



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273)
Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
info@cmac-journal.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование
Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2023.

Содержание

Болезни и возбудители

- Эйдельштейн И.А.
332 *Mycoplasma pneumoniae* – современные данные о строении, молекулярной биологии и эпидемиологии возбудителя
- Зырянов С.К., Бутранова О.И., Абрамова А.А.
350 Профиль госпитализированных пациентов с летальным исходом вследствие COVID-19
- Долгополов И.С., Зайцева А.В., Хамцова Ж.В., Иванова А.В., Цветкова Е.О.
358 Диссеминированная инфекция *Mycobacterium genavense* у ранее здорового ребенка: описание клинического случая и обзор литературы

Антимикробные препараты

- Резолюция совета экспертов
366 Цефподоксима проксетил – новые возможности антибактериальной терапии респираторных инфекций
- Козлов Р.С., Иванчик Н.В., Скленова Е.Ю., Микотина А.В., Азизов И.С., Трушин И.В., Дехнич А.В.
372 *In vitro* активность цефподоксима в отношении клинических изолятов *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes*
- Веселов А.В.
379 Клиническая фармакология и практические аспекты применения изавуконазола
- Гомон Ю.М., Колбин А.С., Арепьева М.А., Каляпин А.А., Балыкина Ю.Е., Курылев А.А., Кузьменков А.Ю., Козлов Р.С.
395 Потребление антимикробных препаратов в РФ в 2008–2022 гг.: фармакоэпидемиологическое исследование

Антибиотикорезистентность

- Бочарова Ю.А., Савинова Т.А., Маянский Н.А., Чеботарь И.В.
401 Новые мутации в генах, связанных с устойчивостью к цефидероколу, у клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa*

Опыт работы

- Коробова А.Г., Мещурова С.Ю., Трушина Е.Е., Самоходская Л.М.
408 Опыт использования автоматического анализатора для диагностики инфекций мочевыводящих путей
- Каражас Н.В., Пульнова Н.Л., Рыбалкина Т.Н., Бошняк Р.Е., Корниенко М.Н., Аветисян Л.Р., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю., Кабикова О.Ф., Габриэлян Н.И.
415 Значение герпесвирусных инфекций в этиологии бронхолегочных осложнений у пациентов, перенесших трансплантацию сердца
- Лавренчук Л.С., Миногина Т.В., Вахрушева Д.В., Скорняков С.Н.
421 Лекарственная устойчивость клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из резектатов костной ткани пациентов с туберкулезными спондилитами
- Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш., Башкина О.А., Наумов В.З.
428 Роль персонализированной медицины в оценке эффективности лечения лепры

Новые мутации в генах, связанных с устойчивостью к цефидероколу, у клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa*

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

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

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

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, резистентность, цефидерокол, мутации.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Проанализировать значимость хромосомных мутаций у клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* для формирования резистентности к цефидероколу.

Материалы и методы. Дизайн исследования предполагал сравнительный анализ характеристик фенотипической резистентности и особенностей хромосомных мутаций у изолятов *P. aeruginosa*, которые имеют единое происхождение, но отличаются по уровню чувствительности к цефидероколу. Объектом исследования были два изолята *P. aeruginosa*, выделенные из одного образца мокроты пациента с муковисцидозом, который ранее не проходил лечение цефидероколом. Методы исследования включали идентификацию при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии с последующим подтверждением на основе данных полногеномного секвенирования. Оценку антибиотикорезистентности проводили на основе определения минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотика. Генетические характеристики изолятов изучали на основе полногеномного секвенирования на платформе MGISEQ-2000 (MGI Tech) с последующей биоинформатической обработкой, направленной на выявление плазмидных генов резистентности и анализ хромосомных мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к цефидероколу.

Результаты. Оба изолята демонстрировали однотипные уровни МПК к антибиотикам, за исключением меропенема и цефидерокола. Наибольшую разницу между двумя изолятами показали МПК цефидерокола. По результатам E-тестов и метода микроразведений в бульоне один изолят соответствовал категории «чувствительный», другой был резистентным. Оба изолята принадлежали к ST2554. У цефидероколорезистентного изолята в генах, связанных с обменом железа и устойчивостью к бета-лактамам, было обнаружено восемь потенциально значимых мутаций, которые отсутствовали у цефидероколочувствительного изолята. У цефидероколорезистентного изолята в генах *pirA*, *pirR* и *piv* были обнаружены мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, а в генах *pfeA*, *cirA*, *iutA*, *pbpA*, *pchD* – несинонимичные мутации.

Выводы. Резистентность к цефидероколу может возникать у *P. aeruginosa* без предварительного контакта с этим антибиотиком как проявление кросс-резистентности. Цефидероколорезистентность может быть детерминирована не единственной мутацией, а совокупностью перестроек хромосомных генов.

Original Article

New mutations in genes associated with cefiderocol resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*

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

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

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

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, resistance, cefiderocol, mutation.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To assess the effects of chromosomal mutations on emergence of cefiderocol resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.

Materials and methods. Study design purported to compare the characteristics of phenotypic antibiotic resistance and chromosomal mutations of *P. aeruginosa* strains of a common origin possessing different resistance levels to cefiderocol. Two *P. aeruginosa* isolates from the sputum of a patient with cystic fibrosis who had not previously received cefiderocol were analyzed. Species identification was performed using an MALDI-TOF MS instrument and whole genome sequencing (WGS) data obtained from the MGISEQ-2000 platform. Antibiotic resistance was estimated based on minimum inhibitory concentration (MIC) testing. Plasmid-borne resistance genes and mutations in chromosomal genes associated with cefiderocol resistance were revealed based on WGS data.

Results. Both *P. aeruginosa* isolates had the same antibiotic MIC values excluding meropenem and cefiderocol MIC values. Cefiderocol MICs were significantly different between the two strains corresponding to the resistant clinical category for one isolate and to the susceptible category for another one. Both strains belonged to 2554 sequence type. Eight potentially significant mutations in iron-uptake genes and genes associated with beta-lactam resistance were detected in the genome of the cefiderocol-resistant isolate,

which were absent in the cefiderocol-susceptible strain. Cefiderocol resistant isolate harbored frameshift mutations in *pirA*, *pirR* and *piv* and nonsynonymous mutations in *pfeA*, *cirA*, *iutA*, *pbpA* and *pchD*.

Conclusions. Cefiderocol resistance can emerge among *P. aeruginosa* isolates which were not exposed to cefiderocol as the phenomenon of cross-resistance. Resistance to cefiderocol can be conferred not by a single mutation, but by a combination of chromosomal gene alterations.

Введение

Pseudomonas aeruginosa включена в перечень ESKAPE-патогенов, которые объединяют шесть наиболее опасных возбудителей оппортунистических инфекций [1]. Инфекции нижних дыхательных путей при муковисцидозе (МВ) являются одним из наиболее ярких и частых примеров клинической опасности *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* является ключевым МВ-патогеном у 18,2–26% пациентов с длительной колонизацией лёгких и служит негативным индикатором течения этой болезни [2, 3]. Резистентные к антибиотикам изоляты этого патогена представляют особую опасность. *P. aeruginosa* способна быстро адаптироваться ко всем классам антисинегной антибиотиков, не исключая новые препараты, в частности, цефидерокол. В настоящее время цефидерокол рекомендуют в качестве препарата выбора для лечения инфекций, вызванных резистентными штаммами *P. aeruginosa*, которые не поддаются эрадикации другими антибиотиками [4]. Эффективность цефидерокола была подтверждена в отношении 97,5% карбапенеморезистентных изолятов *P. aeruginosa*, 91% карбапенеморезистентных изолятов *Acinetobacter baumannii* и 99,6% карбапенеморезистентных изолятов *Stenotrophomonas maltophilia* [5]. Однако к настоящему времени уже описаны случаи устойчивости *P. aeruginosa* к цефидероколу. В частности, анализ 150 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от 50 пациентов с МВ показал, что 6 пациентов были носителями 9 цефидероколорезистентных изолятов [6].

Основой цефидероколорезистентности считают модификацию генов, прямо или косвенно участвующих в транспорте железа, которых насчитывается не менее 120. Не исключается роль повреждения генов-мишеней цефидерокола (РВР2-кодирующий ген *pbpA* и РВР3-кодирующий ген *ftsI*), генов цефалоспоринызы *AmpC*, генов регуляторных систем (*pmrAB*, *fusA1*) [6]. Однако вопросы о значимости конкретных нарушений структуры тех или иных генов в реализации резистентности являются спорными. Например, по данным Luscher A. и соавт., делеция *TopB*-ассоциированного гена *pivA* (ген одного из рецепторов сидерофоров) вызывает 16-кратное увеличение минимальной подавляющей концентрации (МПК) цефидерокола изолята *P. aeruginosa* PAO-1 [7]. Gupta A. и соавт. получили обратные результаты: изолят с двукратным снижением экспрессии *pivA* демонстрировал крайне высокую чувствительность к цефидероколу [8]. Подобная неоднозначность наблюдается и в отношении других мутаций. Указанные противоречия актуализируют исследования генетических меха-

низмов, индуцирующих цефидероколорезистентность. Нам удалось обнаружить интересные клинические изоляты *P. aeruginosa*, анализ геномов которых позволяет расширить представление о механизмах адаптации *P. aeruginosa* к цефидероколу.

Цель настоящей работы – проанализировать значимость хромосомных мутаций у клинических изолятов *P. aeruginosa* для формирования цефидероколорезистентности.

Материалы и методы

Объектом исследования были два изолята *P. aeruginosa*, выделенные из одного образца мокроты пациента с МВ в возрасте 17 лет, проживающего в Москве. Из анамнеза заболевания известно, что пациент ранее проходил лечение фторхинолонами, аминогликозидами, бета-лактамами антибиотиками (цефалоспоринами, карбапенемами), но не цефидероколом.

Выделение микроорганизмов проводили в соответствии с принципами лабораторного стандарта получения и исследования микробиологических образцов от пациентов с МВ [9]. Видовую принадлежность определяли при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии (Vitek-MS, bioMérieux) с последующим подтверждением на основе данных полногеномного секвенирования (см. ниже).

МПК антибиотиков определяли с использованием тест-систем Sensititre Gram Negative GNX2F AST Plate (Thermo Fisher Scientific), для оценки МПК цефидерокола использовали два метода: метод градиентной диффузии (Е-тест) при помощи (MIC test strip FDC 0,016-256, Liofilchem srl.) и метод микроразведений в бульоне (ComASP Cefiderocol 0,008-128, Liofilchem srl.). В соответствии с рекомендациями производителя тест-систем «MIC test strip FDC 0,016-256» метод градиентной диффузии воспроизводили на необходимом по катионам железа агаре Мюллера-Хинтона (использовался агар производства Bio-Rad Laboratories Inc., арт. 64884). Контроль качества и интерпретацию результатов выполняли, основываясь на рекомендациях Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) [10].

Бактериальную ДНК выделяли из суточных культур исследуемых изолятов при помощи наборов QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). ДНК-библиотеки готовили, используя ультразвуковую фрагментацию (Covaris) бактериальной ДНК с последующей репарацией концевых

последовательностей и лигированием адаптеров (MGI). Очистку ДНК-библиотек проводили при помощи магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman).

Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MGISEQ-2000 (MGI Tech) с длиной прочтений 250 пар оснований.

Для сборки бактериального генома применяли программу SPAdes 3.14 [11]. Контроль полноты сборки и исключение возможности контаминации проводили с использованием веб-сервера Contest16S и программы CheckM [12, 13]. Качество сборки оценивали при помощи QUAST 5.0 [14].

Для анализа геномов использовали платформу Galaxy (<https://usegalaxy.org>), сервисы ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>) и BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве референсов сравнения использовали геномы штаммов *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* PAO1. Исключение составлял референс сравнения гена *piuD*, который не присутствует в геномах вышеупомянутых референсных штаммов, *piuD* сравнивали с соответствующим геном штамма *P. aeruginosa* LESB58, как было предложено Luscher A. и соавт. [7]. Сиквенс-тип изолятов определяли в соответствии со стандартной схемой мультилокусного сиквенс-типирования для *P. aeruginosa* с использованием данных полногеномного секвенирования (<https://pubmlst.org/paeruginosa>). Геномы изолятов были депонированы в базу данных GenBank (BioProject accession numbers JAJPLK000000000 и JAJPKW000000000).

Результаты

Значения уровней чувствительности к антибиотикам изучаемых изолятов *P. aeruginosa* показаны в Таблице 1. Оба изолята демонстрировали однотипные уровни МПК и были резистентны к тикарциллину/клавуланату, пиперациллину/тазобактаму, цефепиму, амикацину, тобрамицину, цiproфлоксацину, левофлоксацину. Оба изолята соответствовали клинической категории «чувствительный при повышенной экспозиции» к имипенему и азтре-

онаму. По формальным критериям чувствительности к цефтазидиму изоляты попадали в различные категории (чувствительность при повышенной экспозиции одного изолята и резистентность второго изолята), однако разница значений их МПК (8 и 16 мг/л) не свидетельствовала о принципиальных различиях их фенотипов устойчивости к цефтазидину. Значительные различия МПК наблюдались для меропенема (в 4 раза) и колистина (в 4 раза, хотя оба изолята и попадали в категорию чувствительных к колистину). У изолята со сниженной чувствительностью к колистину (МПК = 1 мг/л) в гене *rhoP* обнаружена делеция C390del, которая приводила к преждевременной терминации синтеза белка (R136stop, неполный белок – 60,18%).

Наибольшую разницу между двумя изолятами показали МПК цефидерокола. По результатам E-тестов и метода микроразведений в бульоне у одного изолята МПК цефидерокола составила 0,016 мг/л и 0,064 мг/л соответственно (категорий «чувствительный»), он получил название FDC-S (от англ. «cefiderocol (FDC) susceptible (S)»). Другой изолят продемонстрировал резистентность с МПК = 3 мг/л и 4 мг/л (E-тест и метод микроразведений соответственно) и был назван FDC-R (от англ. «cefiderocol (FDC) resistant (R)»).

Оба изолята принадлежали к ST2554, количество однонуклеотидных полиморфизмов кор-генома (core genome single nucleotide polymorphism, cgSNP), отличающих изоляты, равнялось 51. У обоих изолятов были обнаружены гены резистентности *bla*_{OXA-486} (бета-лактамаза типа OXA-486), *aph* (3')-IIIb (аминогликозид-3'-О-фосфотрансфераза), *crpP* (ципрофлоксацин-фосфотрансфераза), *bla*_{PDC-1} (AmpC-цефалоспориноаза).

У цефидероколорезистентного изолята FDC-R в генах, связанных с обменом железа и устойчивостью к бета-лактамам, было обнаружено восемь потенциально значимых мутаций, которые отсутствовали у цефидероколочувствительного изолята. Перечень обнаруженных мутаций суммирован в Таблице 2. Мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания у цефидероколорезистентного изолята, были обнаружены в генах *pirA* (424Tfs), *pirR* (130Rfs) и *piv* (67Pfs). В генах *pfeA*, *cirA*, *iutA*, *pbpA*,

Таблица 1. Фенотипическая резистентность цефидероколочувствительного (FDC-S) и цефидероколорезистентного (FDC-R) изолятов *P. aeruginosa*

Изоляты <i>P. aeruginosa</i>	МПК (мг/л)/интерпретация по EUCAST													
	TIM ^a	P/T ^a	FEP ^a	TAZ ^a	MEM ^a	IMI ^a	AZT ^a	AMI ^a	TOB ^a	CIP ^a	LEV ^a	COL ^a	FDC ^b	FDC ^c
FDC-S	64/R	64/R	16/R	8/I	1/S	1/I	16/I	> 32/R	> 8/R	2/R	8/R	0,25/S	0,016/S	0,064/S
FDC-R	128/R	> 64/R	> 16/R	16/R	4/I	2/I	16/I	> 32/R	8/R	2/R	8/R	1/S	3/R	4/R

S – чувствительные, I – чувствительные при повышенной экспозиции, R – резистентные;

TIM – тикарциллин/клавуланат, P/T – пиперациллин/тазобактам, FEP – цефепим, TAZ – цефтазидим, AZT – азтреонам, MER – меропенем, IMI – имипенем, AMI – амикацин, GEN – гентамицин, TOB – тобрамицин, CIP – цiproфлоксацин, LEV – левофлоксацин, COL – колистин, FDC – цефидерокол

^a МПК была определена при помощи Sensititer GNX2F Panel;

^b МПК была определена при помощи MIC test strip FDC (E-test);

^c МПК была определена при помощи ComASP™ Cefiderocol 0,008-128.

Таблица 2. Сравнение изменений аминокислотных последовательностей продуктов генов, влияющих на чувствительность к цефидероколу, у чувствительного (FDC-S) и резистентного (FDC-R) изолятов *P. aeruginosa*

Ген	Изолят	
	FDC-S (продукты генов)	FDC-R (продукты генов)
Гены, ассоциированные с рецепцией и транспортом железа/сидерофоров		
<i>pirA</i> (рецептор ферриэнтеробактина)	G363S	424Tfs
<i>pfeA</i> (рецептор ферриэнтеробактина)	H181R	H181R, D401N
<i>femA</i> (рецептор ферримикобактина)	E535D	E535D
<i>pfuA</i> (вероятный TopB-зависимый рецептор PfuA)	G466S	wt
<i>cirA</i> (вероятный TopB-зависимый рецептор CirA, домен)	A61T, V339M	A61T, A62T , V339M
<i>optI</i> (TopB-зависимый рецептор OptI)	G52S, G96D, E104K	G52S, G96D
<i>optJ</i> (TopB-зависимый рецептор OptJ)	V672A	V672A
<i>sppR</i> (TopB-зависимый рецептор SppR)	Y823H	wt
<i>bfrD</i> (TopB-зависимый рецептор BfrD)	G466S	wt
<i>iutA</i> (рецептор ферриаэробактина)	wt	D701N
<i>piuD*</i> (ортолог гена <i>piuA</i> , см. текст)	Q96K, P539S, V577A, T605A, S612T	Q96K, P539S, V577A, S612T
<i>tonb3</i> (трансмембранный транспортер)	F57L	F57L
<i>exbB2</i> (транспортный протеин ExbB2)	276Gfs	276Gfs
<i>exbD1</i> (транспортный протеин ExbD)	V73I	V73I
<i>pchD</i> (протеин биосинтеза пиохелина PchD)	L295P	L257P
<i>pchF</i> (пиохелин-синтетаза PchF)	A103V, P122L, A315T, A532V, S1428L, E1738A	A103V, P122L, A315T, A532V, S1428L, E1738A
<i>ferG</i> (транспортный протеин ферриэнтеробактина FerG)	Q9L, I30V, L254M	Q9L, I30V, L254M
<i>pirR</i> (регулятор ответа двухкомпонентной системы, индуктор экспрессии <i>pirR</i> and <i>piuA</i>)	I30R_131GinsG	130Rfs
<i>pvdN</i> (периплазматическая аминотрансфераза PvdN)	V32A	V32A
<i>pvdQ</i> (3-оксо-С12-гомосерин-лактон-ацилаза PvdQ)	R210H	R210H
Гены, кодирующие мишени цефидерокола		
<i>pbpA</i> (пенициллин-связывающий протеин PBP2)	wt	D391G
<i>ftsI</i> (<i>pbp3</i>) (пенициллин-связывающий протеин PBP3)	G63S	wt
Гены, определяющие структуру и регулирующие экспрессию природных цефалоспоринов <i>P. aeruginosa</i> (PDC)		
<i>ampC</i> (цефалоспориназа AmpC)	A24T, L176R	A24T, L176R
<i>ampD</i> (амидаза AmpD)	R11L, T182I	R11L, T182I
Гены, связанные с регуляцией эффлюкса		
<i>nalC</i> (транскрипционный фактор)	G71E	G71E
<i>texR</i> (транскрипционный регулятор)	R63H, L123P	L123P
Другие гены		
<i>piv</i> (протеаза IV)	H137R	67Pfs

fs – «frameshift», мутация, приводящая к сдвигу рамки считывания, wt – «wild type», в анализируемом гене нет изменений при сравнении с референсными генами, ins – инсерция аминокислоты;

* в качестве референса использован штамм *P. aeruginosa* LESB58;

■ – мутации, которые присутствовали у изолята FDC-S;

■ – мутации, которые могут участвовать в индукции резистентности к цефидероколу;

Жирный шрифт – мутации, которые встречаются только у цефидероколорезистентного изолята.

pchD были обнаружены несинонимичные мутации (по сравнению с цефидероколовым чувствительным изолятом).

У цефидероколовым чувствительного изолята FDC-S в 28 генах, связанных с обменом железа и устойчивостью к бета-лактамам, было обнаружено 26 несинонимичных мутаций (по сравнению с цефидероколорезистентным изолятом FDC-R и референс-штаммами *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* PAO1). У обоих изолятов отсутствовали гены *piuA* (рецептор сидерофоров) и *frpA* (рецептор феррипиовердина).

Обсуждение

Нам удалось обнаружить два интересных клинических изолята *P. aeruginosa*, анализ геномов которых позволяет расширить представление о роли различных мутаций для адаптации к цефидероколу. Эти изоляты имели единое происхождение и подверглись дивергенции в дыхательных путях одного пациента с МВ. Доказательством близкого родства изолятов явилась их принадлежность к ST2554 и носительство одинаковых модификации генов, нетипичных для референсных штаммов *P. aeruginosa*. Фенотипическая устойчивость изолятов к антисинегнойным бета-лактамам, фторхинолонам и аминогликозидам логично коррелировала с наличием генов резистентности *bla_{OXА-486}*, *aph (3')-IIIb* и *crpP*. Причина снижения чувствительности FDC-R-изолята к колистину, вероятно, связана с летальной мутацией (C390del → R136stop) в его гене *phoP*, который является транскрипционным регулятором, принадлежащим к двухкомпонентной регуляторной системе PhoPQ и участвующим в модификации липополисахарида (липида А) [15]. Интересно, что один из этих изолятов оказался устойчивым к цефидероколу, хотя пациент никогда не получал этот антибиотик. Случаи формирования цефидероколорезистентности без предварительной терапии цефидероколом описаны ранее. Streling A.P. и соавт. описали 3 изолята *P. aeruginosa*, выделенные из крови пациента, которые имели единое клональное происхождение [16]. Один из этих изолятов обладал резистентностью к цефидероколу (МПК = 8 мг/л) и был носителем нонсенс-мутаций в связанных с транспортом железа генах *piuD* и *pirR*, которые авторы расценивали в качестве детерминант цефидерокол-резистентности. Вероятно, возникновение цефидероколорезистентности без предварительного воздействия цефидерокола является проявлением феномена кросс-резистентности, который наблюдался ранее в ответ на терапию цефтолозаном/тазобактамом [17].

Другой важный результат работы заключается в возможности вычленивать мутации (либо группы мутаций), которые могут детерминировать устойчивость к цефидероколу. К числу мутаций, нарушающих структуру гена, можно отнести обнаруженные нами сдвиги рамки считывания в генах рецептора энтеробактерина и синтетических катехолатов *pirA* (мутация в продукте гена – 424Tfs), регулятора двухкомпонентной регуляторной системы *pirR*

(мутация в продукте гена – 130Rfs) и эндопротеазы *piv* (мутация в продукте гена – 67Pfs). Эти мутации теоретически могли бы приводить к нарушению транспорта железа и снижению чувствительности к цефидероколу. Однако практика проведенных ранее исследований не подтвердила этого. Эксперименты с мутантами *P. aeruginosa* PAO1 показали, что делеция гена *pirA* не влияла на чувствительность к цефидероколу при отсутствии поломок в других генах, связанных с транспортом железа [7]. Повреждение, нарушающее структуру рамки считывания гена *pirA* (nt1269Δ1) и описанное в респираторных изолятах от пациента с МВ, также не вызвало резистентности к цефидероколу [6]. Аналогичная ситуация наблюдалась с мутациями в генах *pirR* и *piv*. Мутации в гене *pirR* (nt388_395ins7G) и (nt387insG) не приводили к формированию цефидероколорезистентности [6, 16]. Описана «мутация nt197Δ1» в гене *piv* трех респираторных изолятов *P. aeruginosa*, два из которых сохраняли чувствительность к цефидероколу, а третий изолят был резистентным, но имел комбинацию мутаций в ассоциированных с транспортом железа генах *pbpA*, *pirR*, *mexZ* [6].

Цефидероколорезистентный фенотип исследованного нами изолята может быть обусловлен двумя причинами. Во-первых, впервые обнаруженные мутации в генах *pirR*, приводящие к 130Rfs, и *piv*, приводящие к 67Pfs, качественно отличаются от описанных ранее мутаций в этих генах, а следовательно, могут быть более значимы для формирования цефидероколорезистентности. Вторая, более вероятная причина может заключаться в сочетании указанных мутаций с многочисленными несинонимичными мутациями в других генах, ассоциированных с обменом железа. Обнаруженные нами мутации в генах *pfeA*, *cirA*, *iutA*, *pbpA*, *pchD* вели к аминокислотным заменам в структуре кодируемых ими белков. О значимости этих мутаций нельзя говорить однозначно. Мутации в генах *pfeA*, *cirA*, *iutA* и *pchD*, приводящие к замене аминокислот, ранее не рассматривались как детерминанты цефидероколорезистентности у *P. aeruginosa*. López-Causapé С. и соавт. считают, что мутации в гене *pbpA* значительно повышают уровень устойчивости *P. aeruginosa* к цефидероколу [6]. Не оспаривая вывод этих авторов в целом, следует акцентировать внимание на неоднозначности обнаруженных ими мутаций в *pbpA*. В частности, изоляты с различными мутациями (со сдвигом или без сдвига рамки считывания) в *pbpA*-гене («nt4879ins1», «nt4763Δ3») демонстрировали разные уровни чувствительности (МПК от 0,5 до 4 мг/л) и принадлежали к разным по уровню чувствительности группам. Изоляты с заменами аминокислот в продуктах *pbpA* P442L и N587S были резистентны к цефидероколу, изоляты с S376N и Y360F – чувствительны. Вероятно, сложное фенотипическое отношение к цефидероколу было результатом сочетания многих мутаций в геномах этих изолятов – количество мутированных генов, ассоциированных с транспортом железа, у изолятов с измененными *pbpA*-генами составляло от 89 до 159 [6].

Отсутствие генов *piuA* и *fpvA* у исследованных нами изолятов является распространенным явлением для *P. aeruginosa*, функции этих генов в случае их отсутствия компенсируются генами-гомологами (*piuD* и др.) [6].

Подводя итог обсуждению значимых для цефидероколорезистентности мутаций, можно предположить, что устойчивость стала результатом комплекса мутаций в генах, ассоциированных с гомеостазом железа в клетках *P. aeruginosa*.

В качестве не менее важного результата исследования можно расценивать обнаружение мутаций, которые с большой долей вероятности не могут быть детерминантами цефидероколорезистентности. Речь идет о мутациях в связанных с транспортом железа в генах цефидероколочувствительного изолята (Таблица 2).

Заключение

Анализ фенотипических и генетических характеристик резистентности изолятов *P. aeruginosa*, одновременно выделенных от одного пациента и имеющих единое происхождение, но различные фенотипы резистентности, позволяет сделать несколько важных выво-

дов. Во-первых, резистентность к цефидероколу может возникать у *P. aeruginosa* без предварительного контакта с этим антибиотиком как проявление кросс-резистентности. Во-вторых, цефидероколорезистентность может быть детерминирована не единственной мутацией, а совокупностью перестроек хромосомных генов, ассоциированных с обменом железа. В-третьих, накопление знаний о мутациях, которые не вызывают устойчивость к цефидероколу, является важным для их исключения из перечня детерминант цефидероколорезистентности в молекулярно-генетической диагностике резистентности в случаях отсутствия сочетаний этих мутаций с другими повреждениями генов.

Благодарность

Мы благодарим Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ за поддержку с методической частью работы.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

Литература

1. Boucher H.W, Talbot G.H, Bradley J.S, Edwards J.E, Gilbert D., Rice L.B., et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1-12. DOI: 10.1086/599017
2. UK Cystic Fibrosis Registry 2021 Annual Data Report. Available at: <https://www.cysticfibrosis.org.uk/sites/default/files/2023-04/CF%20Trust%20Annual%20Data%20Report%202021.pdf>. Accessed September 20, 2023.
3. 2022 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Available at: <https://www.cff.org/medical-professionals/patient-registry>. Accessed September 20, 2023.
4. Tamma P.D., Aitken S.L., Bonomo R.A., Mathers A.J., van Duin D., Clancy C.J. Infectious Diseases Society of America Guidance on the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacterales* (ESBL-E), carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-*P. aeruginosa*). *Clin Infect Dis.* 2021;72:e169-83. DOI: 10.1093/cid/ciaa1478
5. Maseda E., Suárez de la Rica A. The role of ceftiderocol in clinical practice. *Rev Esp Quimioter.* 2022;35(Suppl. 2):39-44. DOI: 10.37201/req/s02.06.2022
6. López-Causapé C., Maruri-Aransas A., Gomis-Font M.A., Penev I., Castillo M.G., Mulet X., et al. Ceftiderocol resistance genomics in sequential chronic *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 2023;29(4):538.E7-538.E13. DOI: 10.1016/j.cmi.2022.11.014
7. Luscher A., Moynié L., Auguste P.S., Bumann D., Mazza L., Pletzer D., et al. TonB-Dependent receptor repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* for uptake of siderophore-drug conjugates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(6):e00097-18. DOI: 10.1128/AAC.00097-18
8. Gupta A., Landman D., Quale J. Relationship of TonB-dependent receptors with susceptibility to ceftiderocol in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77(5):1282-1285. DOI: 10.1093/jac/dkac022
9. Laboratory Standards for Processing Microbiological Samples from People with Cystic Fibrosis. Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group. 2010. Available online: <https://www.cysticfibrosis.org.uk/sites/default/files/2020-12/Laboratory%20standards.pdf>. Accessed September 20, 2023.
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 13.2, 2023. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, valid from 2023-01-01. Available online: <https://www.eucast.org/>. Accessed September 20, 2023.
11. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell

- sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
12. Lee I., Chalita M., Ha S.M., Na S.I., Yoon S.H., Chun J. ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(6):2053-2057. DOI: 10.1099/ijsem.0.001872
 13. Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 2015;25(7):1043-1055. DOI: 10.1101/gr.186072.114
 14. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013;29(8):1072-1075. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086
 15. Lee J.Y., Ko K.S. Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78(3):271-276. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.027
 16. Streling A.P., Al Obaidi M.M., Lainhart W.D., Zangeh T., Khan A., Dinh A.Q., et al. Evolution of cefiderocol non-susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* in a patient without previous exposure to the antibiotic. *Clin Infect Dis.* 2021;73(11):e4472-e4474. DOI: 10.1093/cid/ciaa1909
 17. Simner P.J., Beisken S., Bergman Y., Posch A.E., Cosgrove S.E., Tamma P.D. Cefiderocol activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates exhibiting ceftolozane-tazobactam resistance. *Open Forum Infect Dis.* 2021;8(7):ofab311. DOI: 10.1093/ofid/ofab311