



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.

Подписные индексы

По каталогу «Журналы России» на 2019 г. агентства «Роспечать»:

82125 – для индивидуальных подписчиков;

82126 – для организаций.

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:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
www.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

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2019.

Содержание

Болезни и возбудители

- Макинтош Д.
253 Разработка вакцин против гонореи, сифилиса, хламидиоза, вируса простого герпеса, вируса иммунодефицита человека и вируса Зика
- Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Кутузова А.В., Аксенова Е.И., Карпова Т.И., Тартаковский И.С., Ющук Н.Д., Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Чемерис О.Ю., Груздева О.А., Мелкумян А.Р., Орлова О.Е., Бурмистрова Е.Н.
261 Листерия: генотипирование как ключ к выявлению возможного источника заражения
- Муравьев А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Куркова А.А., Цветкова И.А., Козлов Р.С. и исследовательская группа «SPECTRUM»
275 Эпидемиология серотипов *S. pneumoniae*, выделенных у лиц старше 18 лет: здоровых носителей, пациентов с острым средним отитом, внебольничной пневмонией и инвазивной пневмококковой инфекцией (исследование «SPECTRUM»)

Антимикробные препараты

- Елисеева Е.В., Азизов И.С., Зубарева Н.А.
282 Обзор международных согласительных рекомендаций по оптимальному использованию полимиксинов
- Козлов Р.С., Голуб А.В.
310 Остановить темпы роста антибиотикорезистентности микроорганизмов сегодня – дать шанс на выживание человечества завтра

Антибиотикорезистентность

- Иванчик Н.В., Сухорукова М.В., Чагарян А.Н., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Архипенко М.В., Беккер Г.Г., Гудкова Л.В., Ершова М.Г., Жолобова А.Ф., Зубарева Н.А., Исакова Л.М., Кречикова О.И., Морозова О.А., Москвитина Е.Н., Петрова Т.А., Сивая О.В., Чернявская Ю.Л.
317 Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Haemophilus influenzae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ПеГАС 2014–2017»
- Веселов А.В.
324 Резистентность *Candida glabrata* к эхинокандинам: некоторые аспекты проблемы
- Зубарева Л.М., Эйдельштейн И.А., Руднева Н.С., Романов А.В., Власова Т.А., Лавриненкова Ю.В., Суханова Л.Н., Ахмедова А.М., Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Евстафьев В.В.
330 Распространенность ассоциированных с устойчивостью к макролидам мутаций у *Mycoplasma genitalium* среди пациентов с негонококковыми инфекциями, передающимися половым путем, в Смоленске и Туле

Опыт работы

- Шагинян И.А., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Сиянова Е.А., Бурмистров Е.М., Воронкова А.Ю., Кондратьева Е.И., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л.
340 Эпидемиологическая значимость молекулярной изменчивости генома изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих хроническую инфекцию легких у больных муковисцидозом
- Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Глинщикова О.А., Дроков М.Ю., Сударики А.Б., Туполева Т.А., Филатов Ф.П.
352 Мутации в гене UL97 цитомегаловируса, ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток
- Кецко Ю.Л., Жестков А.В., Гусякова О.А., Лунина А.В., Лямин А.В.
359 Влияние тинкториальных свойств микроорганизма на нутритивный статус и ближайший прогноз у пациентов с синдромом системной воспалительной реакции бактериального генеза
- Шамсиев Г.А., Хаммуд Ф.А., Закиров Ф.И., Попов Д.А., Лазарев Р.А., Абдуллоев О.К.
366 Случай успешного лечения инфекционного эндокардита митрального клапана, вызванного *Listeria monocytogenes*, после ранее выполненной операции на сердце

Эпидемиологическая значимость молекулярной изменчивости генома изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих хроническую инфекцию легких у больных муковисцидозом

Шагинян И.А.¹, Аветисян Л.Р.¹, Чернуха М.Ю.¹, Сиянова Е.А.¹, Бурмистров Е.М.¹, Воронкова А.Ю.², Кондратьева Е.И.², Чучалин А.Г.³, Гинцбург А.Л.¹

¹ ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

³ ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, Москва, Россия

Контактный адрес:
Марина Юрьевна Чернуха
Эл. почта: chernukha@gamaleya.org

Ключевые слова: хроническая инфекция легких, *P. aeruginosa*, полногеномное секвенирование, изменчивость, мутации.

Цель. Представить данные об одном из основных механизмов молекулярной изменчивости *P. aeruginosa*, вызывающей хроническую инфекцию легких у больных муковисцидозом.

Материалы и методы. На протяжении 10 лет исследовано 1800 мазков из зева и образцов мокроты от больных муковисцидозом. Идентификацию *P. aeruginosa* проводили классическими методами и с помощью тест-системы API 20NE (bioMerieux, Франция). Чувствительность к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом и с помощью ATB/M PSE 5 (bioMerieux, Франция). Генотипирование проводили методом RAPD-ПЦР и MLST. Полногеномное секвенирование трех изолятов *P. aeruginosa* провели на платформе Ion PGM Torrent с наборами Ion Sequencing Kit и чипами 316v1 (Life Technologies Thermo Fisher, США) по протоколу производителя. Первичная аннотация была проведена с помощью онлайн программы RAST.

Результаты. При проведении мониторинга хронической инфекции легких у больных МВ выявили 3 основных варианта изменчивости возбудителей: гетерогенность популяции возбудителя, микроэволюция возбудителя и смена одного вида возбудителя на другой вид или на тот же вид другого генотипа. Показано, что изменчивость генома возбудителей обусловлена приобретением мобильных генетических элементов (плазмид); мутациями в хромосомных генах, ответственных за устойчивость к антибиотикам, обеспечивающих жизнеспособность и выживаемость возбудителя при персистенции в организме больного; изменениями в профаговых регионах возбудителя.

Выводы. Эпидемиологическая значимость обнаруженных молекулярных механизмов изменчивости заключается, прежде всего, в способности штаммов к формированию эпидемически значимых клонов и необходимости в связи с этим разработки противоэпидемических мероприятий, направленных на ограничение их формирования и распространения.

Original Article

Epidemiological significance of genome variations in *Pseudomonas aeruginosa* causing chronic lung infection in patients with cystic fibrosis

Shaginyan I.A.¹, Avetisyan L.R.¹, Chernukha M.Yu.¹, Siyanova E.A.¹, Burmistrov E.M.¹, Voronkova A.Yu.², Kondratieva E.I.², Chuchalin A.G.³, Gintzburg A.L.¹

¹ National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

² Research Centre of Medical Genetics named after N.P. Bochkov, Moscow, Russia

³ Research Institute of Pulmonology, Moscow, Russia

Contacts:
Marina Yu. Chernukha
E-mail: chernukha@gamaleya.org

Key words: chronic lung infection, *P. aeruginosa*, whole genome sequencing, variation, mutations.

Objective. To present the data on the main mechanism of molecular variation in *P. aeruginosa* causing chronic lung infection in patients with cystic fibrosis.

Materials and methods. A total of 1800 throat swabs and sputum samples from cystic fibrosis patients were included in the study over the 10-year period. *P. aeruginosa* isolates were primarily identified by the biochemical method using the API 20NE test strips (bioMerieux, France). Antimicrobial susceptibility testing was performed by disc diffusion method. Genotyping was conducted by RAPD-PCR and MLST. Whole genome sequencing of three typical *P. aeruginosa* isolates was performed on an Ion PGM Torrent platform with Ion Sequencing Kit and 316v1 chips (Life Technologies Thermo Fisher, US) according to the manufacturer's protocol. The RAST web application was used for initial annotation.

Results. There were three main variants of the pathogen variability found: population heterogeneity, pathogen microevolution, and replacement by another genotype of the same species. The variation of the pathogen's genome is due to the acquisition of mobile genetic elements (plasmids), mutations in the chromosomal genes responsible for antibiotic resistance, bacterial viability and survival during persistence in a host, and changes in the prophage regions of the pathogen.

Conclusions. Epidemiological significance of the molecular mechanisms of pathogen variation is primarily due to the ability of strains to form epidemiologically significant clone. This requires control measures aimed to limit emergence and distribution of such clones to be developed.

Введение

Муковисцидоз (МВ) — наследственное аутосомно-рецессивное заболевание. Продолжительность жизни больных муковисцидозом в основном зависит от степени поражения органов дыхания условно-патогенными микроорганизмами. Это связано с тем, что основная причина летальных исходов у 90–95% больных МВ – инфекционные процессы в легких, вызываемые *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter* spp. [1]. Микроорганизмы, инфицирующие нижние дыхательные пути больного МВ, определяют лечение, качество жизни, перспективы для трансплантации и общую выживаемость [2]. Учитывая длительную персистенцию основных возбудителей в легких у больных МВ, как лечащих врачей, так и исследователей интересуют следующие вопросы: насколько стабильна и постоянна популяция возбудителя; происходят ли какие-либо изменения в микроорганизме; от чего может изменяться тактика лечения хронической инфекции легких и эпидемиология данной инфекции. Выявление особенностей персистенции основных возбудителей в легких больных МВ необходимо не только для выработки тактики лечения больных, но и для выяснения ряда важных вопросов эпидемиологии и микробиологии хронической инфекции легких у больных МВ. Показано, что выяснение данных вопросов возможно только на основе точной и своевременной идентификации возбудителей, которая имеет существенное значение для обеспечения своевременного начала лечения соответствующими антимикробными препаратами (АМП) (для элиминации бактериальных патогенов) и организации надлежащего инфекционного контроля (для профилактики распространения патогенных микроорганизмов среди больных МВ) [3]. С помощью разработанного алгоритма микробиологической диагностики хронической инфекции легких у больных МВ [4] были исследованы эпидемиологические особенности хронической инфекции легких, вызванной основными возбудителями: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* complex и *Achromobacter* spp. Было показано, что популяция основных возбудителей хронической инфекции легких на протяжении жизни пациента с МВ характеризуется изменчивостью, которая осуществляется двумя основными механизмами: фенотипической гетерогенностью и микроэволюцией возбудителя во время персистенции в результате приобретения геномом возбудителя мобильных генетических элементов и изменчивости хромосомных генов. Третий механизм обусловлен сменой возбудителя на другого возбудителя того же вида, но другого генотипа, или на возбудителя другого вида.

Цель этой статьи – представление данных об одном из основных механизмов молекулярной изменчивости возбудителя хронической инфекции легких (*P. aeruginosa*), а именно микроэволюции, происходящей вследствие горизонтального переноса генов (ГПП) лекарственной устойчивости, мутаций хромосомных генов возбудителя, ответственных за устойчивость к АМП, и генов, ответственных за жизнедеятельность, приспособляемость и выживаемость бактерий в легких больного. Обсуждается эпидемиологическая значимость данного механизма и его роль в формировании «эпидемически» значимых штаммов.

Материалы и методы

За период с 2008 по 2017 г. в динамике на протяжении 10 лет было исследовано 1800 мазков из зева и образцов мокроты от 300 детей с МВ. Большинство больных проходило лечение в отделении медицинской генетики Республиканской детской клинической больницы (РДКБ) или находилось на амбулаторном лечении в Московском центре муковисцидоза на базе Городской детской клинической больницы (ГДКБ №13) им. Н.Ф. Филатова. Были также исследованы 220 образцов мокроты от 100 взрослых больных, наблюдавшихся в НИИ пульмонологии Федерального медико-биологического агентства (ФМБА).

У детей образцы брали до и после антимикробной терапии (АМП) с интервалом 15–45 дней и более 6 месяцев. Длительность микробиологического мониторинга составляла от 4 месяцев до 10 лет.

Первичная идентификация *P. aeruginosa* проводилась с использованием теста на наличие оксидазы и коммерческой тест-системы API 20NE (bioMérieux, Франция).

С помощью диско-диффузионного метода определяли чувствительность к следующим АМП: имипенем, цефепим, цефтазидим, гентамицин, тобрамицин, ципрофлоксацин. Дополнительно проводили определение чувствительности с помощью АТВ™ PSE 5 (bioMérieux, Франция) к следующим АМП: имипенем (4–8 мкг), цефепим (8–16 мкг), цефтазидим (8–16 мкг), гентамицин (4–8 мкг), тобрамицин (4–8 мкг), ципрофлоксацин (1–2 мкг). Интерпретацию результатов определения чувствительности производили согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Версия 2015-02).

Для генотипирования штаммов использовали метод RAPD-ПЦП со случайным олигонуклеотидным праймером размером 10 нуклеотидов Sh1 – AATCGGGCTG.

Мультилокусное секвенирование *P. aeruginosa* проводили по методике Curran B. и соавт. [5].

Образование биопленок (БП) изучали путем определения способности штаммов *P. aeruginosa* к адгезии на поверхности 96-луночного полистиролового планшета. Ночную бульонную культуру бактерий разводили 1:100 в L-бульоне и инокулировали в лунки планшета по 150 мкл в четырех повторах. В качестве отрицательного контроля вносили по 150 мкл L-бульона. После инокуляции планшеты инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Через 24 ч. из лунок удаляли планктонные клетки и окрашивали пленки. Для этого в лунку вносили 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% кристалл-виолета и инкубировали в течение 45 мин. при комнатной температуре. После трехкратного промывания дистиллированной водой в лунки добавляли 200 мкл 96% этанола. Размер БП определялся путем измерения оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 540 нм интенсивности окрашивания содержимого лунок, которая соответствовала степени пленкообразования. Количественным выражением степени образования БП служили значения оптической плотности.

Исследование гипермутабельности проводили с использованием метода 10-кратных серийных разведений на агаре Мюллера – Хинтона с добавлением рифампицина согласно Oliver и соавт. [6].

Из числа больных был отобран пациент, который наблюдался в динамике в течение почти 10 лет. Как и у большинства больных, течение хронической инфекции у данного пациента характеризовалось периодами ремиссии и обострения.

За этот период больному проводили обязательные профилактические курсы АМТ после определения чувствительности микрофлоры мокроты: 1 раз в 3 месяца в/в, не менее двух АМП, длительность курсов не менее 2–3 недель. Превентивные курсы проводились 4 раза в год. При обострении бронхолегочного процесса пациент также получал курсы в/в АМТ в максимальных дозах, рекомендованных для больных МВ с высевом синегнойной палочки не менее 21 дня. Частота обострений в разные годы наблюдений составляла от одного до трех раз в год.

Для АМТ у данного пациента применялись следующие режимы: антисинегнойные цефалоспорины 3–4 поколения (цефтазидим 200 мг/кг/сут, или цефепим 150–200 мг/кг/сут или цефоперазон 160 мг/кг/сут) в сочетании с аминогликозидами (амикацин 20–25 мг/кг/сут в 1–2 введения или тобрамицин 10 мг/кг/сут), или карбапенемы (меропенем 4–6 г/сут) в сочетании с упомянутыми выше аминогликозидами. При нетяжелых обострениях в качестве монотерапии и при тяжелых обострениях дополнительным (третьим) АМП применялся внутрь цiproфлоксацин 750 мг 2 р/сут, курсы от 14 до 28 дней. Курсы цiproфлоксацина проводились до 2–3 раз в год.

В 2006 г. из мокроты больного выделяли мукоидный вариант *P. aeruginosa* и *S. aureus*. В 2007–2012 гг. эти микроорганизмы продолжали выделяться из материала, взятого из дыхательных путей. В 2012 г. были выделены мукоидный и немуюкоидный варианты *P. aeruginosa*, относящиеся к одному сиквенс-типу, и *S. aureus*. В 2016 г. были обнаружены только мукоидные штаммы *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *Achromobacter* spp. При по-

вторных посевах в 2017 г. и 2018 г. в мокроте больного присутствовали только *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Для полногеномного секвенирования нами были отобраны мукоидные варианты *P. aeruginosa*, выделенные соответственно в 2006 г., 2012 г. и 2016 г.

Полногеномное секвенирование проводили на платформе Ion PGM Torrent с наборами Ion Sequencing Kit и чипами 316v1 (Life Technologies Thermo Fisher, США) по протоколу производителя. (www.thermofisher.com/ru/ru/home/references/protocols.html) [7,8]. Первичная аннотация была проведена с помощью программ RAST (<http://rast.nmpdr.org>).

Результаты

Механизмы изменчивости *P. aeruginosa* при хронической инфекции легких

При проведении мониторинга хронической инфекции легких у больных МВ мы выявили 3 основных варианта изменчивости возбудителей хронической инфекции.

Первый вариант изменчивости характеризуется гетерогенностью популяции возбудителя. При анализе микробиологических образцов, выделенных из легких больных с хронической синегнойной инфекцией, в 40% случаев мы наблюдали гетерогенность популяции: изоляты характеризовались разной морфологией колоний, причем 18% штаммов были мукоидного фенотипа. При анализе как разных по морфологии, так и идентичных колоний наблюдались разные спектры устойчивости к АМП. Как правило, изоляты с разной морфологией (мукоидного и немуюкоидного фенотипов) и с разными спектрами устойчивости к АМП принадлежали к одному генотипу. В зависимости от длительности хронической инфекции легких гетерогенность популяции была незначительной при небольшой ее длительности (10% – до года; 15–20% – 1–4 года) и увеличивалась до 40–45% у больных с длительностью инфекции более 5 лет.

Второй вариант изменчивости – микроэволюция возбудителя – детально рассмотрен и проанализирован на примере 10-летнего мониторинга изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из легких больного с хронической инфекцией. При реализации этих механизмов изменчивости эрадикации возбудителя не происходило, и изменчивость осуществлялась внутри определенного конкретного вида возбудителя.

Третий выявленный механизм изменчивости характеризовался тем, что в результате проводимого лечения осуществлялась эрадикация возбудителя. При проведении курсов АМТ истинная эрадикация наблюдалась у 26% больных, инфицированных *S. aureus*; у 41% больных, инфицированных *P. aeruginosa*; у 30% больных, инфицированных *Achromobacter* spp. При проведении АМТ эрадикации *V. seraciacomplex* не происходило. После истинной эрадикации золотистого стафилококка или синегнойной палочки, как правило, наступала новая колонизация возбудителем того же вида, но другого генотипа, или колонизация возбудителем другого вида. Во время исследований также встречались и результаты ложной эрадикации, которая у золотистого стафилококка достигала 50%, а у синегнойной палочки – 18%. В этих случаях после предыдущего отрицательного вы-

сева наблюдали последующий высев первоначального возбудителя с теми же фенотипическими и генотипическими характеристиками. Данный механизм изменчивости будет обсужден в отдельной работе.

В этом исследовании анализируются данные, характеризующие микроэволюцию возбудителя хронической инфекции (*P. aeruginosa*) в результате ГПГ и изменчивости вследствие мутаций хромосомных генов, обуславливающих резистентность к АМП, и генов, обеспечивающих адаптацию бактерий к персистенции в легких у больных МВ.

Молекулярные механизмы формирования антибиотикорезистентных бактерий

Изменчивость в результате ГПГ лекарственной устойчивости

В Таблице 1 приведены основные фенотипические характеристики штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из легких одного пациента в период с 2006 по 2016 г.

Из Таблицы 1 видно, что основные фенотипические характеристики данных штаммов (пигментообразование, формирование БП, продукция альгината и гипермутабельность) идентичны и различия наблюдаются только в спектрах устойчивости к АМП. Первоначальный штамм характеризуется при этом как чувствительный, тогда как последующие стали устойчивыми к АМП, которые неоднократно использовались в лечении больного при обострениях хронической инфекции.

Для изучения процессов микроэволюции, происходящих в бактериях при персистенции, было проведено полногеномное секвенирование ДНК. Анализ результатов выравниваний нуклеотидных последовательностей 10 наиболее длинных контигов генома одного штамма на нуклеотидные последовательности другого штамма показал практически полное отсутствие однонуклеотидных замен. Это свидетельствует о том, что данные 3 штамма имеют клональное происхождение.

В результате секвенирования в первую очередь были подтверждены фенотипические результаты определения чувствительности к АМП исследованных штаммов. В Таблице 2 приведены гены, детерминирующие резистентность к АМП.

Таблица 1. Основные фенотипические свойства штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от одного пациента в 2006–2016 гг., и спектры их устойчивости к АМП

	Альгинат	Пигмент (пиомелин)	SCV-фенотип	Биопленки	Гипермутабельность	Чувствительность к АМП*					
						Имипенем	Цефтазидим	Цефепим	Гентамицин	Тобрамицин	Ципрофлоксацин
2006 г. (штамм 70Л)	+	+	-	+	+	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
2012 г. (штамм 203-2)	+	+	-	+	+	Р	Ч	Р	Р	Р	Ч
2016 г. (штамм 159В)	+	+	-	+	+	Р	Р	Р	Р	Р	Р

* Р – резистентный; Ч – чувствительный.

Таблица 2. Наличие и отсутствие генов антибиотикорезистентности у штаммов *P. aeruginosa*

Гены резистентности	Штамм 70Л	Штамм 203-2	Штамм 159В
к бета-лактамам			
<i>blaOXA-50</i>	+	+	+
<i>blaPAO</i> (класс C)	+	+	+
<i>blaTEM</i>	-	+	+
<i>blaSCO-1</i>	-	+	+
к аминогликозидам			
<i>aph(3')-Ib</i> аминогликозид 3'-фосфотрансфераза	+	+	+
<i>aac(3)-IIa</i> аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансфераза	-	+	+
к фосфомицину			
<i>fosA</i>	-	+	+
к фторхинолонам			
<i>aph(6')-Ib-cr</i>	-	-	-

Поиск генов антибиотикорезистентности проводили с помощью ResFinder.

Из Таблицы 2 видно, что все 3 штамма имеют гены бета-лактамазы класса D – *blaOXA-50* (карбапенемаза, проявляющая слабую карбапенемазную активность и имеющая хромосомную локализацию). Бета-лактамазы класса C (AmpC), которые могут гидролизовать цефалоспорины широкого спектра и не ингибируются классическими ингибиторами бета-лактамаз, обычно имеют хромосомную локализацию, но встречается и плазмидная. Второй (203-2) и третий (159В) штаммы отличаются от первого наличием трех дополнительных генов, детерминирующих резистентность к АМП: бета-лактамазы семейства *blaTEM* (класс A); ген *aac(3)-IIa* (аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансфераза); ген *fosA*. Гены *blaTEM* и *aac(3)-IIa* находятся на одном контиге. При выравнивании с помощью программы BLAST контигов обоих клонов, на которых находятся эти гены, с коллекцией нуклеотидных последовательностей базы NCBI было обнаружено, что контиг штамма 203-2 длиной 7365 на 99% идентичен участку, входящему в уже описанную плазмиду *Klebsiella pneumoniae* plasmid pKp848CTX (LM994717.1), а контиг штамма 159В имеет участки, идентичные на 100% участкам плазмид ряда бактерий, в том числе *K. pneumoniae* pKp848CTX (*C. freundii* strain SL 151 plasmid, *E. coli* strain Ecol_448 plasmid, *S. marcescens* strain R471 plasmid и др.). Вероятно, за 6 лет персистенции в организме больного *P. aeruginosa* в результате ГПГ приобрела гены *blaTEM* и *aac(3)-IIa* и продолжала колонизировать легкие больного, адаптируясь к условиям окружающей среды. Кроме того, при выравнивании нуклеотидной последовательности контигов, на которых находятся гены *blaTEM* и *aph(3')-Ib*, с геномом штамма 70Л совпадений выявлено не было, что также свидетельствует о приобретении данного участка, содержащего гены резистентности.

Мутации хромосомных генов, детерминирующих резистентность к АМП

Поскольку антибиотикорезистентность обуславливается не только ферментативной инактивацией, но и

Таблица 3. Аминокислотные делеции и замены в белках, ответственных за антибиотикорезистентность

	Аминокислотные замены и делеции у штаммов		
	70Л	203-2	159В
Резистентность к бета-лактамам			
AmpC ингибирование	Q44H(в), G148A(н), D183Y(н)	Q44H(в), G148A(н), D183Y(н)	Q44H(в), G148A(н), D183Y(н)
AmpR	M288R(н)	M288R(н)	M288R(н)
DacB	A394E(н)	A394E(н)	A394E(н)
OrpD	дт	5 замен и 2 делеции (N219del-в), (D218del-в)	7 замен S59R (н), S57E(н), D43N(н), I216T(в), A215P(н), Y214S(в), I210A(н)
MexAB-OrpM гиперфункция	гиперфункция	норм	норм
MexR (репрессор оперона множественной лекарственной устойчивости)	P85R(н), N86Q(в)	M1V(н)-	V5M(н) 1, MNYP, Del(н)
NalC (регулятор-репрессор транскрипции)	G71E(н)	G71E(н)	G71E(н)
NalD (регулятор транскрипции) – второй репрессор	V28M(в)	дт	дт
ArmR-MexR антирепрессор	дт	дт	дт
MexCD-OrpJ гиперфункция	норм	норм	норм
NfxB (регулятор транскрипции) репрессор	дт	дт	дт
Резистентность к аминогликозидам			
MexXY-OrpM гиперфункция	норм	гиперфункция	гиперфункция
MexZ (отрицательный регулятор MexXY) (<i>agrZ</i>)	G67V(н) – дт	Делеция (вр)	Делеция (вр)
RplA (50S рибосомальный белок L1)	дт	дт	дт
Fmt	S54N(н), P245Q(н)- дт	L5M(н), S54N(н), P245Q(н)-дт	L5M(н), S54N(н), P245Q(н)-дт
FolD	дт	дт	дт
rplU-rpmA промоутер	дт	дт	дт
rplU (50S рибосомальный белок L21)	дт	дт	дт
rpmA (50S рибосомальный белок L27)	дт	дт	дт
ParRS ParR (регулятор двухкомпонентной системы регуляции) ParS	дт	дт	дт
PA2572-PA2573	H398R(н)	H398R(н)	H398R(н)
	дт	дт/N236D(н), H283D(н)	дт/N236D(н), H283D(н)
Резистентность к фторхинолонам			
ДНК-топоизомеразы			
GyrA	S784P(н)	S784P(н)	S784P(н)
ParC	дт	дт	дт
GyrB	дт	дт	S466F(в)
ParE	S181G(н), N205S(н)	S181G(н), N205S(н)	S181G(н), N205S(н)
MexEF-OrpN гиперфункция	снижена	снижена	норм
MexT (положительный регулятор)	Q80H(в)	Q80H(в)	Del DARTQRDRPRRETVPRA(н) F172I(н)
MexS	V104M(н), D249N(н)	V4M(н), D49N(н)	дт
MexXY-OrpM гиперфункция	норм	гиперфункция	гиперфункция
MexCD-OrpJ гиперфункция	норм	норм	норм
MexAB-OrpM гиперфункция	Гиперфункция (есть мутации в репрессорах)	норм	норм

дт – дикий тип, аминокислотная последовательность идентична референсной последовательности; (в) – вредная аминокислотная замена; (н) – нейтральная аминокислотная замена; Del – делеция; норм – функция не нарушена.

другими механизмами, то были изучены гены, мутации в которых также могут привести к появлению резистентности у бактерий. В Таблице 3 приведены основные гены и аминокислотные замены в кодируемых ими белках. Замены, нарушающие функцию белка, отмечены буквой «в».

Установлено, что у трех клонов имеется вредная мутация в гене *ampD*, приведшая к замене в белке AmpD, регулирующем продукцию AmpC (Q44H-вредная, G148A-нейтральная, D183Y-нейтральная), и нарушению функции данного белка; это приводит к гиперфункции AmpC и появлению резистентности ко всем бета-лактамам, кроме цефепима и карбапенемов.

У штаммов 203-2 и 159В можно предположить нарушение функции порина OprD, что обусловлено двумя делециями: N219del-(в) и D218del-(в) (Таблица 3). Последовательность нуклеотидов гена и аминокислотная последовательность OprD являются индивидуальными для разных представителей *P. aeruginosa*. Идентичность нуклеотидной последовательности при этом может составлять от 91% до 93%, а идентичность аминокислотных последовательностей – от 88% до 93% [9]. В исследуемых в данной работе штаммах идентичность составляет 99%, что подтверждает их клональность. Но у штаммов 203-2 и 159В, в отличие от 70Л (2006 г.), в процессе персистенции появляются мутации в гене, кодирующем белок OprD. Это приводит к аминокислотным заменам и делециям, что и вызывает нарушение функции порина у клонов, выделенных в более поздние сроки. OprD представляет собой субстрат-специфичный порин, облегчающий диффузию основных аминокислот, малых пептидов и карбапенемов в бактериальную клетку. OprD-опосредованная резистентность возникает в результате сниженной транскрипционной экспрессии OprD и/или мутаций, приводящих к потере активности белка. Снижение чувствительности к карбапенемам в исследованных штаммах, в которых нет генов металло-бета-лактамазы, является результатом комбинированного действия ферментов ОХА и дефицита порина.

В резистентности к бета-лактамам большую роль играют системы эффлюкса MexAB-OprM и MexCD-OprJ. В генах, кодирующих белки MexR (репрессор оперона множественной лекарственной устойчивости) и NalD (регулятор транскрипции), у штамма 70Л были выявлены мутации, которые вызывают в белках ArgM гиперфункцию эффлюкса MexAB-OprM, являющегося антирепрессором MexR и NfxB (репрессор насоса MexCD-OprJ); замен обнаружено не было. У более поздних штаммов мутаций в вышеуказанных белках не выявлено.

Таким образом, различия в генетической детерминации резистентности к бета-лактамам выявлены у трех штаммов. У первого штамма (70Л) резистентность определяется ферментативным ингибированием (*bla*OXA-50, *bla*PAO (класс C)) и гиперфункцией эффлюкса MexAB-OprM. У второго и третьего штаммов (203-2 и 159В) резистентность к бета-лактамам определяется ферментативным ингибированием (*bla*OXA-50, *bla*PAO (класс C), *bla*TEM) и сниженной проницаемостью наружной мембраны (потеря OprD).

В белке MexZ (отрицательный регулятор MexXY на-

сосо, обеспечивающего резистентность к аминогликозидам), регулирующем активность эффлюкса MexXY-OprM (резистентность к аминогликозидам), мутации были выявлены только у штаммов 203-2 и 159В. В белках ParR-ParS двухкомпонентной регуляторной системы, принимающей участие в адаптивной резистентности, которая в присутствии АМП начинает контролировать порядка 100 генов (среди которых гены эффлюкса MexXY, гены *arn*BCADTEF оперона модификации липополисахарида, гены порина OprD) и приводит к полирезистентному фенотипу [10], отклонений ни у одного штамма выявлено не было.

Таким образом, у клона 70Л был обнаружен только ген *aph(3')-IIB*, ответственный за резистентность к аминогликозидам, а у штаммов 203-2 и 159В резистентность к аминогликозидам обусловлена как ферментативным ингибированием (*aac(3)-IIa* и *aph(3')-IIB*), так и гиперфункцией эффлюкса MexXY-OprM. Изменений в генах рибосомальных мишеней также не обнаружено.

Анализ генов мишеней фторхинолонов (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, и *parE*) показал, что мутаций в этих генах ни у штамма 70Л (2006 г.), ни у штамма 203-2 (2012 г.) нет. Но уже в штамме 159В (2016 г.) в области, определяющей устойчивость к хинолонам (QRDR), а именно в гене *gyrB*, кодирующем В-субъединицу ДНК-гиразы (топоизомераза II), появляется мутация, отсутствовавшая у клонов, выделенных в 2006 г. и 2012 г., которая привела к аминокислотной замене S466F в В-субъединице. В процессе персистенции благодаря мутации в гене *gyrB* *P. aeruginosa* приобретает резистентность к фторхинолонам (офлоксацину, цiproфлоксацину и левофлоксацину), что видно из антибиотикограммы (Таблица 2).

У клонов 70Л (2006 г.) и 203-2 (2012 г.) в MexT (положительный регулятор; один из двух регуляторных протеинов эффлюкса MexEF-OprN, которые обеспечивают выведение из клетки фторхинолонов, триметоприма и хлорамфеникола [11]) была выявлена нарушающая функцию белка замена Q80H(в). Следует отметить, что MexEF-OprN насос является единственной положительно регулируемой из 11 существующих RND системой эффлюкса у *P. aeruginosa*, его экспрессия активируется белком MexT семейства LysR [12]. В MexT у последнего клона (2016 г.) такая замена отсутствовала, однако была делеция, которая не привела к нарушению функции белка, т.е. у последнего клона не была нарушена работа эффлюкса MexEF-OprN. Таким образом, в обоих более ранних клонах была неблагоприятная мутация в генах, которая отсутствовала у штамма 159В (2016 г.). Это является примером гетерогенности и показывает, что одна из субпопуляций, вероятно, в результате направленного отбора выживает и сохраняется в макроорганизме.

Генетическая основа резистентности к остальным АМП у всех трех штаммов одинакова и обусловлена наличием генов, обеспечивающих ферментативное ингибирование соответствующего АМП.

Таким образом, ферментативное ингибирование преобладает среди механизмов резистентности к АМП у всех трех штаммов и наиболее выражено у штаммов 203-2 и 159В, которые, в отличие от 70Л, имеют еще 3 дополнительных гена: *bla*TEM, *aph(3')-IIa* и *fosA*.

У первого штамма имеются мутации в репрессорах, возможно, приводящие к усилению функции *MexAB-OprM* эффлюкса. Насос *MexAB-OprM* способен выводить из клетки АМП разных групп, включая фторхинолоны, тетрациклины, хлорамфеникол, бета-лактамы, ингибиторы бета-лактамаз, макролиды, новобиоцин, триметоприм и сульфаниламиды [13, 14]. Из всех RND насосов *MexAB-OprM* имеет наиболее широкий профиль субстратов из бета-лактамов, способен выводить карбоксипенициллин, азтреонам, цефалоспорины широкого спектра (цефтазидим и цефотаксим), карбапенемы (меропенем, но не имипенем) [15]. Экспрессия *MexAB-OprM* контролируется системой «quorum sensing» [16, 17]. У второго и третьего штаммов мутации обнаружены в генах, регулирующих экспрессию *MexXY-OprM* и порина *OprD*. Для *MexXY* субстратами являются фторхинолоны, цефепим, аминогликозиды, тетрациклин, хлорамфеникол [18]. Экспрессия *mexXY* гена индуцируется при росте клеток в присутствии тетрациклина, эритромицина и гентамицина [17]. Кроме того, у третьего клона (2016 г.) появляется мутация в гене *guyB*, приводящая к возникновению резистентности к фторхинолонам. Таким образом, в процессе персистенции происходят постоянные генетические изменения, приводящие к повышению резистентности микроорганизма к АМП.

Генетические механизмы адаптации бактерий к персистенции в легких у больных МВ

Изменчивость генов, ответственных за жизнедеятельность, приспособляемость и выживаемость бактерий

У штаммов 70Л и 203-2 были также проанализированы некоторые гены, ответственные за жизнедеятельность, приспособляемость и выживаемость бактерий, в частности, гены системы «quorum sensing»; гены, участвующие в продукции альгината, экспрессии токсинов секреторной системы третьего типа (ССТП) и др.

Система «quorum sensing» (QS) – способность бактерий общаться с помощью молекулярных сигналов (аутоиндукторов) в зависимости от плотности клеток и координировать экспрессию ряда генов (факторов вирулентности) [19]. В инактивированном состоянии система QS у *P. aeruginosa* находится под негативным контролем трех белков-репрессоров (*RsmA*, *RpoS* и *QscR*), которые предупреждают раннюю активацию. При высокой плотности клеток штамм дикого типа вырабатывает факторы вирулентности, формирует БП и становится более устойчивым к АМП, что не наблюдается у *lasR*-мутантов [20, 21]. *lasR* – транскрипционный регулятор системы QS. Система *las* состоит из транскрипционных активаторов *LasR* и *LasI*, которые определяют синтез аутоиндуктора N-(3-оксодеканоил) гомосеринлактона (PAI-1). Система *rhl* состоит из *RhlR*- и *RhlI*-транскрипционных активаторов, которые определяют синтез N-бутирил гомосеринлактона (PAI-2). Исследования показали, что в зависимости от экспериментальных условий системы *LasRI* и *RhlRI* вместе контролируют от 6% до 12% всех хромосомных генов *P. aeruginosa*, в том числе и генов, кодирующих факторы вирулентности [22].

Исследование ключевых генов системы QS у двух штаммов 70Л, 203-2 и 159В показало, что у клона 70Л

ген *lasR* кодирует протеин на 99% сходный с референсным – PAO1. Имеется одна замена Y64C, которая приводит к потере функции белка. У клонов 203-2 и 159В в гене *lasR* мутаций нет (100% сходство с референсной последовательностью). Белок, кодируемый *LasI*, у трех штаммов также на 100% сходен с референсной последовательностью. Белок, кодируемый *RhlI*, у трех штаммов на 99% имеет сходство с референсом: имеются замены S62G и D83E, которые являются нейтральными и не нарушают функцию белка. Таким образом, только штамм 70Л представлял собой *lasR*-мутант.

Показано, что мутанты *lasR* индуцируют сильно выраженный воспалительный ответ в респираторных эпителиальных клетках с повышенной аккумуляцией провоспалительных цитокинов и накоплением нейтрофилов из-за отсутствия бактериально зависимой деградации цитокинов. Было показано, что у пациентов с МВ, инфицированных *lasR*-мутантами, повышена концентрация в плазме интерлейкина-8, являющегося маркером воспаления. Эти данные свидетельствуют о том, что адаптивные изменения, происходящие в бактериях, могут способствовать патогенезу и усилению воспалительного процесса в легких и прогрессированию хронических заболеваний легких у пациентов с МВ [23].

Считается, что *lasR*-мутанты более приспособлены к существованию в условиях, характерных для легких у больного МВ. Инфекция, ассоциированная с *lasR*-мутантом, характеризуется более плохим прогнозом [24].

В нашем случае, очевидно, существуют другие многочисленные факторы, способствующие селекции бактерий, т.к. мы наблюдаем исчезновение данного мутанта (штамма 70Л): в ключевых генах системы QS у более поздних изолятов мутации отсутствуют.

Микроэволюционные изменения в бактериях во многих случаях обуславливаются мутациями. Частота этих мутаций находится под контролем системы MMR (DNA mismatch repair system). Она узнает и восстанавливает все ошибочные инсерции, делеции, возникающие при репликациях и рекомбинациях ДНК. Вероятность ошибки при репликации ДНК составляет 10⁻⁷–10⁻⁸. Система MMR снижает вероятность до 10⁻⁹. Данная система выработалась в процессе эволюции для подавления изменений и сохранения вида. Мутации в генах системы MMR приводят к ее инактивации, выключается каскад MMR, нарушается работа, что влияет на скорость возникновения мутаций в геноме микроорганизмов, т.е. увеличиваются адаптационные способности бактерий. Мутации в генах *mutS* и/или *mutL* данной системы приводят к нарушению функции и появлению фенотипа с высокой частотой мутаций – гипермутабельного фенотипа. Исследование гена *mutL* показало, что у всех трех штаммов (70Л, 203-2 и 159В) этот ген не имеет мутации и имеет 100% сходство с *mutL* геном PAO1, т.е. функционирует полноценно. Анализ локуса *mutS* у штамма 70Л показал, что данный локус имеет идентичность с *mutS* PAO1 на 99%, 3 делеции и 1 замену. Выравнивание соответствующего протеина с протеином PAO1 показало сходство на 98% (9 замен, например, P614S(в), N615E(в), которые являются вредными, и инсерция I620). Белок *MutS* у штаммов 203-2 и 159В также характеризуется делецией аминокислот, которая привела

к нарушению его функции. Аминокислотная последовательность белка MutS клонов 203-2 и 159В при этом идентичная, но отличается от последовательности белка MutS клона 70Л. Это указывает на то, что мутации в одних и тех же генах могут различаться, однако могут приводить к потере функции белка, кодируемого этим геном. В системе восстановления ДНК, участвующей в рекомбинационной репарации одноцепочечных брешей ДНК, в белке RecN у клонов 70Л и 203-2 имеются одинаковые нейтральные замены (N251S(н) и E360K(н)) по сравнению с референсом. В белке RecF у клона 70Л выявлена одна замена L183M(н), у клона 203-2 – одна замена S263A(н).

Таким образом, все 3 штамма характеризуются высокой частотой мутаций, что связано с мутацией в гене *mutS*. Критическим компонентом MMR выступают протеины MutS и MutL, определяющие гипермутабельный фенотип [25].

Одним из факторов вирулентности *P. aeruginosa* является продукция экзополисахарида альгината, который защищает бактерии от фагоцитоза, облегчает их прикрепление к клеткам макроорганизма, принимает участие в формировании БП и способствует персистенции бактерий. Клоны 70Л и 203-2 имеют все 12 генов *algA*-*algD* оперона, участвующего в биосинтезе альгината. Экспрессия данного оперона находится под регуляцией *algD* промотора, который в свою очередь регулируется анти-сигма фактором MucA, подавляющим транскрипционную активность альтернативного сигма-фактора *algU*, который является позитивным регулятором продукции альгината и негативным регулятором подвижности палочек с помощью жгутика. Мутации, инактивирующие MucA, приводят к появлению мукоидного фенотипа, обусловленного гиперпродукцией альгината. Анализ гена, кодирующего MucA в клонах 70Л, 203-2 и 159В, и сравнение с аналогичной последовательностью лабораторного штамма PAO1 показали замены T199G, A244G244, A341G341, T382G, которые не привели к нарушению аминокислотного состава кодируемого белка. Однако у клона 70Л в гене имелась делеция гуанина в позиции 427 (ΔG427). Это привело к формированию преждевременного стоп-кодона TGA в позиции 440, что явилось причиной нарушения аминокислотной структуры и функции MucA и появления мукоидного фенотипа (подтверждено при росте на агаре). Мутация гена *lasR* в первом штамме также вызывает активацию *algU*, являющегося положительным регулятором продукции альгината. У клонов 203-2 и 159В в гене *mucB*, который также является отрицательным регулятором *algU*, имеется делеция (ΔG21716), которая привела к формированию преждевременного стоп-кодона TGA в позиции 21950 и нарушению синтеза белка MucB. Таким образом, у трех клонов наблюдается активация *algU*, что обуславливает гиперпродукцию альгината как у раннего, так и у поздних штаммов.

Дефект в MucA также вызывает активацию *algU*, который в том числе является отрицательным регулятором подвижности палочек с помощью жгутика, что приводит к ее снижению. Жгутик *P. aeruginosa* – важный фактор вирулентности и потенциальный активатор иммуни-

тета макроорганизма [26]. Несмотря на то что в клонах 70Л, 203-2 и 159В присутствуют 42 гена, участвующих в биосинтезе жгутика (который обеспечивает подвижность методом плавания), у них отсутствует ген *fliC*, кодирующий субъединицу флагеллина – основного компонента жгутиков. Такие штаммы являются *fliC*-мутантами, что указывает на отсутствие подвижности в жидкой среде. Флагеллин представляет собой лиганд для рецептора TLR5 врожденной иммунной системы, связываясь с которым индуцируется высвобождение провоспалительных медиаторов [27, 28]. В связи с этим потеря экспрессии жгутика может выступать адаптивным ответом, позволяющим уходить из-под контроля иммунной системы при хронической инфекции легких у больных МВ. На модели острой инфекции легких с использованием мутантов, неспособных синтезировать жгутик, было показано, что отсутствие жгутика существенно не влияет на LD50 [29].

Таким образом, клоны 70Л, 203-2 и 159В не имеют жгутиков и соответственно лишены подвижности методом плавания. Кроме того, этот адаптивный ответ обеспечивает неузнаваемость со стороны иммунной системы, что способствует персистенции возбудителя.

Другим фактором вирулентности являются пилы IV типа, которые обеспечивают адгезию и движение путем подергивания, что позволяет бактерии передвигаться по поверхности эпителиальной клетки. Они участвуют в формировании БП, трансформации и трансдукции. Изучение генов, участвующих в биосинтезе пилей IV типа, показало, что у обоих клонов присутствуют 34 гена. PilA – основной белок пилей – у двух штаммов отличается наличием у второго клона (203-2) делеции и замены, которые не привели к нарушению функции белка. У первого клона (70Л), в отличие от второго, имеется вредная мутация в гене *pill*, которая приводит к замене, нарушающей функцию белка. У мутантов *pill* ослаблена способность к продукции пилей, поэтому они малоподвижны.

Одним из основных факторов вирулентности *P. aeruginosa* является ССТТ. Она ингибирует защитную систему макроорганизма, индуцируя апоптоз в макрофагах, полиморфноядерных лейкоцитах и эпителиальных клетках [30]. ССТТ кодирует около 30 белков, объединяющихся в комплекс, который доставляет молекулы непосредственно в цитоплазму клетки хозяина. Основные сигналы для экспрессии генов ССТТ – это контакт бактериальной клетки с клеткой макроорганизма и низкая концентрация внеклеточного кальция [31].

Мы проанализировали ССТТ у двух клонов 70Л (2006 г.) и 203-2 (2012 г.). Из четырех эффекторных молекул у обоих штаммов присутствуют гены *ExoT*, *ExoY*.

Для выявления изменений функции ССТТ в процессе персистенции у исследуемых штаммов мы проанализировали гены, кодирующие белки основных компонентов ССТТ (базальное тело, экспортный аппарат, игла, шапероны и белки, участвующие в транслокации). Бактерия может содержать все гены данной системы, однако только некоторые клетки способны секретировать белки ССТТ в соответствующих условиях, что связано со сложной регуляцией генов. В связи с этим также проанализировали гены, участвующие в регуляции ССТТ

(например, транскрипционный активатор ExsA, транскрипционные регуляторы CyaB и Vfr, RhlI/RhlR системы QS, сигма-фактор стационарной фазы RpoS, RetS/LadS/GacA/GacS регуляторная система и трехкомпонентная регуляторная система SadARS).

В результате было сделано предположение, что у клона 70Л (2006 г.) нарушена способность экспрессировать протеины третьего типа, обусловленная дефектом в белках базального тела PscC и экспортера PscN, мутацией в гене *tucA*. Мутации в генах, регулирующих ССТТ, у штамма 203-2 наблюдались в генах *gacA* и *sadA*, которые могут привести к усилению экспрессии ССТТ. В остальных генах, активирующих или подавляющих ССТТ, у обоих штаммов изменений не наблюдалось. Таким образом, можно предположить, что штамм 70Л, в отличие от штамма 203-2, характеризуется сниженной способностью к экспрессии ССТТ. Согласно исследованиям, только 18% изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от хронически инфицированных детей, и 4% изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от хронически инфицированных взрослых, способны продуцировать белки ССТТ [32]. Кроме того, штаммы 70Л и 203-2, являясь GacA-мутантами, должны проявлять сниженную вирулентность, обусловленную снижением экспрессии внеклеточных продуктов, таких как гидроген цианида, пиоцианина, эластазы, хитиназы и хитин-связывающего протеина. Таким образом, в процессе хронической инфекции клоны *P. aeruginosa*, вероятно, постепенно теряют способность экспрессировать различные факторы вирулентности.

Наличие мутаций в раннем клоне (2006 г.), которые отсутствуют в позднем, дает основание предположить параллельную микроэволюцию одновременно существующих разных субпопуляций одного клона.

Анализ последовательностей области, ответственной за продукцию пиовердина, у обоих штаммов показал, что они не способны его продуцировать. Такие выводы совпадают с данными других исследований, демонстрирующих потерю способности к продукции пиовердина в процессе адаптации к условиям окружающей среды в легких у больных МВ. Изменения у обоих штаммов имеются в генах, участвующих в основном биосинтезе пиовердина, способность экспрессировать рецепторы при этом сохранена. В штаммах 70Л и 203-2 рецептор пиовердина представлен FrvV для пиовердина первого типа. Включенные в исследование штаммы, сами не синтезируя пиовердин, т.е. не затрачивая ресурсы на его

биосинтез, способны использовать пиовердин, синтезируемый другой бактериальной клеткой. Этот процесс в англоязычной литературе принято называть «cheating» (мошенничество); клетки, не продуцирующие пиовердин, – «cheats»; продуцирующие – «cooperators». Таким образом, способность экспрессировать рецепторы сохраняется до тех пор, пока есть внешний источник пиовердина. Можно предположить, что микроэволюция в системе пиовердина в изученных штаммах идет в контексте социальной эволюции: бактерия кооперируется и/или конкурирует с другой [33].

Анализ генов оперона биосинтеза пиохейлина показал, что оба штамма являются пиохейлин-дефектными: в опероне *pchDCBA* вредную мутацию содержит ген *pchC* – ген тиоэстеразы, способствующий высвобождению пиохейлина, что приводит к снижению его продукции. Дефектные по пиохейлину штаммы являются менее вирулентными по сравнению с дикими штаммами *P. aeruginosa* [34].

В штаммах 70Л и 203-2 сохранена способность к синтезу токсинов секреции второго типа, за исключением гемолитической фосфолипазы. Анализ последовательностей белков компонентов T1SS показал, что у штаммов 70Л и 203-2 этот участок не отличается. Только в белке рецептора HasR была обнаружена аминокислотная замена, приводящая к нарушению функции. Это дает основание предположить наличие сниженной способности к утилизации гема и гемоглобина этими штаммами.

Таким образом, в процессе хронической инфекции клоны *P. aeruginosa* в результате мутаций в генах, вероятно, постепенно теряют способность экспрессировать различные факторы вирулентности.

Изменчивость в профаговых регионах («крупные» геномные изменения) исследованных штаммов

Кроме «мелких» геномных изменений, связанных с нуклеотидными изменениями хромосомных генов и ГПГ лекарственной устойчивости, выявлены также «крупные» изменения в профаговых регионах клонов 70Л и 203-2.

С помощью программы PHAST у обоих клонов выявлены 4 профаговых региона.

Как видно из Таблицы 4, три профаговых региона у обоих штаммов сохранились на протяжении 6 лет персистенции, но подверглись изменениям.

Первый регион (Pseudo_JBD5_NC_020202) претерпел некоторые изменения. Размер изменился с 23,3 Кб

Таблица 4. Изменчивость в профаговых регионах у штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в 2006–2016 гг.

Регион	Длина региона		Число кодирующих последовательностей в регионе		Предполагаемый фаг		Содержание GC (%)	
	70Л	203-2	70Л	203-2	70Л	203-2	70Л	203-2
1	23,3 Кб	40,1 Кб	43	63	PHAGE_Pseudo_JBD5_NC_020202	PHAGE_Pseudo_JBD5_NC_020202	64,6	64,6
2	17,7 Кб	20 Кб	20	25	PHAGE_Escher_ep3_NC_025430	PHAGE_Escher_ep3_NC_025430	65,5	64,9
3	11,6 Кб	45,5 Кб	16	63	PHAGE_Pseudo_phi297_NC_016762	PHAGE_Pseudo_phi297_NC_016762	64,7	63,3
4	11,9 Кб		13		PHAGE_Pseudo_F116_NC_006552		66	
5		30,8 Кб		24		PHAGE_Pithov_sibericum_NC_023423		62,1

до 40,1 Kb в результате интеграции 20 дополнительных кодирующих последовательностей. У первого штамма регион включал 43 последовательности, которые кодируют фаговые протеины. У второго штамма в данный регион входят 20 дополнительных кодирующих последовательностей, 16 из которых кодируют фаговые белки, 4 – нефаговые белки (1 – мембранный белок, ответственный за транспорт мононуклеотида никотинамида, являющегося предшественником НАД, который функционирует в качестве переносчика электронов во многих окислительно-восстановительных реакциях; 2 последовательности, кодирующие *FarB*- и *FarA*-протеины амиллоида, участвующего в образовании БП и повышенной адгезии; 1 – предполагаемый протеин). Вероятно, когда-то произошла интеграция другого фага с дополнительными генами в этот участок.

Второй профаговый регион (*Escher_ep3_NC_025430*) также претерпел изменения. Размер увеличился с 17,7 Kb до 20 Kb, количество кодирующих последовательностей – с 20 до 25 в результате потери и приобретения кодирующих последовательностей.

Наибольшим изменениям подвергся третий профаговый регион (*Pseudo_phi297_NC_016762*), длина которого за 6-летний период увеличилась с 11,6 Kb до 45,5 Kb. Количество кодирующих последовательностей изменилось с 16 до 63. Это произошло благодаря внедрению в данный регион другого фага, о чем свидетельствуют гибридные сайты *attL* и *attR*, присутствующие в данном участке, которые фланкируют вновь приобретенный фаг. В данном случае был использован *attB*-сайт тРНК, присутствующего в исходном профаге. Одновременно наблюдается исчезновение некоторых кодирующих последовательностей исходного профага. Все это свидетельствует о непрерывных генетических перестановках, происходящих в таких участках.

Четвертый профаговый регион (*Pseudo_F116_NC_006552*) штамма 70Л длиной 11,9 Kb в штамме 203-2 не определяли. Вместо него выявили другой профаговый регион (*Pithov_sibericum_NC_023423*) длиной 30,8 Kb и полностью отличающийся по кодирующим последовательностям. Этот профаг фланкирован гибридными сайтами интеграции *attL* и *attR*, которые образуются в результате рекомбинации сайтов интеграции *attP* фаговой ДНК и *attB* бактериальной ДНК, т.е. имела место сайт-специфическая рекомбинация, в результате которой фаг интегрировался в геном бактерии. Такие значительные изменения в профаговых регионах штаммов 70Л и 203-2 также свидетельствуют о генетической адаптации возбудителя в легких у больных МВ в процессе длительной персистенции микроорганизма.

Заключение

Таким образом, в результате сравнения определенных участков геномов штаммов, выделенных в динамике от одного больного, было установлено, что фенотипическая гетерогенность может быть обусловлена не только одновременно циркулирующими разными генотипами, но и присутствием различных субпопуляций одного генотипа, сформировавшихся в результате микроэволюции благодаря «крупным» (приобретение или потеря фагов,

плазмид, интегронов), и «мелким» геномным изменениям (мутациям в генах, кодирующих факторы вирулентности и резистентность к АМП, или в регуляторных генах). Микроэволюция происходит при этом по нескольким направлениям, о чем свидетельствуют некоторые изменения (мутации), которые есть в раннем клоне, но отсутствуют в позднем. Например, в системе QS в процессе хронической инфекции *P. aeruginosa* постепенно теряют способность экспрессировать различные факторы вирулентности и становятся более резистентными к АМП. Можно предположить, что в различные периоды могут преобладать различные субпопуляции с разным «набором» мутаций. Выживает та субпопуляция, которая наиболее приспособлена. Например, гипермутабельный клон 70Л, вероятно, со временем исчез: из-за гипермутабельности у него, наряду с полезными, накопились еще и вредные мутации. В то же время другие изменения, позволяющие выживать бактериям (например, отсутствие гена *fliC*, кодирующего флагеллин, которое позволяет избежать воздействия иммунной системы), отбираются, способствуя персистенции бактерий в организме больного. Мы наблюдаем внутриклональную изменчивость, обеспечивающую направленную перестройку популяции возбудителя. Таким образом, персистенция микроорганизма – ключевое патогенетическое звено в формировании хронической инфекции, обеспечивающее выживание и распространение возбудителя.

Генетическая структура популяций микроорганизма и обусловленная ею фенотипическая и генотипическая гетерогенность популяций являются одними из положений, объясняющих механизмы саморегуляции паразитарных систем, которые имеют влияние на развитие эпидемического процесса [35].

Проведенный нами анализ геномов клонов *P. aeruginosa* – возбудителя хронической инфекции легких у больных МВ – убедительно продемонстрировал изменчивость штаммов при персистенции в легких на протяжении почти 10 лет. Данная изменчивость обусловлена ГПГ лекарственной устойчивости; заменами нуклеотидов в хромосомных генах, ответственных за антибиотикорезистентность; мутациями в генах, ответственных за выживаемость, приспособляемость, жизнедеятельность бактерий (система QS, система MMR, продукция альгината, пили IV типа, ССТТ); изменчивостью в профаговых регионах. Это приводит к тому, что первоначальный клон (фактически чувствительный к исследованному АМП), полученный больным, вероятно, из окружающей среды, в результате приобретения плазмиды (ГПГ) и мутаций в генах, ответственных за выживаемость, приспособляемость и жизнедеятельность, становится «эпидемически» значимым [36]. Для предотвращения инфицирования таким клоном других пациентов необходимо проводить соответствующие противоэпидемические мероприятия.

Наблюдаемая микроэволюция, как показывают полученные нами данные, направлена прежде всего на способность бактерий к выживанию в легких больного. В результате этого у бактерий повышается устойчивость к действию иммунной системы макроорганизма, усиливается способность к формированию БП и теряется способность к продукции факторов вирулентности. Выявленная

фенотипическая и генотипическая гетерогенность является убедительным доказательством саморегуляции паразитарных систем и способности микроорганизма приспособляться при персистирующей инфекции [35]. Поскольку в результате проведенного нами исследования была показана гетерогенность популяции возбудителя при хронической инфекции легких у больных МВ, может возникнуть вопрос о существовании всех выявленных нами вариантов изменчивости при единичном

высеве, а не в интервале около 10 лет. Это обстоятельство нельзя полностью исключить, хотя в данном случае нами отбирались доминантные варианты. Однако даже если такая вероятность существует, то полученные данные убедительно демонстрируют варианты изменчивости единственного клона, происходящие в легких больного при персистенции инфекции и при многократном использовании АМП во время рецидивов хронической инфекции легких.

Литература

- Chernukha M.Yu., Shaginyan I.A. Microbiology of chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. In: Cystic fibrosis. М.: Medpraktika-M; 2014. 672 p. Russian. (Чернуха М.Ю., Шагинян И.А. Микробиология хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. В книге «Муковисцидоз». М.: Медпрактика-М, 2014. 672 с.)
- Shaginyan I.A., Chernukha M.Yu., Kapranov N.I., Kondrat'eva E.I., Kashirskaja N.Ju., Amelina E.L., et al. Consensus "Cystic fibrosis: definition, diagnostic criteria, therapy". Section "Microbiology and epidemiology of chronic respiratory infection in cystic fibrosis" *Pediatrics*. 2016;7(6):80-96. Russian. (Шагинян И.А., Чернуха М.Ю., Капранов Н.И., Кондратьева Е.И., Каширская Н.Ю., Амелина Е.Л. и соавт. Консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия». Раздел «Микробиология и эпидемиология хронической респираторной инфекции при муковисцидозе» *Педиатрия*. 2016;7(6):80-96.) DOI: 10.17816/PED7180-96
- Shaginyan I.A., Chernukha M.Yu., Avetisyan L.R., Sijanovа E.A., Kuljastova D.G., Medvedeva O.S., et al. Epidemiological features of chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. *Epidemiologia i vakcinoprofilaktika*. 2017;6:5-13. Russian. (Шагинян И.А., Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Сиянова Е.А., Кулястова Д.Г., Медведева О.С. и соавт. Эпидемиологические особенности хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017;6:5-13.) DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-5-13
- Chernukha M.Yu., Avetisyan L.R., Shaginyan I.A., Alekseeva G.V., Avakjan L.V., Kashirskaja N.Ju., et al. Microbiological diagnosis algorithm for chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2014;16(4):278-290. Russian. (Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Алексеева Г.В., Авакян Л.В., Каширская Н.Ю. и соавт. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции лёгких у больных муковисцидозом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014;16(4):278-290.)
- Curran B., Jonas D., Grundmann H., Pitt T., Dowson C.G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5644-5649. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004
- Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000;288:1251-1254. DOI: 10.1126/science.288.5469.1251
- Dubodelov D.V., Lubasovskaya L.A., Shubina E.S., Mukosej I.S., Korostin D.O., Kochetkova T.O., et al. Genetic determinants of resistance of hospital-associated strains of *Klebsiella pneumoniae* to β -lactam antibiotics isolated in neonates. *Genetika*. 2016;52(9):1097-1102. Russian. (Дубоделов Д.В., Любасовская Л.А., Шубина Е.С., Мукосей И.С., Коростин Д.О., Кочеткова Т.О. и соавт. Генетические детерминанты резистентности к бета-лактамам антибиотикам госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных. *Генетика*. 2016;52(9):1097-1102.) DOI: 10.1134/S1022795416090040
- Buermans H.P., den Dunnen J.T. Next generation sequencing technology: advances and application. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(10):932-1941. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015
- Pirnay J.P., De Vos D., Mossialos D., Bilocq F., Vanderkelen A., Zizi M., et al. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol*. 2002;4:872-882. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2002.00281.x
- Fernandez L., Gooderham W.J., Bains M., McPhee J.B., Wiegand I., Hancock R.E., 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. DOI: 10.1128/AAC.00242-10
- Köhler T., Michea-Hamzehpour M., Henze U., Gotoh N., Curty L.K., Pechère J.C. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 1997;23:345-354. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.2281594.x
- Köhler T., Kok M., Michea-Hamzehpour M., Plesiat P., Gotoh N., Nishino T., et al. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:2288-2290. DOI: 10.1128/AAC.40.10.2288
- Li X.Z., Zhang L., Srikumar R., Poole K. Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:399-403. PMID: 9527793
- Srikumar R., Kon T., Gotoh N., Poole K. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *E. coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:65-71. DOI: 10.1128/AAC.42.1.65
- Poole K., Srikumar R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms, and clinical significance. *Curr Top Med Chem*. 2001;1(1):59-71. DOI: 10.2174/1568026013395605
- Maseda H., Sawada I., Saito K., Uchiyama H., Nakae T., Nomura N., 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. DOI: 10.1128/AAC.48.4.1320-1328.2004

17. Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Tsujimoto H., Nishino T., et al. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2242-2246. DOI: 10.1128/AAC.44.9.2242-2246.2000
18. Schweizer H.P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res.* 2003;2:48-62. PMID: 12917802
19. Van Delden C., Iglewski B.H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 1998;4:551-560. DOI: 10.3201/eid0404.980405
20. Hentzer M., Wu H., Andersen J.B., Riedel K., Rasmussen T.B., Bagge N., et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 2003;22:3803-3815. DOI: 10.1093/emboj/cdg366
21. Schuster M., Lostroh C.P., Ogi T., Greenberg E.P. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol.* 2003;185:2066-2079. DOI: 10.1128/JB.185.7.2066-2079.2003
22. Heurlier K., Déneraud V., Haenni M., Guy L., Krishnapillai V., Haas D. Quorum-sensing-negative (*lasR*) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *J Bacteriol.* 2005;187(14):4875-4883. DOI: 10.1128/JB.187.14.4875-4883.2005
23. LaFayette S.L., Houle D., Beaudoin T., Wojewodka G., Radzioch D., Hoffman L.R., et al. Cystic fibrosis-adapted *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing *lasR* mutants cause hyper inflammatory responses. *Sci Adv.* 2015;1(6). DOI: 10.1126/sciadv.1500199
24. Hoffman L.R., Richardson A.R., Houston L.S., Kulasekara H.D., Martens-Habbena W., Klausen M., et al. Nutrient availability as a mechanism for selection of antibiotic tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF airway. *PLoS Pathog.* 2010;8;6(1). DOI: 10.1371/journal.ppat.1000712
25. Sachadyn P. Conservation and diversity of MutS proteins. *Mutat Res.* 2010;694(1-2):20-30. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.08.009
26. Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001;410:1099-1103. DOI: 10.1038/35074106
27. Jyot J., Sonawane A., Wu W. Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. *Mol Microbiol.* 2007;63:1026-1038. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05573.x
28. LaFayette S.L., Houle D., Beaudoin T., Wojewodka G., Radzioch D., Hoffman L.R., et al. Cystic fibrosis-adapted *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing *lasR* mutants cause hyper inflammatory responses. *Sci Adv.* 2015;1(6). pii: e1500199. DOI: 10.1126/sciadv.1500199
29. Ramphal R., Balloy V., Jyot J., Verma A., Si-Tahar M., Chignard M. Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J Immunol.* 2008;181(1):586-592. DOI: 10.4049/jimmunol.181.1.586
30. Jia, J., Alaoui-El-Azher M., Chow M., Chambers T.C., Baker H., Jin S. c-Jun NH2-terminal kinase-mediated signaling is essential for *Pseudomonas aeruginosa* ExoS-induced apoptosis. *Infect Immun.* 2003;71:3361-3370. DOI: 10.1128/IAI.71.6.3361-3370.2003
31. Hueck C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:379-433. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.03.011
32. Jain M., Ramirez D., Seshadri R., Cullina J.F., Powers C.A., Schuler G.S., et al. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5229-5237. DOI: 10.1128/JCM.42.11.5229-5237.2004
33. Winstanley C., O'Brien S., Brockhurst M.A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol.* 2016;24(5):327-337. DOI: 10.1016/j.tim.2016.01.008
34. Reimann C., Patel H.M., Walsh C.T., Haas D. *PchC* thioesterase optimizes nonribosomal biosynthesis of the peptide siderophore pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2004;186(19):6367-6373. DOI: 10.1128/JB.186.19.6367-6373.2004
35. Beliakov V.D., Golubev V.D., Kaminskij G.D. Self-regulation of parasitic systems: molecular genetic mechanisms. М., 1987, 240 p. Russian. (Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д. Саморегуляция паразитарных систем: молекулярно-генетические механизмы. М., 1987, 240 с.)
36. Avetisyan L.R., Shaginyan I.A., Chernukha M.Yu. The Basic Mechanisms of the Formation of Epidemically Significant Nosocomial Bacterial Clones. *Uspekhi sovremennoi biologii.* 2016;136(1):41-52. Russian. (Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Основные механизмы формирования эпидемически значимых госпитальных клонов бактерий. Успехи современной биологии. 2016;136(1):41-52.) DOI: 10.1134/S2079086416040022