

МУТАЦИОННЫЕ ОСНОВЫ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К МЕРОПЕНЕМУ У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

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

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

Резистентные к карбапенемам штаммы *Pseudomonas aeruginosa* расценивают в качестве критически опасных патогенов первого уровня приоритета. Расшифровка механизмов формирования устойчивости к карбапенемам является актуальной задачей современной медицинской науки. Целью работы было описать разнообразие и закрепление мутаций, ассоциированных с формированием карбапенемрезистентности в процессе адаптации *P. aeruginosa* к повышающимся концентрациям меропенема. Объектами исследования были изоляты *P. aeruginosa*, полученные при росте референтного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 в градиенте возрастающих концентраций меропенема. Оценку чувствительности изолятов к меропенему выполняли при помощи е-тестов (эпсилонметрический метод) с меропенемом и при помощи метода диффузии антибиотика в агаре. Геномы изолятов были секвенированы на полногеномном секвенаторе MGISEQ-2000. Полученные результаты показали, что формирование высоких уровней резистентности к меропенему у *P. aeruginosa* в эксперименте происходит в короткие сроки (6 суток). Эволюция резистентности сопряжена с процессом клонирования, при котором происходит возникновение множества клонов с различными генотипами. Основой клонирования является мутагенез, в который вовлечены 11 генов, включая *oprD*, *pbuE*, *nalD*, *nalC*, *spoT*, *mlaA*, *mexD*, *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*. Часть образовавшихся клонов, независимо от уровня их резистентности к меропенему, не получают прогрессивного развития и вытесняются более успешными клонами.

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

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: И. В. Чеботарь — концептуализация, подготовка рукописи; Ю. А. Бочарова — методология, формальный анализ; А. В. Чаплин — формальный анализ данных секвенирования; Т. А. Савинова — формальный анализ данных секвенирования; Ю. А. Василиадис — методология, выполнение секвенирования; Н. А. Маянский — концептуализация, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации и норм работ с условно-патогенными организмами.

✉ **Для корреспонденции:** Игорь Викторович Чеботарь
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия: nizarnn@yandex.ru

Статья получена: 25.11.2022 **Статья принята к печати:** 11.12.2022 **Опубликована онлайн:** 28.12.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.063

MUTATIONAL BASIS OF MEROPENEM RESISTANCE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Chebotar IV , Bocharova YuA, Chaplin AV, Savinova TA, Vasiliadis YuA, Mayansky NA

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The carbapenem-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* are considered as the dangerous pathogens of critical priority. Deciphering the mechanisms underlying the development of carbapenem resistance is an urgent challenge faced by modern medical science. The study was aimed to describe the diversity and fixation of mutations associated with the development of carbapenem resistance during the *P. aeruginosa* adaptation to the increasing meropenem concentrations. The objects of the study were *P. aeruginosa* isolates obtained by growing the ATCC 27853 *P. aeruginosa* reference strain exposed to increasing concentrations of meropenem. The isolates were tested for meropenem susceptibility using E-tests (Epsilonometer tests) and by the agar dilution method. Genomes of the isolates were sequenced in the MGISEQ-2000 whole-genome sequencer. The findings show that in experimental settings *P. aeruginosa* develops high meropenem resistance very quickly (in 6 days). Evolution of resistance is associated with cloning involving the emergence of multiple clones with various genotypes. Mutagenesis that involves 11 genes, including *oprD*, *pbuE*, *nalD*, *nalC*, *spoT*, *mlaA*, *mexD*, *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*, provides the basis for cloning. Regardless of the levels of their meropenem resistance, some of the emerging clones do not progressively develop and are replaced by more successful clones.

Keywords: antibiotics, resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, meropenem, mutation

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 20-15-00235).

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

Author contribution: Chebotar IV — concept, manuscript writing; Bocharova YuA — methods, formal analysis; Chaplin AV — formal analysis of sequencing data; Savinova TA — formal analysis of sequencing data; Vasiliadis YuA — methods, sequencing; Mayansky NA — concept, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was performed in full compliance with the principles of the Declaration of Helsinki and the standards for handling opportunistic pathogens.

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor V. Chebotar
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia: nizarnn@yandex.ru

Received: 25.11.2022 **Accepted:** 11.12.2022 **Published online:** 28.12.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.063

Pseudomonas aeruginosa является одним из ключевых оппортунистических патогенов [1]. Особую угрозу для пациентов несут карбапенемрезистентные штаммы *P. aeruginosa*, именно поэтому они были включены в Лист приоритета ВОЗ («WHO priority list for R&D of new

antibiotics for antibiotic-resistant bacteria») в качестве критически опасных патогенов первого уровня приоритета [2]. Карбапенемрезистентность может формироваться двумя путями. Первый путь реализуется за счет приобретения генов резистентности из внешних

источников путем горизонтального переноса. Этот механизм устойчивости, часто называемый «plasmid-borne resistance», обеспечивает высокие уровни резистентности, и его изучение более популярно среди исследователей. Главной молекулярной основой карбапенемрезистентности, передаваемой горизонтально, являются энзимы — разнородные бета-лактамазы разных Ambler классов, объединенные по функциональному принципу в группу карбапенемаз. Однако существует и второй тип формирования карбапенемрезистентности, не связанный с горизонтальной передачей генов. Он базируется на уникальном адаптационном потенциале *P. aeruginosa* и реализуется за счет мутационной изменчивости хромосомных генов [3]. Среди клинических изолятов наиболее яркие примеры мутационной антибиотикорезистентности демонстрируют штаммы *P. aeruginosa*, выделенные у пациентов с муковисцидозом. Описаны высокорезистентные штаммы, имеющие более 60 поврежденных мутациями генов, которые могут быть причиной формирования устойчивости к разным классам антибиотиков [4]. Из них 26 мутировавших генов могли быть причиной карбапенемрезистентности.

Исследование разнообразия мутаций, возникающих в процессе адаптации *P. aeruginosa* к карбапенемам, представляет интерес для прогнозирования эволюции карбапенемрезистентности среди клинических изолятов. Механизмы мутационной карбапенемрезистентности анализируют при помощи двух методологических подходов: 1) изучения генетических и фенотипических свойств клинических карбапенемрезистентных изолятов; 2) направленного моделирования карбапенемрезистентности *in vitro* при контакте *P. aeruginosa* с антибиотиком.

Цель настоящей работы — описать разнообразие и закрепление мутаций, ассоциированных с формированием карбапенемрезистентности в процессе адаптации *P. aeruginosa* к повышающимся концентрациям меропенема.

Чаще направленное получение резистентных штаммов *P. aeruginosa* моделируют при помощи серии последовательных трансферов бактерий в жидких питательных средах, содержащих антибиотик в восходящей концентрации от 0 мкг/мл до концентраций, превосходящих минимальные ингибирующие концентрации (МИК) в десятки и сотни раз [5]. Мы использовали другую модель [6], которая базировалась на эволюции подвижных бактерий в градиенте повышающихся концентраций антибиотика. Такой подход позволяет изолировать большее количество клонов с различными генотипами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил референсный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, который используют в качестве стандарта чувствительности к карбапенемам (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0. Available at: www.eucast.org).

Исследование проводили на основе пространственно-временной модели формирования резистентности подвижных бактерий к антибиотикам, методика которой подробно описана ранее [7]. В емкости размером 20,0 × 40,0 см создавали пять разделенных перегородками отсеков глубиной 2,0 см и заполняли их плотной питательной средой на основе бульона Луреа–Бертани (LB Miller, Becton Dickinson and Co.; США). Среда в отсеках содержала меропенем (Supelco® Analytical Products, Merck

& Co. Inc.; США) в последовательных концентрациях 0, 0,2, 20, 200, 2000 мкг/мл. Поверх отсеков наслаивали единый слой не содержащей меропенема плотной питательной среды (высота примерно 0,6 см) на основе бульона Луреа–Бертани. Сверху наслаивали слой полужидкого агара (содержание агара 0,28%) на основе бульона Луреа–Бертани без меропенема, высота слоя составляла примерно 0,8 см. Перед началом эксперимента культуру *P. aeruginosa* адаптировали к полужидкой питательной среде по ранее описанной методике [7].

Для посева использовали суспензию бактерий, стандартизованную по оптической плотности до 0,5 ед. по МакФарланду. Посев производили путем укола в полужидкий агар на глубину примерно 1–2 мм в секторе А (рис. 1).

Каждые 24 ч с фронта распространения *P. aeruginosa* отбирали образцы и пересеивали на агар Мюллера–Хинтона (Becton Dickinson and Co., США) для накопления биоматериала с целью последующего изучения фенотипических свойств (профиль антибиотикорезистентности) и изменений бактериального генома.

Оценку чувствительности изолятов к меропенему выполняли путем определения МИК двумя способами: 1) при помощи е-тестов (эпсилонметрический метод) с меропенемом согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (BioMerieux SA; Франция); 2) при помощи метода диффузии антибиотика в агаре [8]. Значения МИК не интерпретировали с клинических позиций и проанализировали исключительно с позиций их динамики.

Через 240 ч после начала эксперимента оценивали остаточную концентрацию меропенема в полужидком агаре методом ВЭЖХ по известной методике [9].

Бактериальную ДНК выделяли из суточных культур изолятов *P. aeruginosa*, выращенных на агаре Мюллера–Хинтона (Becton Dickinson and Co., 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 Tech, Китай). Для очистки ДНК-библиотек использовали магнитные частицы Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, 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 Tech, Китай). Длина прочтений составляла 250 пар оснований. Оценку качества проводили с использованием программ FASTQC (Babraham Institute; Великобритания) и Trimmomatic v.0.38 (Usadel Lab; США). Сборку геномов *de novo* осуществляли с использованием программы SPAdes 3.14 [10]. Для контроля полноты сборки и исключения возможности контаминации использовали веб-сервер Contest16S. Качество сборки оценивали при помощи QUAST 5.0 [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 «нулевого» изолята, т. е. изолята, который был получен после адаптации штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 к полужидкому агару и который использовали для старта эксперимента. Для аннотации выявленных вариантов и

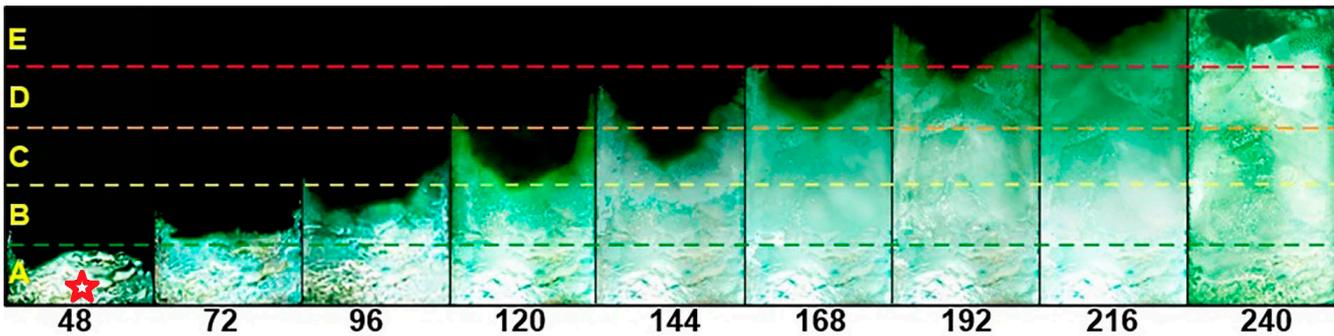


Рис. 1. Динамика распространения *P. aeruginosa* по поверхности полужидкого агара в градиенте повышающейся концентрации меропенема. Фотографии получены на сроках культивирования 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 ч от начала эксперимента. Штриховые линии — границы, разделяющие секторы А, В, С, D, Е с различными концентрациями меропенема (0, 0,2, 20, 200, 2000 мкг/мл соответственно) в нижнем слое плотной питательной среды (см. раздел «Материалы и методы»). Звездочка — точка старта (внесения культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853)

предсказания их влияния на гены применяли программу SnpEff [15].

При помощи инструментов BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) в геномах всех полученных изолятов были проанализированы гены и последовательности аминокислот в их продуктах. Для анализа детерминант резистентности использовали также сервисы ResFinder и алгоритм AMRFinderPlus, входящий в NCBI Pathogen Detection pipeline [16, 17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика продвижения *P. aeruginosa* по поверхности полужидкого агара в направлении повышения концентрации меропенема показана на рис. 1. За 168 ч (7 суток) граница роста *P. aeruginosa* достигла зоны с максимальной концентрацией меропенема, в течение 240 ч (10 суток) был получен рост на всей площади питательной среды. Концентрация меропенема в секторе Е полужидкого агара (рис. 1) в конце эксперимента составляла 56 мкг/мл.

В ходе эксперимента с фронта распространения *P. aeruginosa* было отобрано 92 изолята. Уровни резистентности к меропенему изолятов росли по мере продвижения бактерий в направлении увеличения концентрации меропенема (рис. 2). Повышение МИК от 0,5 мкг/мл до 2, 4 и 8 мкг/мл наблюдалось уже через 72 ч от начала эксперимента. Изоляты с МИК = 16 мкг/мл и МИК = 32 мкг/мл появлялись через 144 ч, МИК = 64 мкг/мл — через 216 ч. МИК меропенема > 8 мкг/мл был зарегистрирован у 61 изолята, МИК ≥ 32 — у 45 изолятов.

Несинонимичные мутации были выявлены в 11 генах, включая *oprD*, *pbuE*, *nalD*, *nalC*, *spoT*, *mIaA*, *mexD*, *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*. В четырех из 92 (4,3%) геномов мутации в этих генах не были обнаружены, данные геномы принадлежали изолятам, полученным в первые 48 ч роста. В остальных 88 из 92 (95,7%) геномов были обнаружены различные комбинации поврежденных мутациями генов (табл. 1). Наиболее часто повреждались гены *oprD*, *pbuE*, *nalD* (табл. 2). Мутации в генах *nalD*, *spoT*, *mIaA*, *mexR*, *mraY*, *pbp3* ассоциировались с высокими уровнями резистентности несущих их изолятов, МИК меропенема которых был >8 мкг/мл (табл. 2). Мутации в гене *oprM*, напротив, были обнаружены лишь у четырех из 92 (4,3%) штаммов с МИК меропенема < 8 мкг/мл. Среди 84 штаммов с мутациями *oprD* было найдено четыре высоко чувствительных изолята с МИК меропенема от 0,5 до 2 мкг/мл. У этих изолятов *oprD*-мутации в трех случаях приводили к заменам L292Q, L252P, G307D и в одном случае — к преждевременному обрыву синтеза белка

(W138stop). Наиболее распространенным был генотип с сочетанием мутаций в генах *oprD*, *pbuE*, *nalD* (табл. 1).

Динамика появления мутаций на разных сроках отбора материала представлена в табл. 2. Самыми первыми стойкие мутационные изменения возникали в генах *oprD* и *pbuE* через 72 ч от начала эксперимента. Мутация в гене *pbuE*, приводящая к замене A261D, была представлена единственным вариантом и равномерно сочеталась с различными вариантами других мутаций у 77 из 92 (83,7%) изолятов. Мутации в гене *oprD* были представлены девятью вариантами. Однако у большинства изолятов с мутациями в *oprD* (73 из 84; 86,9%) были найдены только два варианта мутаций, приводящих к заменам G307D (*oprD*-G307D) и L238P (*oprD*-L238P). Другие семь вариантов *oprD*-мутаций были относительно редкими и обнаружены у 11 из 84 (13,1%) изолятов с мутированными *oprD*-генами. Таким образом, первоначальный штамм разделился на два клона — *oprD*-G307D и *oprD*-L238P (рис. 2). Штамм, являющийся прямым родоначальником клона *oprD*-G307D, появился через 96 ч

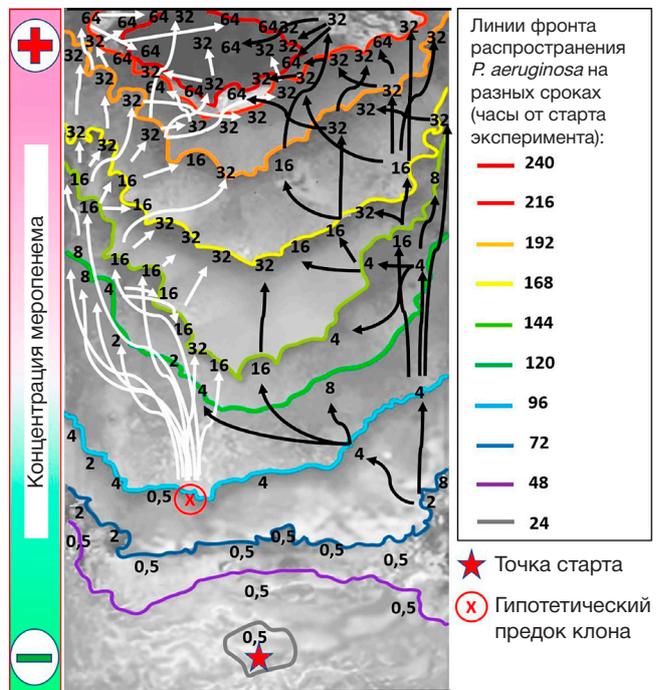


Рис. 2. Топология клонов *P. aeruginosa* на поверхности полужидкого агара в градиенте повышающейся концентрации меропенема через 240 ч культивирования. Цифрами даны МИК меропенема (мкг/мл) изолятов, отобранных в месте расположения цифры. Белыми стрелками показано распространение клона *oprD*-L238P, черными — распространение клона *oprD*-G307D

Таблица 1. Гены и сочетания генов, в которых были обнаружены несинонимические мутации

№	Комбинации генов с мутациями	Число штаммов (% от всех штаммов, <i>n</i> = 92)
1	<i>oprD, pbuE, nalD</i>	20 (22,2)
2	<i>oprD, pbuE</i>	11 (12,0)
3	<i>oprD, pbuE, nalD, spoT</i>	10 (10,9)
4	<i>oprD, pbuE, nalD, mlaA</i>	11 (12,0)
5	<i>oprD, pbuE, mexD</i>	9 (10)
6	<i>oprD</i>	6 (7)
7	<i>oprD, pbuE, spoT</i>	4 (4)
8	<i>oprD, pbuE, mexR</i>	3 (3)
9	<i>pbuE</i>	3 (3)
10	<i>oprD, nalD</i>	2 (2)
11	<i>oprD, pbuE, mexR, mraY</i>	2 (2)
12	<i>oprD, oprM</i>	2 (2)
13	<i>oprM</i>	1 (1)
14	<i>oprD, nalC, pbuE</i>	1 (1)
15	<i>oprD, pbuE, oprM</i>	1 (1)
16	<i>oprD, pbuE, spoT, mexD</i>	1 (1)
17	<i>oprD, pbuE, pbp3</i>	1 (1)
18	отсутствие мутаций	4 (4)

эксперимента и имел МИК = 2 мкг/мл меропенема. Штамм, являющийся прямым родоначальником клона *oprD*-L238P, не был изолирован в ходе эксперимента, гипотетически он появился на сроках до 120 ч от начала эксперимента. Эволюция главных клонов *oprD*-G307D и *oprD*-L238P была связана с уменьшением их чувствительности к меропенему (рис. 2) и накоплением мутаций в других генах, значимых для развития карбапенмрезистентности.

Начиная с 144 ч эксперимента среди штаммов клона *oprD*-G307D появились изоляты с мутацией в гене *nalD*, приводящей к замене G172D. К концу эксперимента 14 из 34 штаммов клона *oprD*-G307D являлись носителями этой мутации.

Клон *oprD*-L238P был связан с другими мутациями в гене *nalD*, приводящими к заменам T11N (24 из 39 изолятов клона) и H56P (4 из 39 изолятов клона). Делеция в гене *mlaA* (5 п.о. del (423–427 нуклеотиды)), приводящая к сдвигу рамки считывания, тоже присутствовала только у изолятов (11 из 39) из клона *oprD*-L238P. Во всех случаях делеция в гене *mlaA* сочеталась с наличием T11N-мутации в гене *nalD*.

Мутации в генах *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*, *nalC* были обнаружены у единичных изолятов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обсуждая фенотипические признаки адаптации *P. aeruginosa* к меропенему, следует акцентировать внимание на скорости формирования резистентности. Уже через шесть суток уровни резистентности отдельных изолятов, полученных на этом сроке, достигали МИК = 32 мкг/мл меропенема. Максимальные значения МИК меропенема составляли 64 мкг/мл и в 128 раз превышали значения МИК, которые регистрировали у изолятов, полученных в первые 48 ч эксперимента. Факт обнаружения изолятов с МИК = 32 мкг/мл в зоне с фактическим содержанием меропенема 56 мкг/мл можно объяснить различием между условиями определения МИК референсными способами (эпсилومترическим методом и методом диффузии в агаре) и условиями эксперимента (питательная среда, время культивирования).

Таблица 2. Фенотипы резистентности *P. aeruginosa* к меропенему и гены с мутациями, которые могут детерминировать устойчивость к карбапенемам

№	Ген	Время появления мутации (в часах от старта)	Число штаммов (% от группы) с мутациями в группах с различными МИК меропенема (мкг/мл)			Число штаммов с мутациями (% от всех штаммов, <i>n</i> = 92)
			≤ 8, <i>n</i> = 31	> 8 < 32, <i>n</i> = 16	≥ 32, <i>n</i> = 45	
1	<i>oprD</i>	72	23 (74,2)	16 (100)	45 (100)	84 (91,3)
2	<i>pbuE</i>	72	16 (51,6)	16 (100)	45 (100)	77 (83,7)
3	<i>nalD</i>	120	1 (3)	12 (75)	30 (66,7)	43 (46,7)
4	<i>spoT</i>	192	0 (0)	1 (6)	14 (31,1)	15 (16,3)
5	<i>mlaA</i>	144	0 (0)	1 (6)	10 (22,2)	11 (12,0)
6	<i>mexD</i>	120	3 (10)	3 (29)	4 (9)	10 (10,9)
7	<i>mexR</i>	144	0 (0)	2 (13)	3 (7)	5 (5)
8	<i>oprM</i>	72	4 (13)	0 (0)	0 (0)	4 (4)
9	<i>mraY</i>	168	0 (0)	0 (0)	2 (4)	2 (2)
10	<i>pbp3</i>	144	0 (0)	0 (0)	1 (2)	1 (1)
11	<i>nalC</i>	72	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Возникновение мутаций в генах было зарегистрировано одновременно с ростом МИК меропенема у отдельных штаммов на сроке 72 ч. На всем протяжении эксперимента было найдено 11 подвергшихся мутациям генов. Из них только для генов *oprD*, *nalC*, *nalD*, *mexD*, *mexR* и *pbp3* ранее были доказаны связи с карбапенемрезистентностью [18–21]. О роли генов *oprM*, *pbuE*, *spoT*, *mraY*, *miaA* в формировании антибиотикорезистентности ранее не сообщалось, что не исключает их косвенного влияния на процесс адаптации к карбапенемам.

Рассматривая мутационную картину в целом, следует обратить внимание на феномен клонирования. На сроках 72–96 ч возникли две главные клональные линии. Все представители одной из них несли мутацию в гене *oprD*, приводящую к замене G307D. У всех представителей другой линии мутация в *oprD* приводила к замене L238P. Внутри сформировавшихся клонов возникали и частично закреплялись новые мутации, которые вели к росту фенотипического уровня устойчивости к меропенему. Наряду с этими линиями возникали единичные клоны с другими мутациями *oprD*, которые не демонстрировали прогрессивного распространения, хотя у некоторых из них МИК меропенема был выше, чем у окружающих представителей *oprD*-G307D и *oprD*-L238P клонов (рис. 2). Вероятно, мутации у неуспешных, но высокорезистентных клонов были фактором, негативно влияющим на итоги внутривидовой конкуренции. Следует отметить, что повреждение *oprD* у меропенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa* наблюдается не только в эксперименте. Так, пять из шести высокорезистентных (МИК > 32 мкг/мл) к меропенему штаммов *P. aeruginosa*, обнаруженных при муковисцидозе и не продуцирующих карбапенемазы, несли мутации в генах *oprD* [4]. Вместе с тем, поломки одного гена *oprD* недостаточно для формирования резистентности к

меропенему. Даже штамм с нонсенс-мутацией (стоп-кодон W138stop) в гене *oprD* сохранял высокую чувствительность к меропенему. Для формирования устойчивости необходима аккумуляция хромосомных мутаций во многих хромосомных генах, прямо или косвенно влияющих на чувствительность к антибиотикам.

Мы не исключаем того, что некоторые изоляты с уникальным генотипом не были отобраны в ходе эксперимента и информация о них была утрачена. Примером этого служит неясность в отношении родоначальника клона *oprD*-L238P, являющегося промежуточным звеном между высокочувствительными и высокорезистентными штаммами. Однако в отличие от эволюции в жидкой среде пространственно-временное моделирование резистентности позволяет изолировать большее число клонов и избежать потери информации о возможных мутациях, приводящих к резистентности.

ВЫВОДЫ

Формирование высоких уровней резистентности к меропенему у *P. aeruginosa* в эксперименте происходит в короткие сроки (6 суток). Эволюция резистентности сопряжена с процессом клонирования, при котором происходит возникновение множества клонов с различными генотипами. Основой клонирования является мутагенез, в который вовлечены 11 генов, включая *oprD*, *pbuE*, *nalD*, *nalC*, *spoT*, *miaA*, *mexD*, *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*. Часть образовавшихся клонов, независимо от уровня их резистентности к меропенему, не получают прогрессивного развития и вытесняются более успешными клонами. Использованная в эксперименте модель является удобным инструментом для получения набора вариантов с разными генотипами резистентности.

Литература

1. Лазарева А. В., Чеботарь И. В., Крыжановская О. А., Чеботарь В. И., Маянский Н. А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клин Микробиол Антимикроб Химиотер.* 2015; 17 (3): 170–86.
2. WHO priority list for research and development of new antibiotics for antibiotic-resistant bacteria. Geneva: World Health Organization, 2017. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed September 1, 2012).
3. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates.* 2015; 21: 41–59. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>.
4. López-Causapé C, Sommer LM, Cabot G, Rubio R, Ocampo-Sosa AA, Johansen H et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international cystic fibrosis clone. *Sci Rep.* 2017; 7: 5555. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05621-5>.
5. Barbosa C, Trebosc V, Kemmer C, Rosenstiel P, Beardmore R, Schulenburg H, et al. Alternative evolutionary paths to bacterial antibiotic resistance cause distinct collateral effects. *Mol Biol Evol.* 2017; 34 (9): 2229–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx158>.
6. 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>.
7. Savinova TA, Bocharova YA, Chaplin AV, Korostin DO, Shamina OV, Mayanskiy NA, et al. Meropenem-induced reduction in colistin susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853. *Bulletin of RSMU.* 2022; 1: 30–4. Available from: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2022.001>.
8. 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>.
9. Казанова А. М., Степанова Е. С., Макаренкова Л. М., Чистяков В. В., Зырянов С. К., Сенченко С. П.. Разработка и валидация методики количественного определения меропенема в плазме крови для терапевтического лекарственного мониторинга. *Химико-фармацевтический журнал.* 2020; 54 (4): 56–60. Available from: <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2020-54-4-56-60>.
10. 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>.
11. 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>.
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. 2015. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. GitHub. Available at: <https://github.com/tseemann/snippy> (accessed November 2022).
 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. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46 (W1): W537–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>.
 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. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 2012; 302 (2): 63–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>.
 19. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22 (4): 582–610. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
 20. 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 *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42 (1): 65–71. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.65>.
 21. Glen KA, Lamont IL. β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens*. 2021; 10 (12): 1638. Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens10121638>.

References

1. Lazareva AV, Chebotar IV, Kryzhanovskaya OA, Chebotar VI, Mayanskiy NA. *Pseudomonas aeruginosa*: patogennost', patogenez i patologiya. *Klin Mikrobiol Antimikrob Ximioter*. 2015; 17 (3): 170–86. Russian.
2. WHO priority list for research and development of new antibiotics for antibiotic-resistant bacteria. Geneva: World Health Organization, 2017. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed September 1, 2012).
3. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*. 2015; 21: 41–59. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>.
4. López-Causapé C, Sommer LM, Cabot G, Rubio R, Ocampo-Sosa AA, Johansen H et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international cystic fibrosis clone. *Sci Rep*. 2017; 7: 5555. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05621-5>.
5. Barbosa C, Trebosc V, Kemmer C, Rosenstiel P, Beardmore R, Schulerburg H, et al. Alternative evolutionary paths to bacterial antibiotic resistance cause distinct collateral effects. *Mol Biol Evol*. 2017; 34 (9): 2229–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx158>.
6. 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>.
7. Savinova TA, Bocharova YA, Chaplin AV, Korostin DO, Shamina OV, Mayanskiy NA, et al. Meropenem-induced reduction in colistin susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853. *Bulletin of RSMU*. 2022; 1: 30–4. Available from: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2022.001>.
8. 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>.
9. Kazanova AM, Stepanova ES, Makarenkova LM, Chistyakov VV, Zyryanov SK, Senchenko SP. Razrabotka i validaciya metodiki kolichestvennogo opredeleniya meropenema v plazme krovi dlya terapevticheskogo lekarstvennogo monitoringa. *Ximikofarmaceuticheskij zhurnal*. 2020; 54 (4): 56–60. Available from: <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2020-54-4-56-60>. Russian.
10. 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>.
11. 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>.
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. 2015. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. GitHub. Available at: <https://github.com/tseemann/snippy> (accessed November 2022).
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. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46 (W1): W537–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>.
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. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 2012; 302 (2): 63–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>.
19. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22 (4): 582–610. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
20. 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 *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42 (1): 65–71. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.65>.
21. Glen KA, Lamont IL. β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens*. 2021; 10 (12): 1638. Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens10121638>.