



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

Учредители:

Синопальников А.И.; Пискунов Г.Г.; Козлов Р.С.; Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Главный редактор:
Синопальников А.И.

Адрес редакции:

214019, Смоленская обл., г. Смоленск, ул. Кирова, д. 46А

Эл. почта: info@cmac-journal.ru

Адрес для корреспонденции:

214019, г. Смоленск, а/я 5.

Тел./факс: +7(4812)45-06-02

Издатель МАКМАХ:

214019, г. Смоленск,

ул. Кирова 46А, www.iacmac.ru

Адрес типографии:

214020, Россия, г. Смоленск,

ул. Смольянинова, д. 1

Электронная версия журнала:

https://cmac-journal.ru

Подписка на сайте издателя:

https://service.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Запись в реестре зарегистрированных СМИ: ПИ № ФС 77 – 86269 от 27.11.2023

Не распространяется через предпринятия связи
Тираж 3000 экз.

Свободная цена

Дата выхода – 24.07.2025

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»

Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России)

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2025.

Содержание

Болезни и возбудители

- 4 Козлов Р.С., Голуб А.В.
Комплексная оценка роли нитрофуранов при инфекциях нижних отделов мочевых путей
Рачина С.А., Купрюшина О.А., Стрелкова Д.А., Авдеев С.Н., Власенко А.Е., Яснева А.С., Юданова Т.А., Трофименко И.Н., Антонов В.Н., Агибалова М.Н., Мержоева З.М., Яцышина С.Б., Тихонова М.А., Елькина М.А., Ананичева Н.А., Бурмистрова Е.Н., Сухорукова М.В., Кашаканова Н.М., Федорова А.Ю., Валиулина Д.С., Семёнова Н.С., Ухорская Ю.А.
- 11 Роль соотношения прокальцитонин/ферритин в дифференциальной диагностике поражения легких вирусной и бактериальной этиологии
Свищева М.В., Колесникова Е.А.
- 18 Клиническое значение бактерий рода *Weissella*: краткий обзор
Рябенко Ю.Н., Рябенко Э.Б.
- 23 Дифтерия и ее профилактика
Ортенберг Э.А., Вешкурцева И.М.
- 27 Интракраниальные абсцессы: некоторые клинико-фармакологические аспекты мультидисциплинарного подхода

Антимикробные препараты

- 33 Струкова Е.Н., Голикова М.В.
Фармакодинамика меропенема и комбинации меропенема с авибактамом при воздействии на *Klebsiella pneumoniae* в динамической системе *in vitro*
- 42 Цефиксим (современный пероральный цефалоспорин III поколения) и его место в клинической практике. Резолюция Совета экспертов

Антибиотикорезистентность

- 51 Резолюция X Всероссийской научно-практической конференции «Стратегия контроля антибиотикорезистентности в стационаре»
Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Гуляева Н.А., Свято О.П.
- 54 Модель экономических потерь при некорректной микробиологической диагностике антимикробной резистентности и нерациональном применении антимикробных препаратов
Венчакова В.В., Оганесян Э.Г., Гусева А.О., Ковыршин С.В., Русецкая Е.В., Марочкович О.А., Долго-Сабурова Ю.В., Богомолова Т.С., Чжан Ф.-М., Мэн Ц., Васильева Н.В., Тараскина А.Е.
- 73 Молекулярно-биологические особенности штаммов *Candida albicans* – возбудителей рецидивирующего вульвовагинального кандидоза с различной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам *in vitro*
Бочарова Ю.А., Кулешов К.В., Чеботарь И.В., Маянский Н.А.
- 88 Феномен изменения чувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к азтреонаму при формировании колистинорезистентности *in vitro*

Опыт работы

- Халитова Ю.А., Жестков А.В., Мياкишева Ю.В.
- 94 Микробиологический статус пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника
Кайтуков А.О., Глушкова Е.В., Брико Н.И., Крыжановский В.Г., Салмина Т.А., Орлова О.Е., Каширина А.Ю.
- 101 Резистентность к антимикробным препаратам стрептококков различных видов в отделениях многопрофильного стационара
Федотов В.Д., Жестков А.В., Лямин А.В., Лавренюк Н.А., Добротина И.С., Фалалеева Е.А.
- 111 Особенности микробиоты у пациентов с различными клиническими фенотипами ХОБЛ и хронического бронхита профессиональной этиологии

Феномен изменения чувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к азтреонаму при формировании колистинорезистентности *in vitro*

Бочарова Ю.А.¹, Кулешов К.В.², Чеботарь И.В.¹, Маянский Н.А.¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

² ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

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

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, антибиотикорезистентность, азтреонам, мутации.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Описать фенотипические и геномные характеристики феномена изменения уровня чувствительности к азтреонаму у клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa* при формировании резистентности к колистину в условиях эволюционного эксперимента.

Материалы и методы. Объектом исследования был клинический изолят *P. aeruginosa* с фенотипом множественной антибиотикорезистентности. Исследование проводили на основе пространственно-временной модели формирования резистентности подвижных бактерий в возрастающей концентрации колистина. Эксперимент продолжался в течение 44 суток. По мере появления роста бактерий в зонах с повышающейся концентрацией колистина, с фронта распространения *P. aeruginosa* отбирали образцы в точках опережающего роста. У отобранных изолятов определяли уровни чувствительности к антибиотикам и выявляли геномные изменения.

Результаты. У исходного изолята МПК азтреонама составляла 4 мг/л, что соответствовало критерию EUCAST «чувствительный при увеличенной экспозиции» Из 74 изолятов *P. aeruginosa*, отобранных в ходе эксперименты, было отобрано 11 изолятов с изменившейся чувствительностью к азтреонаму. У 6 из 11 отобранных изолятов чувствительность к азтреонаму повысилась, у 5 изолятов усилилась резистентность. Генетические детерминанты резистентности, присутствующие в исходном штамме, не изменились. Изоляты, у которых восстановилась чувствительность к азтреонаму, имели набор мутаций, включающих повреждение генов *pmrB* (del-18bp-298-315) и *davD* (TGA1450-1452→CTC). Изоляты, у которых МПК азтреонама увеличилась в 4 раза, несли различные мутационные профили. Изолят с максимальной устойчивостью к азтреонаму (МПК = 32 мг/л) имел мутацию в гене *capD* (del-T-360) и большую делецию 262 402 bp (239 ORF). Мутации, появлявшиеся в генах *phoQ*, *lpxL_2*, *wecA*, *mexB*, *spaQ*, *pcpR* и *rpoA*, не оказывали значительного влияния на уровень чувствительности к азтреонаму.

Выводы. Полученные результаты внесли вклад в понимание направлений генно-инженерного моделирования, направленного на расширение представлений о механизмах устойчивости к азтреонаму.

Original Article

The phenomenon of changing aztreonam susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* during formation of colistin resistance *in vitro*

Bocharova Yu.A.¹, Kuleshov K.V.², Chebotar I.V.¹, Mayanskiy N.A.¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

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

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, aztreonam, mutations.

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

External funding source: no external funding received.

Objective. To describe the phenotypic and genome characteristics of the phenomenon of aztreonam susceptibility changes in a clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate developing colistin resistance in an evolutionary experiment *in vivo*.

Materials and methods. A clinical *P. aeruginosa* isolate with a multiple drug resistance phenotype was examined using the spatiotemporal model of colistin resistance development under the increasing colistin concentration. During the 44-day experiment, isolates were selected from the frontal growing line; these isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing and genome sequencing.

Results. An aztreonam MIC of the parental isolate was 4 mg/L corresponding to the EUCAST category 'susceptible, increased exposure'. Among the 74 selected *P. aeruginosa* isolates, 11 isolates changed the aztreonam MIC. Six out of 11 isolates became more susceptible to aztreonam, whereas in the remaining 5 isolates the aztreonam MIC increased. Isolates with the restored aztreonam susceptibility carried alterations in *pmrB* (del-18bp-298-315) and *davD* (TGA1450-1452→CTC). In isolates with a 4-fold aztreonam MIC elevation, various mutation profiles were observed. An isolate with a maximal aztreonam elevation of 32 mg/L harbored a *capD* mutation (del-T-360) and a large 262,402 bp deletion (239 ORF). Mutations in *phoQ*, *lpxL_2*, *wecA*, *mexB*, *spaQ*, *pcpR* and *rpoA* did not influence the susceptibility to aztreonam.

Conclusions. Our results contributed to the understanding of the directions of genetic engineering modeling aimed at expanding the understanding of the mechanisms of resistance to aztreonam.

Бочарова Ю.А. и соавт.

Введение

Степень опасности антибиотикорезистентности достигла такого уровня, что Генеральная Ассамблея ООН в сентябре 2024 г. была вынуждена провести совещание высокого уровня, посвященное мерам противодействия этой угрозе [1]. Важным направлением борьбы с антибиотикорезистентностью является расшифровка молекулярных механизмов, позволяющих понять процессы формирования и утраты резистентности бактерий. Приобретение устойчивости к антибиотикам – это чрезвычайно сложный процесс, который часто сопровождается парадоксальными эффектами. К числу таких эффектов относится влияние на бактериальный фитнес, проявляющееся в виде снижения вирулентности, что, несомненно, может быть полезным для пациента [2]. Негативным эффектом может оказаться кросс-резистентность – явление, при котором под воздействием одного класса антибиотиков у бактерии формируется устойчивость к антибиотикам других классов [3]. Самым интересным является феномен восстановления (реверсии) чувствительности к антибиотику под влиянием другого антибиотика. Понимание этого явления может помочь в разработке принципиально нового класса препаратов, направленных на восстановление чувствительности. В настоящей работе мы описали феномен изменения уровня чувствительности к азтреонаму у клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa* при формировании резистентности к колистину в условиях эволюционного эксперимента и его генетическую основу. Выбор *P. aeruginosa* качестве модельного организма был обусловлен огромным клиническим значением этого патогена, а также его высокими адаптационными возможностями [4].

Материалы и методы

Объектом исследования был клинический изолят *P. aeruginosa* 39648 (далее – *Pa_MDR*) с фенотипом множественной антибиотикорезистентности. Исследование проводили на основе пространственно-временной модели формирования резистентности подвижных бактерий в возрастающей концентрации колистина, которая была подробно описана ранее [5]. Эксперимент продолжался в течение 44 суток. По мере появления роста бактерий в зонах с повышающейся концентрацией колистина с фронта распространения *P. aeruginosa* отбирали образцы в точках опережающего роста (опережение > 5 мм в день) и пересеивали их на агар Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson and Co., США) для накопления биоматериала с целью последующего изучения фенотипических (профиль антибиотикорезистентности) и генетических свойств. Суточные культуры замораживали и хранили при -82°C.

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков определяли с помощью наборов Sensititre Gram Negative GNX2F AST Plates (Thermo Fisher Scientific, США) и интерпретировали согласно критериям European

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [6]. Значимыми считали различия МПК в 4 и более раз.

Бактериальную ДНК выделяли из суточных культур *P. aeruginosa*, выращенных на агаре Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson) из замороженных образцов (см. выше) при помощи наборов QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) по протоколу фирмы-производителя и хранили при -20°C.

ДНК-библиотеки готовили при помощи наборов MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI Tech, Китай). Для фрагментации ДНК применяли ультразвуковой дезинтегратор Covaris S220 (Covaris, США). Для очистки ДНК-библиотек использовали магнитные частицы Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Концентрацию бактериальной ДНК и ДНК-библиотек контролировали при помощи флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). В среднем длина полученных фрагментов ДНК составляла 250 пар нуклеотидов. Контроль ДНК-библиотек (определение распределения размеров библиотеки и подтверждение отсутствия оставшихся димеров адаптера) проводили на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). Полногеномное секвенирование выполняли на платформе MGISEQ-2000 (MGI Tech, Китай), используя набор DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set PE100 kit (MGI Tech, Китай) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Качество ридов и их подготовку проводили с использованием программ FASTQC и Trimmomatic v.0.38. Сборку геномов *de novo* осуществляли с использованием программы SPAdes 3.14 [7]. Для гибридной сборки из данных MGI применяли Flye, BWA, Pilon [8, 9]. Для контроля полноты сборки и исключения возможности контаминации использовали веб-сервер Contest16S. Качество сборки оценивали при помощи QUAST 5.0 [10]. Поиск генетических детерминант резистентности в собранных геномах *de novo* проводили с помощью программы ResFinder 4.6.0 (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) [11].

Геномы аннотировали с помощью программы Prokka [12]. В качестве референсного генома использовали геном исходного штамма *Pa_MDR*. Для анализа данных секвенирования применяли Breseq pipeline [13]. Риды картировали на геном исходного изолята. Генетические вариации, представленные в каждом клоне, идентифицировали путем поиска расхождений между выровненными ридами и референсным геномом изолята *Pa_MDR*.

Результаты

По результатам эволюционного эксперимента было изучено 75 изолятов *P. aeruginosa*, включая 1 исходный изолят и 74 изолята, полученных после контакта с колистином. Профиль чувствительности к антибиотикам исходного изолята представлен в Таблице 1. В частности, МПК исходного изолята к азтреонаму составляла 4 мг/л, что соответствовало критерию EUCAST «чув-

Таблица 1. Профиль чувствительности к антибиотикам исходного изолята *P. aeruginosa*

№	Антибиотик	МПК, мг/л (оценка чувствительности)*
1.	Пиперацillin-тазобактам	32 (R)
2.	Цефтазидим-авибактам	> 16 (R)
3.	Цефтолозан-тазобактам	> 32 (R)
4.	Цефтазидим	32 (R)
5.	Азтреонам	4 (I)
6.	Меропенем	> 16 (R)
7.	Имипенем	> 16 (R)
8.	Амикацин	> 32 (R)
9.	Тобрамицин	> 8 (R)
10.	Ципрофлоксацин	> 2 (R)
11.	Колистин	1 (S)

R – резистентность, S – чувствительный, I – чувствительный при увеличенной экспозиции.

* Результаты интерпретированы в соответствии с критериями EUCAST v 14.0.

ствительный при увеличенной экспозиции». Исходный изолят нес плазмидные гены резистентности *bla_{VM-2}*, *bla_{OXA-395}*, *bla_{PDC-3}*, *sul1*, *aac(6')-29b*, *fosA*, *catB7*, *crpP*.

Изоляты (n = 74), полученные в ходе эволюционного эксперимента, характеризовались разными уровнями чувствительности к колистину и различными изменениями в геномах. Фенотипические и генетические особенности приобретения колистинорезистентности в этом эксперименте были подробно описаны ранее [5].

Среди 74 изолятов, полученных в эксперименте, было обнаружено 11 изолятов, у которых значительно изменилась МПК азтреонама. У 6 изолятов МПК понизилась до уровня 0,001 мг/л, что соответствовало критерию «чувствительный». У 4 изолятов МПК увеличилась в 4 раза до уровня 16 мг/л, и у одного изолята МПК увеличилась до уровня, соответствующего критерию «резистентный», достигнув 32 мг/л. Уровни чувствительности у всех изолятов к другим антибиотикам не изменились.

Суммарно во всех изолятах с измененной чувствительностью к азтреонаму было выявлено 12 генетических поломок. Генетические детерминанты резистентности, присутствовавшие в исходном штамме, не изменились в течение всего эволюционного эксперимента. Более подробно мутационные профили изолятов со значительно изменившейся в ходе эксперимента чувствительностью к азтреонаму показаны в Таблице 2.

Один из 6 изолятов, ставших чувствительными к азтреонаму, был выделен из зоны роста с концентрацией колистина 40 мг/л и имел мутации в генах *pmrB* (del-18bp-298-315) и *lasR* (G588→T) с МПК колистина 16 мг/л. Пять других азтреоночувствительных изолятов появились в зоне роста с концентрацией колистина 400 мг/л и имели набор мутаций, включавших повреждение генов *pmrB* (del-18bp-298-315) и *davD* (TGA1450-1452→CTC). МПК колистина у них составляла от 32 до 64 мг/л. Четыре изолята, у которых МПК азтреонама увеличилась в 4 раза до МПК = 16 мг/л, появились в зоне роста с концентрацией колистина от 2 до 4 мг/л и обладали различными мутационными профилями (Таблица 2). Изолят с максимальной устойчи-

Таблица 2. Мутации, специфичные для изолятов *P. aeruginosa* с изменившейся чувствительностью к азтреонаму

№	Изолят *	Колистин в питательной среде, мг/л	МПК колистина, мг/л	МПК азтреонама, мг/л	Мутации в генах/локусах										
					<i>pmrB</i>	<i>lasR</i> **	<i>capD</i>	<i>invA</i>	<i>davD</i>	<i>hp / PAO285</i>	<i>rpoB</i>	<i>morA</i>	<i>exsD</i>	<i>degS</i>	262402 bp (239 ORF)
1.	Pa_MDR-96	2	1	16											
2.	Pa_MDR-120	2	1	16											
3.	Pa_MDR-168	2	1	32											
4.	Pa_MDR-288	4	4	16		1									
5.	Pa_MDR-384/a	4	4	16		1									
6.	Pa_MDR-384/b	40	16	0,001		2									
7.	Pa_MDR-1008/a	400	64	0,001											
8.	Pa_MDR-1008/b	400	32	0,001											
9.	Pa_MDR-1028/c	400	32	0,001											
10.	Pa_MDR-1028/d	400	64	0,001											
11.	Pa_MDR-1056	400	64	0,001											

Зеленый цвет – миссенс-мутации, желтый – делеции 18–24 нуклеотидов, красный – круциальные поломки гена (преждевременный стоп-кодон, потеря стоп-кодона, большая делеция, сдвиг рамки считывания).

* В названии изолята цифры обозначают время в часах, через которое он был получен в ходе эволюционного эксперимента.

** В гене *lasR* у разных изолятов были выявлены разные мутации: 1 – нонсенс-мутация G502→T, приводящая к появлению преждевременного стоп-кодона; 2 – миссенс-мутация G502→T, приводящая к замене одной аминокислоты.

Таблица 3. Изменения в генах и продуктах генов, обнаруженные у изолятов *P. aeruginosa* с изменившейся чувствительностью к азтреонаму

№	Ген/сет генов	Продукт гена	Мутация в гене	Изменение продукта гена	Изменение чувствительности к азтреонаму
1.	<i>pmrB</i>	Сенсор двухкомпонентной системы PmrB, гистидинкиназа	del-18bp-298-315	del-L100-Q105	Повышение
2.	<i>lasR</i>	Транскрипционный регулятор LasR	G502→T, преждевременный стоп-кодон G588→T	E168*, дефектный (неполный) протеин E196D	Снижение Неочевидно
3.	<i>capD</i>	УДФ-глюкоза-4-эпимераза	del-T-360	A119fs, дефектный протеин	Снижение
4.	<i>invA</i>	Протеин PcrD системы секреции третьего типа	ins-G-1726	G575fs, дефектный протеин	Снижение
5.	<i>davD</i>	Глютар-семиальдегид-дегидрогеназа DavD	TGA1450-1452→CTC, потеря стоп-кодона	дефектный протеин	Повышение
6.	<i>hp /PA0285</i>	di-GMP фосфодиэстераза PirA	G1516→A	E506K	Снижение
7.	<i>groB</i>	Бета-цепь ДНК-зависимой РНК-полимеразы	del-24bp-850-873	del-K284-E291	Снижение
8.	<i>morA</i>	Регулятор подвижности	A3121→C	T1041P	Снижение
9.	<i>exsD</i>	Транскрипционный анти-активатор ExsD	G64→A	V22M	Снижение
10.	<i>degS</i>	Протеаза AlgW	T692→A	L231Q	Снижение
11.	262402 bp (239 ORF)	Большая делеция, затрагивающая комплекс генов, включая уридин-дифосфат-глюкозопирофосфатазу и продукты <i>mexXY</i> -оперона			Снижение

востью к азтреонаму (МПК = 32 мг/л) имел мутацию в гене *capD* (del-T-360) и большую делецию 262402 bp (239 ORF).

Мутации, появившиеся в генах *phoQ* (del-23bp-223-245), *lpxL_2* (del-CATG-300-303), *wecA* (C313→T), *mexB* (C2795→T), *spaQ* (T122→C), *pcpR* (G430→T) и *groA* (ins-CTGGTC-604), не оказывали значительного влияния на уровень чувствительности к азтреонаму.

Обсуждение

Исходный изолят *P. aeruginosa* обладал резистентностью к пиперациллину-тазобактаму, цефтазидиму-авибактаму, цефтолозану-тазобактаму, цефтазидиму, меропенему, имипенему, амикацину, тобрамицину, цiproфлоксацину и сниженной чувствительностью (уровень «чувствительный при увеличенной экспозиции») к азтреонаму, что на генетическом уровне соответствовало набору детерминант резистентности, обнаруженному в его геноме. Набор генов резистентности не был уникальным для клинических изолятов *P. aeruginosa* [14]. В частности, сниженная чувствительность к азтреонаму объяснялась сочетанием генов металло-β-лактамазы *bla_{VIM-2}*, гена цефалоспоринызы AmpC-типа *bla_{PDC-3}* и гена оксацилиназы *bla_{OXA-395}*. Ранее был описан штамм *P. aeruginosa* с таким же уровнем чувствительности к азтреонаму (МПК = 4 мг/л) и набором аналогичных генов резистентности, включавшим гены металло-β-лактамазы (*bla_{IMP-45}*), цефалоспоринызы AmpC-типа (*bla_{PDC-16}*) и оксацилиназы (*bla_{OXA-395}*) [15].

Стресс, индуцированный колистином, повлиял на азтреонамочувствительность исходного изолята *P. aeruginosa* в двух противоположных направлениях: у одних клонов устойчивость увеличилась в 4–8 раз, другой клон реверсировал в чувствительное состояние с МПК = 0,001 мг/л. Усиление резистентности можно рассматривать как проявление известного феномена кросс-резистентности [3].

Проведенное исследование позволило выявить хромосомные гены и сочетания генов, повреждения которых можно рассматривать как детерминанты резистентности к азтреонаму. Наглядно они представлены в Таблице 2, конкретные поломки в генах и их продуктах описаны в Таблице 3. К ним можно отнести (1) большую делецию 262402 bp (239 ORF), затрагивающую комплекс генов, включая уридиндифосфат-глюкозопирофосфатазу и продукты *mexXY*-оперона, (2) сочетание нонсенс-мутации в гене *lasR* с мутациями в генах *morA* и *exsD*, (3) сочетание нонсенс-мутации в гене *lasR* с мутациями в *invA*, *groB*, *degS* и гене гипотетического протеина *hp/PA0285*. Наибольший вклад в усиление азтреонаморезистентности вносило сочетание нонсенс-мутации в гене транскрипционного регулятора *lasR* и большой делеции 262402 bp (239 ORF). Многие из перечисленных генов вовлечены в глобальную регуляцию метаболических процессов грамотрицательных бактерий (Таблица 3) [16, 17], поэтому не удивительно, что их поломки снижают чувствительность к антибиотикам [18].

Более интересным стало восстановление чувствительности к азтреонаму. При этом генетические перестройки,

возникшие в ходе формирования резистентности к колистину не затронули структуру генов резистентности исходного штамма. Следовательно, возникшие мутации в генах *pmrB* и *davD* (Таблица 2, Таблица 3) могут рассматриваться в качестве нейтрализующих эффект генов, детерминирующих азтреонамрезистентность. Мутации в гене сенсора двухкомпонентной системы *PmrB* традиционно рассматриваются как причины резистентности к полимиксинам и мурепавадину [19, 20]. В настоящем исследовании впервые обнаружен факт восстановления чувствительности к антибиотику (азтреонаму), ассоциированный с сочетанием крупной делеции (del-18bp-298-315) в гене *pmrB*, и нонсенс-мутации в гене глутар-семиальдегид-дегидрогеназы *DavD*. Миссенс-мутацию в гене *lasR* нельзя рассматривать как дефект, который влияет на чувствительность к азтреонаму, так как ее отсутствие у других представителей этого клона на влияло на МПК.

Безусловно, пока сложно оценить количественный вклад перечисленных мутаций в изменение чувствительности к азтреонаму, поскольку для этого нужно исследовать нокаутированные по перечисленным генам мутанты. Однако полученные результаты позволили определить перечень генов, с которыми нужно проводить генно-инженерные манипуляции в первую очередь.

Не менее интересен набор генов, фатальные мутации в которых не влияют на устойчивость *P. aeruginosa* к азтреонаму (*phoQ* (del-23bp-223-245), *lpxL_2* (del-

CATG-300-303), *groA* (ins-CTGGTC-604)). Относительно их роли можно сделать окончательный вывод и исключить из дальнейших исследований азтреонамрезистентности.

Заключение

В работе еще раз было показано, что формирование антибиотикорезистентности – сложное явление, сопровождающееся парадоксальными эффектами. Так, приобретение устойчивости *P. aeruginosa* к колистину сопровождалось изменением уровня чувствительности к азтреонаму. Изоляты, у которых устойчивость увеличилась, отличались от изолятов с восстановленной чувствительностью набором альтераций в генах, участвующих в регуляции глобального метаболизма бактерий. Полученные результаты внесли вклад в понимание направлений генно-инженерного моделирования, нацеленного на расширение представлений о механизмах устойчивости к азтреонаму.

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. Political declaration of the high-level meeting on antimicrobial resistance. Available at: www.un.org/pga/wp-content/uploads/sites/108/2024/09/FINAL-Text-AMR-to-PGA.pdf. Accessed November 5, 2024.
2. Chebotar I.V., Kuleshov K.V. Antibiotic resistance vs. virulence in the context of bacterial fitness dialectics. *Klinicheskaa mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya*. 2024;26(1):59-66. Russian. (Чеботарь И.В., Кулешов К.В. Между антибиотикорезистентностью и вирулентностью: диалектика бактериального фитнеса. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2024;26(1):59-66.) DOI: 10.36488/смас.2024.1.59-66
3. Pál C., Papp B., Lázár V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. *Trends Microbiol*. 2015;23(7):401-407. DOI: 10.1016/j.tim.2015.02.009
4. Botelho J., Grosso F., Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44:100640. DOI: 10.1016/j.drup.2019.07.002
5. Chebotar I., Savinova T., Bocharova J., Korostin D., Evseev P., Mayanskiy N. Genetic alternatives for experimental adaptation to colistin in three *Pseudomonas aeruginosa* lineages. *Antibiotics* (Basel). 2024;13(5):452. DOI: 10.3390/antibiotics13050452
6. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0. Available at: www.eucast.org/clinical_breakpoints. Accessed November 5, 2024.
7. 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;19:455-477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
8. Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pevzner P. Assembly of long error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol*. 2019;37(5):540-546. DOI: 10.1038/s41587-019-0072-8
9. Walker B.J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*. 2014;9(11):e112963. DOI: 10.1371/journal.pone.0112963
10. 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
11. Florensa A.F., Kaas R.S., Clausen P.T.L.C., Aytan-Aktug D., Aarestrup F.M. ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microb Genom*. 2022;8(1):000748. DOI: 10.1099/mgen.0.000748
 12. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-2069. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153
 13. Barrick J.E., Colburn G., Deatherage D.E., Traverse C.C., Strand M.D., Borges, J.J., et al. Identifying structural variation in haploid microbial genomes from short-read resequencing data using breseq. *BMC Genomics*. 2014;15(1):1039. DOI: 10.1186/1471-2164-15-1039
 14. Ahmed O.B. Detection of antibiotic resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* by whole genome sequencing. *Infect Drug Resist*. 2022;15:6703-6709. DOI: 10.2147/IDR.S389959
 15. Ding L., Sun Y., Zhang Y., Shen S., Hu F. *In vivo* development of aztreonam resistance in meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* owing to overexpression of the blaPDC-16. *Microbiol Spectr*. 2023;11(3):e0308022. DOI: 10.1128/spectrum.03080-22
 16. Simanek K.A., Paczkowski J.E. Resistance is not futile: the role of quorum sensing plasticity in pseudomonas aeruginosa infections and its link to intrinsic mechanisms of antibiotic resistance. *Microorganisms*. 2022;10(6):1247. DOI: 10.3390/microorganisms10061247
 17. Lorusso A.B., Carrara J.A., Barroso C.D.N., Tuon F.F., Faoro H. Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):15779. DOI: 10.3390/ijms232415779
 18. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582-610. DOI: 10.1128/CMR.00040-09
 19. Disney-McKeethen S., Seo S., Mehta H., Ghosh K., Shamoo Y. Experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa* to colistin in spatially confined microdroplets identifies evolutionary trajectories consistent with adaptation in microaerobic lung environments. *mBio*. 2023;14(6):e0150623. DOI: 10.1128/mbio.01506-23
 20. Ghassani A., Triponney P., Bour M., Plésiat P., Jeannot K., MucoMicrobes study Group. Mutations in genes lpxL1, bamA, and pmrB impair the susceptibility of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* to murepavadin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2024;68(1):e0129823. DOI: 10.1128/aac.01298-23