентность [12]. Опасность резистентных штаммов *P. aeruginosa* для человека подтверждается статистически: в условиях современного госпиталя погибает 1/3 всех пациентов с инвазивной инфекцией, вызванной карбапенеморезистентными штаммами *P. aeruginosa* [13].

Все АМП в зависимости от отношения к ним синегнойной палочки можно разделить на 3 группы. Первую группу составляют антибиотики, к которым нечувствительны практически все штаммы вида *P. aeruginosa*. Видовой характер устойчивости дал основание назвать этот феномен «природная резистентность». Другая группа антибиотиков может быть губительной для *P. aeruginosa*, но подавление метаболизма

реализуется не для всех штаммов, а лишь для тех, которые не обладают приобретенными механизмами устойчивости к какому-либо антибиотику. Для этой группы АМП разработаны критерии, которые позволяют определить чувствительность к ним конкретного штамма и на основе полученной оценки назначать эффективное лечение. К третьей группе можно отнести антибиотики, которые теоретически могут подавлять жизнедеятельность *P. aeruginosa*, но существующие методики не позволяют определить лабораторные критерии чувствительности для конкретного штамма. Терапевтическое использование АМП третьей группы не является рациональным, успех эрадикации возбудителя в этом случае определяется случайностью. Понятно, что вопрос выбора оптимальной терапии возникает только для препаратов второй группы. Сложность проблемы резистентности состоит в том, что *P. aeruginosa* может использовать разнообразные приемы для нейтрализации антибиотиков, часто сочетая их. В этом случае выбор и назначение пациенту эффективного курса АМП будет возможен только на основе понимания механизмов резистентности конкретного штамма.

Очевидно, что знание молекулярных механизмов устойчивости к антибиотикам у *P. aeruginosa*, которым посвящена большая часть данного обзора литературы, будет способствовать оптимизации терапии инфекций, вызванных этим возбудителем.

Природная резистентность

P. aeruginosa обладает природной (видовой) устойчивостью к ряду антибиотиков, включая ампициллин, амоксициллин, ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавуланат, цефалоспорины¹ I и II поколения, цефотаксим, цефтриаксон, цефамицины (цефокситин, цефотетан), клиндамицин, даптомицин, гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин), фузидиевую кислоту, линезолид, макролиды, рифампицин, эртапенем, хлорамфеникол (левомицетин), канамицин, неомицин, триметоприм, триметоприм/сульфаметоксазол, тетрациклины [14, 15]. Справедливо уточнить, что природная резистентность *P. aeruginosa* не является абсолютной. Даже в дикой популяции бактерий присутствует от 1 до 3% штаммов, которые из-за наличия мутаций и/или снижения экспрессии систем, инактивирующих антибиотики, могут проявлять высокую чувствительность к перечисленным препаратам [15]. Основы природной резистентности *P. aeruginosa* связаны с (1) отсутствием мишеней для некоторых групп антибиотиков, (2) наличием естественно продуцируемых бета-лактамаз и других ферментов, инактивирующих антибиотики, (3) особенностями пориновой проницаемости, (4) активностью систем эффлюкса. Проявления природной резистентности чаще базируются на комплексных механизмах. Самый яркий пример этого – устойчивость к пенициллинам и цефалоспорином, которая может быть опосредована через слабую проницаемость бактериальной стенки для АМП, гидролиз присутствующими *P. aeruginosa* «природными» ферментами (бета-лактамаза RoxB, бета-лактамаза расширенного спектра (цефалоспоринолаза) AmpC) [16-18], и ускоренное выведение из клетки за счёт систем эффлюкса. В случае с эртапеномом наблюдается аналогичная картина. Канамицин и неомицин инактивируются с помощью специфического фермента – аминогликозид-3'-фос-

фотрансферазы и активно удаляются из клетки за счёт механизмов эффлюкса [19]. В отношении некоторых антибиотиков может действовать преимущественно один механизм. Например, из-за больших размеров ванкомицина не способен быстро проникать через наружную мембрану грамотрицательных бактерий и создавать опасные для бактерии концентрации в периплазматическом пространстве [20]. Для даптомицина у синегнойной палочки, как и у других грамотрицательных бактерий, нет специфичной мишени [21]. С практической точки зрения, знание особенностей природной резистентности *P. aeruginosa* определяет перечень антибиотиков, которые должны быть исключены из списка препаратов для лечения синегнойной инфекции.

Приобретенная резистентность

Перечень антисинегнойных антибиотиков, чувствительность к которым можно оценить при помощи лабораторных методов, не очень велик. Список Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) включает несколько пенициллинов (пиперациллин, пиперациллин/тазобактам, тикарциллин, тикарциллин/клавуланат), четыре препарата из группы цефалоспоринов (цефепим, цефтазидим, цефтазидим/авибактам, цефтолозан/тазобактам), карбапенемы (имипенем, меропенем, дорипенем), монобактамы (азтреонам), фторхинолоны (левофлоксацин, цiproфлоксацин), аминогликозиды (гентамицин, амикацин, нетилмицин, тобрамицин) и полимиксины (колистин) [14]. Рекомендации Института клинических и лабораторных стандартов США (CLSI) дополняют этот список отдельными критериями для нескольких фторхинолонов (норфлоксацин, ломефлоксацин, офлоксацин, гатифлоксацин) и полимиксина В [15]. В клинических условиях *P. aeruginosa* может формировать резистентность к каждому из перечисленных антибиотиков.

Устойчивость к бета-лактамам

Резистентность к бета-лактамам у *P. aeruginosa* может быть обусловлена тремя механизмами: (1) выработка неконstitutивных (адаптивных) бета-лактамаз; (2) снижение проницаемости мембраны; и (3) эффлюкс-зависимое удаление антибиотика из периплазматического пространства. У многих нозокомиальных штаммов (>40%) эти механизмы сочетаются друг с другом [22, 23].

Адаптивные бета-лактамазы *P. aeruginosa* представляют собой неоднородную группу ферментов, гены которых локализованы в хромосоме или плазмиде и часто входят в состав интегронов или мобильных генетических элементов (МГЭ). Присутствие бета-лактамаз у грамотрицательных бактерий регистрируется в цитоплазме и периплазматическом пространстве, значительное их количество ассоциировано с наружной мембраной [24, 25]. Они попадают во внеклеточную среду, что происходит, вероятно, в результате лизиса бактериальных клеток. Гены природных и приобретенных бета-лактамаз у грамотрицательных бактерий (в отличие от грамположительных) экспрессируются постоянно [26]. Но существуют и исключения из этого правила. Например, уровень экспрессии конститутивной для *P. aeruginosa* бета-лактамазы AmpC подвержен гибкой регуляции, что может иметь клиническое значение (см. ниже). Важно, что бета-лактамазы, обнаруженные у *P. aeruginosa*, встречаются у других видов грамотрицательных бактерий, что

¹ *P. aeruginosa* не обладает природной резистентностью к «антисинегнойным» цефалоспорином – цефепиму, цефтазидиму.

подтверждает широкую практику горизонтального переноса генов в бактериальной популяции (см. ниже).

Неоднородность генетической регуляции и химической структуры бета-лактамаз отражается в особенностях их субстратной специфичности и разной гидролитической активности в отношении бета-лактамов. В связи с этим бета-лактамазы *P. aeruginosa* классифицируются не только согласно критериям Ambler [27], но и подразделяются на функциональные группы в соответствии с субстратной специфичностью. Примеры бета-лактамаз *P. aeruginosa* с разными функциональными свойствами представлены в Таблице 1.

Интересно, что приобретенная резистентность к антисинегнойным бета-лактамам у *P. aeruginosa* может реализоваться с участием природной бета-лактамазы AmpC. Являясь природной для *P. aeruginosa* бета-лактамазой расширенного спектра, в условиях гиперпродукции в сочетании с активацией эффлюкса и угнетением поринов, AmpC может обеспечивать резистентность к антисинегнойным цефалоспорином и карбапенемам. Гиперпродукция AmpC индуцируется через два механизма [64]. Первый связан с воздействием на клетку бета-лактамов (показано на примере цефокситина и имипенема), которые резко увеличивают концентрацию 1,6-ангидромуропептидов в периплазме, а, следовательно, и в цитоплазме. Последние взаимодействуют с транскрипционным регулятором AmpR, конвертируя его в активатор гена *ampC*, который способствует

повышению его экспрессии. К такому же эффекту приводит другой механизм, связанный с нарушением функции цитоплазматического фермента AmpD, который вызывает расщепление образующихся в естественных условиях 1,6-ангидромуропептидов. Избыточное накопление 1,6-ангидромуропептидов через взаимодействие с AmpR ведет к гиперэкспрессии гена *ampC* и вызывает гиперпродукцию AmpC. При этом повышение экспрессии *ampC* сочетается с угнетением синтеза поринов OprD и активацией системы эффлюкса MexAB-OprM [65]. В конечном итоге, это обеспечивает резистентность к антисинегнойным цефалоспорином и карбапенемам.

Недавние исследования косвенно подтверждают возможность модификации мишени для развития резистентности к бета-лактамам. Из 10 карбапенеморезистентных штаммов *P. aeruginosa* (клональный комплекс 274), выделенных от больных муковисцидозом, 9 имели нарушения структуры пенициллинсвязывающих белков (PBP) [66]. Десять из одиннадцати чувствительных к бета-лактамам штаммов того же клонального комплекса не имели признаков изменения PBP; у единственного в этой группе изолята с мутантным PBP3 были пограничные значения МПК цефепима.

Помимо бета-лактамаз и модификации мишени, в формирование резистентности к бета-лактамам существенный вклад вносят ещё два механизма – системы эффлюкса и нарушение проницаемости пориновых структур. Для *P. aeruginosa* описа-

Таблица 1. Приобретенные бета-лактамазы *P. aeruginosa*

Функциональная группа ферментов	Молекулярный класс ферментов	Антибиотик-субстрат (из группы антисинегнойных препаратов)	Ферменты	Источник
Группа 2b	A	Пенициллины	TEM-1, TEM-2, SHV-1	[28]
Группа 2be	A	Пенициллины, цефалоспорины, монобактамы	TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42, TEM-116 SHV-2, SHV-2a, SHV-5, SHV-12 CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-43 PER-1, PER-2 VEB-1, VEB-1a, VEB-1b, VEB-2 GES-1, GES-8, GES-9 BEL-1, BEL-2	[29-33] [34-36] [30, 37, 38] [37, 39] [40-42] [43-45] [46, 47]
Группа 2c	A	Пенициллины, тикарциллин/клавуланат	PSE-1, PSE-3, PSE-4, PSE-5 CARB-3, CARB-4	[48-50]
Группа 2d	D	Пенициллины, ингибиторозащищенные пенициллины	OXA-1, OXA-2, OXA-3, OXA-4, OXA-5, OXA-6, OXA-10, OXA-13, OXA-20, OXA-46, OXA-50, OXA-56	[51]
Группа 2de	D	Пенициллины, ингибиторозащищенные пенициллины, цефалоспорины, монобактамы	OXA-11, OXA-14 – OXA-19, OXA-28, OXA-31, OXA-32, OXA-35, OXA-45, OXA-74, OXA-147, OXA-161,	[51-53]
Группа 2df	D	Пенициллины, ингибиторозащищенные пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	OXA-40, OXA-50a, OXA-50b, OXA-50c, OXA-50d	[54, 55]
Группа 2f	A	Пенициллины, ингибиторозащищенные пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	KPC-2, KPC-5 GES-2, GES-5	[56, 57] [58, 59]
Группа 3	B	Пенициллины, ингибиторозащищенные пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	IMP-1, IMP-2, IMP-4 – IMP-11, IMP-13 – IMP-16, IMP-18 – IMP-22, IMP-25, IMP-26, IMP-29 – IMP-31, IMP-33, IMP-35, IMP-37, IMP-40, IMP-41, IMP-43 – IMP-45, IMP-48 VIM-1 – VIM-11, VIM-13 – VIM-18, VIM-20, VIM-28, VIM-30, VIM-36 – VIM-38, VIM-43 SPM-1 GIM-1 NDM-1 AIM-1 SIM-1 FIM-1	[60] [61] [61] [62] [63] [63] [60]

но 64 пориновых структуры – трансмембранных каналов, обеспечивающих поступление специфических субстратов внутрь бактериальной клетки; 6 из них (OprF, OprK, OprD, OprO, OprD, OprD) транспортируют бета-лактамы (Таблица 2) [67]. *P. aeruginosa* характеризуется широким набором эффлюксных насосов – систем выведения специфических субстратов из клетки. За выведение бета-лактамов отвечают системы семейства RND (от англ. «resistance-modulation-division») – MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY (Таблица 2) [68]. Чрезвычайно важной является специфичность MexAB-OprM, которая обеспечивает удаление из клеток меропенема, но не имипенема. Эта особенность может объяснить существование штаммов с высокими значениями МПК меропенема и низкими значениями МПК имипенема, которые нередко встречаются в практике клинической микробиологии.

Существовало мнение, что высокие значения МПК карбапенемов (>32 мг/л) и антисинегнойных цефалоспоринов (>256 мг/л) регистрируются, главным образом, у штаммов-продуцентов карбапенемаз, особенно у носителей металло-бета-лактамаз (МБЛ) [69]. К настоящему времени это положение опровергнуто. Так, в исследовании Lopez-Causare и соавт. были обнаружены многочисленные МБЛ-негативные изоляты *P. aeruginosa* с МПК меропенема и имипенема >32 мг/л, МПК цефепима и цефтазидима >256 мг/л [66]. Авторы полагают, что такие высокие значения МПК цефалоспоринов и карбапенемов были обусловлены комплексами мутаций, в том числе мутациями в генах, контролирующих синтез РВР, работу систем эффлюкса и проницаемость мембраны. На возможность значительного МБЛ-независимого увеличения МПК карбапенемов (>64-256 мг/л меропенема) у *P. aeruginosa* указывают и результаты других исследований [70, 71].

Устойчивость к фторхинолонам

Приобретенная резистентность к антибиотикам группы фторхинолонов у *P. aeruginosa* может быть связана с тремя механизмами: (1) модификация мишени действия антибиотика; (2) функционирование систем эффлюкса; и (3) ферментативная инактивация антибиотика.

Таблица 2. Сочетания механизмов приобретенной резистентности к бета-лактамам антибиотикам у *P. aeruginosa*

Группа антибиотиков	Механизм резистентности		
	Разрушение антибиотика бета-лактамазами	Нарушение функции поринов	Эффлюкс-зависимое выведение антибиотика
Пенициллины	Группы 2b, 2be, 2c, 2d, 2de, 2df, 2f, 3	Порины OprF, OprK (OccK1), OprD (OccK2)	Система эффлюкса MexAB-OprM
Цефалоспорины	Группы 2be, 2de, 2df, 2f, 3	Порины OprF, OprO (OccK3)	Система эффлюкса MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY
Карбапенемы	Группы 2df, 2f, 3	Порины OprD (OccD1), OprD (OccK7)	Система эффлюкса MexAB-OprM
Монобактамы	Группы 2be, 2de	Нет данных	Система эффлюкса MexAB-OprM
Ингибиторозащищенные бета-лактамы	Группы 2c, 2d, 2de, 2df, 2f, 3	Нет данных	Система эффлюкса MexAB-OprM

Чеботарь И.В. и соавт.

Мишенью действия фторхинолонов являются ферменты топоизомеразы (топоизомераза II (гираза) и топоизомераза IV), играющие важную роль в репликации, транскрипции, рекомбинации и репарации ДНК. Мутации, происходящие в генах этих ферментов, ведут к их структурным изменениям и, следовательно, нечувствительности к фторхинолонам. У *P. aeruginosa*, как и у других грамотрицательных бактерий, мутирует в первую очередь ген гиразы (в отличие от грамположительных бактерий, у которых первоначально повреждается ген топоизомеразы IV) [72]. Последующее возникновение мутаций в генах топоизомеразы IV ведет к ещё большему увеличению уровня резистентности к фторхинолонам. Каждый из ферментов состоит из двух субъединиц: гиразы формируют субъединицы GyrA и GyrB, топоизомераза IV – ParC и ParE. При этом мутации, вызывающие резистентность к фторхинолонам, локализируются в генах субъединиц GyrA и/или ParC в так называемых участках QRDR (от англ. «quinolone resistance determining region») [73].

Вторым механизмом резистентности *P. aeruginosa* к фторхинолонам является эффлюкс-зависимое выведение антибиотика из бактериальной клетки. Данный механизм реализуется за счет 4 систем эффлюкса семейства RND: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM [74] и дополнительных систем: MexHI-OprM и MexVW-OprM [75, 76].

В исследованиях Henrichfreise и соавт. и Tomas и соавт. у клинических изолятов *P. aeruginosa*, резистентных к фторхинолонам, описаны мутации в генах репрессоров, регулирующих экспрессию систем эффлюкса MexAB-OprM и MexCD-OprJ [77, 78]. Активация системы эффлюкса MexXY-OprM у резистентных к фторхинолонам изолятов происходит также за счет возникновения инактивирующих мутаций в гене репрессора MexZ. Однако описаны случаи резистентности к фторхинолонам и нормального уровня экспрессии MexXY-OprM, даже при отсутствии мутаций в гене *mexZ* [79].

В отличие от других представителей семейства RND, экспрессия которых регулируется репрессорами, система эффлюкса MexEF-OprN экспрессируется при участии активатора транскрипции MexT. У чувствительных к фторхинолонам изолятов *P. aeruginosa* MexEF-OprN не функционирует вследствие мутаций в гене данного активатора, характерных для диких штаммов *P. aeruginosa* [80]. При реверсии мутаций в гене *mexT* активируется экспрессия MexEF-OprN, и изолят становится резистентным [80, 81]. У таких «реверсированных» изолятов дополнительно возникает устойчивость к карбапенемам, но не за счёт работы системы эффлюкса, а путем MexT-опосредованного угнетения экспрессии гена порина OprD [82].

Ферментативная инактивация фторхинолонов происходит под действием аминогликозидацетилтрансферазы. Данные ферменты осуществляют ацетилирование аминогрупп антибиотиков, и большинство из них активны в отношении аминогликозидов. Однако фермент AAC(6)-Ib-cr, обнаруживаемый на плазмидах *P. aeruginosa*, способен инактивировать и аминогликозиды, и фторхинолоны [83].

Устойчивость к аминогликозидам

Приобретенная резистентность *P. aeruginosa* к аминогликозидам обусловлена тремя механизмами: (1) модификация мишени действия антибиотика (действие рРНК-метилазы); (2) инактивация антибиотика аминогликозид-модифицирующими ферментами (АМФ); (3) функционирование систем эффлюкса.

Мишенью действия антибиотиков группы аминогликозидов является 30S субъединица рибосом. Ферменты рРНК-метилазы осуществляют метилирование рРНК, находящейся в составе 30S субъединицы рибосом, обеспечивая высокий уровень резистентности бактерии к клинически значимым аминогликозидам: гентамицину, тобрамицину и амикацину [84]. У *P. aeruginosa* описаны несколько 16S рРНК-метилаз: RmtA, RmtB, RmtD, ArmA [84-88]. Установлено, что продукция RmtD сочетается с продукцией МБЛ типа SPM-1, а продукция ArmA – с МБЛ типа IMP-1.

В зависимости от способа инактивации аминогликозидов, АМФ делят на 3 группы: аминогликозидацетилтрансферазы – ААС (от англ. «aminoglycoside acetyltransferases»), аминогликозидаденилтрансферазы – ААД (от англ. «aminoglycoside adenyltransferase»), иногда их называют АНТ (от англ. «aminoglycoside nucleotidyltransferases»), и аминогликозидфосфорилтрансферазы – АРН (от англ. «aminoglycoside phosphoryltransferase»).

ААС инактивируют аминогликозиды путём ацетилирования аминогрупп. Данные ферменты обычно действуют на 3- и 6'-аминогруппы антибиотика (семейства ААС(3) и ААС(6')) соответственно, реже встречаются ААС, действующие на 1- и 2'-аминогруппы [89-91]. Ферменты семейства ААС(3) у *P. aeruginosa* представлены 5 подсемействами (I, II, III, IV и VI). Наличие у изолята любого из ферментов семейства ААС(3) ассоциировано с резистентностью к гентамицину [89], в то время как резистентность к тобрамицину возникает только при наличии ферментов подсемейств II, III и VI [92]. Семейство ААС(6') делят на 2 подсемейства: II и I (менее распространенное) [89]. Изоляты, обладающие ферментами ААС(6'), резистентны к тобрамицину и амикацину (подсемейство I) или тобрамицину и гентамицину (подсемейство II) [92]. Однако описаны варианты подсемейства I, неактивные в отношении амикацина [93, 94]. Как упоминалось ранее, один из представителей семейства ААС(6') – ААС(6')-Ib-*sg*, демонстрирует активность в отношении фторхинолонов [95].

Среди ферментов АНТ чаще всего обнаруживают АНТ(2')-I, инактивирующий гентамицин и тобрамицин. Реже встречается АНТ(4')-II, обуславливающий резистентность к тобрамицину и амикацину [92].

Точкой приложения АРН является 3-ОН группа аминогликозидов. У клинических изолятов *P. aeruginosa* наиболее распространенным является фермент АРН(3')-II. Как уже говорилось, он обеспечивает природную резистентность синегнойной палочки к канамицину, неомицину и стрептомицину [92]. Однако описаны случаи обнаружения у *P. aeruginosa* АРН, ассоциированных с резистентностью к амикацину (АРН(3')-VI, АРН(3')-IIb-like), тобрамицину и гентамицину (АРН(2'')) [96-98].

Третьим механизмом резистентности *P. aeruginosa* к аминогликозидам является эффлюкс-зависимое выведение антибиотика из клетки. За выведение из клетки аминогликозидов отвечает система эффлюкса MexXY-OprM. Как и в случае эффлюкс-зависимой резистентности к фторхинолонам, MexXY-OprM активно продуцируется при наличии мутаций в гене репрессора *texZ*, регулирующего её экспрессию. Интересно, что у некоторых изолятов, даже при отсутствии мутаций в гене *texZ*, наблюдается экспрессия MexXY-OprM, что делает их устойчивыми к аминогликозидам и свидетельствует о наличии дополнительных генов/мутаций, влияющих на активность этой системы эффлюкса. Например, ген *parR* является частью оперона *parRS*, кодирующего двухкомпонентную регуляторную систему, влияющую на экспрессию многих генов резистентности у *P. aeruginosa*, в том числе ген *mexXY*. Именно возникнове-

нием мутаций в гене *parR* объясняют экспрессию *mexXY* при отсутствии мутаций в гене *texZ* [99].

Резистентность к полимиксинам

Основным механизмом резистентности *P. aeruginosa* к полимиксинам (колистину и полимиксину В) является модификация мишени действия. Антибактериальное действие полимиксинов основано на электростатическом связывании положительно заряженной полипептидной части антибиотика и отрицательно заряженного липополисахарида (ЛПС) наружной мембраны грамотрицательных бактерий, а также на взаимодействии «липидного хвоста» полимиксина и жирных кислот липида А. Связываясь с ЛПС, антибиотик вытесняет мембраностабилизирующие ионы магния и кальция, которые соединяют соседние молекулы липида А и укрепляют наружную мембрану. Это нарушает барьерную функцию наружной мембраны, что ведет к потере периплазматических белков и поступлению в периплазматическое пространство веществ, для которых клеточная стенка ранее была непроницаема, в том числе и полимиксина [100]. Предполагалось, что полимиксин В нонапептид (РМБН (от англ. «Polymyxin B nonapeptide»)) – часть молекулы полимиксина без «липидного хвоста» – не обладает антибиотической активностью, однако, в исследованиях Lu и соавт. (2014) и Zhang и соавт. (2000) было показано, что РМБН не теряет способности повреждать наружную мембрану [101, 102]. Такое объяснение механизма действия полимиксинов предполагает, что эта структура является главной мишенью антибиотика, и нарушение её проницаемости ведет к гибели бактериальной клетки. Следовательно, модификация наружной мембраны (а именно ЛПС) приводит к развитию резистентности к полимиксинам.

ЛПС модифицируется путем присоединения 4-амино-L-арабинозы к липиду А. Модификация осуществляется ферментами, кодируемыми опероном *arnBCADTEF-ugd*, также называемым *pmrHFUKLM-ugd*-оперон или *arn*-оперон [103, 104]. Экспрессия оперона находится под контролем двухкомпонентной регуляторной системы ParRS и активируется в ответ на субингибиторную концентрацию полимиксинов [105]. ParRS не является единственным регулятором *arn*-оперона, на его экспрессию могут влиять системы PhoPQ, PmrAB, CprRS, ColRS [106]. Мутации в генах белков PmrB, PhoQ, ParR и ParS ведут к повышенной экспрессии *arn*-оперона и обнаруживаются у клинических штаммов *P. aeruginosa*, в разной степени резистентных к колистину (МПК от 4 до >512 мг/л) [107-109]. Следует отметить, что мутации в генах белков ParS или ParR не только запускают каскад реакций, ведущих к модификации ЛПС, но и регулируют экспрессию белков, участвующих в формировании резистентности к другим группам антибиотиков: увеличивают экспрессию системы эффлюкса MexXY и угнетают экспрессию порина OprD. Таким образом, повреждение генетической структуры регуляторной системы ParRS приводит к возникновению резистентности к четырем группам антибиотиков, а именно, полимиксинам, бета-лактамам (карбапенемам), аминогликозидам и фторхинолонам [99].

Ряд исследований, показывающих отсутствие корреляции между степенью проницаемости наружной мембраны и гибелью бактериальных клеток в присутствии полимиксинов, указывают на то, что наружная мембрана не является их единственной мишенью, и обосновывают необходимость поиска дополнительных механизмов действия [102, 110]. Например, в качестве мишени действия рассматривались 16S рРНК, фер-

менты дыхания бактерий [111, 112]. В исследовании Fernandez и соавт. (2013) описаны 17 генов, повреждение которых приводило к изменению МПК колистина [113]. Среди них вышеупомянутые *parR*, *pmrA*, *phoQ*, а также гены ферментов метаболизма и гены, отвечающие за транспорт ЛПС. Изоляты с поврежденными генами метаболизма *purB*, *pdxB*, *sucC*, *tpiA* и *agoV* демонстрировали более низкие значения МПК колистина, чем контрольный штамм, а также характеризовались замедленным ростом. Данные повреждения ведут к формированию резистентности не только к полимиксинам, но и к антибиотикам других групп [114-117].

У штаммов с повреждениями в генах, участвующих в синтезе и транспорте ЛПС, также регистрировались более низкие значения МПК, чем у контрольного штамма [113]. Например, чувствительность к колистину увеличивалась при повреждении гена белка GalU – уридиндифосфат-глюкоза-пирофосфорилазы, участвующей в синтезе уридиндифосфат-D-глюкозы, которая является неотъемлемым компонентом ЛПС. Подобным образом проявляются нарушения в структуре гена *ssg* (от англ. «cell surface sugar biosynthetic glycosyltransferase») – гликозилтрансферазы, в гене белка WapR (рамнозилтрансферазы), ответственных за синтез компонентов ЛПС, в гене белка, гомологичного LptC *E. coli*, участвующего в транспорте ЛПС на наружную мембрану.

В исследовании Fernandez и соавт. (2013) штаммы с поврежденными генами *galU*, *wapR*, *ssg* и контрольный штамм выращивали в условиях низкой концентрации ионов магния, полагая, что данные условия являются триггерным фактором модификации ЛПС. При масс-спектрометрической оценке контрольный штамм демонстрировал наличие пиков аминокарабинозы, в то время как у исследуемых штаммов подобные пики не обнаруживались [113]. Других механизмов резистентности к полимиксинам у *P. aeruginosa* пока достоверно не установлено.

Прогресс в исследовании многоклеточных бактериальных сообществ позволил обосновать существование ещё одного вида устойчивости – биопленочной антибиотикорезистентности. Несмотря на многочисленные доказательства важности этого типа резистентности, его роль до настоящего времени остается недооцененной. В частности показано, что МПК антибиотиков могут увеличиваться в сотни раз в случаях, когда бактерии организуются в биопленки. Механизмы биопленочной резистентности были подробно описаны нами ранее [118]. Коротко можно сказать, что главные из этих механизмов связаны с: 1) биопленочным матриксом, который инактивирует антибиотики, и 2) многократным увеличением в биопленочном пуле количества персистирующих бактериальных клеток. У синегнойной палочки инактивирующая роль матрикса реализуется, главным образом, за счет альгината, хотя и другие компоненты матрикса могут принимать участие в «фильтрационной» задержке антибиотиков [119, 120]. Персистирующие клетки проявляют настолько низкий уровень метаболизма, что становятся неуязвимыми для антибиотиков, целью которых являются, прежде всего, метаболически активные бактерии.

Приобретение и регуляция устойчивости

Приобретение резистентности – это синтез новых белков и/или изменение структуры (следовательно, и функции) уже существующих в клетке биополимеров. Понятно, что такая перестройка реализуется за счет приобретения новых генов извне, а также за счет активации или, наоборот, ингибирования

существующих генов. В условиях контакта с антибиотиками эти процессы запускаются очень быстро и реализуются через разные механизмы, определяемые конкретным микроокружением и особенностями генетического аппарата штаммов синегнойной палочки. Одной из самых наглядных моделей эволюции резистентности служит селекция антибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa* при муковисцидозе. До 70% штаммов от пациентов с хроническим носительством синегнойной палочки характеризуются полирезистентностью, механизмы которой крайне разнообразны, даже в случае принадлежности штаммов к одному клону [66]. Всего в процесс реализации резистентности при муковисцидозе может вовлекаться более 100 генов. Количество мутантных генов, задействованных в приобретенной устойчивости, колеблется от 3 (изолят, резистентный только к азтреонаму) до 24 (полирезистентность) на один изученный штамм [66]. Как считают авторы, каждая из обнаруженных мутаций была значима для возникновения резистентности. Причина такого большого количества полезных для *P. aeruginosa* мутаций кроется в особых свойствах выживших после воздействия антибиотиков клонов. Главным свойством их генетического аппарата считается склонность к спонтанным мутациям: их вероятность в 1000 раз больше, чем у среднестатистического дикого штамма, что дало повод назвать их гипермутаторами или бактериями с гипермутабельным фенотипом [121]. Причина гипермутабельности кроется в поломках системы репарации хромосомной ДНК, которые оказываются полезными для выживания вида в условиях антибиотикотерапии. В результате безжалостной селекции под прессом антибиотиков остаются только те клоны, мутации которых оказались направленными на нейтрализацию АМП. Как правило, первичное инфицирование при муковисцидозе является внебольничным. Бронхолегочная система при этом контаминирована негоспитальными, а, значит, нерезистентными штаммами. Изоляты, полученные от пациентов с нозокомиальными инфекциями, имеют дополнительные (горизонтальные) пути приобретения резистентности. Это наиболее ярко иллюстрируется на примере приобретенных бета-лактамаз, которые редко присутствуют у штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у детей с муковисцидозом [122]. Частота их обнаружения растет вместе с взрослением пациента и длительностью его нахождения в больничных учреждениях. Считается, что приобретенные бета-лактамазы расширенного спектра и карбапенемазы кодируются генами, происходящими из плазмид и МГЭ, в том числе транспозонов. Гены бета-лактамаз часто находятся в составе генных кассет в интегронах, соседствуя с генами резистентности к другим антибиотикам. В таких случаях плазмид- и транспозон-зависимая передача резистентности горизонтальным путем будет обеспечивать одномоментное приобретение множественной лекарственной устойчивости. Например, в исследовании Yu и соавт. описаны штаммы *P. aeruginosa* с интегронами, несущими ген МБЛ и гены АМФ [123]. Источником отдельных генов и кассет резистентности являются нозокомиальные штаммы, которые интегрировали в свой геном полезные для приобретения резистентности детерминанты. По мере дальнейшего контакта с новыми антибиотиками и взаимодействия с микробным окружением, штаммы *P. aeruginosa* при помощи фермента интегразы продолжают захватывать нужные для выживания гены, увеличивая объем интегронов [123]. Функционально это проявляется в расширении спектра резистентности. В качестве первичных хозяев генов резистентности, обнаруживаемых у синегнойной палочки, называют бактерии из окружающей

среды, нередко принадлежащие к отдаленным от *Pseudomonas* spp. таксонам. Например, бета-лактамаза СТХ-М была «заимствована» синегнойной палочкой у свободноживущих видов семейства Enterobacteriaceae *Kluyvera ascorbata* и *Kluyvera georgiana*, у которых СТХ-М является природным ферментом [124]. В качестве первичных носителей NDM рассматриваются *Klebsiella pneumoniae* или *Escherichia coli* [125]. Происхождение генов бета-лактамаз может быть связано не только с энтеробактериями. На роль кандидатов в естественные носители генов бета-лактамаз ОХА претендуют *Ralstonia* spp., *Burkholderia* spp. и *Shewanella* spp. [124].

Как уже было сказано, причиной запуска других механизмов резистентности может быть повреждение бактериальных генов мутациями, реорганизацией генома (протяженными делециями и инверсиями) и МГЭ. Данные факторы могут модифицировать мишень, нарушать структуру поринов, замедляя тем самым транспорт антибиотиков внутрь клетки, и повреждать гены, репрессирующие эффлюкс антибиотика из периплазмы бактерий [72, 126, 127]. Если мутации носят случайный характер, то протяженные делеции и инверсии могут быть не случайными, являясь следствием реорганизации генома под воздействием МГЭ [128]. МГЭ, в свою очередь, способны проявлять тропность к определенным генам [129]. К настоящему времени насчитывается около 40 IS-элементов (разновидность МГЭ, от англ. «insertion sequence» – вставочная последовательность), которые индуцируют резистентность *P. aeruginosa* к антибиотикам, встраиваясь в гены поринов и повреждая гены репрессоров эффлюксных насосов [23, 130-132]. Присутствие МГЭ в геноме синегнойной палочки также может быть следствием межвидовой передачи. В нашей лаборатории были обнаружены штаммы *P. aeruginosa*, OprD-порины которых были повреждены IS-элементами ISPme1 и ISPst2, ранее найденными у других псевдомонад – соответственно *Pseudomonas mendocina* и *Pseudomonas stutzeri* (неопубликованные данные).

Глобальная картина функциональной регуляции резистомы *P. aeruginosa* поддается осмыслению лишь на уровне отдельных процессов, в достаточной степени изученных к настоящему времени. Трудность общего понимания определяется двумя причинами. Во-первых, остаются недостаточно изученными различные варианты межмолекулярных взаимодействий биополимеров, вовлеченных в реализацию устойчивости. Вторая причина кроется в сложности системы. Одномоментная индукция взаимоисключающих процессов, шунтированность путей регуляции, внутривидовое разнообразие сайтов для межмолекулярных контактов, приводящее к неоднородности силы сигнала от взаимодействия, – всё это определяет систему регуляции как динамический хаос. Впрочем, это не отменяет важнейшего результата работы такой системы, заключающегося в приобретении резистентности.

Проиллюстрируем сложность регуляции на примере систем эффлюкса и пориновой проницаемости. Подавление транскрипции гена *oprD* осуществляется регулятором MexT, одновременно активирующим транскрипцию генов, которые кодируют белки систем эффлюкса MexEF-OprN (насос для фторхинолонов, триметоприма и хлорамфеникола) [82]. В то же время, MexT подавляет активность другого насоса, выводящего фторхинолоны (а также бета-лактамы) из клетки – MexAB-OprM. Происходит это за счет подавления MexAB-OprM-стимулирующего эффекта от важного индуктора системы «чувство кворума» N-бутирил-L-гомосеринлактона [133]. В этом мы видим, по крайней мере, два противоположно направленных яв-

ления. Первое заключается в одновременной активации одной (MexEF-OprN) и подавлении другой (MexAB-OprM) системы эффлюкса для фторхинолонов. Второе противоречие заключается в том, что MexT подавляет OprD-зависимый транспорт бета-лактамов в клетку и одновременно подавляет их выведение специфичной для бета-лактамов системой эффлюкса MexAB-OprM. Сложность усугубляется тем, что эти процессы находятся под влиянием «чувства кворума», а, следовательно, зависят от фазы роста бактерий, их концентрации и условий микроокружения. Кроме того, синегнойная палочка располагает дублирующими механизмами индукции эффлюкса и порин-зависимой резистентности. Например, под воздействием субтоксичных для *P. aeruginosa* доз антибиотиков (ципрофлоксацин, 0,05 мг/л) уже упомянутая система MexEF-OprN активируется независимо от MexT за счет неуставленных медиаторов [134]. Подобным образом функционируют и другие системы, отвечающие в клетках *P. aeruginosa* за устойчивость к повреждающим агентам. Считается, что только сложность регуляторных механизмов может обеспечить гибкость поведения *P. aeruginosa*, проявляющуюся в её способности быстро приобретать и быстро утрачивать резистентность в зависимости от условий окружающей среды. Регуляторный аппарат синегнойной палочки обеспечивает уникальное свойство – самые разнообразные стресс-факторы могут усиливать устойчивость к АМП, индуцируя перекрестную резистентность [135]. Это дало повод сформулировать оригинальное правило для предсказания последствий контакта *P. aeruginosa* с АМП: «Все дороги ведут к резистентности» [135].

В целом, механизмы регуляции резистентности *P. aeruginosa* направлены на возможность быстрого возникновения устойчивых клонов. Однако не следует забывать, что этот процесс является обратимым. «Цена», которую бактерии «платят» за резистентность, формируется за счет перенаправления энергетических и структурных ресурсов клетки на синтез факторов резистентности в ущерб процессам общего метаболизма. Такие затраты становятся неоправданными в отсутствие антибиотиков, и клоны, не способные избавиться от «расходов» на поддержание резистентности, проигрывают во внутривидовой борьбе и вытесняются другими популяциями с более эффективным метаболизмом. Это явление, известное как «бактериальный фитнес», является фундаментальной основой перспективности мероприятий, регулирующих потребление антибиотиков в борьбе с глобальной резистентностью.

Диагностика устойчивости к АМП

Если методы определения общей чувствительности к антибиотикам отработаны до совершенства, то оценка конкретных механизмов резистентности представляет большую практическую проблему для клинической микробиологии. Это, прежде всего, касается фенотипических методов определения бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемаз – Ходж-тест, СИМ-тест, МБЛ-Е-тест и др. [136-138]. Многочисленные литературные источники, включая «Экспертные правила оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» указывают, что «*in vitro* оценка уровней устойчивости к β -лактамам у штаммов, продуцирующих БЛРС или карбапенемазы, способные расщеплять данные антибиотики, может быть недостаточно точной и воспроизводимой, особенно в рутинной практике» [139]. Длительность выполнения и низкая специфичность не оставляют фенотипическим методам выяв-

ления бета-лактамаз перспектив на существование даже в недалеком микробиологическом будущем. Ещё более плачевная ситуация сложилась с определением пориновой проницаемости и активности систем эффлюкса, а также с методиками выявления модификации мишени (например, ЛПС при резистентности к колистину): в практике клинической микробиологии не существует общепринятых способов их оценки. Есть мнение, что по-настоящему качественная и быстрая оценка механизмов резистентности возможна только при использовании генетических или протеомных подходов [140]. Способы определения генов бета-лактамаз хорошо зарекомендовали себя при воспроизведении на основе мультиплексной ПЦР и на ДНК-чипах. Серийно выпускающиеся наборы для мультиплексной ПЦР позволяют находить в чистых культурах и клиническом материале гены наиболее важных карбапенемаз *P. aeruginosa* – VIM, IMP, NDM, KPC, SPM, SIM, GIM и OXA [141-143]. Чип-технологии тоже показали себя в качестве перспективных диагностических систем: испытания чипа «Check-MDR CT103 XL» подтвердили его надежность для определения 23 генетических детерминант резистентности, кодирующих наиболее актуальные БЛРС, цефалоспорины и карбапенемазы грамотрицательных оппортунистических патогенов, включая *P. aeruginosa* [144]. Выявление эффлюкс- и порин-зависимых механизмов резистентности при помощи генетических методов является более сложным. Для этого необходимо секвенирование генов, контролирующих структуру и функцию поринов и эффлюксных насосов. Реализация таких технологий в условиях больших потоков образцов в клинической микробиологической лаборатории в ближайшее время кажется неосуществимой. Более перспективными для решения этой задачи кажутся протеомные технологии на основе масс-спектрометрии [145]. Возможность осуществления структурного анализа поринов и систем эффлюкса *P. aeruginosa* на основе матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) была реализована почти

10 лет назад [146]. Весьма интересным является масс-спектрометрическое определение дефектов ЛПС у резистентных к колистину штаммов [147]. У липида А, экстрагированного из штаммов *P. aeruginosa* с повышенными значениями МПК колистина, при помощи MALDI-TOF MS (в качестве матрицы использовался норхарман) были обнаружены специфические изменения масс-спектра. Присутствие бета-лактамаз также может выявляться при помощи масс-спектрометрии. В частности, MALDI-TOF MS позволяет оценить гидролиз карбапенемов у штаммов синегнойной палочки [148]. Методика основана на оценке пиков, специфичных для нативных и гидролизированных форм карбапенемов после инкубации исследуемого штамма с антибиотиком [149].

Заключение

Изложенный в обзоре материал свидетельствует об исключительной сложности механизмов резистентности у *P. aeruginosa*. Тем не менее, проведенный анализ позволяет сделать несколько практических обобщений. Во-первых, выбор антибиотикотерапии при синегнойной инфекции должен быть обоснован с позиции молекулярных механизмов резистентности возбудителя. Во-вторых, мониторинг нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa* и планирование противозидемических мероприятий должны проводиться с учетом информации о генетических основах резистентности на основании технологий молекулярной эпидемиологии. В-третьих, для борьбы с растущей резистентностью *P. aeruginosa* необходимо внедрение новых антисинегнойных препаратов. Последнее положение подтверждается экспертами Всемирной организации здравоохранения, которые считают, что резистентные штаммы *P. aeruginosa* занимают второе место в приоритетном листе патогенов, требующих разработки новых антибиотиков, а поиск новых АМП, эффективных в отношении карбапенеморезистентных штаммов, является критически важной задачей [150].

Литература

1. Kozlov R.S., Golub A.V., Dekhnich A.V., SMART Study Group. Antimicrobial Resistance of Gram-negative Microorganisms Causing Complicated Intra-abdominal Infections in Russia. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2015;17(3):227-234. Russian. (Козлов Р.С., Голуб А.В., Дехнич А.В., исследовательская группа SMART. Антибиотикорезистентность грамотрицательных возбудителей осложнённых интраабдоминальных инфекций в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015;17(3):227-234.)
2. Mayr F.B., Yende S., Angus D.C. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4-11.
3. Doring G., Conway S.P., Heijerman H.G., et al. J. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*. 2000;16(4):749-767.
4. Hidron A. I., Edwards J. R., Patel J., National Healthcare Safety Network Team. The National Healthcare Safety Network Team and Participating National Healthcare Safety Network Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29:996-1011.
5. Djordjevic Z., Folic M.M., Zivic Z., Markovic V., Jankovic S.M. Nosocomial urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species: Sensitivity to antibiotics and risk factors. *Am J Infect Control*. 2013;41(12):1182-1187.
6. Brewer S.C., Wunderink R.G., Jones C.B., Leeper K.V. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*. 1996;109:1019-1029.
7. Rello J., Rue M., Jubert P., et al. Survival in patients with nosocomial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiologic agent. *Crit Care Med*. 1997;25:1862-1867.
8. Edelstein M.V., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., and the «MARATHON» study group. Antimicrobial resistance of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013-2014. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2017;19(1):37-41. Russian. (Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю. и исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2013-2014 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017;19(1):37-41.)
9. Weiner L.M., Webb A.K., Limbago B., et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37(11):1288-1301.
10. Lazareva A.V., Tchebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Tchebotar V.I., Mayanskiy N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity, Pathogenesis and Diseases. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2015;17(3):170-186. Russian. (Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015;17(3):170-186.)
11. Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., et al. Complete genome sequence

- of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959-964.
12. Safaei H.G., Moghim S., Isfahani B.N., et al. Distribution of the Strains of Multidrug-resistant, Extensively Drug-resistant, and Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Burn Patients. *Adv Biomed Res*. 2017;6:74.
 13. Colomb-Cotinat M., Lacoste J., Brun-Buisson C., et al. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016;5(1):56.
 14. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Available at: www.eucast.org.
 15. The Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Available at: www.clsi.org.
 16. Hancock R.E.W. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*. 1998;27(1):S93-99.
 17. Cox G., Wright G.D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(6):287-292.
 18. Kong K.F., Jayawardena S.R., Del Puerto A., et al. Characterization of *poxB*, a chromo-somal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene*. 2005;358:82-92.
 19. Jana S., Deb J.K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;70:140-150.
 20. Arzanlou M., Chai W.C., Venter H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem*. 2017;61(1):49-59.
 21. Rice L.B. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc*. 2012;87(2):198-208.
 22. Rostami S., Sheikh A. F., Shoja S., et al. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(2):127-132.
 23. Wotkowicz T., Patzer J. A., Kaminska W., Gierczynski R., Dzierzanowska D. Distribution of carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates among hospitalised children in Poland: Characterisation of two novel insertion sequences disrupting the *oprD* gene. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016;7:119-125.
 24. Ishii Y., Ichikawa M., Yamaguchi K., Takano K., Inoue M. Localization of cephalosporinase in *Enterobacter cloacae* by immunocytochemical examination. *J Antibiot*. 1991;44(10):1088-1095.
 25. Francisco J.A., Earhart C.F., Georgiou G. Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89(7):2713-2717.
 26. Foster T.J. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol Rev*. 1983;47(3):361-409.
 27. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289:321-331.
 28. Jacoby G.A., Matthew M. The distribution of beta-lactamase genes on plasmids found in *Pseudomonas*. *Plasmid*. 1979;2(1):41-47.
 29. Mugnier P., Dubrous P., Casin I., Arlet G., Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(11):2488-2493.
 30. al Naiemi N., Duim B., Bart A. A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol*. 2006;55(11):1607-1608.
 31. Dubois V., Arpin C., Noury P., Quentin C. Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Carrying a blaTEM-21 Gene Located on a Chromosomal Interrupted TnA Type Transposon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(11):3624-3626.
 32. Marchandin H., Jean-Pierre H., De Champs C., et al. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(1):213-216.
 33. Poirel L., Ronco E., Naas T., Nordmann P. Extended-spectrum β -lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 1999;5(10):651-652.
 34. Chanawong A., M'Zali F.H., Heritage J., Lulitanond A., Hawkey P.M. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(6):839-852.
 35. Naas T., Philippon L., Poirel L., Ronco E., Nordmann P. An SHV-Derived Extended-Spectrum β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(5):1281-1284.
 36. Naiemi N.A., Duim B., Savelkoul P.H.M., et al. Widespread Transfer of Resistance Genes between Bacterial Species in an Intensive Care Unit: Implications for Hospital Epidemiology. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4862-4864.
 37. Celenza G., Pellegrini C., Caccamo M., et al. Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(5):975-978.
 38. Picao R.C., Poirel L., Gales A.C., Nordmann P. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(5):2225-2226.
 39. Nordmann P., Ronco E., Naas T., et al. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(5):962-969.
 40. Naas T., Poirel L., Karim A., Nordmann P. Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;176(2):411-419.
 41. Girlich D., Naas T., Leelaporn A., et al. Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):603-611.
 42. Poirel L., Rotimi V.O., Mokaddas E.M., Karim A., Nordmann P. VEB-1-like extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3):468-470.
 43. Dubois V., Poirel L., Marie C., et al. Molecular Characterization of a Novel Class 1 Integron Containing blaGES-1 and a Fused Product of aac(3)-Ib/aac(6)-Ib" Gene Cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(3):638-645.
 44. Kotsakis S.D., Papagiannitsis C.C., Tzelepi E., et al. GES-13, a β -Lactamase Variant Possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):1331-1333.
 45. Poirel L., Brinas L., Fortineau N., Nordmann P. Integron-Encoded GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamase with Increased Activity toward Aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3593-3597.
 46. Poirel L., Brinas L., Verlinde A., Ide L., Nordmann P. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(9):3743-3748.
 47. Poirel L., Docquier J.-D., De Luca F., et al. BEL-2, an Extended-Spectrum β -Lactamase with Increased Activity toward Expanded-Spectrum Cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):533-535.
 48. Paisley J.W., Washington J.A. Combined Activity of Clavulanic Acid and Ticarcillin Against Ticarcillin-Resistant, Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978;14(2):224-227.
 49. Thomson K.S., Weber D.A., Sanders C.C., Sanders W.E. Beta-lactamase production in members of the family Enterobacteriaceae and resistance to beta-lactam-enzyme inhibitor combinations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(4):622-627.
 50. Sanders C.C., Iaconis J.P., Bodey G.P., Samonis G. Resistance to ticarcillin-potassium clavulanate among clinical isolates of the family Enterobacteriaceae: role of PSE-1 beta-lactamase and high levels of TEM-1 and SHV-1 and problems with false susceptibility in disk diffusion tests. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(9):1365-1369.
 51. Poirel L., Naas T., Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):24-38.
 52. Hall L.M., Livermore D.M., Gur D., Akova M., Akalin H.E. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(8):1637-1644.
 53. Juan C., Mulet X., Zamorano L., et al. Detection of the Novel Extended-Spectrum β -Lactamase OXA-161 from a Plasmid-Located Integron in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5288-5290.
 54. Girlich D., Naas T., Nordmann P. Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):2043-2048.
 55. Sevillano E., Gallego L., Garcia-Lobo J.M. First detection of the OXA-40

- carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57(6):493-495.
56. Labuschagne C.J., Weldhagen G.F., Ehlers M.M., Dove M.G. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(6):527-530.
 57. Poirel L., Weldhagen G. F., De Champs C., Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(3):561-565.
 58. Villegas M.V., Lolans K., Correa A., and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1553-1555.
 59. Wolter D.J., Kurpiel P.M., Woodford N., et al. Phenotypic and Enzymatic Comparative Analysis of the Novel KPC Variant KPC-5 and Its Evolutionary Variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):557-562.
 60. Hong D.J., Bae I.K., Jang I.H., et al. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*. 2015;47(2):81-97.
 61. Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):306-325.
 62. Jovcic B., Lepsanovic Z., Suljagic V., et al. Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(8):3929-3931.
 63. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008;17(2):131-143.
 64. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582-610.
 65. Quale J., Bratu S., Gupta J., Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(5):1633-1641.
 66. Lopez-Causape C., Sommer L.M., Cabot G., et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistance in an international Cystic Fibrosis clone. *Sci Rep*. 2017;7(1):5555.
 67. Chevalier S., Bouffartigues E., Bodilis J., et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(5):698-722.
 68. Wolter D.J., Lister P.D. Mechanisms of β -lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Pharm Des*. 2013;19(2):209-222.
 69. Xavier D.E., Picao R.C., Girardello R., Fehlberg L.C., Gales A.C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol*. 2010;10:217.
 70. Lazareva A.V., Kryzhanovskaya O.A., Bocharova Ju.A., Chebotar' I.V., Mayanskiy N.A. The prevalence of metallo-beta-lactamases and efflux-mediated mechanisms in carbapenem nonsusceptible nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Moscow in 2012-2015. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk*. 2015;6:679-683. Russian. (Лазарева А.В., Крыжановская О.А., Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Распространенность металло-бета-лактамаз и эффлюкс-механизмов у карбапенемрезистентных госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в г. Москве в 2012-2015 годах. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015;6:679-683.)
 71. Chalhoub H., Saenz Y., Rodriguez-Villalobos H., et al. High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(6):740-743.
 72. Jacoby G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005;41(2):120-126.
 73. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the Max. *Front Microbiol*. 2011;2:65.
 74. Poole K. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(9):2233-2241.
 75. Li Y., Mima T., Komori Y., Morita Y., et al. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob. Chemother*. 2003;52:572-575.
 76. Sekiya H., Mima T., Morita Y., et al. Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, mexHI-opmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003;47:2990-2992.
 77. Tomas M., Doumith M., Warner M., et al. Efflux Pumps, OprD Porin, AmpC β -Lactamase, and Multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(5):2219-2224.
 78. Henrichfreise B., Wiegand I., Pfister W., Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(11):4062-4070.
 79. Hocquet D., Muller A., Blanc K., et al. Relationship between antibiotic use and incidence of MexXY-OprM overproducers among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1173-1175.
 80. Maseda H., Saito K., Nakajima A., Nakae T. Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;192(1):107-112.
 81. Jalal S., Ciofu O., Hoiby N., Gotoh N., Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:710-712.
 82. Ochs M.M., McCusker M.P., Bains M., Hancock R.E. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1085-1090.
 83. Cayci Y.T., Coban A.Y., Gunaydin M. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Indian J Med Microbiol*. 2014;32(3):285-289.
 84. Doi Y., Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 2007;45:88-94.
 85. Yamane K., Doi Y., Yokoyama K., et al. Genetic environments of the rmtA gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2069-2074.
 86. Jin J.S., Kwon K.T., Moon D.C., Lee J.C. Emergence of 16S rRNA methylase rmtA in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:490-491.
 87. Zhou Y., Yu H., Guo Q., et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:1349-1353.
 88. Gurung M., Moon D.C., Tamang M.D., et al. Emergence of 16S rRNA methylase gene armA and cocarriage of bla_{IMP-1} in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68:468-470.
 89. Ramirez M.S., Tolmasek M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist*. 2010;13:151-171.
 90. Biddlecome S., Haas M., Davies J., et al. Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: a new 3-N-acetylating enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;9:951-955.
 91. Haas M., Biddlecome S., Davies J., Luce C.E., Daniels P.J. Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: a new 6'-N-acetylating enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;9:945-950.
 92. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:479-487.
 93. Galimand M., Lambert T., Gerbaud G., Courvalin P. Characterization of the aac(6)-Ib gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase in *Pseudomonas aeruginosa* BM2656. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:1456-1462.
 94. MacLeod D.L., Nelson L.E., Shawar R.M., et al. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J Infect Dis*. 2000;181:1180-1184.
 95. Guillard T., Duval V., Moret H., et al. Rapid Detection of aac(6)-Ib-cr Quinolone Resistance Gene by Pyrosequencing. *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):286-289.
 96. Kettner M., Milosovic P., Hletkova M., Kallou J. Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates. *Infection*. 1995;23:380-383.
 97. Kim J.Y., Park Y.J., Kwon H.J., et al. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:479-483.
 98. Riccio M.L., Pallechi L., Fontana R., Rossolini G.M. In70 of plasmid pAX22, a bla_{IMP-1}-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1249-1253.

99. Muller C., Plesiat P., Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;55:1211-1221.
100. Trimble M.J., Mlynarcik P., Kolar M., Hancock R.E. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(10).
101. Lu S., Walters G., Parg R., Dutcher J.R. Nanomechanical response of bacterial cells to cationic antimicrobial peptides. *Soft Matter.* 2014;10:1806-1815.
102. Zhang L., Dhillon P., Yan H., Farmer S., Hancock R.E.W. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:3317-3321.
103. McPhee J.B., Lewenza S., Hancock R.E. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2003;50:205-217.
104. Yan A., Guan Z., Ratz C.R. An undecaprenyl phosphate-aminocarabiose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2007;282:36077-36089.
105. Fernandez L., Gooderham W. J., Bains M., et al. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:3372-3382.
106. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5:643.
107. Moskowitz S.M., Brannon M.K., Dasgupta N., et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):1019-1030.
108. Barrow K., Kwon D.H. Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5150-5154.
109. Gutu A. D., Sgambati N., Strasbourger P., et al. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2204-2215.
110. Daugelavicius R., Bakiene E., Bamford D.H. Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2969-2978.
111. McCoy L.S., Roberts K.D., Nation R.L., et al. Polymyxins and analogues bind to ribosomal RNA and interfere with eukaryotic translation *in vitro*. *Chembiochem.* 2013;14:2083-2086.
112. Mogi T., Murase Y., Mori M., et al. Polymyxin B identified as an inhibitor of alternative NADH dehydrogenase and malate: Quinone oxidoreductase from the Gram-positive bacterium *Mycobacterium smegmatis*. *J Biochem.* 2009;146:491-499.
113. Fernandez L., Alvarez-Ortega C., Wiegand I., et al. Characterization of the Polymyxin B Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):110-119.
114. Alvarez-Ortega C., Wiegand I., Olivares J., Hancock R.E.W., Martinez J.L. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4159-4167.
115. Breidenstein E.B.M., Khaira B.K., Wiegand I., Overhage J., Hancock R.E.W. Complex ciprofloxacin resistance revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:4486-4491.
116. Dotsch A., Becker T., Pommerenke C., et al. Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2522-2531.
117. Schurek K.N., Marr A.K., Taylor P.K., et al. Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:4213-4219.
118. Chebotar I.V., Mayansky A.N., Konchakova E.D., Lazareva A.V., Chistyakova V.P. Antimicrobial Resistance of Bacteria in Biofilms. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2012;14(1):51-58. Russian. (Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2012;14(1):51-58.)
119. Nichols W.W., Dorrington S.M., Slack M.P., Walmsley H.L. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(4):518-523.
120. Suci P.A., Mittelman M.W., Yu F.P., Geesey G.G. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(9):2125-2133.
121. Macia M.D., Blanquer D., Togores B., et al. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3382-3386.
122. Llanes C., Pourcel C., Richardot C., GERPA Study Group. Diversity of β -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(8):1763-1771.
123. Yu Y.S., Qu T.T., Zhou J.Y., et al. Integrons Containing the VIM-2 Metallo- β -Lactamase Gene among Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Different Chinese Hospitals. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):4242-4245.
124. Pfeifer Y., Cullik A., Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(6):371-379.
125. Wei W.J., Yang H.F., Ye Y., Li J.B. New Delhi metallo- β -lactamase-mediated carbapenem resistance: origin, diagnosis, treatment and public health concern. *Chin Med J.* 2015;128(14):1969-1976.
126. Sanbongi Y., Shimizu A., Suzuki T., et al. Classification of OprD sequence and correlation with antimicrobial activity of carbapenem agents in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates collected in Japan. *Microbiol Immunol.* 2009;53(7):361-367.
127. Adewoye L., Sutherland A., Srikumar R., Poole K. The MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J Bacteriol.* 2002;184(15):4308-4312.
128. Ooka T., Ogura Y., Asadulghani M., et al. Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. *Genome Res.* 2009;19(10):1809-1816.
129. Siguier P., Gourbeyre E., Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):865-891.
130. Bouteille D., Corvec S., Caroff N., et al. Detection of an IS21 insertion sequence in the mexR gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;230(1):143-146.
131. Diene S.M., L'homme T., Bellulo S., et al. ISPa46, a novel insertion sequence in the oprD porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(3):268-271.
132. Sun Q., Ba Z., Wu G., et al. Insertion sequence ISRP10 inactivation of the oprD gene in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47(5):375-379.
133. Masada H., Sawada I., Saito K., et al. Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-oprN efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1320-1328.
134. Kumar A., Schweizer H.P. Evidence of MexT-independent overexpression of MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in presence of metabolic stress. *PLoS One.* 2011;6:e26520.
135. Breidenstein E.B., de la Fuente-Nunez C., Hancock R.E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011;19(8):419-426.
136. Cohen Stuart J., Leverstein-Van Hall M.A. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(3):205-210.
137. Song W., Kim H., Kim J., et al. Carbapenem inactivation method: accurate detection and easy interpretation of carbapenemase production in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Ann Clin Microbiol.* 2016;19(4):83-87.
138. Woodford N., Eastaway A.T., Ford M., et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2010;48(8):2999-3002.
139. Clinical recommendations. Determination of the susceptibility of microorganisms to antimicrobials, 2015. Available at: www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015. Russian. (Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антими-

- кробным препаратам, 2015. Доступно по адресу: www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.
140. Baranov A.A., Mayansky A.N., Chebotar I.V., Mayansky N.A. A new era in medical microbiology. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk.* 2015;85(11):1011-1018. Russian. (Баранов А.А., Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Новая эпоха в медицинской микробиологии. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2015;85(11):1011-1018.)
 141. Tihomirov D.S., Katrysh S.A., Savochkina Ju.A., et al. Multiplex PCR as a new method for determining carbapenem resistance genes. *Gematologija i transfuziologija.* 2014;59(1):123. Russian. (Тихомиров Д.С., Катрыш С.А., Савочкина Ю.А. и соавт. Мультиплексная ПЦР как новый метод определения генов устойчивости к карбапенемам. *Гематология и трансфузиология.* 2014;59(1):123.)
 142. Pobolelova Yu.I., Ulyashova M.M., Rubtsova M.Yu., Egorov A.M. Multiplex PCR for joint amplification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D. *Biohimija.* 2014;79(6):718-723. Russian. (Поболелова Ю.И., Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Мультиплексная ПЦР для совместной амплификации генов бактериальных ферментов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D. *Биохимия.* 2014;79(6):718-723.)
 143. Shirani K., Ataei B., Roshandel F. Antibiotic resistance pattern and evaluation of metallo-beta lactamase genes (VIM and IMP) in *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBL enzyme, isolated from patients with secondary immunodeficiency. *Adv Biomed Res.* 2016;5:124.
 144. Bogaerts P., Cuzon G., Evrard S., et al. Evaluation of a DNA microarray for rapid detection of the most prevalent extended-spectrum β -lactamases, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Int J Antimicrob Agents.* 2106;48(2):189-193.
 145. Hrabak J., Chudackova E., Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):103-114.
 146. Imperi F., Ciccocanti F., Perdomo A.B., et al. Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics.* 2009;9(7):1901-1915.
 147. Liu Y.Y., Chandler C.E., Leung L.M., et al. Structural Modification of Lipopolysaccharide Conferred by mcr-1 in Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):e00580-17.
 148. Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3222-3227.
 149. Mirande C., Canard I., Buffet Croix Blanche S., et al. Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(11):2225-2234.
 150. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Available at: www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf.