

МЕРОПЕНЕМ-ИНДУЦИРОВАННОЕ СНИЖЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К КОЛИСТИНУ У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853

Т. А. Савинова , Ю. А. Бочарова, А. В. Чаплин, Д. О. Коростин, О. В. Шамина, Н. А. Маянский, И. В. Чеботарь

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия


Нечувствительные к антибиотикам штаммы *Pseudomonas aeruginosa* представляют собой глобальную проблему в здравоохранении. Исследование механизмов возникновения резистентности лежит в основе разработки способов борьбы с *P. aeruginosa*. Целью работы было исследовать возникновение кросс-резистентности у *P. aeruginosa* в процессе адаптации к популярному антибиотику меропенему. Объектами исследования были образцы *P. aeruginosa*, полученные при росте референтного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 на среде с возрастающей концентрацией меропенема. Чувствительность изолятов к карбапенемам и колистину определяли при помощи разведения в агаре, чувствительность к колистину оценивали методом серийных разведений. Было получено 93 изолята *P. aeruginosa*, два из которых имели сниженную чувствительность одновременно к карбапенемам (меропенем, имипенем) и колистину. Геномы изолятов секвенировали на полногеномном секвенаторе MGISEQ-2000; обнаружены миссенс-мутации в генах *oprD* и *mexD* и нонсенс-мутация в *phoQ*. Полученные результаты показывают, что при воздействии меропенема на штаммы *P. aeruginosa* может развиваться кросс-резистентность к колистину — препарату резерва для лечения синегнойной инфекции.

Ключевые слова: антибиотики, резистентность, *Pseudomonas aeruginosa*, меропенем, колистин

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

Благодарности: авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ за консультации по методической части исследования.

Вклад авторов: Т. А. Савинова — формальный анализ данных секвенирования, подготовка рукописи; Ю. А. Бочарова — методология, формальный анализ; А. В. Чаплин — формальный анализ данных секвенирования; Д. О. Коростин — методология, валидация данных; О. В. Шамина — методология; Н. А. Маянский, И. В. Чеботарь — концептуализация, редактирование рукописи.

 **Для корреспонденции:** Татьяна Александровна Савинова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; taniyasavinova@gmail.com

Статья получена: 27.12.2021 **Статья принята к печати:** 10.01.2022 **Опубликована онлайн:** 19.01.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.001

MEROPENEM-INDUCED REDUCTION IN COLISTIN SUSCEPTIBILITY IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAIN ATCC 27853

Savinova TA , Bocharova YuA, Chaplin AV, Korostin DO, Shamina OV, Mayansky NA, Chebotar IV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Antibiotic-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* are a global threat to public health. The knowledge of mechanisms underlying antibiotic resistance is essential to counter *P. aeruginosa* infections. This study describes the phenomenon of meropenem-induced cross-resistance to colistin in the ATCC 27853 strain of *P. aeruginosa*. The study was conducted in the specimens of *P. aeruginosa* grown from the reference ATCC 27853 strain in the medium containing meropenem gradients. Susceptibility of the isolates to carbapenems and colistin was assessed using the agar dilution method; susceptibility to colistin was assessed using the broth microdilution method. A total of 93 *P. Aeruginosa* isolates were analyzed; of them two demonstrated reduced susceptibility to carbapenems (meropenem, imipenem) and colistin. Whole-genome sequencing of the isolates was performed on a MGISEQ-2000 platform. Missense mutations in the *oprD* and *mexD* genes and a nonsense mutation in the *phoQ* gene were detected. We conclude that exposure of *P. aeruginosa* to meropenem can lead to cross-resistance to colistin, a last resort drug for *P. aeruginosa* infections.

Keywords: antibiotic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, meropenem, colistin

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (Project 20-15-00235).

Acknowledgements: the authors thank the Center of Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of Pirogov Russian National Research Medical University for their advice on the methodology of the study.

Author contribution: Savinova TA — formal analysis of sequencing data, manuscript preparation; Bocharova YuA — methodology, formal analysis; Chaplin AV — formal analysis of sequencing data; Korostin DO — methodology, data validation; Shamina OV — methodology; Mayansky NA, Chebotar IV — concept; manuscript editing.

 **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Savinova
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; taniyasavinova@gmail.com

Received: 27.12.2021 **Accepted:** 10.01.2022 **Published online:** 19.01.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.001

Pseudomonas aeruginosa является одним из важнейших оппортунистических патогенов, который наносит человечеству серьезный урон в медицинской и экономической сферах [1]. Особенно опасны устойчивые к карбапенемам штаммы *P. aeruginosa*, которые эксперты ВОЗ расценивают как критически опасные патогены [2]. В связи с этим исследование механизмов возникновения карбапенем-резистентности является актуальной задачей современной медицинской микробиологии. При исследовании молекулярно-генетической базы карбапенемрезистентности чаще

уделяют внимание β -лактамазным механизмам, которые детерминируются плазмидными генами и могут передаваться горизонтальным путем. Однако существует и мутационная изменчивость, затрагивающая гены кор-генома *P. aeruginosa* и приводящая к развитию карбапенем-резистентности достаточно высокого уровня [3]. Изучение мутаций, индуцирующих карбапенем-резистентность, проводят в двух направлениях. Первый подход направлен на исследование изолятов с признаками сформировавшейся резистентности, полученных из

клинических, сельскохозяйственных источников или из окружающей среды. Второе направление основано на моделировании эволюции резистентности в условиях *in vitro*. Обычно резистентность воспроизводят путем культивирования бактерий в повышающихся концентрациях антибиотика. Разработан весьма удачный способ исследования мутационной резистентности [4]. Его авторы предложили пространственно-временную модель, которая обеспечивала движение *Escherichia coli* в градиенте повышения концентраций триметоприма или цiproфлоксацина и позволяла изолировать множество клональных вариантов бактерии с целью изучения их мутационной изменчивости. Однако в геномах новых клонов *E. coli* обнаружены мутации, которые не направлены на повышение устойчивости к триметоприму либо цiproфлоксацину [4]. Нас заинтересовал актуальный вопрос о направленности последствий подобных мутаций. В частности, практически значимой является возможность мутаций, возникающих под воздействием какого-либо антибиотика, индуцировать резистентность к другим антибиотикам (феномен кросс-резистентности) [5, 6]. Целью работы было исследование возникновения кросс-резистентности у *P. aeruginosa* в процессе адаптации к популярному антибиотику меропенему.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериологические исследования

Исследование проводили на основе пространственно-временной модели формирования резистентности подвижных бактерий к антибиотикам [4]. Референтный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 предварительно культивировали (24 ч при 37 °С) на чашке Петри с полужидким агаром Луреа–Бертани (содержание агарозы — 0,28%), спустя сутки выполняли пересев на другую чашку Петри с полужидким агаром Луреа–Бертани, забирая материал с края распространившейся колонии. Процедуру выполняли трижды. Затем при помощи бактериальной петли (10 мкл) уколком в верхний слой полужидкого агара выполняли пересев бактерий на верхний слой (полужидкий агар) питательной среды в устройстве, схема которого представлена на рисунке. Среда в устройстве имела «сэндвич»-структуру. Нижний слой был изготовлен из бульона Луреа–Бертани (LB Miller, Becton Dickinson, США), содержащего 1,6% агарозы, 30 мкг/мл канамицина сульфата, 100 мкг/мл циклогексимида и меропенем в расчетной концентрации (см. рис.). Оптимальная толщина нижнего слоя составляла 3/5 от общей толщины «сэндвич»-среды (примерно 2,0 см). Нижний слой разливался в пять изолированных отсеков, в каждом из отсеков содержалась среда с разными концентрациями меропенема. Средний слой (1/5 от общей толщины «сэндвич»-среды) был изготовлен из бульона Луреа–Бертани (модификация Миллер), содержащего 2,0% агарозы, 30 мкг/мл канамицина сульфата, 100 мкг/мл циклогексимида с добавлением туши (4,0 мл на 1 л среды) для контрастирования бактериальных колоний при фотофиксации их роста; он наслаивался поверх отсеков нижнего слоя и был сплошным. Верхний слой (1/5 общей толщины среды) представлял собой полужидкий агар (бульон Луреа–Бертани в модификации Миллер, содержащий 0,3% агарозы, 30 мкг/мл канамицина сульфата, 100 мкг/мл циклогексимида).

Инкубацию проводили при 37 °С в течение 216 ч в аэробных условиях. Каждые 12 ч с фронта распространения *P. aeruginosa* отбирали образцы и пересевали на агар Мюллера–Хинтона (Becton Dickinson; США) для накопления биоматериала с целью последующего изучения фенотипических свойств (профиль антибиотикорезистентности) и изменений бактериального генома.

Оценку чувствительности изолятов к меропенему и имипенему выполняли при помощи метода диффузии в агаре [7]. Оценку чувствительности изолятов к колистину (при помощи метода серийных разведений) и интерпретацию полученных результатов выполняли в соответствии с протоколом Института клинических и лабораторных стандартов CLSIA (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)) [8].

Бактериальную ДНК выделяли из суточных культур изолятов *P. aeruginosa*, выращенных на агаре Мюллера–Хинтона (Becton Dickinson; США), с использованием наборов QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen; Германия) по протоколу фирмы-производителя. Образцы ДНК хранили при –20 °С.

Для подготовки библиотек геномной ДНК применяли ультразвуковую фрагментацию (Covaris; США) бактериальной ДНК (400 нг) с последующей репарацией концевых последовательностей и лигированием адаптеров (MGI; Китай). Для очистки ДНК-библиотек использовали магнитные частицы Agencourt AMPure XP (Beckman; США). Концентрацию бактериальной ДНК и ДНК-библиотек измеряли при помощи прибора Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific; США).

Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MGISEQ-2000 (MGI; Китай). Длина прочтений составляла 250 пар оснований.

Оценку качества 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 [9]. Для контроля полноты сборки и исключения возможности контаминации использовали веб-сервер Contest16S. Качество сборки оценивали при помощи QUAST 5.0 [10]. Анализ сходства полных геномов проводили с использованием программы MUMmer [11]. Геномы аннотировали с помощью сервера RAST [12] и программы Prokka [13]. Для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) осуществляли картирование коротких ридов на референс при помощи программы Snippy [14]. В качестве референсного генома использовали геном ATCC 27853. Для аннотации выявленных вариантов и предсказания их влияния на гены применяли программу SnpEff [15]. Поиск и анализ генов резистентности, а также валидацию выявленных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) осуществляли при помощи BLASTn в собранных геномах *de novo*. Для анализа детерминант резистентности также использовали сервисы ResFinder и алгоритм AMRFinderPlus, входящий в NCBI Pathogen Detection pipeline [16, 17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в течение 216 ч инкубации было получено 93 изолята *P. aeruginosa* с различными фенотипическими свойствами (цвет колоний, профиль антибиотикорезистентности, наличие слизи) и мутациями в геномах. Среди этих изолятов было обнаружено два штамма (E62 был получен через 192 ч инкубации и E74 — через 216 ч инкубации), у которых зарегистрировано значительное снижение чувствительности к колистину (в 4–8 раз) при высоких

Таблица. Характеристики карбапенем-резистентных изолятов *P. aeruginosa* со снижением чувствительности к колистину

Методический подход		Признак	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, референс	<i>P. aeruginosa</i> , изолят E62	<i>P. aeruginosa</i> , изолят E74
Фенотипическая оценка чувствительности к антибиотикам	Метод дилуции в агаре, чувствительность к	меропенему	0,25 мкг/мл, S	16 мкг/мл, R	16 мкг/мл, R
		имипенему	0,001 мкг/мл, S	128 мкг/мл, R	256 мкг/мл, R
	Метод серийных микроразведений, чувствительность к	колистину	0,5 мкг/мл, I*	2 мкг/мл, I*	4 мкг/мл, R
Оценка изменений генома	Гены резистентности к карбапенемам	<i>oprD</i>	wt	мутация, ведущая к G307D	мутация, ведущая к G307D
		<i>mexD</i>	wt	мутация, ведущая к E89K	мутация, ведущая к E89K
	Гены резистентности к колистину	<i>phoQ</i>	wt	нонсенс-мутация, ведущая к Y290stop	нонсенс-мутация, ведущая к Y290stop
	Полиморфизм	SNP	—	134	177

Примечание: S — чувствительный; I — чувствительный при повышенной экспозиции антибиотика; R — резистентный; wt — дикий тип (wild type), соответствие референсу; SNP — однонуклеотидный полиморфизм; * — согласно критериям CLSI, для *P. aeruginosa* в отношении колистина неприменим термин «чувствительный», все штаммы, для которых минимальная подавляющая концентрация (МПК) колистина ≤ 2 мкг/мл, расцениваются как «чувствительные при повышенной экспозиции антибиотика».

уровнях резистентности к меропенему и имипенему. Фенотипические и генетические особенности этих штаммов представлены в таблице.

Показатели МПК меропенема и имипенема у штамма E62 составляли соответственно 16 и 128 мкг/мл, у штамма E74 — 16 и 256 мкг/мл, что соответствовало критерию резистентности. Показатель чувствительности к колистину у штамма E62 интерпретировали в соответствии с критериями CLSI как «чувствительный при повышенной экспозиции антибиотика», и его превышение МПК исходного штамма было в 4 раза. Штамм E74 согласно критериям CLSI был резистентным (МПК — 4 мкг/мл).

У обоих штаммов в гене порина *oprD* была идентифицирована мутация, приводящая к замене глицина на аспарагиновую кислоту в позиции 307 белка. Кроме того, у обоих штаммов была детектирована миссенс-мутация в гене *mexD* (кодирует субъединицу эффлюксной системы MexCD-OprJ). В гене *phoQ* у штаммов E62 и E74 была выявлена нонсенс-мутация, приводящая к преждевременной остановке синтеза продукта (289/448 аминокислот).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существование штаммов *P. aeruginosa*, демонстрирующих устойчивость одновременно к карбапенемам и полимиксидам, нередкое явление. Например, показано, что среди *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью 22,2% от общего количества меропенем-резистентных изолятов были нечувствительны к колистину [18]. В большинстве исследований отсутствует описание эволюции таких изолятов — не исключается возможность формирования подобного профиля резистентности вследствие поочередного или одновременного терапевтического применения карбапенемов и колистина. Описанный нами феномен очень интересен именно потому, что доказывает возможность снижения чувствительности к колистину после воздействия на *P. aeruginosa* меропенема. Гипотетические механизмы индукции меропенемом кросс-резистентности к колистину укладываются в постулат «у синегнойной палочки все пути

ведут к резистентности», подразумевающий, что любой стресс вызывает гипермутабельность и возникновение большого количества клонов с новыми свойствами [3]. С известной долей вероятности в результате такого мутационного «взрыва» могут возникать и закрепляться мутации, приводящие к нарушению синтеза главной мишени колистина — липополисахарида.

В геномах штаммов E62 и E74 были обнаружены мутации, объясняющие их устойчивость к меропенему/имипенему и снижение чувствительности к колистину. Выявленная нами миссенс-мутация в гене *oprD* могла вызывать изменение структуры порина OprD, транспортирующего меропенем и имипенем внутри бактериальной клетки [19]. Поиск в базе данных GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) позволил выявить один клинический изолят с аналогичной аминокислотной последовательностью порина OprD (номер генома в GeneBank — GCA_003194245.1). Данный изолят, выделенный в 2013 г., тоже был устойчив к меропенему и имипенему (МПК меропенема и имипенема — > 32 мкг/мл). Другой мутацией, которая могла снижать уровень чувствительности к карбапенемам, является миссенс-мутация в гене *mexD*, кодирующей субъединицу эффлюксной системы MexCD-OprJ. Система MexCD-OprJ вовлечена в эффлюкс β -лактамов и ее гиперэкспрессия коррелирует с устойчивостью *P. aeruginosa* к карбапенемам [20]. Ген *phoQ* кодирует сенсорную гистидинкиназу, являющуюся частью двухкомпонентной регуляторной системы PhoPQ. Мутации, вызывающие поломки гена *phoQ*, описаны как причина устойчивости к полимиксидам у изолятов *P. aeruginosa*, в том числе выделенных от пациентов с муковисцидозом [21, 22].

Таким образом, все фенотипические особенности карбапенем-резистентных изолятов со сниженной чувствительностью к колистину имели мутационную основу.

ВЫВОДЫ

Феномен кросс-резистентности, описанный в настоящем исследовании, можно объяснить тем, что в условиях стресса у *P. aeruginosa* возрастает скорость накопления

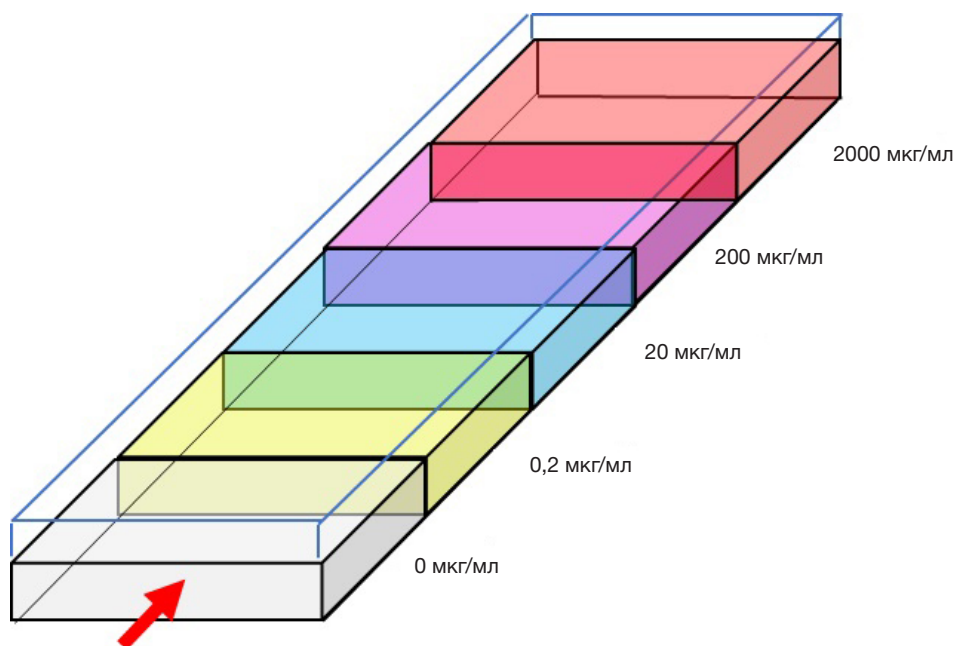


Рис. Устройство (mega-plate) для пространственно-временного моделирования устойчивости *P. aeruginosa* к меропенему. Общий размер устройства 40 × 20 см. Нижняя часть устройства разделена на пять отсеков с открытым верхом, которые разделены перегородками высотой 2,5 см. Среда в устройстве имела «сэндвич»-структуру. Нижний слой изготовлен из плотного агара Лурее–Бертани (состав см. в тексте). Нижний слой разливался в изолированные отсеки, в каждом из отсеков содержалась среда с разными концентрациями меропенема, концентрации указаны справа. Средний слой был изготовлен из Лурее–Бертани агара без меропенема. Верхний слой представлял собой полужидкий агар на основе среды Лурее–Бертани. Стрелкой показана точка первоначального посева и направление распространения *P. aeruginosa* по поверхности полужидкого агара

точечных мутаций, в том числе в генах, ответственных за развитие антибиотикорезистентности. Полученные результаты доказывают, что при воздействии меропенема у штаммов *P. aeruginosa* может развиваться резистентность

не только к другим β-лактамам антибиотикам, но и к препарату резерва для лечения синегнойной инфекции — колистину, что крайне неблагоприятно с точки зрения выбора стратегии лечения.

Литература

- Bou R, Lorente L, Aguilar A, Perpignan J, Ramos P, Peris M, et al. Hospital economic impact of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Hosp Infect.* 2009; 71 (2): 138–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.07.018>.
- World Health Organization (WHO). Global Priority List of Antibiotic-Resistance. Geneva, Switzerland: 2017. Available at: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf (accessed November 2021).
- Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011; 19 (8): 419–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science.* 2016; 353 (6304): 1147–51. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>.
- Pai C, Papp B, Lazar V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. *Trends Microbiol.* 2015; 23 (7): 401–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>.
- Gnanadhas DP, Marathe SA, Chakravorty D. Biocides–resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013; 22 (2): 191–06. Available from: <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.748035>.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6 (9): 509–15. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Available from: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (accessed November 2021).
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012; 19: 455–77. Available from: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013; 29 (8): 1072–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
- Marcais G, Delcher AL, Phillippy AM, Coston R, Salzberg SL, Zimin A. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS Comput Biol.* 2018; 14 (1): e1005944. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944>.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: D206–14. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014; 30 (14): 2068–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Seemann T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. GitHub. 2015. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy> (accessed November 2021).
- Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly.* 2012; 6 (2): 80–92. Available from: <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
- Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Validating the AMRFinder Tool and Resistance

- Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63 (11): e00483-19. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19>.
17. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75 (12): 3491–500. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
 18. Sader HS, Huband MD, Castanheira M, Flamm RK. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility results from four years (2012 to 2015) of the international network for optimal resistance monitoring program in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61 (3): e02252–16. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.02252-16>.
 19. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41 (5): 698–722. Available from: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>.
 20. Zahedi Bialvaei A, Rahbar M, Hamidi-Farahani R, Asgari A, Esmailkhani A, Mardani Dashti Y, et al. Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Microbial Pathog.* 2021; 153: 104789. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104789>.
 21. Barrow K, Kwon DH. Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (12): 5150–4. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00893-09>.
 22. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (12): 5761–9. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.05391-11>.

References

1. Bou R, Lorente L, Aguilar A, Perpignan J, Ramos P, Peris M, et al. Hospital economic impact of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Hosp Infect.* 2009; 71 (2): 138–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.07.018>.
2. World Health Organization (WHO). Global Priority List of Antibiotic-Resistance. Geneva, Switzerland: 2017. Available at: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf (accessed November 2021).
3. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011; 19 (8): 419–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
4. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science.* 2016; 353 (6304): 1147–51. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>.
5. Pal C, Papp B, Lazar V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. *Trends Microbiol.* 2015; 23 (7): 401–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>.
6. Gnanadhas DP, Marathe SA, Chakravorty D. Biocides–resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013; 22 (2): 191–06. Available from: <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.748035>.
7. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6 (9): 509–15. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Available from: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (accessed November 2021).
9. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012; 19: 455–77. Available from: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
10. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013; 29 (8): 1072–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
11. Marçais G, Delcher AL, Phillippy AM, Coston R, Salzberg SL, Zimin A. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS Comput Biol.* 2018; 14 (1): e1005944. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944>.
12. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: D206–14. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
13. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014; 30 (14): 2068–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
14. Seemann T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. GitHub. 2015. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy> (accessed November 2021).
15. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly.* 2012; 6 (2): 80–92. Available from: <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
16. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63 (11): e00483-19. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19>.
17. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75 (12): 3491–500. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
18. Sader HS, Huband MD, Castanheira M, Flamm RK. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility results from four years (2012 to 2015) of the international network for optimal resistance monitoring program in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61 (3): e02252–16. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.02252-16>.
19. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41 (5): 698–722. Available from: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>.
20. Zahedi Bialvaei A, Rahbar M, Hamidi-Farahani R, Asgari A, Esmailkhani A, Mardani Dashti Y, et al. Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Microbial Pathog.* 2021; 153: 104789. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104789>.
21. Barrow K, Kwon DH. Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (12): 5150–4. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00893-09>.
22. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (12): 5761–9. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.05391-11>.