

Федеральное государственное автономное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Бочарова Юлия Александровна

Молекулярно-генетические механизмы устойчивости
Pseudomonas aeruginosa к антибиотикам группы карбапенемов

03.02.03 - Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Чеботарь И.В.

Москва - 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	17
Глава 1. Обзор литературы. Механизмы резистентности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> к антибиотикам и их регуляция.....	17
1.1. Природная резистентность.....	18
1.2. Приобретенная резистентность.....	20
1.3. Как приобретается и регулируется резистентность.....	46
1.4. Оценка антибиотикорезистентности	50
Глава 2. Материалы и методы исследования	57
2.1 Штаммы микроорганизмов.....	57
2.2 Бактериологические методы.....	58
2.3 Молекулярно-генетические методы.....	61
2.4 Статистические методы.....	64
Глава 3. Роль бета-лактамаз в формировании нечувствительности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> к антибиотикам группы карбапенемов.....	65
3.1. Введение к главе.....	65
3.2. Материалы и методы, использованные для оценки роли бета-лактамаз в формировании нечувствительности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> к карбапенемам.....	66
3.3. Результаты и обсуждение.....	70
Глава 4. Роль порина OprD в формировании нечувствительности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> к антибиотикам группы карбапенемов.....	85
4.1. Введение к главе.....	85

4.2. Материалы и методы, использованные для оценки роли порина OprD в формировании нечувствительности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> к карбапенемам.....	85
4.3. Результаты и обсуждение.....	89
Глава 5. Роль эффлюкс-систем в формировании нечувствительности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> к антибиотикам группы карбапенемов.....	105
5.1. Введение к главе.....	105
5.2. Материалы и методы, использованные для оценки роли эффлюкс-системы в формировании нечувствительности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> к карбапенемам.....	105
5.3. Результаты и обсуждение.....	108
Глава 6. Комплексная оценка механизмов резистентности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> к карбапенемам.....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	126
ВЫВОДЫ.....	138
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	140
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	141
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного исследования

Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* является одним из самых актуальных оппортунистических патогенов, что позволило включить ее в группу «ESKAPE»¹, объединяющую шесть самых опасных условно-патогенных бактерий для населения развитых стран [43]. Частота ее обнаружения в крови при сепсисе составляет примерно 20%, в мокроте при муковисцидозе и нозокомиальных пневмониях – 45-70%, в экссудатах при интраабдоминальных инфекциях – 28%, в моче при госпитальных уроинфекциях – 10% случаев [7, 48, 70, 72, 101, 150, 193]. В общей этиологической структуре госпитальных инфекций доля *P. aeruginosa* варьирует в диапазоне от 20 до 30% [21, 238]. Опасность синегнойной палочки обусловлена не только широким спектром патогенетических факторов и генетической пластичностью, самым негативным свойством *P. aeruginosa* является способность быстро приобретать резистентность к разным группам антибиотиков [8].

Распространение резистентных штаммов синегнойной палочки достигло глобальных масштабов. Нозокомиальные штаммы *P. aeruginosa*, изолированные в России в 2013-2014 гг., в 52-60% случаев были нечувствительны к антисинегнойным цефалоспорином (цефепим, цефтазидим), в 58% случаев – к пиперациллину-тазобактаму, более чем в 60% случаев, – к фторхинолонам, более чем в 50% случаев, – к аминогликозидам, в 41% случаев – к азтреонаму [21]. Фенотипом множественной резистентности (устойчивости к антибиотикам, принадлежащим как минимум к трем различным категориям) обладали 83% изолятов, фенотип экстремальной резистентности (устойчивости к препаратам всех, за исключением одной или двух категорий антибиотиков) присутствовал у 51% изолятов, обнаружен штамм с фенотипом

¹ Термин «ESKAPE» объединяет группу бактерий и является аббревиатурой от первых букв родовых наименований бактерий, входящих в эту группу: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды рода *Enterobacter*.

панрезистентности [21]. По данным Центров контроля и профилактики заболеваний США (CDC), на территории США регистрируется более 50000 случаев тяжелой синегнойной инфекции в год, 13% из которых связаны с мультирезистентными формами *P. aeruginosa* [57]. Экономический ущерб от патологии, вызванной мультирезистентными формами *P. aeruginosa*, составляет в США более 116 миллионов долларов в год. В зависимости от локальных условий госпитальная резистентность *P. aeruginosa* к отдельным группам антибиотиков может достигать почти 100%. Например, в 2015 году в одном из иранских госпиталей (Исфахан) 95% изолятов от ожоговых больных были резистентны к амикацину, 96% из них проявляли мультирезистентность [202]. В связи с высокой распространенностью штаммов, резистентных к фторхинолонам, антисинегнойным пенициллинам и цефалоспорином, карбапенемы нередко остаются единственным доступным средством для лечения синегнойных инфекций. В ответ на применение карбапенемов синегнойная палочка реагирует формированием резистентности к наиболее часто применяющимся представителям этого класса антибиотиков – имипенему и меропенему. Данные мониторинга говорят о том, что распространенность карбапенемрезистентных штаммов *P. aeruginosa* растет [21]. Опасность устойчивых к карбапенемам форм синегнойной палочки подтверждается статистически: в условиях современного госпиталя погибает треть всех пациентов с инвазивной инфекцией, если процесс вызван карбапенемрезистентными штаммами *P. aeruginosa* [63].

Перечисленные факты доказывают важность изучения инфекционной патологии, связанной с карбапенемрезистентными штаммами *P. aeruginosa*, для современного здравоохранения. Решение этой проблемы, включающее в себя мониторинг резистентности, рационализацию терапии, проведение противоэпидемических мероприятий, может быть достигнуто только на основе современных диагностических технологий, направленных на идентификацию возбудителя и развернутую оценку его устойчивости к антибиотикам, включая

карбапенемы. Расшифровка молекулярно-генетических механизмов устойчивости *P. aeruginosa* к карбапенемам, основанная на внедрении в диагностические процедуры новых бактериологических, генетических и масс-спектрометрических технологий, является актуальным направлением современной медицинской науки.

Степень разработанности темы диссертационного исследования

Говоря о «медицинской» истории синегнойной палочки, нужно отметить, что еще в 1912 году Л.А. Тарасевич пророчески предупреждал о возможности «завоевания синегнойной палочкой хирургических отделений» [17]. Хотя случаи синегнойной инфекции были описаны еще в конце 19 в., ее клиническое значение долгое время не принималось всерьез. Только во второй половине 60-х годов 20-го века началось активное изучение синегнойной палочки как опасного оппортунистического патогена [1]. Примерно в это же время бактериологи обратили внимание на необычно высокую степень природной устойчивости *P. aeruginosa* к антибиотикам [240]. Приобретенная антибиотикорезистентность синегнойной палочки эволюционировала параллельно с внедрением в широкое использование новых классов антибиотиков. В частности, появление первых клинических изолятов, устойчивых к карбапенемам, было зарегистрировано в начале 80-х годов двадцатого столетия [190].

В настоящее время проблема инфекций, связанных с *P. aeruginosa*, является предметом изучения многих исследовательских коллективов: согласно базе данных PubMed, по этой теме в мире ежегодно публикуется более 3000 научных работ [164]. Не имея возможности перечислить все научные группы, работающие с синегнойной палочкой, следует упомянуть самые известные из них. В Институте молекулярной бактериологии (Ганновер, Германия, руководитель исследований – доктор А. Lorenz) разрабатываются модели для

оценки межмолекулярных взаимодействий между *P. aeruginosa* и клетками макроорганизма при развитии инфекционного процесса, в том числе, в условиях воздействия антибактериальных препаратов [139, 186]. Коллектив Клинического госпиталя Барселоны (руководитель исследований – доктор J.A. Martinez) сосредоточил свои изыскания на поиске новых ингибиторов бета-лактамаз синегнойной палочки [145, 247]. В Центре молекулярной микробиологии и инфекций (Императорский медицинский колледж, Лондон, Великобритания, руководитель исследований – доктор A. Filloux) изучается биопленочная резистентность *P. aeruginosa* [233]. В клинике Университета Цинциннати (штат Огайо, США, руководитель исследований – доктор J.P. Clancy) исследуется роль трансмембранного транспорта антибиотиков в формировании антибиотикорезистентности [152]. Темы научных трудов, публикуемых перечисленными коллективами, концентрируются на исследовании генетических детерминант резистентности, их регуляции и передаче. Синегнойная палочка является постоянным объектом международных программ по мониторингованию нозокомиальных патогенов и их резистентности.

В России несколько научных коллективов активно занимаются проблемой синегнойной инфекции и резистентности *P. aeruginosa*. Перманентное исследование распространения резистентных штаммов бактерий, включая *P. aeruginosa*, осуществляется в рамках программы МАРАФОН, координирующей сообществом «Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, научная школа проф. Р.С. Козлова) [15, 21]. Молекулярно-генетические особенности патогенности и резистентности грамотрицательных бактерий-продуцентов бета-лактамаз интенсивно изучаются в НИИДИ ФМБА России (Санкт-Петербург, научная школа проф. С.В. Сидоренко) [9, 10]. Роль синегнойной палочки и ее резистентных форм в развитии отдельных видов патологии (нозокомиальные инфекции,

муковисцидоз, ожоговая болезнь) являются предметом интереса исследовательских групп ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (под руководством академика А.Л. Гинцбурга), ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (руководитель – академик РАН В.Г. Акимкин), ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (руководитель – академик В.В. Зверев), НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (руководитель – профессор РАН С.С. Петриков), ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» (лаборатория под руководством д.м.н. Д.А. Попова) и других научных коллективов [6, 12, 13, 20].

Приведенная информация свидетельствует о большом интересе научно-медицинского сообщества к проблеме резистентности *P. aeruginosa*. Большинство отечественных работ, посвященных роли синегнойной палочки в патологии человека, сконцентрировано на эпидемиологических вопросах, они описывают лишь общий профиль антибиотикорезистентности клинических изолятов. Если методы определения общей чувствительности к карбапенемам у синегнойной палочки отработаны до совершенства, то оценка конкретных механизмов резистентности к этой группе представляет большую практическую проблему для клинической микробиологии. Это, прежде всего, касается фенотипических методов определения бета-лактамаз, гидролизующих карбапенемы. Многочисленные литературные источники, включая «Экспертные правила оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», указывают, что существующая «оценка уровней устойчивости к бета-лактамам у штаммов, продуцирующих ESBL или карбапенемазы, способные расщеплять данные антибиотики, может быть недостаточно точной и воспроизводимой, особенно в рутинной практике» [79]. Вопросы, связанные с молекулярно-генетическими основами нарушений транспорта карбапенемов внутрь бактериальной клетки через мембранные поры и активацией их эффлюкс-откачки, также являются малоизученными направлениями современной медицинской микробиологии.

Цель исследования

Цель исследования – охарактеризовать молекулярно-генетические механизмы устойчивости клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам группы карбапенемов.

Задачи исследования

1. Определить цефалоспориновую и карбапенемазную активность клинических изолятов *P. aeruginosa* и оценить вклад цефалоспоринов и карбапенемаза в формирование устойчивости к карбапенемам.

2. Изучить структурные особенности гена *oprD*, а также оценить экспрессию *oprD*-генов у карбапенемнечувствительных изолятов *P. aeruginosa* и проанализировать роль порина OprD в формировании нечувствительности к карбапенемам.

3. Охарактеризовать активность RND-эффлюкс-систем у карбапенемнечувствительных изолятов *P. aeruginosa* и оценить их роль в формировании устойчивости к карбапенемам.

4. Провести анализ сочетаний механизмов резистентности у карбапенемнечувствительных изолятов *P. aeruginosa* и выявить зависимость между уровнем минимальной подавляющей концентрации карбапенема и наличием механизмов устойчивости к нему.

5. Обосновать возможности использования масс-спектрометрии для оценки карбапенемазной активности клинических изолятов *P. aeruginosa*.

Научная новизна

В составе гена *oprD* карбапенемнечувствительных изолятов *P. aeruginosa* обнаружены вставочные элементы (IS), которые ранее не встречались у

представителей вида *P. aeruginosa*. Два типа обнаруженных у *P. aeruginosa* IS-элементов (ISP_{smel} и ISP_{st2}) были описаны ранее у других видов рода *Pseudomonas*, а один тип, ISP_{a195}, был ранее неизвестен. Впервые в России проанализирована роль нарушений структуры порина OprD и экспрессии гена *oprD* в формировании устойчивости к карбапенемам у клинических изолятов *P. aeruginosa*.

Введены понятия, по-новому характеризующие значимость цефалоспоринов в развитии устойчивости синегнойной палочки к карбапенемам. Доказано наличие закономерностей, определяющих высокие уровни минимальных подавляющих концентраций (МПК) карбапенемов у карбапенемрезистентных штаммов. Доказана возможность использования матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ-ВП МС) для достоверного выявления изолятов *P. aeruginosa*, продуцирующих карбапенемазы. Впервые в России проанализирована карбапенемазная активность клинических изолятов *P. aeruginosa* при помощи МАЛДИ-ВП МС.

Впервые в России у клинических изолятов *P. aeruginosa* была проанализирована активность эффлюкс-зависимого выведения карбапенемов из клетки, и сделаны выводы о роли эффлюкс-систем в формировании карбапенемрезистентности.

Вскрыта значимость влияния разных механизмов устойчивости на уровень МПК карбапенемов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования вносят существенный вклад в изучение механизмов устойчивости к карбапенемам у *P. aeruginosa* и позволяют получить представление о существовании отдельных и сочетанных механизмов устойчивости у клинических изолятов *P. aeruginosa*. В работе научно

обоснована и подтверждена концепция о том, что потеря чувствительности к карбапенемам у синегнойной палочки в большинстве случаев является результатом комплексных структурных и/или функциональных изменений молекулярно-генетического профиля бактериальной клетки. Выявлены закономерности, определяющие зависимость интенсивного гидролиза меропенема от карбапенемаз группы VIM. Изучены связи между продукцией металло-бета-лактамаз и максимальным повышением МПК карбапенемов у изолятов *P. aeruginosa*. Получено представление о многообразии мутаций гена *oprD*, влияющих на возникновение устойчивости к карбапенемам. Расширены представления о роли вставочных элементов, повреждающих *oprD*-ген синегнойной палочки, в развитии устойчивости к карбапенемам. Теоретически обоснован выбор методов оценки роли того или иного механизма в формировании устойчивости к карбапенемам при исследовании клинических изолятов *P. aeruginosa*.

Показано, что использованные для решения задач диссертационной работы методические подходы являются перспективными для оценки механизмов резистентности в работе научно-исследовательских и клинических микробиологических лабораторий. Успешно адаптирован для изучения синегнойной палочки и апробирован на клинических изолятах *P. aeruginosa* масс-спектрометрический метод оценки активности карбапенемаз. Установлено, что данные о наличии карбапенемаз, получаемые с помощью МАЛДИ-ВП МС, соответствуют данным, получаемым традиционными методами (генетическим и фенотипическим). Предложен протокол определения активности цефалоспоринов у *P. aeruginosa* с помощью нитроцефина для выявления штаммов с гиперпродукцией цефалоспоринов.

Обнаруженный в ходе исследования новый вставочный элемент ISPa195 был зарегистрирован в базах данных GenBank и IS-finder под номером MF770250, благодаря чему его нуклеотидная последовательность стала референсным эталоном для поиска аналогичных вставочных элементов.

Определены уровни МПК карбапенемов, обнаружение которых при тестировании изолята *P. aeruginosa* может свидетельствовать о наличии у него конкретных механизмов устойчивости к карбапенемам.

Методология и методы исследования

Методология организована в соответствии с целью диссертационного исследования. Объектами исследования являлись штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, резистентные к карбапенемам. Минимальные подавляющие концентрации карбапенемов определяли при помощи метода серийных разведений. Наличие металло-бета-лактамаз выявляли при помощи МБЛ-Е-теста (BioMerieux, Франция), наличие генов карбапенемаз и экспрессию гена *oprD* определяли при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени. Продукцию цефалоспоринов оценивали при помощи спектрофотометрии, карбапенемазную активность – при помощи масс-спектрометрии. Мутации в гене *oprD* определяли при помощи секвенирования по методу Сэнгера. Активность эффлюкс-систем оценивали при помощи ингибитора эффлюксных систем - карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразона. Статистическую обработку данных проводили при помощи программы SPSS 20.0 (SPSS Statistics).

Положения, выносимые на защиту

1. Гиперпродукция цефалоспоринов, сочетающаяся с другими механизмами резистентности, и продукция карбапенемаз приводят к формированию высоких уровней устойчивости к карбапенемам у клинических изолятов *P. aeruginosa*. Матрично-активированная лазерная десорбционно-ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия является достоверным

методом ускоренного выявления изолятов *P. aeruginosa*, продуцирующих карбапенемазы.

2. Генетически детерминированная инактивация порина OprD, являясь распространенным механизмом нечувствительности *P. aeruginosa* к карбапенемам, обусловлена разнообразными структурными и функциональными нарушениями *oprD*-гена. У изолятов *P. aeruginosa* с инактивацией OprD регистрируется более низкий уровень резистентности к карбапенемам, чем у штаммов, продуцирующих металло-бета-лактамазы группы VIM или гиперпродуцирующих цефалоспорины.

3. Гиперактивность RND-эффлюкс-систем является распространенным свойством карбапенемнечувствительных штаммов *P. aeruginosa* и участвует в формировании нечувствительности к карбапенемам в сочетании с другими механизмами устойчивости, включая продукцию металло-бета-лактамаз, гиперпродукцию цефалоспоринов, нарушения пориновой проницаемости.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в проведении микробиологической части исследования (культуральный посев, идентификация и реидентификация бактерий, определение минимальных подавляющих концентраций меропенема и имипенема), оценке цефалоспориновой и карбапенемазной активности изолятов, определении активности эффлюкс-систем, проведении секвенирования и оценке экспрессии гена *oprD* у *P. aeruginosa* в лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Выбор материала для исследования проводился совместно с зав. лабораторией микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» к.м.н. Лазаревой А.В. Определение наличия металло-бета-лактамаз проводилось совместно с м.н.с. Пономаренко О.А., выявление генов карбапенемаз проводилось совместно с

к.м.н. Крыжановской О.А. (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России). Секвенирование генов *oprD* проводилось совместно с к.б.н. Савиновой Т.А. (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России). Биоинформатическая обработка экспериментальных результатов (масс-спектрометрии, генетических исследований) проводилась совместно с Маянским Н.А. (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России), Карасевой О.В. («НИИ НДХиТ» ДЗМ), Тепаевым Р.Ф. (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России) и Гореликом А.Л. («НИИ НДХиТ» ДЗМ).

Внедрение результатов в практику

Результаты исследований в качестве диагностических технологий внедрены в практическую работу подразделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, «НИИ неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы, ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова» Департамента здравоохранения города Москвы, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности результатов работы свидетельствует использование современных адекватных методов исследования, которые характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью, а также поддерживаются программным обеспечением, позволяющим проводить статистический анализ больших массивов данных.

В работе использовались микробиологические, молекулярно-генетические, спектрофотометрические и масс-спектрометрические методы. Все виды оборудования, на котором проводились исследования, проходили

регулярную метрологическую поверку. Объем проведенных исследований позволил осуществить корректную статистическую обработку полученных данных.

Диссертация апробирована на заседании лабораторного отдела Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №5 от 22.12.2017 г.).

Материалы диссертации были представлены на 27-ом Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ЕССМID - Вена, 2017), на Научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Кашкинские чтения - Санкт-Петербург, 2016), на Заседании секции медицинской и фармацевтической микробиологии Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2017).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.03 – «микробиология», области исследований «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов».

Публикации

Результаты проведенного диссертационного исследования в полном объеме изложены в 7 научных работах, из которых: 5 работ (три оригинальных статьи и два обзора литературы) опубликованы в журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК, 5 работ (три оригинальных статьи и два обзора литературы) - в журналах, реферируемых РИНЦ, 4 работы (три оригинальных статьи и обзор литературы) - в журналах, реферируемых базой

данных Scopus, 1 оригинальная статья - в журнале, реферируемом базой данных Web of Science.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста и состоит из введения, основной части (обзора литературы, описания материалов и методов исследования и 4 глав, отражающих результаты собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 22 рисунками. Библиографический указатель включает 257 источников литературы, в том числе 21 ссылка на отечественных авторов и 236 ссылок на зарубежных авторов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. Обзор литературы. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция

Опасность *P. aeruginosa* базируется на «трех китах»: способности вызывать прямые повреждения тканей человека, удивительной генетической пластичности и прогрессирующей резистентности к антимикробным препаратам. Прямое повреждение *P. aeruginosa* осуществляет при помощи богатого патогенетического арсенала, включающего адгезины, ферменты, токсины, факторы ускользания от иммунных эффекторов и агрессии в адрес последних [8]. Генетическая пластичность реализуется за счет дополнения соге-нома объемным количеством добавочного генетического материала и наличия необычно большого для бактерий количества регуляторных генов – до 8,4% от общего объема хромосомы [217]. Следствием генетической пластичности является быстрая утрата либо приобретение признаков, что позволяет бактериям адаптироваться к внешним воздействиям за короткий срок. Распространение резистентных к антибиотикам штаммов синегнойной палочки достигло глобальных масштабов.

Все антибиотики, в зависимости от отношения к ним синегнойной палочки, можно разделить на три группы. Первую группу составляют субстанции, к которым нечувствительны практически все штаммы вида *P. aeruginosa*. Видовой характер устойчивости дал основание назвать этот феномен «природная резистентность». Другая группа антибиотиков может быть губительной для *P. aeruginosa*, но подавление метаболизма реализуется не для всех штаммов, а лишь для тех, которые не обладают приобретенными механизмами устойчивости к какому-либо антибиотику. Для этой группы антибиотиков определены критерии, которые дают возможность оценить чувствительность к ним конкретного штамма-возбудителя и на основе

полученной оценки назначать эффективное лечение. К третьей группе можно отнести антибиотики, которые теоретически могут подавлять жизнедеятельность *P. aeruginosa*, но существующие методики не позволяют определить лабораторные критерии чувствительности для конкретного изолята. Терапевтическое использование препаратов третьей группы не является рациональным, успех эрадикации возбудителя в этом случае определяется случайностью. Понятно, что вопрос выбора оптимальной терапии возникает только для препаратов второй группы. Сложность проблемы резистентности состоит в том, что *P. aeruginosa* может использовать разнообразные приемы для нейтрализации антибиотиков, часто сочетая их. В этом случае выбор и назначение пациенту эффективного антибактериального курса будут возможны только на основе полного понимания механизмов резистентности конкретного штамма.

Настоящий обзор написан для того, чтобы показать, что знание механизмов устойчивости к антибиотикам на молекулярном уровне помогает оптимизировать терапию инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

1.1. Природная резистентность

Синегнойная палочка обладает природной (видовой) устойчивостью к ряду антибиотиков, включая ампициллин/амоксициллин, ампициллин-сульбактам, амоксициллин-клавуланат, цефалоспорины² I и II поколения, цефазолин, цефотаксим, цефтриаксон, цефамицины (цефокситин, цефотетан), клиндамицин, даптомицин, гликопептиды (ванкомицин, тейкоплакин), фузидиевую кислоту, линезолид, макролиды, рифампицин, хинупристин-дальфопристин, эртапенем, хлорамфеникол (левомицетин), канамицин, неомицин, триметоприм, триметоприм-сульфаметоксазол, тетрациклины [79].

² *P. aeruginosa* не обладает природной резистентностью к «антисинегнойным» цефалоспорином – цефепиму, цефтазидиму.

Справедливо уточнить, что природная резистентность *P. aeruginosa* не является абсолютной. Даже в дикой популяции бактерий присутствует от 1 до 3% штаммов, которые из-за наличия мутаций и/или снижения экспрессии (down-регуляции) инактивирующих антибиотики систем могут проявлять высокую чувствительность к перечисленным препаратам [79]. Основы природной резистентности *P. aeruginosa* связаны с (1) отсутствием мишеней для некоторых групп антибиотиков, (2) наличием естественно-продуцируемых бета-лактамаз и других ферментов, инактивирующих антибиотики, (3) особенностями пориновой проницаемости, (4) активностью эффлюкс-помп. Проявления природной резистентности чаще базируются на комплексных механизмах. Самый яркий пример этого – устойчивость к пенициллинам и цефалоспорином, которые характеризуются слабой проницаемостью внутрь клетки, гидролизуются присущими для *P. aeruginosa* «природными» ферментами (бета-лактамаза PoxB, бета-лактамаза расширенного спектра (цефалоспориноаза) AmpC) [64, 99, 124], и ускоренно выводятся из клетки за счет эффлюкс-помп. В случае с эртапенемом наблюдается аналогичная картина. Канамицин и неомицин инактивируются с помощью специфического фермента аминогликозид-3'-фосфотрансферазы и активно откачиваются из клетки за счет эффлюкс-механизмов [114]. В отношении некоторых антибиотиков может использоваться преимущественно один механизм. Например, из-за больших размеров молекулы ванкомицина не способны проникать через наружную мембрану грам-негативных бактерий и создавать опасные для бактерии концентрации в периплазматическом пространстве [31]. Для даптомицина у синегнойной палочки, как и других грамотрицательных бактерий, нет специфичной мишени [195]. С практической точки зрения, знание особенностей природной резистентности *P. aeruginosa* определяет перечень антибиотиков, которые должны быть исключены из списка препаратов для лечения синегнойной инфекции.

1.2. Приобретенная резистентность

Перечень антисинегнойных антибиотиков, чувствительность к которым можно оценить при помощи лабораторных методов, не очень велик. По мнению экспертов EUCAST, он включает несколько пенициллинов (пиперациллин, пиперациллин-тазобактам, тикарциллин, тикарциллин-клавуланат), четыре препарата из группы цефалоспоринов (цефепим, цефтазидим и цефтазидим-авибактам, цефтолозан-тазобактам), карбапенемы (имипенем, меропенем и дорипенем), монобактамы (азтреонам), фторхинолоны (левофлоксацин, ципрофлоксацин), аминогликозиды (гентамицин, амикацин, нетилмицин, тобрамицин) и полимиксины (колистин) [80]. Американские специалисты дополняют этот список отдельными критериями для нескольких фторхинолонов (норфлоксацина, ломефлоксацина, офлоксацина, гатифлоксацина) и полимиксина В [226]. В условиях клинических воздействий синегнойная палочка может формировать резистентность к каждому из перечисленных антибиотиков.

Приобретенная резистентность к бета-лактамам у *P. aeruginosa* связана с (1) выработкой неконститутивных бета-лактамаз, (2) снижением проницаемости через мембранные порыны и (3) эффлюкс-зависимым удалением антибиотика из периплазматического пространства. У подавляющего большинства госпитальных изолятов – в 40-43% случаев - эти механизмы сочетаются друг с другом [241].

Среди бета-лактамаз *P. aeruginosa* встречаются представители с различными молекулярными характеристиками, сгруппированные R. Ambler (1980) в четыре класса – А, В, С и D. [29]. Бета-лактамазы, принадлежащие к молекулярному классу А и содержащие в своем активном центре серин, гидролизуют пенициллины, и с разной активностью могут разрушать цефалоспорины и карбапенемы. Важнейшими бета-лактамазами класса А синегнойной палочки являются КРС (от англ. «*K*lebsiella *p*neumoniae

carbapenemase» – карбапенемаза *Klebsiella pneumoniae*), IMI (от англ. «*imipenemase*» - имипенемаза), SME (от англ. «*Serratia marcescens enzyme*» - энзим *Serratia marcescens*), SFC (от англ. «*Serratia fonticola carbapenemase*» - карбапенемаза *Serratia fonticola*). Ферменты молекулярного класса В - NDM (от словосочетания *New Delhi metallo-beta-lactamase*, в котором отражено название столицы Индии, где впервые был обнаружен этот энзим), VIM (от словосочетания *Verona integron-encoded MBLs*, в котором отражено название города, где впервые был обнаружен этот фермент), IMP (от англ. «*imipenemase*» - имипенемаза) - являются цинк-зависимыми бета-лактамазами, то есть металло-бета-лактамазами (МБЛ). Они гидролизуют все бета-лактамы, исключая монобактамы. Бета-лактамазы *P. aeruginosa*, принадлежащие к классу D (ОХА-тип сериновых бета-лактамаз), разрушают пенициллины, слабо гидролизуют карбапенемы и не гидролизуют некоторые цефалоспорины [183]. Сериновые бета-лактамазы молекулярного класса С - AmpC (от англ. «*ampicillinase C*» - ампициллиназа молекулярного класса С), CMY (от англ. «*cephamycinase*» - цефамициназа), FOX (от англ. «*cefloxitinase*» - цефокситиназа) - гидролизуют пенициллины, цефалоспорины (за исключением цефепима, цефтазидима, цефтазидима-авибактама, цефтолозана-тазобактама) и обладают слабой гидролитической активностью в отношении карбапенемов [108]. Значимость представителей этого класса в развитии карбапенемрезистентности до настоящего времени вызывает вопросы.

Адаптивные или приобретенные бета-лактамазы *P. aeruginosa* представляют собой неоднородную группу ферментов, гены которых локализируются в хромосоме или плазмидах и часто входят в состав интегронов либо мобильных генетических элементов (МГЭ). Присутствие бета-лактамаз у грамотрицательных бактерий регистрируется в цитоплазме и периплазматическом пространстве, значительное их количество ассоциировано с наружной мембраной [87, 110]. Они попадают во внеклеточную среду, что происходит, вероятно, в результате лизиса бактериальных клеток. Гены

природных и приобретенных бета-лактамаз у грамотрицательных бактерий (в отличие от грамположительных) экспрессируются постоянно [86]. Но существуют и исключения из этого правила. Таким исключением является бета-лактамаза AmpC. Её уровень выработки подвержен гибкой регуляции, что приобретает клиническое значение (см. ниже). Важно, что бета-лактамазы, обнаруженные у *P. aeruginosa*, встречаются у представителей других видов грамотрицательных бактерий, что подтверждает широкую практику горизонтального переноса генов в мире бактерий (см. ниже).

Неоднородность бета-лактамаз проявляется в их генетических основах и химической структуре, а, следовательно, - в особенностях их субстратной специфичности и разной гидролитической активности в отношении бета-лактамов. Из-за этого бета-лактамазы *P. aeruginosa* классифицируются не только согласно критериям Ambler [29], но и подразделяются на функциональные группы в соответствии с субстратной специфичностью. Примеры бета-лактамаз *P. aeruginosa* с разными функциональными свойствами представлены в таб. 1.

Интересно, что приобретенная резистентность к антисинегнойным бета-лактамам у *P. aeruginosa* может реализоваться с участием природной бета-лактамазы AmpC. Являясь природной для *P. aeruginosa* бета-лактамазой расширенного спектра, в условиях гиперпродукции в сочетании с активацией эффлюкса и угнетением поринов, AmpC способна придавать бактериям резистентность к антисинегнойным цефалоспорином и карбапенемам. Гиперпродукция AmpC индуцируется через два механизма [134, 188]. Первый связан с воздействием на клетку бета-лактамов (показано на примере цефокситина и имипенема), которые резко увеличивают концентрацию 1,6-ангидромуропептидов в периплазме, а, следовательно, и в цитоплазме. 1,6-ангидромуропептиды взаимодействуют с транскрипционным регулятором AmpR, конвертируя его в активатор гена *ampC*. Экспрессия *ampC* резко повышается, и начинается гиперсинтез AmpC.

Приобретенные (адаптивные) бета-лактамазы *P. aeruginosa*

Функциональная группа ферментов	Молекулярный класс ферментов	Антибиотик – субстрат (из группы антисинегнойных препаратов)	Ферменты	Источник
Группа 2b	A	Пенициллины	TEM-1, TEM-2, SHV-1	[243]
Группа 2be	A	Пенициллины, цефалоспорины, монобактамы	TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42, TEM-116	[243]
			SHV-2, SHV-2a, SHV-5, SHV-12	[243]
			CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-43	[243]
			PER-1, PER-2	[243]
			VEB-1, VEB-1a, VEB-1b, VEB-2	[243]
			GES-1, GES-8, GES-9	[243]
			BEL-1, BEL-2	[243]
Группа 2c	A	Пенициллины, тикарциллин- клавуланат	PSE-1, PSE-3, PSE-4, PSE-5	[243]
			CARB-3, CARB-4	[243]

Продолжение таблицы 1

Функциональная группа ферментов	Молекулярный класс ферментов	Антибиотик – субстрат (из группы антисинегнойных препаратов)	Ферменты	Источник
Группа 2d	D	Пенициллины, ингибиторозащищенные пенициллины	ОХА-1, ОХА-2, ОХА-3, ОХА-4, ОХА-5, ОХА-6, ОХА-10, ОХА-13, ОХА-20, ОХА-46, ОХА-50, ОХА-56 LCR-1	[243] [243]
Группа 2de	D	Пенициллины, ингибиторозащищенные пенициллины, цефалоспорины, монобактамы	ОХА-11, ОХА-14 - ОХА-19, ОХА-28, ОХА-31, ОХА-32, ОХА-35, ОХА-45, ОХА-74, ОХА-147, ОХА-161,	[243]

Продолжение таблицы 1

Функциональная группа ферментов	Молекулярный класс ферментов	Антибиотик – субстрат (из группы антисинегнойных препаратов)	Ферменты	Источник
Группа 2df	D	Пенициллины, ингибиторо-защищенные пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	OXA-40, OXA-50a, OXA-50b, OXA-50c, OXA-50d	[243; 236]
Группа 2f	A	Пенициллины, ингибиторо-защищенные пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	KPC-2, KPC-5 GES-2, GES-5	[243] [243]

Продолжение таблицы 1

Функциональная группа ферментов	Молекулярный класс ферментов	Антибиотик – субстрат (из группы антисинегнойных препаратов)	Ферменты	Источник
Группа 3	В	Пенициллины, ингибиторо-защищенные пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	IMP-1, IMP-2, IMP-4 - IMP-11, IMP-13 - IMP-16, IMP-18 - IMP-22, IMP-25, IMP-26, IMP-29 - IMP-31, IMP-33, IMP-35, IMP-37, IMP-40, IMP-41, IMP-43 - IMP-45, IMP-48 VIM-1 - VIM-11, VIM-13 - VIM-18, VIM-20, VIM-28, VIM-30, VIM-36 - VIM-38, VIM-43 SPM-1 GIM-1 NDM-1 AIM-1 SIM-1 FIM-1	[104] [243] [243] [117] [184] [184] [104]

К такому же эффекту приводит другой механизм, связанный с нарушением функции цитоплазматического фермента AmpD, вызывающего расщепление физиологически образующихся 1,6-ангидромуропептидов. Избыточное накопление 1,6-ангидромуропептидов через взаимодействие с AmpR и гиперэкспрессию *ampC* вызывает гиперпродукцию AmpC. При этом экспрессия *ampC* идет в функциональном синергизме угнетением синтеза поринов OprD и активации помп MexAB-OprM [188]. В итоге это приводит к возникновению резистентности к антисинегнойным цефалоспорином и карбапенемам.

Недавние исследования косвенно подтверждают возможность модификации мишени для развития резистентности к бета-лактамам. Из десяти карбапенемрезистентных штаммов *P. aeruginosa* (клональный комплекс 274), изолированных от больных муковисцидозом, лишь один не имел нарушений структуры пенициллин-связывающих белков - РВР (от англ. «*penicillin-binding proteins*») [138]. Пять изолятов несли признаки модификации РВР3 и один – РВР1А. Десять из одиннадцати чувствительных к бета-лактамам штаммов того же клонального комплекса не имели признаков изменения РВР; единственный в этой группе изолят с мутированным РВР3 имел пограничные значения МПК цефепима.

Помимо бета-лактамаз и модификации мишени, в формирование резистентности к бета-лактамам существенный вклад вносят еще два механизма – нарушение проницаемости пориновых структур (инактивация порина) и гиперактивность эффлюкс-систем (гиперэффлюкс).

Для *P. aeruginosa* описано 64 пориновых структуры. Физиологическая роль пориновых структур заключается в организации направленного транспорта внутрь клеток низкомолекулярных субстратов - аминокислот, сахаров, солей, органических кислот, которые необходимы для бактериального метаболизма [235]. Число неспецифических поринов в наружной мембране *P. aeruginosa* гораздо меньше, чем в наружных мембранах других бактерий.

Именно с этим связывают низкую проницаемость барьерных структур синегнойной палочки для антимикробных субстратов [78, 224]. Описано несколько семейств поринов *P. aeruginosa* (таб. 2). Порины семейства OprF не обладают высокой специфичностью и отвечают за проникновение внутрь бактериальной клетки сахаров, ионов железа, нитратов и нитритов [35, 132, 155, 252]. Через порины семейства OprB в бактериальную клетку поступают сахара, OprP – фосфаты, OprO – пирофосфаты, OprG - аминокислоты (аланин, глицин, серин, валин) [60].

Порины семейства Oсс отвечают за проникновение в клетку соединений, несущих карбоксильную группу, в том числе некоторых антибактериальных средств (таб. 2). На основе филогенетического анализа они разделяются на два подсемейства: OссК и OссD [60].

Что касается карбапенемов, то главным каналом для их транспорта внутрь бактерий является порин OprD (или OссD1) [191]. Хотя для карбапенемов существуют и альтернативные пути поступления в клетку – порины OprD (OссК7) и OprP (OссD3), считается, что именно с дефектами каналов OprD (OссD1) связан один из самых значимых механизмов карбапенемрезистентности *P. aeruginosa* [49, 216]. OprD - это монопротеиновый порин. Белок OprD представляет собой мономерную β-складчатую структуру, состоящую из 18 нитей (S) и 9 петель (L), с массой 45 кДа, кодируется 1332 парами нуклеотидов (п. н.). [131, 191, 251]. Его строение впервые было описано Biswas S. et al. (2007) с помощью рентгеноструктурного анализа [38].

Предполагалось, что OprD может функционировать как фермент - сериновая протеаза [253]. В более поздних исследованиях показано, что позиции, в которых находятся аминокислоты гистидин 156, аспарагин 208, серин 296, необходимые для образования каталитической триады, не позволяют сформировать каталитический центр [38].

Петли L3 и L7 формируют сужение в просвете OprD. Остовом сужения являются 14 аминокислот.

Семейства поринов *P. aeruginosa* и их субстраты

Семейство поринов		Субстрат
OprF		Неспецифический
OprB		Глюкоза
OprG		Аланин, глицин, серин, валин
OprP		Фосфаты
OprO		Пирофосфаты
Oсс		
Подсемейство OссD	OprD (OссD1)	Лизин, гистидин, аргинин, орнитин, меропенем, имипенем
	OprC (OссD2)	Гистидин, аргинин
	OprP (OссD3)	Глицин-глутамат, аргинин, меропенем
	OprT (OссD4)	Тирозин
	OprI (OссD5), OprQ (OссD6), OprJ (OссD8)	Аргинин
	OprB (OссD7)	Пролин, аргинин
Подсемейство OссK	OprK (OссK1)	Ваниллат, бензоат, карбенициллин, цефокситин, тетрациклин
	OprF (OссK2)	Глюкуронат, карбенициллин, цефокситин, гентамицин
	OprO (OссK3)	Пироглутамат, цефотаксим
	OprL (OссK4)	Фенилацетат
	OprH (OссK5)	Цис-акониат, 3-карбоксилаты
	OprD (OссK7)	Меропенем

Шесть из них образуют линию положительного заряда: аргинин 389 и лизин 375 - на периплазматической стороне сужения, аргинин 391 и аргинин

410 - в центре сужения, аргинин 30 и аргинин 39 - со стороны внеклеточного пространства (рис. 1). Эта «аминокислотная лестница» формирует нарастающий градиент электростатических зарядов, по которому противоположно-заряженные группировки специфического для OprD субстрата скользят из внеклеточной среды в периплазматическое пространство [38]. Специфичность пространственно-зарядовой архитектуры субстратов OprD обеспечивается во многом за счет карбоксильной группы, которая необходима для транспорта молекул через порин [78].

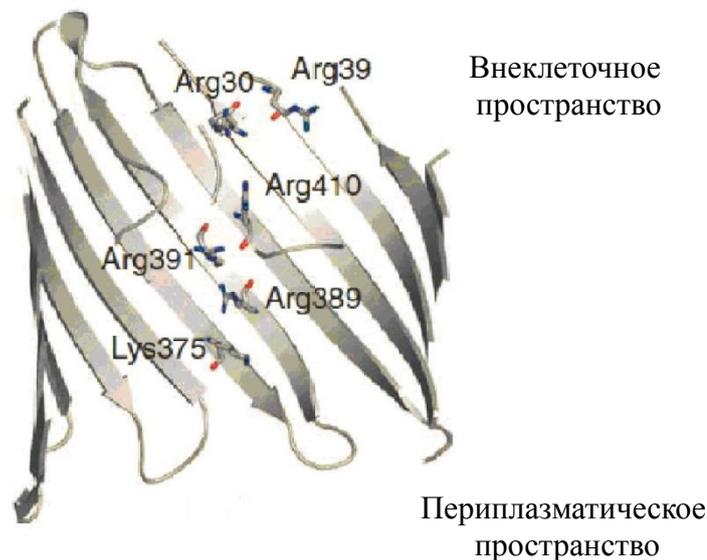


Рисунок 1. Структура порина OprD *P. aeruginosa* [38]

Примечание. Широкие полосы – нити белка; узкие полосы – петли белка; Arg39, Arg30, Arg410, Arg391, Arg389, Lys375 – аминокислоты, формирующие линию положительного заряда в «аминокислотной лестнице».

Именно из-за наличия карбоксильной группы в транспортируемых через OprD веществах этот порин и другие каналы этой группы были объединены под общим наименованием Омс (от англ. «outer membrane carboxylate channels»).

Канал OprD обеспечивает проникновение внутрь бактериальной клетки аминокислот (лизин, гистидин, аргинин, орнитин) и антибиотиков-карбапенемов (меропенем, имипенем, дорипенем и др.). Этот факт

подтверждается тем, что между перечисленными веществами при их одновременном поступлении в клетку возникает конкуренция. В присутствии основных аминокислот проникновение имипенема в клетку существенно замедляется [230].

Регуляция функционирования OprD-канала осуществляется посредством двух механизмов: 1) за счет структурных изменений в нуклеотидной последовательности *oprD*-гена и/или его промотора, 2) через управление экспрессией *oprD*. Встречаются три типа структурных нарушений *oprD*-гена. К первому относятся мутации, включая замены отдельных нуклеотидов, короткие делеции и короткие¹ инсерции. Ко второму принадлежат повреждения гена за счет инсерции мобильных генетических элементов (МГЭ), а именно IS-элементов (от англ. «*insertion sequence*» - вставочная последовательность). Третий тип поломок возникает вследствие реорганизации генома и включает протяженные делеции и инверсии (более 20 п. н.).

Мутации, нарушающие структуру *oprD* и его промотора приводят к разным функциональным последствиям. Они могут вызывать обрыв синтеза аминокислотной последовательности OprD [204]. Сюда можно отнести все инсерции МГЭ, а также мутации, которые реорганизуют геном, приводят к возникновению стоп-кодона, сдвигают рамки считывания. Встречаются мутации, которые не обрывают синтез OprD-протеина, а ведут лишь к изменению его аминокислотной последовательности. Они могут снижать либо не снижать функцию порина. И тот, и другой случай были неоднократно описаны [59].

Самое существенное повреждение гена *oprD* может быть связано с инсерцией в его структуру МГЭ [68, 220, 241]. Наиболее распространенным видом МГЭ, обнаруживаемым в *oprD*-гене, являются IS-элементы с набором

¹ Под короткими делециями и инсерциями понимается соответственно утрата или вставка нескольких - до 20 – п. н. [154].

признаков, позволяющих отличать их от других видов МГЭ. К числу отличительных признаков можно отнести: 1) размеры, соответствующие протяженности от 700 до 3000 п. н., 2) отсутствие структурных генов, за исключением гена транспозазы, которая необходима для перемещения самого IS-элемента, 3) наличие инвертированных повторов на терминальных участках IS-элемента и прямых повторов во фланкирующих областях [212]. В зависимости от размера, последовательностей инвертированных и прямых повторов, особенностей гена транспозазы, IS-элементы подразделяются на семейства. Результатом встраивания вставочной последовательности в геном клетки-хозяина является нарушение экспрессии *oprD* [242]. Реже *oprD* повреждается вследствие IS-ассоциированной реорганизации генома. IS-ассоциированная реорганизация - это протяженные делеции и инверсии последовательности ДНК, возникающие вследствие встраивания и перемещения IS-элемента в геноме бактериальной клетки. [27, 130].

Отсутствие нарушений в структуре *oprD* не гарантирует его нормальной экспрессии, которая контролируется различными факторами. Уровень транскрипции *oprD*-гена регулируется системами ArgR и MexT. Аргинин-зависимый регулятор ArgR способен связываться с оператором гена *oprD* и повышать его экспрессию (рис. 2). Активность ArgR возрастает в том случае, когда аминокислоты являются единственным источником углерода в среде [170]. Снижение уровня экспрессии осуществляется регулятором MexT, активирующимся в присутствии салицилата [171]. Ионы металлов снижают активность OprD на транскрипционном уровне. Например, цинк и медь действуют соответственно через регуляторные системы *czcSR* и *copSR* (рис. 2) [52; 69]. Молекулы некоторых веществ (например, спермин и спермидин) непосредственно блокируют функционирование OprD [131].

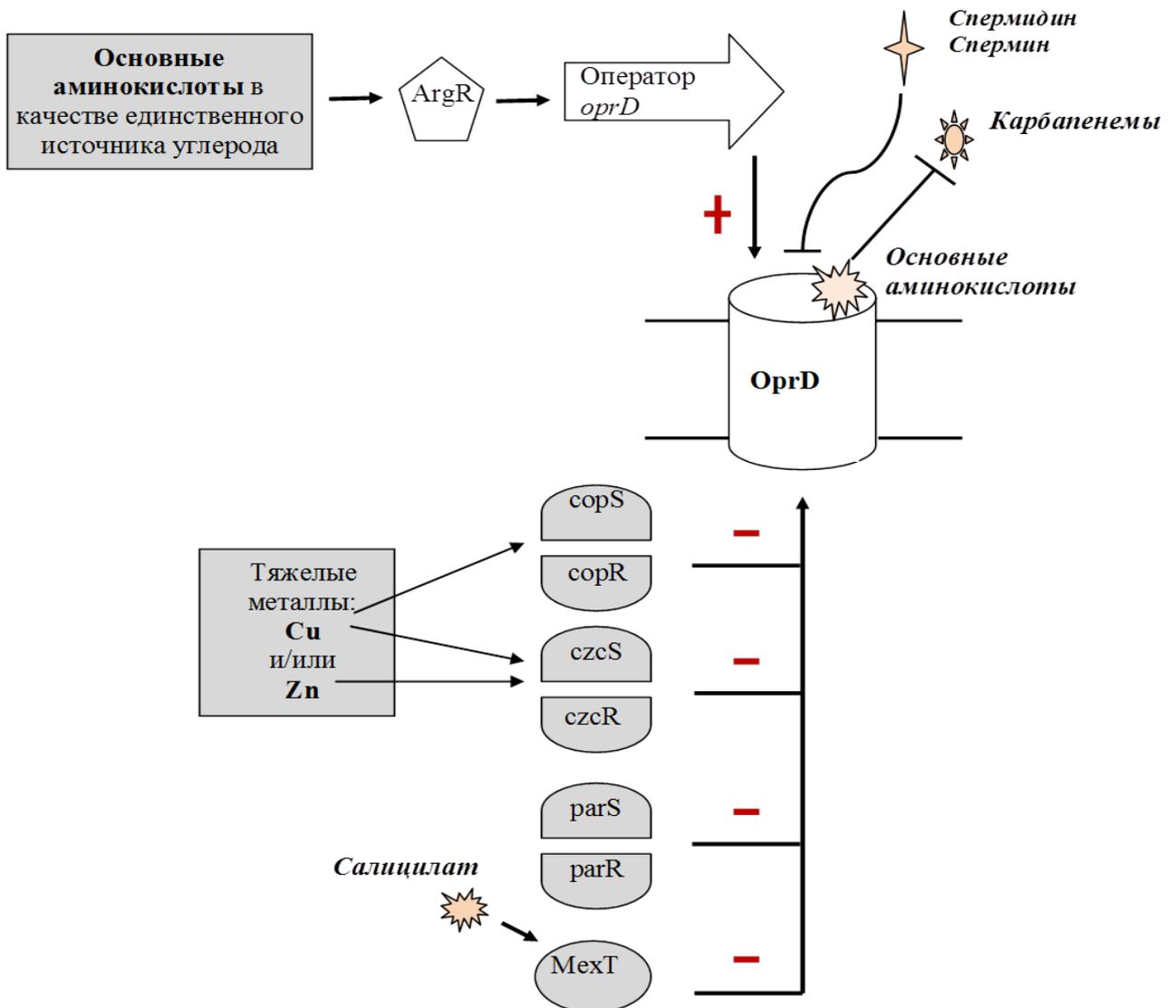


Рисунок 2. Регуляция экспрессии и функции порина OprD *P. aeruginosa* [131]

Примечание. ArgR, copSR, czcSR, parSR, MexT – регуляторы экспрессии *oprD*; «+» - увеличение экспрессии, «-» - снижение экспрессии. Прямой линией показана конкуренция основных аминокислот и карбапенемов при проникновении через OprD, изогнутой линией показан прямой блок OprD спермидином и спермином.

Эффлюкс-системы, обеспечивающие транспорт антибиотиков у *P. aeruginosa*, принадлежат к семейству RND (от англ. «*r*esistance-*n*odulation-*d*ivision»). Они функционируют за счет градиента электрохимического (протонного) потенциала [67]. RND-системы транспортируют из внутриклеточной во внешнюю среду антибиотики, красители, детергенты,

дезинфектанты, органические растворители [182]. Эффлюкс-система семейства RND представляет собой трехкомпонентную структуру, элементами которой являются RND, MFP и OMP [84]. Протеин RND - это компонент цитоплазматической мембраны. MFP (от англ. «*m*embrane *f*usion *p*rotein» - интегративный белок) – периплазматический белок, объединяющий RND и OMP. OMP (от англ. «the *o*uter *m*embrane *p*rotein» - белок наружной мембраны) – компонент наружной мембраны. Перечисленные белки формируют канал для активного выведения субстрата через периплазматическое пространство и наружную мембрану во внешнюю среду [84].

У синегнойной палочки насчитывается 12 видов эффлюкс-систем RND. Ответственными за выведение антибактериальных препаратов являются четыре RND-системы, включая MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM (таб. 3). За выведение бета-лактамов отвечают системы MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY-OprM [243].

Чрезвычайно важной является специфичность MexAB-OprM. MexAB-OprM может обеспечивать откачку из клеток меропенема, но не имипенема. Эта особенность может объяснить существование штаммов с высокими МПК меропенема и низкими МПК имипенема, которые довольно-таки часто обнаруживаются в практике клинической микробиологии.

Фторхинолоны транспортируются через MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM [181]. Эффлюкс аминогликозидов обеспечивает MexXY-OprM [158] (таб. 3). Строение эффлюкс-системы MexAB-OprM изучено с помощью рентгеноструктурного анализа [24].

Антибиотики-субстраты эффлюкс-систем *P. aeruginosa*

Эффлюкс-система <i>P. aeruginosa</i>	Антибиотик-субстрат
МехAB-ОргМ	Бета-лактамы (в том числе карбапенемы), фторхинолоны
МехCD-ОргJ	Бета-лактамы, фторхинолоны
МехХУ-ОргМ	Бета-лактамы, фторхинолоны, аминогликозиды
МехEF-ОргN	Фторхинолоны

Как и все RND-структуры, МехAB-ОргМ состоит из цитоплазматического (транспортер МехВ), периплазматического (МехА) и ассоциированного с наружной мембраной (ОргМ) компонентов. Самой массивной частью МехAB-ОргМ является белок МехА (рис. 3). Он состоит из 13 протомеров, каждый протомер включает по три домена. Первый (основной) домен представляет собой α -спираль, расширяющуюся на одном конце. Второй домен — глобулярный, сформирован восемью β -листами и находится рядом с основным доменом. Третий домен расположен дистально по отношению к основному домену, он представляет собой глобулярный протеин, сформированный семью β -листами. Протомеры располагаются напротив друг друга, соединяясь в области основного домена. Шесть протомеров находятся со стороны наружной мембраны и связаны с белком ОргМ, остальные семь — со стороны цитоплазматической мембраны и связаны с белком МехВ [25].

Белок ОргМ представляет собой канал в наружной мембране. Он образован тремя мономерами, каждый из которых состоит из α - и β -доменов.

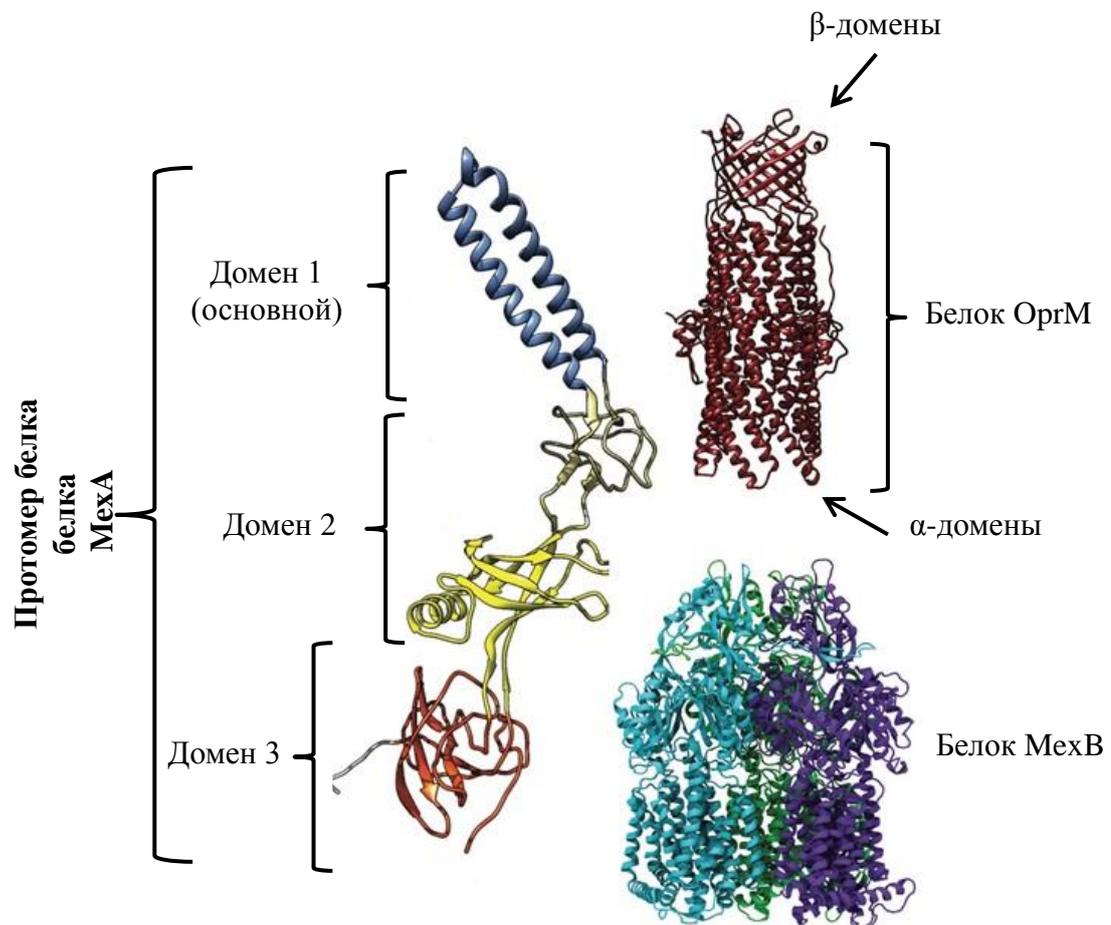


Рисунок 3. Структура эффлюкс-системы MexAB-OrgM [137]

β -домен крепится к наружной мембране, α -домен — участвует в образовании просвета канала. OrgM прикрепляется к наружной мембране с помощью ковалентных связей между аминокислотными группами белка и жирными кислотами фосфолипидов мембраны. [24]. Регуляция экспрессии эффлюксной системы MexAB-OrgM осуществляется репрессором MexR (рис. 4) — при нарушении его функционирования (например, под действием активных форм кислорода, изменяющих конформацию регулятора MexR) MexAB-OrgM активируется и изолят приобретает резистентность к карбапенемам [205]. Замечено, что наиболее высокий уровень экспрессии эффлюксной системы присущ изолятам, находящимся в стационарной фазе роста. В данном случае экспрессия регулируется за счет факторов системы глобального сигналинга «кворум сенсинг» [147]. При этом их влияние снижается под действием регулятора

МехТ и экспрессия МехАВ-ОprМ угнетается. Одновременно с угнетением МехАВ-ОprМ, регулятор МехТ усиливает экспрессию эффлюкс-системы МехЕF-ОprN, что фенотипически проявляется резистентностью к фторхинолонам и чувствительностью к бета-лактамам [232]. Важными факторами регуляции экспрессии эффлюкс-системы являются репрессор NalD и фактор NalC. NalD связывается непосредственно с промотерной областью МехАВ-ОprМ и угнетает экспрессию. Фактор NalC действует опосредованно через комплекс МехR-ArmR, активирующий экспрессию эффлюкс-системы. NalC является репрессором белка ArmR и препятствует образованию данного комплекса, в результате чего МехАВ-ОprМ не экспрессируется [92]. Действие NalC нейтрализуется под действием некоторых соединений, например фенолов.

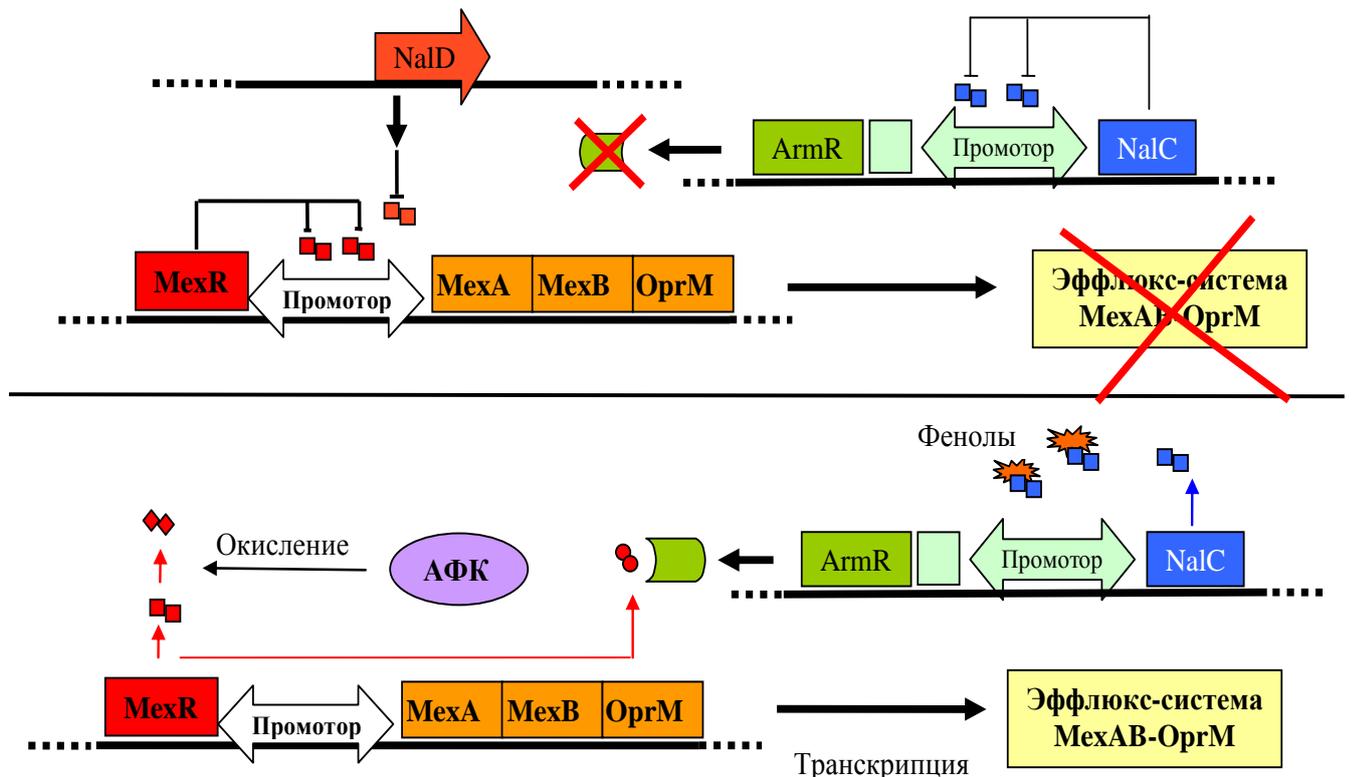


Рисунок 4. Схема регуляции экспрессии белков эффлюкс-системы МехАВ-ОprМ [45]

Примечание. MexR, ArmR, NalC и NalD – регуляторы экспрессии белков эффлюкс-системы МехАВ-ОprМ; АФК – активные формы кислорода.

Долгое время существовало мнение о том, что большие значения МПК карбапенемов (>32 мкг/мл) и антисинегнойных цефалоспоринов (>256 мкг/мл) регистрируются только у штаммов-продуцентов карбапенемаз, особенно – у продуцентов металло-бета-лактамаз (МБЛ). Часто это подтверждалось экспериментальными результатами [246]. К настоящему времени данное положение опровергнуто. В упоминавшемся исследовании Lopez-Causape S. et al. были обнаружены многочисленные МБЛ-негативные изоляты *P. aeruginosa* с МПК меропенема и имипенема >32 мкг/мл, МПК цефепима и цефтазидима >256 мкг/мл [138]. Авторы полагают, что такие большие значения МПК для цефалоспоринов и карбапенемов были обусловлены комплексами мутаций, в том числе - мутациями в генах, контролирующих синтез РВР, работу эффлюкс-систем и мембранную проницаемость. На возможность значительного МБЛ-независимого увеличения МПК карбапенемов (>64-256 мкг/мл меропенема) у *P. aeruginosa* указывают и результаты, полученные в других работах [58]. В таб. 4 показаны сочетания механизмов приобретенной резистентности к бета-лактамным антибиотикам у *P. aeruginosa*.

Приобретенная резистентность к антибиотикам группы фторхинолонов у *P. aeruginosa* связана с (1) модификацией мишени действия антибиотика, (2) функционированием эффлюкс-систем и (3) ферментативной инактивацией антибиотика. Мишенью действия фторхинолонов являются ферменты топоизомеразы (топоизомераза II (гираза) и топоизомераза IV), играющие важную роль в репликации, транскрипции, рекомбинации и репарации ДНК. Мутации, происходящие в генах данных ферментов, ведут к их структурным изменениям и, следовательно, нечувствительности к фторхинолонам. У *P. aeruginosa*, как и у других грамотрицательных бактерий, мутации в первую очередь происходят в гене фермента гиразы (в отличие от грамположительных бактерий, у которых первоначально повреждается ген топоизомеразы IV) [111].

Сочетания механизмов приобретенной резистентности к бета-лактамым антибиотикам у *P. aeruginosa*

Группа антибиотиков	Механизм резистентности		
	Разрушение антибиотика бета-лактамазами	Нарушение функции поринов	Эффлюкс-зависимое выведение антибиотика
Пенициллины	Группы 2b, 2be, 2c, 2d, 2de, 2df, 2f, 3	Порины OprF, OprK (OscK1), OprF (OscK2)	Эффлюкс-система МехAB-OprM
Цефалоспорины	Группы 2be, 2de, 2df, 2f, 3	Порины OprF, OprO (OscK3)	Эффлюкс-системы МехAB-OprM, МехCD-OprJ, МехXY
Карбапенемы	Группы 2df, 2f, 3	Порины OprD (OscD1), OprD (OscK7), OprP (OscD3)	Эффлюкс-система МехAB-OprM
Монобактамы	Группы 2be, 2de	Нет данных	Эффлюкс-система МехAB-OprM
Ингибиторозащищенные бета-лактамы	Группы 2c, 2d, 2de, 2df, 2f, 3	Нет данных	Эффлюкс-система МехAB-OprM

Последующее возникновение мутаций в генах фермента топоизомеразы IV ведет к еще большему увеличению уровня резистентности к фторхинолонам. Каждый из ферментов состоит из двух субъединиц: фермент гиразу формируют субъединицы GyrA и GyrB, топоизомеразу IV - ParC и ParE. При этом мутации, вызывающие резистентность к фторхинолонам локализуются в генах субъединиц GyrA и/или ParC в так называемых участках QRDR (от англ. «*quinolone resistance determining region*») [184].

Вторым механизмом резистентности *P. aeruginosa* к фторхинолонам является эффлюкс-зависимое выведение антибиотика из бактериальной клетки. Как говорилось выше, данный механизм реализуется за счет четырех эффлюкс-систем семейства RND: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM и дополнительных систем MexHI-OpmD и MexVW-OprM [133, 181, 210].

В исследованиях Henrichfreise B. et al. и Tomas M. et al. у клинических изолятов *P. aeruginosa*, резистентных к фторхинолонам, описаны мутации в генах репрессоров, регулирующих экспрессию эффлюксных систем MexAB-OprM и MexCD-OprJ [100, 228]. Активация эффлюкс-системы MexXY-OprM у фторхинолон-резистентных изолятов происходит за счет возникновения инактивирующих мутаций в гене репрессора MexZ. Однако, показаны случаи резистентности к фторхинолонам и нормального уровня экспрессии MexXY-OprM даже при отсутствии мутаций в *mexZ* [103].

В отличие от других представителей семейства RND, экспрессия которых регулируется репрессорами, эффлюкс-система MexEF-OprN экспрессируется за счет активатора транскрипции MexT. У чувствительных к фторхинолонам изолятов *P. aeruginosa* MexEF-OprN не функционирует в результате возникновения мутаций в гене данного активатора, характерных для диких штаммов *P. aeruginosa* [146]. При реверсии мутаций в гене *mexT* активируется экспрессия MexEF-OprN и изолят становится резистентным [113, 146]. У таких «реверсированных» изолятов дополнительно возникает резистентность к

антибиотикам группы карбапенемов, но не за счет работы эффлюкс-системы, а за счет MexT-опосредованного угнетения экспрессии гена порина OprD [171].

Ферментативная инактивация фторхинолонов происходит под действием аминогликозидацетилтрансферазы. Данные ферменты осуществляют ацетилирование аминогрупп антибактериальных препаратов и большинство из них активны только в отношении аминогликозидов. Однако, фермент AAC(6')-Ib-cr, обнаруживаемый на плазмидах *P. aeruginosa*, способен инактивировать и аминогликозиды, и фторхинолоны [56].

Приобретенная резистентность *P. aeruginosa* к аминогликозидам обусловлена тремя механизмами: (1) модификация мишени действия антибиотика (действие рРНК-метилазы), (2) инактивация антибиотика аминогликозид-модифицирующими ферментами – АМЕ (от англ. «aminoglycoside-modifying enzymes»), (3) действие эффлюкс-систем.

Мишенью действия антибиотиков группы аминогликозидов является 30S-субъединица рибосом. Ферменты рРНК-метилазы осуществляют метилирование 16S рРНК 30S субъединицы, обеспечивая высокий уровень резистентности бактерии к клинически значимым аминогликозидам: гентамицину, тобрамицину, амикацину [71]. У *P. aeruginosa* описаны такие 16S рРНК метилазы, как RmtA, RmtB, RmtD, ArmA [68, 92, 112, 242, 249]. Замечено, что продукция RmtD сочетается с продукцией МБЛ типа SPM-1, а продукция ArmA – с МБЛ типа IMP-1 [71, 95].

Ферменты АМЕ, в зависимости от способа инактивирования аминогликозидов, разделяют на три группы: аминогликозидацетилтрансферазы – AAC (от англ. «aminoglycoside acetyltransferases»), аминогликозидаденилтрансферазы – AAD (от англ. «aminoglycoside adenylyltransferase»), иногда их называют ANT (от англ. «aminoglycoside nucleotidyltransferases»), и аминогликозидфосфорилтрансферазы - APH (от англ. «aminoglycoside phosphoryltransferase»).

ААС инактивируют аминогликозиды посредством ацетилирования аминогрупп. Данные ферменты обычно действуют на 3- и 6'-аминогруппы антибиотика (семейства ААС(3) и ААС(6'), соответственно), реже встречаются ААС, действующие на 1- и 2'-аминогруппы [37, 97, 192]. Среди ферментов семейства ААС(3) выделяют пять подсемейств (I, II, III, IV и VI). Наличие у изолята любого из ферментов ААС(3) ассоциировано с резистентностью к гентамицину [192], в то время как резистентность к тобрамицину возникает только при наличии ферментов подсемейств II, III и VI [183]. Семейство ААС(6') разделяют на два подсемейства: II и, менее распространенное, I [192]. Изоляты, обладающие ферментами ААС(6'), резистентны к тобрамицину и амикацину (подсемейство I) или тобрамицину и гентамицину (подсемейство II) [183]. Однако, описаны варианты подсемейства I, неактивные в отношении амикацина [88, 142]. Как упоминалось ранее, один из представителей семейства ААС(6') - ААС(6')-Ib-cr, демонстрирует активность в отношении фторхинолонов [94].

Среди ферментов ANT чаще всего обнаруживают ANT(2')-I, инактивирующий гентамицин и тобрамицин. Реже встречается ANT(4')-II, обуславливающий резистентность к тобрамицину и амикацину [183].

Точкой приложения действия ферментов APH является 3-ОН группа аминогликозидов. У клинических изолятов *P. aeruginosa* наиболее распространенным является фермент APH(3')-II. Как уже говорилось, он обеспечивает природную резистентность синегной палочки к канамицину, неомицину, стрептомицину [183]. Однако, описаны случаи обнаружения у *P. aeruginosa* APH, ассоциированных с резистентностью к амикацину (APH(3')-VI, APH(3')-Ib-like), тобрамицину и гентамицину (APH(2'')) [118, 119, 194].

Третьим механизмом резистентности *P. aeruginosa* к аминогликозидам является эффлюкс-зависимое выведение антибиотика из клетки. Как говорилось выше, за выведение из клетки аминогликозидов отвечает эффлюкс-система MexXY-OprM. Так же, как и в случае эффлюкс-зависимой резистентности к

фторхинолонам, MexXY-OprM активно экспрессируется при наличии мутаций в гене репрессора *mexZ*, регулирующего экспрессию данной эффлюкс-системы [163].

Основным механизмом резистентности *P. aeruginosa* к полимиксинам (колистину и полимиксину В) является модификация мишени действия. Антибактериальное действие полимиксинов основано на электростатическом связывании положительно заряженной полипептидной части антибиотика и негативно заряженного липополисахарида (ЛПС) наружной мембраны грамотрицательных бактерий и, дополнительно, взаимодействии «липидного хвоста» полимиксина и жирных кислот липида А. Связываясь с ЛПС, антибиотик вытесняет мембраностабилизирующие ионы магния и кальция, соединяющие соседние молекулы липида А и укрепляющие наружную мембрану. Вследствие вытеснения ионов магния и кальция барьерная функция наружной мембраны нарушается, что ведет к утечке периплазматических белков и поступлению в периплазматическое пространство веществ, ранее не пропускаемых наружной мембраной, в том числе и самой молекулы полимиксина [231]. Предполагалось, что полимиксин В нонапептид (PMBN (от англ. «*polymyxin B nonapeptide*»)) - часть молекулы полимиксина без «липидного хвоста» - не активен, однако, в исследованиях Zhang et al., 2000 и Lu et al., 2014 показано, что PMBN не теряет способности повреждать наружную мембрану [140, 255]. Данное объяснение механизма действия полимиксинов предполагает, что наружная мембрана является единственной мишенью действия антибиотика, и нарушение ее проницаемости ведет к гибели бактериальной клетки. Следовательно, модификация наружной мембраны (а именно ЛПС) ведет к развитию резистентности к полимиксинам.

ЛПС модифицируется путем присоединения 4-амино-L-арабинозы к липиду А. Модификация осуществляется ферментами, кодируемыми опероном *arnBCADTEF-ugd*, также называемым *pmrHFIJKLM-ugd*-оперон или *arn*-оперон [153, 250]. Экспрессия оперона находится под контролем двухкомпонентной

регуляторной системы Par RS и активируется в ответ на субингибиторную концентрацию полимиксинов [82]. Par RS - не единственная система, регулирующая экспрессию *arn*-оперона. Обсуждается потенциальный вклад систем PhoPQ, PmrAB, CprRS, ColRS [172]. Мутации в генах белков PmrB, PhoQ, ParR и ParS ведут к повышенной экспрессии *arn*-оперона и обнаруживаются у клинических изолятов *P. aeruginosa*, в разной степени резистентных к колистину (от 4 до >512 мкг/мл) [34, 96, 161].

Следует отметить, что мутации в генах белков ParS или ParR не только запускают каскад реакций, ведущих к модификации ЛПС, но и регулируют экспрессию белков, участвующих в формировании резистентности к другим группам антибиотиков: увеличивают экспрессию эффлюкс-системы MexXY и угнетают экспрессию порина OprD. Таким образом, повреждение генетической структуры регуляторной системы ParRS ведет к возникновению резистентности к четырем группам антибиотиков: полимиксинам, бета-лактамам (карбапенемам), аминогликозидам и фторхинолонам [163].

Ряд исследований, показывающих отсутствие корреляции между степенью проницаемости наружной мембраны и гибелью бактериальных клеток в присутствии полимиксинов, опровергают предположение, что наружная мембрана является единственной мишенью действия антибиотика, и обосновывают необходимость поиска дополнительных механизмов действия [66, 255]. Например, в качестве мишени действия рассматривались 16S рРНК, ферменты дыхания бактерий [151, 158]. В исследовании Fernandez L. et al., 2013 описаны 17 генов, повреждение которых ведет к изменению МПК колистина [83]. Среди них вышеупомянутые *parR*, *pmrA*, *phoQ*, а также гены ферментов метаболизма и гены, отвечающие за транспорт ЛПС. Данные повреждения ведут к формированию резистентности не только к полимиксинам, но и к другим группам антибиотиков [28, 46, 73, 208]. Изоляты с поврежденными генами метаболизма *pyrB*, *pdxB*, *sucC*, *tpiA* и *aroB* демонстрировали более

низкий уровень МПК колистина, чем контрольный штамм, а также характеризовались замедленным ростом.

У изолятов с повреждением в генах, участвующих в синтезе и транспорте ЛПС, также регистрировался более низкий уровень МПК, чем у контрольного штамма [83]. Например, чувствительность к колистину возрастала при повреждении гена белка GalU – уридиндифосфат-глюкоза-пирофосфорилазы, участвующей в синтезе уридиндифосфат-D-глюкозы, неотъемлемого компонента ЛПС. Подобным образом проявляются нарушения в структуре гена *ssg* (от англ. «cell surface sugar biosynthetic glycosyltransferase») – гликозилтрансферазы, гене белка WapR (рамнозилтрансферазы), ответственных за синтез компонентов ЛПС, в гене белка, гомологичного LptC *E. coli*, участвующего в транспорте ЛПС на наружную мембрану.

Для подтверждения зависимости между повреждением описанных генов и неспособностью исследуемых штаммов к модификации ЛПС (и, как следствие, снижением уровня МПК колистина) в исследовании Fernandez L. et al., 2013 штаммы с поврежденными генами *galU*, *wapR*, *ssg* и контрольный штамм выращивали в условиях низкой концентрации ионов магния, так как данные условия являются триггерным фактором модификации ЛПС. При масс-спектрометрической оценке контрольный штамм демонстрировал наличие пиков аминокарабинозы, в то время как у исследуемых штаммов подобные пики не обнаруживались [83]. Других механизмов резистентности к полимиксинам у *P. aeruginosa* пока не описано.

Прогресс в исследовании многоклеточных бактериальных сообществ позволил обосновать существование еще одного вида устойчивости – биопленочной антибиотикорезистентности. Несмотря на существование многочисленных доказательств важности этого типа резистентности, его роль до настоящего времени остается недооцененной. В частности показано, что МПК антибиотиков могут возрастать в сотни раз в случаях, когда бактерии организуются в биопленки. Механизмы биопленочной резистентности были

подробно описаны ранее [19]. Вкратце можно сказать, что главные из этих механизмов связаны с: 1) биопленочным матриксом, который инактивирует антибиотики, и 2) многократным увеличением в биопленочном пуле количества бактерий-персистеров. У синегнойной палочки инактивирующая роль матрикса реализуется, главным образом, за счет альгината, хотя и другие компоненты матрикса могут принимать участие в «фильтрационной» задержке антибиотиков [165, 219]. Персистирующие клетки проявляют настолько низкий уровень метаболизма, что становятся неуязвимыми для антибиотиков, целью которых являются, прежде всего, метаболически активные бактерии.

1.3. Как приобретается и регулируется резистентность

Приобретение резистентности - это синтез новых белков, а также изменение структуры и/или функции уже существующих в клетке биополимеров. Понятно, что такая перестройка реализуется за счет приобретения новых генов извне, а также за счет активации или, наоборот, ингибирования существующих генов. В целом, у *P. aeruginosa* 0,3% общего количества генов вовлекаются в процессы реализации устойчивости к антимикробным препаратам [120, 245]. В условиях контакта с антибиотиками эти процессы запускаются очень быстро и реализуются через разные механизмы, определяемые конкретным микроокружением и штаммовыми особенностями генетического аппарата синегнойной палочки. Одной из самых наглядных моделей эволюции резистентности служит селекция антибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa* при муковисцидозе. 70% изолятов от пациентов с хроническим носительством синегнойной палочки характеризуются множественной резистентностью, механизмы которой крайне разнообразны даже в случаях принадлежности изолятов к одному клональному комплексу [138]. Всего в процесс реализации резистентности при муковисцидозе вовлекается более 100 генов. Количество мутированных генов,

задействованных в приобретенной устойчивости, колеблется от 3 (изолят, резистентный только к азтреонаму) до 24 (мультирезистентный изолят) на один изученный штамм. Каждая из обнаруженных мутаций, как считают авторы, была значима для возникновения резистентности [138]. Причина такого большого количества полезных для синегнойной палочки мутаций кроется в особых свойствах выживших после воздействия антибиотиков клонов. Главным свойством их генетического аппарата считается склонность к спонтанным мутациям – их вероятность в 1000 раз больше, чем у среднестатистического дикого штамма, что дало повод назвать их гипермутаторами или бактериями с гипермутабельным фенотипом [141]. Причина гипермутабельности кроется в поломках системы репарации хромосомной ДНК, которые оказываются полезными для выживания вида в условиях антибиотикотерапии. В результате безжалостной селекции под прессом антибиотиков остаются только те клоны, мутации которых оказались направленными на нейтрализацию антимикробных препаратов. Как правило, первичное заражение при муковисцидозе является внебольничным. Бронхо-легочная система при этом контаминируется негоспитальными, а, значит, нерезистентными штаммами. Изоляты, полученные от пациентов с нозокомиальными инфекциями, имеют дополнительные, горизонтальные, пути приобретения резистентности. Это наиболее ярко иллюстрируется на примере приобретенных бета-лактамаз, которые редко присутствуют у детей с муковисцидозом [136]. Частота их обнаружения растет вместе с взрослением пациента и временем его нахождения в лечебных учреждениях. Считается, что приобретенные бета-лактамазы расширенного спектра и карбапенемазы кодируются генами, происходящими из плазмид и МГЭ, в том числе транспозонов. Гены бета-лактамаз часто находятся в составе генных кассет в интегронах, соседствуя с генами резистентности к другим антибиотикам. В таких случаях плазмид- и транспозон-зависимая передача резистентности горизонтальным путем будет обеспечивать одномоментное приобретение множественной лекарственной устойчивости.

Например, в исследовании Yu Y.S. et al. описаны штаммы *P. aeruginosa* с интегронами, несущими ген МБЛ и гены ферментов инактивации аминогликозидов [254]. Источником отдельных генов и касет резистентности являются госпитальные штаммы, которые интегрировали в свой геном полезные для приобретения резистентности детерминанты. По мере дальнейшего контакта с новыми антибиотиками и взаимодействия с микробным окружением, штаммы *P. aeruginosa* при помощи фермента интегразы продолжают захватывать нужные для выживания гены, увеличивая объем интегронов [254]. Функционально это проявляется в расширении спектра резистентности. В качестве первичных хозяев генов резистентности, обнаруживаемых у синегнойной палочки, называют бактерии из окружающей среды, нередко принадлежащие к отдаленным от *Pseudomonas spp.* таксонам. Например, бета-лактамаза СТХ-М была «заимствована» синегнойной палочкой у свободноживущих видов семейства *Enterobacteriaceae Kluyvera ascorbate* и *Kluyvera georgiana*, у которых СТХ-М является природным ферментом [178]. В качестве первичных носителей NDM рассматриваются энтеробактерии *Klebsiella pneumoniae* или *Escherichia coli* [237]. Происхождение генов бета-лактамаз может быть связано не только с энтеробактериями: на роль кандидатов в естественные носители генов ОХА-бета-лактамаз претендуют *Ralstonia spp.*, *Burkholderia spp.* и *Shewanella spp.* [178].

Как уже было сказано, причиной запуска других механизмов резистентности может быть повреждение генов бактерии мутациями, реорганизацией генома (протяженными делециями и инверсиями) и МГЭ. Данные факторы могут модифицировать мишень, нарушать структуру поринов, замедляя тем самым транспорт антибиотиков внутрь клетки, и повреждать гены, репрессирующие эффлюкс-выведение антибиотика из периплазмы бактерий [23, 111, 204]. Если мутации носят случайный характер, то протяженные делеции и инверсии могут быть не случайными - они могут являться следствием реорганизации генома под воздействием МГЭ [173].

Предполагается, что МГЭ, в свою очередь, тропны к определенным генам [212]. К настоящему времени насчитывается около 40 IS-элементов (разновидность МГЭ, от англ. «*insertion sequence*» - вставочная последовательность), которые индуцируют резистентность *P. aeruginosa* к антибиотикам, встраиваясь в гены поринов и нарушая гены репрессоров эффлюкс-помп [44, 68, 220, 241].

Глобальная картина функциональной регуляция резистома *P. aeruginosa* поддается осмыслению лишь на уровне отдельных процессов, в достаточной степени изученных к настоящему времени. Невозможность общего понимания определяется двумя причинами. Во-первых, отсутствует информация обо всех возможных вариантах межмолекулярных взаимодействий биополимеров, вовлеченных в реализацию устойчивости. Вторая причина кроется в сложности системы. Одновременная индукция взаимоисключающих процессов, шунтированность путей регуляции, внутривидовое разнообразие сайтов для межмолекулярных контактов, приводящее к неоднородности силы сигнала от взаимодействия – все это определяет систему регуляции как динамический хаос. Впрочем, это не отменяет важнейшего результата работы этой системы, заключающегося в приобретении резистентности.

Проиллюстрируем сложность регуляции на примере эффлюкс-помп и пориновой проницаемости. Подавление транскрипции *oprD* осуществляется регулятором MexT, одновременно активирующим транскрипцию генов, которые кодируют белки эффлюксных систем MexEF-OprN (насос для фторхинолонов, триметоприма и хлорамфеникола) [171]. В то же время, MexT подавляет активность другой помпы, откачивающей фторхинолоны (а также бета-лактамы) из клетки – MexAB-OprM. Происходит это за счет подавления MexAB-OprM-стимулирующего эффекта от важного индуктора системы «кворум-сенсинг» N-бутирил-L-гомосеринлактона [147]. В этом мы видим, по крайней мере, два противоположных явления. Первое заключается в одновременной активации одной (MexEF-OprN) и подавлении другой (MexAB-OprM) помпы для фторхинолонов. Второе противоречие заключается в том, что

MexT подавляет OprD-зависимый транспорт бета-лактамов в клетку и одновременно подавляет их выведение специфичной для бета-лактамов помпой MexAB-OprM. Сложность усугубляется тем, что эти процессы находятся под влиянием кворум-сенсинга, а, следовательно, зависят от фазы роста бактерий, их концентрации и микроокружения. Кроме того, синегнойная палочка располагает дублирующими механизмами индукции эффлюкс- и порин-зависимой резистентности. Например, под воздействием субтоксичных для *P. aeruginosa* доз антибиотиков (ципрофлоксацин, 0,05 мкг/мл) уже упомянутая система MexEF-OprN активируется независимо от MexT за счет неустановленных медиаторов [126]. Подобным образом функционируют и другие системы, отвечающие в клетках *P. aeruginosa* за устойчивость к повреждающим агентам. Считается, что только сложность регуляторных механизмов может обеспечить гибкость поведения *P. aeruginosa*, проявляющуюся в ее способности быстро приобретать и быстро утрачивать резистентность в зависимости от условий окружающей среды. Регуляторный аппарат синегнойной палочки обеспечивает уникальное свойство - самые разнообразные стресс-факторы могут усиливать устойчивость к антимикробным препаратам, индуцируя кросс-резистентность [47]. Это дало повод сформулировать оригинальное правило для предсказания последствий контакта *P. aeruginosa* с антимикробными препаратами: «Все дороги ведут к резистентности» [47].

1.4. Оценка антибиотикорезистентности

Подходы для детекции бета-лактамаз, гидролизующих карбапенемы, можно условно разделить на молекулярные, фенотипические и аналитические. Молекулярные подходы подразумевают выявление генов бета-лактамаз с помощью различных видов амплификации (мультиплексная ПЦР, петлевая

изотермическая амплификация) и секвенирования [33, 39, 65, 90, 162, 168, 177, 180, 187].

Фенотипические подходы выявления бета-лактамаз, гидролизующих карбапенемы, включают: 1) использование карбапенем-содержащих питательных сред, 2) модифицированный тест Ходжа, 3) СИМ-тест, 4) тесты с ингибиторами карбапенемаз, 5) выявление штаммов, продуцирующих карбапенемазы, с помощью бактериологических анализаторов.

Карбапенем-содержащие питательные среды могут быть использованы для отбора изолятов, требующих детального определения у них карбапенемазной активности [54, 203].

Модифицированный тест Ходжа основан на феномене роста контрольного карбапенемчувствительного штамма в присутствии карбапенемов и тестируемого штамма в случае, если тестируемый штамм продуцирует карбапенемазу. Данный тест позволяет определить только наличие карбапенемазы без уточнения ее типа, практически безошибочно выявляет представителей классов А и D, но слабо чувствителен для карбапенемаз класса В [175, 227].

Принципы тестов с ингибиторами бета-лактамаз основаны на изменении МПК карбапенемов в присутствии специфических ингибиторов: для класса А ингибиторами являются бороновая кислота, для класса В – этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), дипиколиновая кислота или меркаптоацетат натрия, класса С – бороновая кислота или клоксациллин, для класса D - авибактам [16, 127, 178, 227]. Существует несколько вариантов тестов с ингибиторами: тест с добавлением ингибитора в среду для определения чувствительности, метод двойных дисков, МБЛ-Е-тест [62, 175, 189]. Тесты с добавлением ингибитора в среду для определения чувствительности основаны на уменьшении МПК карбапенемов у продуцентов карбапенемаз в среде с ингибитором [98]. Метод двойных дисков позволяет выявлять изоляты-продуценты карбапенемаз по изменению формы зоны задержки роста вокруг

дисков с карбапенемами вблизи диска с ингибитором. С помощью МБЛ-Е-тестов определяют наличие МБЛ у тестируемого штамма по уменьшению МПК имипенема на шкале «имипенем + ЭДТА» по сравнению с МПК имипенема на шкале «имипенем». Однако, метод двойных дисков и МБЛ-Е-тест позволяют выявлять только карбапенемазы класса В.

Для проведения СИМ-теста (от англ. «*carbapenem inactivation method*» - метод инактивации карбапенема) диск с меропенемом инкубируют с тестируемым штаммом, после инкубации его помещают на твердую питательную среду, засеянную контрольным карбапенемчувствительным штаммом. Результат теста считают положительным в случае наличия роста контрольного штамма вокруг диска, что обусловлено инактивацией антибиотика карбапенемазой тестируемого штамма [214].

Чувствительность и специфичность методов определения карбапенемазной активности с помощью бактериологических анализаторов варьирует в широких пределах в зависимости от фирмы-производителя [244]. Наиболее достоверный результат дает система BD Phoenix (Becton Dickinson): чувствительность и специфичность определения карбапенемазной активности составляют 100% [244].

Фенотипические подходы более экономичны и просты, но их выполнение занимает больше времени. Они не позволяют расшифровать тип карбапенемазы, а некоторые из них (Ходж-тест) характеризуются большой вероятностью ошибки [175, 227].

Аналитические методы выявления карбапенемаз можно разделить на три группы: 1) электрофоретические (электрофокусирование), 2) иммунохимические (иммунохроматография) и 3) основанные на выявлении продуктов гидролиза карбапенемов (Carba NP-тест, УФ- и масс-спектрометрия).

Электрофокусирование - тип электрофореза, при котором белки разделяются в зависимости от величины изоэлектрической точки, - один из первых методов разделения бета-лактамаз [149]. Расположение бета-лактамаз на

геле определяется при помощи фильтровальной бумаги, пропитанной хромогенным цефалоспорином, который при соприкосновении с ферментом подвергается гидролизу и меняет цвет. Дополнительное нанесение на гель ЭДТА или клавулановой кислоты позволяет выявить молекулярный класс фермента по его чувствительности к соответствующему ингибитору [189].

Иммунохроматографический анализ основан на реакции антиген-антитело, антигеном является молекула карбапенемазы. Иммунохроматографию успешно применяют для детекции IMP [121]. Данные методы длительны по времени, электрофокусирование не позволяет определить тип карбапенемаз, иммунохроматография информативна лишь для некоторых типов карбапенемаз.

Принцип Carba NP-теста основан на изменении цвета кислотно-основного индикатора при гидролизе имипенема тестируемым штаммом, позволяет отличить продуцентов карбапенемаз от изолятов с иными бета-лактамазами [167]. С помощью УФ-спектрометрии измеряют степень гидролиза карбапенема в смеси антибиотика с исследуемым штаммом (или очищенными бета-лактамазами). Наиболее сильный гидролиз имипенема демонстрируют продуценты карбапенемазы KPC и NDM [36].

Carba NP-тест и УФ-спектрометрия просты в исполнении, но, как и фенотипические подходы, не позволяют расшифровывать тип карбапенемазы.

Для выявления у *P. aeruginosa* гиперпродукции бета-лактамазы AmpC, участвующей в формировании карбапенемрезистентности в комплексе с другими механизмами, используют тест с нитроцефином. Нитроцефин – хромогенный цефалоспорин, гидролизующийся под действием цефалоспориназ с образованием окрашенного продукта. Количество продуктов гидролиза измеряют с помощью спектрофотометрии [222].

Есть мнение, что по-настоящему качественная и быстрая оценка механизмов резистентности возможна только при использовании генетических или протеомных подходов [2]. Способы определения генов бета-лактамаз хорошо зарекомендовали себя при воспроизведении на основе мультиплексной

ПЦР и на ДНК-чипах. Серийно выпускающиеся наборы для мультиплексной ПЦР позволяют находить в чистых культурах и клиническом материале гены наиболее важных карбапенемаз синегнойной палочки – VIM, IMP, NDM, KPC, SPM, SIM, GIM, OXA [11, 18, 211]. Чип-технологии тоже показали себя в качестве перспективных диагностических систем: испытания чипа «Check-MDR CT103 XL» подтвердили его надежность для определения 23-х генетических детерминант резистентности, кодирующих наиболее актуальные ESBL, цефалоспорины и карбапенемазы грамотрицательных оппортунистических патогенов, включая *P. aeruginosa* [40].

Выявление эффлюкс- и порин-зависимых механизмов резистентности при помощи генетических методов является более сложным. Для этого необходимо секвенирование генов, контролирующих структуру и функции поринов и эффлюкс-помп. Реализация таких технологий в условиях больших потоков образцов в клинической микробиологической лаборатории в ближайшее время кажется неосуществимой. Более перспективными для решения этой задачи кажутся протеомные технологии на основе масс-спектрометрии [107]. Возможность осуществления структурного анализа поринов и эффлюкс-систем *P. aeruginosa* на основе матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ-ВП МС) была реализована почти десять лет назад [109].

Весьма интересным является масс-спектрометрическое определение дефектов ЛПС у устойчивых к колистину штаммов [135]. У липида А, экстрагированного из штаммов *P. aeruginosa* с повышенными МПК колистина, при помощи МАЛДИ-ВП МС (в качестве матрицы использовался норхарман) были обнаружены специфические изменения масс-спектра.

Присутствие бета-лактамаз тоже может выявляться при помощи масс-спектрометрии. Весьма перспективным методом оценки гидролиза карбапенемов является МАЛДИ-ВП МС [116]. Выявление продуцентов карбапенемаз с помощью масс-спектрометрии основано на оценке пиков,

специфичных для нативных и гидролизированных форм карбапенемов после инкубации исследуемого штамма с антибиотиком [157]. Процент гидролиза рассчитывается по отношению интенсивности пиков продуктов гидролиза к интенсивности пиков нативного препарата [159]. Способ пробоподготовки оказывает значительное влияние на результат теста. При использовании в качестве исследуемого материала белкового экстракта, полученного из изучаемого изолята, чувствительность и специфичность метода достигают 100% [159]. В случае исследования бактериальных клеток без предварительной процедуры экстракции чувствительность метода составляет 95%, специфичность - 97% [159]. При воспроизведении методов МС-оценки активности карбапенемаз следует учитывать особенности карбапенемов, используемых в реакции в качестве объектов гидролиза. Имипенем позволяет выявлять все типы карбапенемаз, включая ОХА-группу, но дает МС-сигналы слабой интенсивности. Интенсивность МС-сигналов продуктов гидролиза эртапенема более высокая при наличии у тестируемых штаммов всех типов карбапенемаз за исключением карбапенемаз группы ОХА-48, которые не гидролизуют эртапенем в данной тест-системе [159]. Результаты зависят от концентрации антибиотика в реакционной смеси и времени, требуемого для получения надежных результатов. Например, для выявления гидролиза эртапенема в концентрации 10 мг/мл штаммом с карбапенемазой КРС требуется 100 мин, а при снижении концентрации до 0,1 мг/мл — всего 30 мин [159].

В отношении синегнойной палочки определение карбапенемаз при помощи МАЛДИ-ВП МС оказалось менее воспроизводимым [106].

Изложенный в обзоре литературы материал свидетельствует об исключительной сложности механизмов резистентности у *P. aeruginosa*. Тем не менее, проведенный анализ позволяет сделать несколько важных выводов. Во-первых, выбор антибиотикотерапии при синегнойной инфекции должен быть обоснован с позиции молекулярных механизмов резистентности возбудителя. Во-вторых, существующие способы оценки механизмов резистентности *P.*

aeruginosa к карбапенемам не соответствуют требованиям современной медицины. В-третьих, назрела необходимость разработки и внедрения в микробиологическую практику новых методических подходов изучения устойчивости к карбапенемам, основанных на фенотипических, генетических и масс-спектрометрических технологиях.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1 Штаммы микроорганизмов

Объектами исследования являлись штаммы *P. aeruginosa* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии ФГАУ "Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей" Минздрава России, собранной в течение 2012 — 2016 гг. Штаммы изолированы от пациентов из 2-х лечебных учреждений города Москвы по принципу «один пациент — один (первый по времени) изолят». Для исследования отбирали изоляты, обладающие клинической значимостью: штаммы из стерильных локусов (кровь, моча, ликвор), штаммы из ануса новорожденных (возрастной период от рождения до 6 недель), изоляты из локусов с явными клиническими признаками воспаления при условии отсутствия других микробных этиологических факторов воспаления. Были выбраны все изоляты, нечувствительные к меропенему и/или имипенему. В качестве критериев нечувствительности для классификации изолятов использовали значения минимальных подавляющих концентраций (МПК), установленные Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (2015 г.) и Европейским комитетом по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, 2018) [5, 80]. Изоляты *P. aeruginosa* с МПК меропенема более 2 мкг/мл и/или с МПК имипенема более 4 мкг/мл считали нечувствительными к карбапенемам (карба-НЧ). Таким образом, к карба-НЧ изолятам относили карбапенемрезистентные изоляты и изоляты с промежуточной чувствительностью к карбапенемам. Для основной части исследования был отобран 51 карба-НЧ изолят. Для контроля в анализе механизмов резистентности были использованы 9 карбапенемчувствительных (карба-Ч) штаммов (МПК меропенема ≤ 2 мкг/мл и МПК имипенема ≤ 4 мкг/мл),

отобранные в случайном порядке, два штамма из коллекции American Type Culture Collection (ATCC): *P. aeruginosa* 27853 и *Escherichia coli* 25922.

2.2 Бактериологические методы

Определение МПК меропенема и имипенема для изолятов *P. aeruginosa* проводили в соответствии с частью 1 стандарта ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 «Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни» [4]. Для приготовления основных растворов антибиотиков использовали фосфатный буфер (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрации меропенема и имипенема (Sigma-Aldrich, США) в основных растворах составляли 40960 мкг/мл. Путем десятикратного разбавления основных растворов с последующими двукратными разведениями получали основные растворы с концентрациями в диапазоне от 1 до 4096 мкг/мл. Для дальнейшего анализа использовали основные растворы с концентрациями 40960 мкг/мл, 4096 мкг/мл, 512 мкг/мл, 64 мкг/мл, 8 мкг/мл и 1 мкг/мл. Для получения рабочих растворов с концентрациями в диапазоне от 0,25 мкг/мл до 4096 мкг/мл выбранные основные растворы разбавляли бульоном Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США) в два, четыре, восемь или десять раз по схеме, представленной в таб. 5 [4]. Рабочие растворы антибиотиков вносили в лунки планшетов для микроразведений (планшеты с круглым дном) по 50 мкл. Для приготовления инокулюма тестируемых изолятов использовали суточную культуру, выращенную на неселективной плотной питательной среде. Культуру вносили в бульон Мюллера-Хинтона так, чтобы конечная концентрация микроорганизмов составляла 5×10^5 КОЕ/мл (концентрацию получали путем 1000-кратного разведения суспензии микроорганизмов с мутностью 0,5 единиц по шкале МакФарланда).

Таблица 5

Схема приготовления рабочих растворов антибиотиков для определения чувствительности *P. aeruginosa* к меропенему и имипенему

Концентрация антибиотика в основном растворе, мкг/мл	Кратность разведения основного раствора	Концентрация антибиотика в рабочем растворе, мкг/мл
40960	10	4096
4096	2	2048
4096	4	1024
4096	8	512
512	2	256
512	4	128
512	8	64
64	2	32
64	4	16
64	8	8
8	2	4
8	4	2
8	8	1
1	2	0,5
1	4	0,25

Планшеты с микроразведениями антибиотков инокулировали исследуемыми штаммами (по 50 мкл) и инкубировали при 37°C. Учет результатов проводили через 18 часов. Минимальная концентрация антибиотика, при которой отсутствовали видимые признаки бактериального роста, соответствовала значению МПК (рис. 5).

Для постановки МБЛ-Е-теста использовали суточные культуры исследуемых штаммов *P. aeruginosa*, выращенные на агаре Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США). Суспензию бактериальных клеток с мутностью 0,5 единиц по шкале МакФарланда наносили на плотную питательную среду (агар Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США)) ватным тампоном. После нанесения суспензии

полоску МБЛ-Е-теста (BioMerieux, Франция) помещали на поверхность питательной среды. Среда инкубировалась 24 часа при 37°C. Результат учитывали по кратности уменьшения значения МПК имипенема на шкале «имипенем+ЭДТА» по сравнению со значением МПК на шкале «имипенем». Тест считали положительным при кратности уменьшения МПК равной или большей 8.

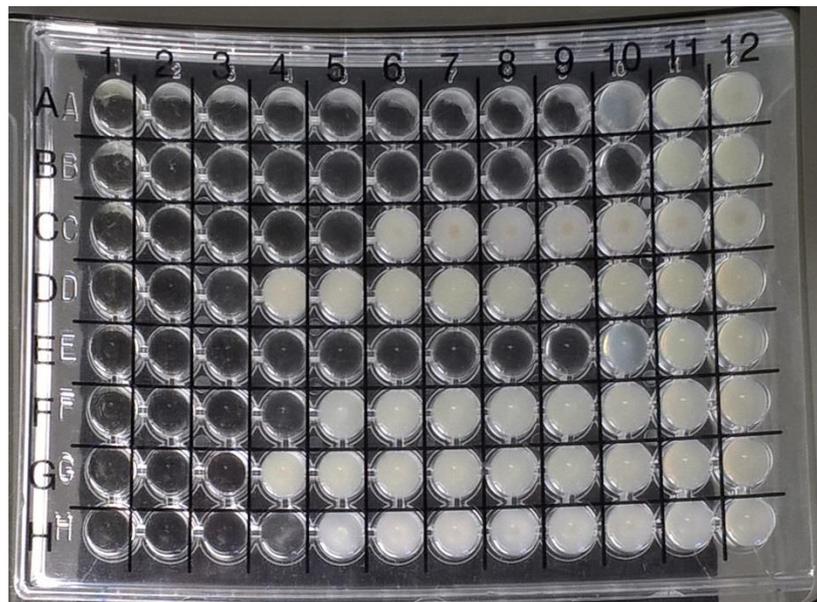


Рисунок 5. Пример определения МПК меропенема методом серийных разведений для штаммов *P. aeruginosa*

Примечание. Лунки планшета 1 – 11 – разведения концентраций меропенема в диапазоне от 2 до 2048 мкг/мл, лунка 1 – максимальная концентрация (2048 мкг/мл), лунка 11 – минимальная концентрация (2 мкг/мл), лунка 12 – контроль роста тестируемого штамма (без антибиотика); исследуемые штаммы расположены в рядах планшета А – Н: ряд А - *P. aeruginosa* 46-818, МПК 8 мкг/мл, ряд В - *P. aeruginosa* 48-1299, МПК 4 мкг/мл, ряд С - *P. aeruginosa* 49-442, МПК 128 мкг/мл, ряд D - *P. aeruginosa* 58-3816, МПК 512 мкг/мл, ряд Е - *P. aeruginosa* 56-883, МПК 8 мкг/мл, ряд F - *P. aeruginosa* 46-1619, МПК 256 мкг/мл, ряд G - *P. aeruginosa* 36-1747, МПК 512 мкг/мл, ряд Н - *P. aeruginosa* 36-1071, МПК 512 мкг/мл.

2.3 Молекулярно-генетические методы

Для выделения ДНК использовали суточные культуры исследуемых штаммов *P. aeruginosa*, выращенные на агаре Мюллера-Хинтона (Bio-Rad). Бактериальную ДНК выделяли с помощью набора «DNeasy Blood & Tissue Kit» (Qiagen, Германия) по протоколу фирмы-производителя. Полученные образцы хранили при -20°C.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для получения ампликонов гена *oprD* проводили с помощью амплификатора LightCycler96 (Roche, США). Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, включая 10 мкл реагента iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad, США), по 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, 5 нг исследуемой ДНК. Условия амплификации: преинкубация при 95°C в течение 5 минут, 37 циклов трехшаговой амплификации (95°C - 30 с, 60°C - 30 с, 72°C - 1 мин 15 с). Праймеры для амплификации и секвенирования гена *oprD* синтезировали в соответствии с известными рекомендациями [169, 198]. Последовательности праймеров приведены в таб. 6. В качестве положительного контроля использовали ДНК штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 2%-ном агарозном геле. Для приготовления геля использовали агарозу (Thermo Fisher Scientific, США) в буфере «ТВЕ» (Bio-Rad, США), в который добавляли этидиум бромид (Bio-Rad, США) до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Электрофорез проводили при напряжении 130 В в течение 30 минут в камере для горизонтального электрофореза (Bio-Rad, США). Для детекции ампликонов использовали систему гель-документации (Bio-Rad, США). Для определения размера ампликонов использовали маркеры длин ДНК «MassRuler™ DNA Ladder Mix» (Thermo Fisher Scientific, США).

Праймеры для амплификации и секвенирования гена *oprD* [169, 198]

Название	Последовательность
OprD_FlankF	5' - CGGCTGAGGGGAAAGTCGCC – 3'
OprD_FlankR	5' - TACGCGGTCATTCTCGGGCG – 3'
OprD.F	5' - GGAACCTCAACTATCGCCAAG – 3'
OprD.R	5' - GTTGCCTGTCGGTTCGATTAC – 3'
OprD2.F	5' - АСТТСАССГАСССГААСС – 3'
OprD2.R	5' - САГАТТГСССГАСССГААААТС – 3'

Для подготовки исследуемых ампликонов к реакции секвенирования осуществляли очистку с помощью набора реагентов «Shrimp Alkaline Phosphatase» и Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Условия реакции получения ампликонов для секвенирования: преинкубация при 96°C в течение 5 мин, 30 циклов трехшаговой амплификации (96°C - 15 с, 55°C - 10 с, 60°C - 4 мин). Секвенирование по методу Сэнгера проводили на секвенаторе 3500xL (Applied Biosystems, США) с помощью набора реагентов «BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты секвенирования обрабатывали с помощью программы Vector NTI Advance (<https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>). Подбор праймеров для секвенирования осуществляли с помощью программ Oligo 7 (<http://www.oligo.net/>) и Vector NTI Advance. Идентификацию IS-элементов проводили на основе базы данных «IS-finder» [212].

Экспрессию гена *oprD* оценивали в соответствии с международными рекомендациями по проведению экспериментов для анализа экспрессии генов [50]. РНК исследуемых изолятов выделяли с помощью набора реагентов RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Очистку полученных образцов РНК от остаточной ДНК и получение комплементарной ДНК (кДНК) осуществляли с помощью набора QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Германия). Реакцию обратной транскрипции (реакцию получения кДНК) проводили в течение 30 минут при 37°C. Концентрацию кДНК измеряли на приборе Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США), каждый образец стандартизовали так, чтобы концентрация кДНК составляла 2 нг/мкл. Образцы кДНК хранили при температуре -20°C. Реакцию ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора LightCycler96. Данные о флуоресценции обрабатывали с помощью программы LightCycler® 96 SW 1.1 (Roche, США). Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, включая 10 мкл реагента iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad, США), 1 мкМ каждого праймера, 0,5 мкМ FAM-меченого зонда, 2 нг кДНК. В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь без кДНК. Последовательности праймеров и зондов для гена *oprD* и внутреннего стандарта экспрессии (ген фактора транскрипции *rpoD*) указаны в таб. 7 [188]. Условия амплификации: преинкубация при 95°C в течение 5 минут, 34 цикла трехшаговой амплификации (94°C - 15 с, 61,5°C - 15 с, 72°C - 20 с). Специфичность продуктов амплификации подтверждали с помощью электрофореза в агарозном геле. В качестве контрольного штамма для расчета показателя экспрессии использовали штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Показатели экспрессии гена *oprD* рассчитывали по формуле:

$$R = (E_{oprD})^{\Delta C_t(\text{control} - \text{test})} / (E_{rpoD})^{\Delta C_t(\text{control} - \text{test})},$$

где R – показатель экспрессии гена *oprD*, $C_t \text{ test}$ – пороговый цикл тестируемого штамма, $C_t \text{ control}$ – пороговый цикл контрольного штамма, E_{oprD} – эффективность ПЦР с кДНК *oprD*, E_{rpoD} – эффективность ПЦР с кДНК *rpoD*. Во всех экспериментах эффективность ПЦР была равна 2, что соответствовало удвоению ДНК за каждый цикл амплификации [50]. Для каждого штамма эксперимент повторяли дважды, усредненные значения показателей экспрессии использовали для дальнейшего анализа.

Таблица 7

Праймеры для определения экспрессии генов *oprD* и *rpoD* [188]

Название	Последовательность
Праймеры для определения экспрессии гена <i>oprD</i>	
<i>oprD</i> _For	5-CTACGGCTACGGCGAGGAT-3
<i>oprD</i> _Rev	5-GACCGGACTGGACCACGТАCT-3
<i>oprD</i> _Probe	[DFAM] CACCACGAAACCAACCTCGAAGCC [DTAM]
Праймеры для определения экспрессии гена <i>rpoD</i>	
<i>RpoD</i> _For	5-GGGCTGTCTCGAATACGTTGA-3
<i>RpoD</i> _Rev	5-ACCTGCCGGAGGATATTTCC-3
<i>RpoD</i> _Probe	[DFAM]TGCGGATGATGTCTTCCACCTGTTCC [DTAM]

Тестирование изолятов на наличие генов карбапенемаз VIM, IMP и NDM проводили при помощи коммерческих наборов для ПЦР в реальном времени «MDR MBL-FL» (АмплиСенс) согласно протоколам фирмы-производителя (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора).

2.4 Статистические методы

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics) и Excel (Microsoft), используя общепринятые статистические критерии (медиана Me, 0,25- и 0,75-перцентили, коэффициенты корреляции Кендела и Спирмена, мера согласованности каппа Коэна k , критерий Манна-Уитни U , уровень значимости p) [3].

Глава 3. Роль бета-лактамаз в формировании нечувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам группы карбапенемов

3.1. Введение к главе

Одним из основных механизмов формирования резистентности *P. aeruginosa* к бета-лактамным антибиотикам является ферментативная инактивация с помощью бета-лактамаз. Как уже говорилось, из-за своей клинической значимости бета-лактамазы, активно гидролизующие антибиотики группы карбапенемов, были выделены в особую функциональную группу и получили название карбапенемаз [189]. Считается, что карбапенемазы вносят самый существенный вклад в развитие устойчивости *P. aeruginosa* к карбапенемам [197]. Бета-лактамазы, относящиеся к функциональному классу цефалоспориноаз, тоже способны к слабому гидролизу карбапенемов, хотя и реализуют карбапенемрезистентность только в синергизме с другими механизмами резистентности (см. «Обзор литературы»).

Выявление бета-лактамаз, гидролизующих карбапенемы, является крайне важным для клинической медицины, так как знание механизма резистентности дает возможность для назначения адекватной антибиотикотерапии. В частности, информация о продукции бета-лактамаз позволяет прогнозировать эффективность применения препаратов, защищенных ингибиторами бета-лактамаз.

Одним из перспективных методов оценки бета-лактамазной активности бактерий является масс-спектрометрия. При помощи масс-спектрометрии возможно быстро определить наличие у тестируемого штамма карбапенемаз. Проведено большое число исследований по масс-спектрометрической детекции карбапенемаз энтеробактерий, которые показали хорошо воспроизводимые результаты [122, 129, 207]. Более сложная ситуация складывается при выявлении карбапенемаз у *P. aeruginosa*. Разные авторские коллективы

предлагают разные условия эксперимента, изменяя состав растворов, в которых происходит гидролиз, время реакции и даже тип матрицы для МС [61, 105, 106, 116]. Это говорит о необходимости оптимизации МС-технологии выявления карбапенемаз у *P. aeruginosa*, которая приведет к разработке чувствительного и хорошо воспроизводимого метода, характеризующегося высокой специфичностью и простотой выполнения.

В настоящей главе проанализированы два практических подхода для оценки бета-лактамазной активности *P. aeruginosa*. Первый подход представляет собой модифицированный протокол детекции карбапенемаз у *P. aeruginosa* с помощью масс-спектрометрии. Второй методический подход направлен на количественную оценку цефалоспориновой активности по интенсивности гидролиза нитроцефина. Напомним, что исследование цефалоспориновой активности является актуальным при оценке карбапенемрезистентности у синегнойной палочки в связи с тем, что *P. aeruginosa* вырабатывает цефалоспориназу AmpC, гиперпродукция которой в комплексе с активацией эффлюкса и снижением пориновой проницаемости может обеспечивать устойчивость к карбапенемам.

3.2. Материалы и методы, использованные

для оценки роли бета-лактамаз в формировании нечувствительности
Pseudomonas aeruginosa к карбапенемам

Для решения задач, поставленных в данном разделе исследования, были использованы следующие способы: 1) фенотипическое определение наличия МБЛ у штаммов *P. aeruginosa*; 2) определение наличия генов карбапенемаз; 3) модифицированный метод масс-спектрометрической детекции карбапенемаз у клинических изолятов и музейных штаммов *P. aeruginosa*; 4) определение цефалоспориновой активности у изолятов *P. aeruginosa*, не продуцирующих МБЛ, при помощи теста с нитроцефином.

МПК меропенема и имипенема исследуемых изолятов определяли при помощи метода серийных разведений (см. главу «Материалы и методы исследования»). Дополнительно для оценки уровня резистентности были использованы два критерия: критерий МПК₅₀ меропенема подразумевал значение МПК для 50% исследованных штаммов, МПК₉₀ меропенема — для 90% исследованных штаммов.

Для фенотипического определения наличия карбапенемаз молекулярного класса В использовали МБЛ-Е-тесты (BioMerieux, Франция) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя (подробнее методика изложена в главе «Материалы и методы исследования»). Наличие МБЛ регистрировалось в случае 8-кратного уменьшения МПК имипенема в присутствии ЭДТА.

Тестирование изолятов на наличие генов карбапенемаз VIM, IMP и NDM проводили при помощи коммерческих наборов для ПЦР в реальном времени «MDR MBL-FL» (АмплиСенс) согласно протоколам фирмы-производителя (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Процедуры определения альтернативных механизмов резистентности (*oprD*-инактивация и гиперэффлюкс) описаны в главах 4 и 5, соответственно.

Для определения наличия карбапенемаз с помощью МАЛДИ-ВП МС использовали суточную культуру *P. aeruginosa*, выращенную на агаре Мюллера-Хинтона (BioRad, США). Материал, собранный бактериологической петлей (1 мкл) из одной колонии (диаметр 1,5-3,0 мм) добавляли к 0,2 мл базового раствора меропенема (1 мг/мл) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,2), содержащем ZnCl₂ (0,01 мг/мл), и тщательно вортиксовали. Процедуру повторяли с тремя колониями данного изолята. Раствор с тестируемым штаммом и антибиотиком инкубировали при 37°C в течение 3 ч при покачивании (240 движений в минуту), после чего останавливали реакцию добавлением 0,2 мл ацетонитрила. Раствор центрифугировали, надосадочную жидкость помещали на мишень. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (ДНВ, от англ. «2,5-*dihydroxybenzoic acid*»),

растворенную в концентрации 10 мг/мл в 50%-ном растворе метанола. Спектры снимали на масс-спектрометре Biotyper Microflex (Bruker, Германия) в диапазоне 100 - 1000 Да, спектры формировались по результатам не менее 240 лазерных импульсов. Все эксперименты повторяли трижды. В качестве негативного контроля использовали референс-штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, не продуцирующий карбапенемаз. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения flexAnalysis 3.3 (Bruker, Германия). Учитывали значения интенсивности пиков нативного антибиотика - $m/z = 384, 406, 428$ - и пиков продуктов его гидролиза - $m/z = 358, 380$. Процент гидролиза рассчитывали по формуле:

$$\text{ПГ} = \frac{\text{ППГ}}{(\text{ППГ} + \text{ПНА})} \times 100 - \text{ПГНК}, \text{ где}$$

ПГ - процент гидролиза, ППГ - сумма интенсивностей пиков продуктов гидролиза, ПНА - сумма интенсивностей пиков нативного антибиотика, ПГНК - процент гидролиза в негативном контроле. Наличие карбапенемазы у тестируемого штамма подтверждалось в случае регистрации гидролиза более 5%.

В качестве положительного контроля выявления карбапенемаз с помощью МБЛ-Е-теста, ПЦР и МАЛДИ-ВП МС использовали референсный штамм *P. aeruginosa* VIM-2 из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии (НИИАХ) ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, продуцирующий МБЛ VIM-2.

Для статистической обработки результатов использовали программный пакет IBM SPSS Statistics 20.0. Для сравнения эффективности трех методов оценки карбапенемазной активности - МБЛ-Е-тест, выявление генов карбапенемаз, МАЛДИ-ВП МС - рассчитывали стандартный статистический показатель, определяющий степень парной согласованности результатов, - меру согласованности κ (каппа Коэна). Каппа Коэна имеет максимум 1 при полной согласованности, и равна 0 в том случае, если согласованность между оценками

(тестами) наблюдается не чаще, чем можно было бы ожидать при случайном совпадении. Значения $k > 0,75$ считаются достаточной степенью согласованности [85].

Активность цефалоспоринов у МБЛ-отрицательных изолятов оценивали по степени гидролиза нитроцефина согласно методике, описанной Tam V.H. et al. в собственной модификации [222]. Суточную культуру *P. aeruginosa*, выращенную на агаре Мюллера-Хинтона, вносили в фосфатно-солевой буфер (pH = 7,2), содержащий $ZnCl_2$ (0,01 мг/мл). Концентрацию бактерий стандартизовали по оптической плотности, доводя до 1,5 единиц по шкале МакФарланда. В пробирку с 0,45 мл полученной суспензии помещали диск с нитроцефином (0,5 мг, Becton Dickinson, США). Инкубировали 30 мин при 37°C в при непрерывном покачивании (250 движений в минуту). После инкубации реакцию гидролиза останавливали путем добавления к реакционной смеси эквивалентного объема ацетонитрила. Пробирку центрифугировали при 10000g в течение 3 мин. Из надосадочной жидкости отбирали 0,2 мл и переносили в лунки 96-луночного планшета Nuclon Surface (лунки с плоским дном, производство - Thermo Fisher Scientific, США, кат. номер 167008). В качестве положительного бактериального контроля использовали референсный штамм *P. aeruginosa* VIM-2. В качестве негативного бактериального контроля применяли референс-штамм *Escherichia coli* ATCC 25922, не продуцирующий бета-лактамазы. В качестве негативного контроля активности нитроцефина использовали бумажные диски без антибиотика. Количественное определение продуктов гидролиза нитроцефина, образовавшихся под влиянием цефалоспоринов и карбапенемов, проводили на планшетном спектрометре Infinity M200 (Tecan, Австрия). Оптическую плотность супернатантов реакционной взвеси измеряли при длине волны 485 нм. Из полученных значений оптической плотности для каждого штамма вычитали показатель негативного контроля (бактерии с бумажными дисками без антибиотика). Результаты выражали в единицах оптической плотности (ед. ОП). В качестве

порогового значения гидролиза использовали 0,75-перцентиль выборки, содержащей значения гидролиза нитроцефина у всех изолятов *P. aeruginosa*, не обладающих МБЛ. Изоляты со значениями гидролиза нитроцефина выше верхнего перцентилля рассматривали как изоляты с гиперпродукцией природных цефалоспоринов.

3.3. Результаты и обсуждение

Уровень МПК меропенема карба-НЧ изолятов варьировал от 4 до 512 мкг/мл, МПК имипенема – от 2 до 512 мкг/мл. МПК₅₀ меропенема для всех карба-НЧ изолятов составила 32 мкг/мл, МПК₉₀ меропенема — 512 мкг/мл.

МБЛ-Е-тест (рис. 6) выявил наличие металло-бета-лактамаз у 15 из 51 (29%) карба-НЧ штаммов (МБЛ-положительные штаммы). Из них 20% (3/15) демонстрировали уменьшение МПК имипенема в присутствии ЭДТА в 128 раз, 13% (2/15) – в 85 раз, 6% (1/15) — в 64 раза, 20% (3/15) — в 43 раза, 35% (5/15) – в 32 раза, 6% (1/15) - в 24 раза. Ни у одного из карба-Ч изолятов не обнаружено металло-бета-лактамаз.

У всех МБЛ-положительных штаммов (15/51) был выявлен ген карбапенемазы типа *VIM*. Ни у одного из МБЛ-отрицательных штаммов (36/51) и ни у одного из карба-Ч изолятов не обнаружено генов карбапенемаз.

МПК₅₀ и МПК₉₀ меропенема для МБЛ-негативных штаммов составляли 16 мкг/мл и 128 мкг/мл, соответственно. МПК₅₀ и МПК₉₀ меропенема для МБЛ-положительных штаммов превышали соответствующие показатели МБЛ-негативных изолятов, составляя 256 мкг/мл и 512 мкг/мл. Средние показатели МПК имипенема ($Me = 512 (256; 512)$) и меропенема ($Me = 256 (256; 512)$) у МБЛ-положительных изолятов также значительно превышали соответствующие значения МБЛ-негативных изолятов (для меропенема $Me = 16 (8; 128)$),

для имипенема $Me = 16$ (16; 64) (рис. 7). Корреляционная связь между уровнем МПК изолята и наличием у него МБЛ была статистически значима (коэффициент корреляции Кендела для меропенема равен 0,86 ($p = 0,001$), для имипенема – 0,90 ($p = 0,001$)).

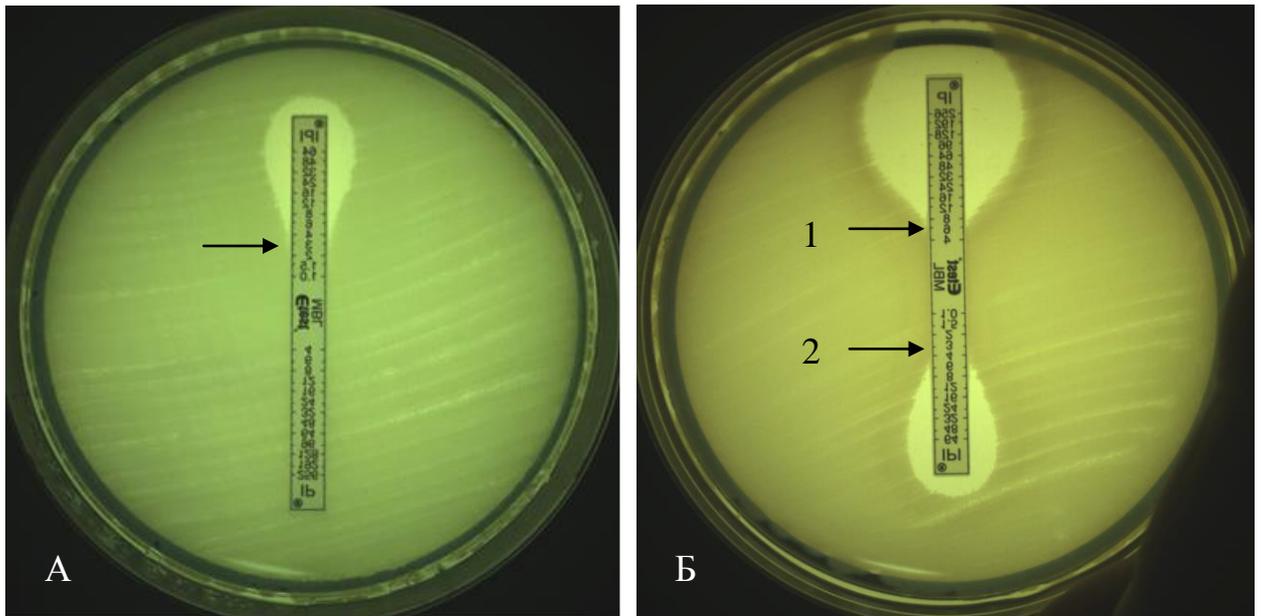


Рисунок 6. Примеры результатов выявления МБЛ у изолятов *P. aeruginosa* с помощью МБЛ-Е-теста

Примечание. А - *P. aeruginosa* 29-528, МБЛ-положительный штамм, МПК имипенема > 256 мкг/мл, МПК имипенема в присутствии ЭДТА - 4 мкг/мл (показано стрелкой), кратность уменьшения МПК в присутствии ЭДТА — 64; Б - *P. aeruginosa* 46-2598, МБЛ-отрицательный штамм, МПК имипенема 8 мкг/мл (стрелка 1), МПК имипенема в присутствии ЭДТА – 4 мкг/мл (стрелка 2).

По результатам выявления карбапенемаз с помощью МАЛДИ-ВП МС карбапенемазную активность демонстрировали 29% (15/51) штаммов (гидролиз-положительные штаммы), нечувствительных к карбапенемам. Процент гидролиза меропенема при тестировании данных штаммов составлял от 7,6 до 59,3%, $Me = 13,6$ (11,2; 38,8).

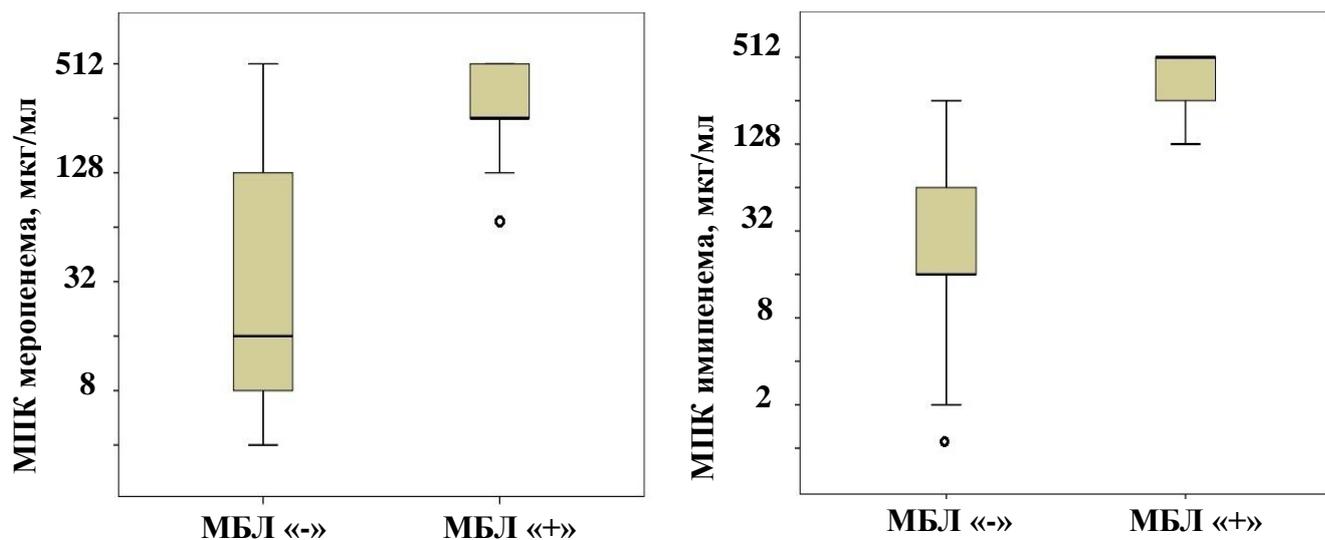


Рисунок 7. Значения МПК меропенема и имипенема у МБЛ-положительных и МБЛ-отрицательных изолятов *P. aeruginosa*

Примечание. МБЛ «+» - МБЛ-положительные изоляты; МБЛ «-» - МБЛ-отрицательные изоляты. Кругами отмечены показатели МПК, не входящие диапазон средних значений.

Пример масс-спектров гидролиз-положительных и гидролиз-отрицательных штаммов показан на рис. 8. Отсутствие карбапенемазной активности демонстрировали 71% (36/51) штаммов, нечувствительных к карбапенемам. Процент гидролиза при их тестировании составлял от 0 до 4%. Ни один из контрольных карба-Ч изолятов не проявлял карбапенемазной активности: процент гидролиза — от 0 до 4,2% (таб. 8).

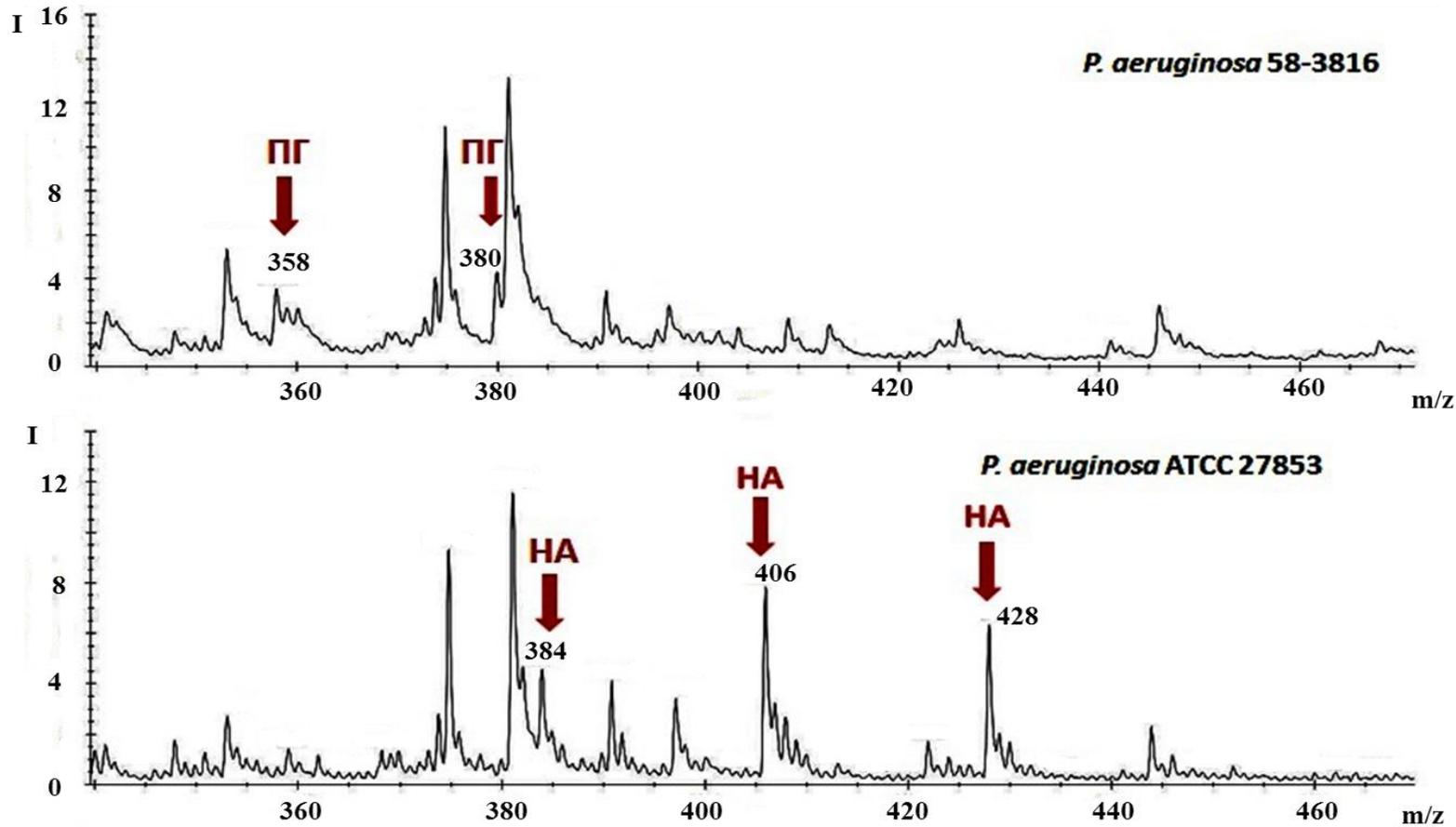


Рисунок 8. Пример спектров гидролиз-положительных и гидролиз-отрицательных штаммов после инкубации с меропенемом

Примечание. Вверху спектр гидролиз-положительного штамма *P. aeruginosa* 58-3816, внизу – гидролиз-отрицательного музейного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 после инкубации с меропенемом. ПГ – пики продуктов гидролиза меропенема ($m/z = 358, 380$); НА – пики нативного меропенема ($m/z = 384, 406, 428$); I – интенсивность пиков (1×10^3).

Таблица 8

Продукция МБЛ и гиперпродукция цефалоспоринов клинических изолятов *P. aeruginosa*

Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	МБЛ-Е-тест	Процент гидролиза меропенема	VIM	Активность цефалоспоринов	Другие механизмы резистентности
Карба-НЧ штаммы							
1. МБЛ-положительные штаммы							
Референс-штамм VIM-2 ¹			+	31,6	+	0,14	
29-528	256	512	+	42,46	+	Не показано ²	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
29-572	256	256	+	54,91	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация
39-381	256	512	+	27,65	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
39-648	256	512	+	59,32	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-36	512	512	+	9,29	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация
46-732	64	128	+	11,5	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
48-1223	256	512	+	9,12	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
49-118	512	512	+	12,9	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация
49-315	512	512	+	11,27	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация
49-442	128	512	+	16,06	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
57-213	256	256	+	11,2	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация
58-348	512	512	+	14,27	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация
58-3816	512	512	+	54,78	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация

Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	МБЛ-Е-тест	Процент гидролиза меропенема	VIM	Активность цефалоспоринов	Другие механизмы резистентности
68-158	256	256	+	7,58	+	Не показано	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-2068	128	128	+	21,22	+	Не показано	Не обнаружено
2. МБЛ-отрицательные штаммы							
36-1071	256	128	-	4,01	-	0,09	<i>oprD</i> -инактивация
36-1747	512	128	-	3,75	-	0,1	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
36-1758	16	32	-	0	-	0,02	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
36-2170	32	8	-	0	-	0	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
36-3185	256	128	-	0	-	0,09	<i>oprD</i> -инактивация
36-989	16	32	-	0	-	0,13	<i>oprD</i> -инактивация
46-1510	8	16	-	2,33	-	0,01	<i>oprD</i> -инактивация
46-1611	8	4	-	0	-	0,01	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-1619	256	128	-	0	-	0,19	<i>oprD</i> -инактивация
46-1976	16	32	-	0	-	0	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-2032	16	32	-	0	-	0,01	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-2598	4	8	-	0	-	0,01	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс

Продолжение таблицы 8

Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	МБЛ-Е-тест	Процент гидролиза меропенема	VIM	Активность цефалоспоринов	Другие механизмы резистентности
46-306	32	16	-	0	-	0,07	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-3109	512	256	-	0	-	0,09	<i>oprD</i> -инактивация
46-3122	8	2	-	0	-	0,09	Гиперэффлюкс
46-3126	256	128	-	0	-	0,14	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-3463	8	16	-	0	-	0,02	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-604	8	8	-	0	-	0,1	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-665	16	16	-	1,8	-	0,02	<i>oprD</i> -инактивация
46-814	4	32	-	0	-	0,09	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
46-818	8	16	-	0	-	0,01	<i>oprD</i> -инактивация
48-1231	8	16	-	0	-	0,02	<i>oprD</i> -инактивация
48-1299	4	16	-	0	-	0,01	<i>oprD</i> -инактивация
48-1330	8	2	-	0	-	0,01	<i>oprD</i> -инактивация
48-1558	4	16	-	0	-	0	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
48-1626	16	8	-	3,43	-	0	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
48-2049	256	256	-	1,76	-	0,09	<i>oprD</i> -инактивация
48-2374	8	8	-	0	-	0,02	<i>oprD</i> -инактивация

Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	МБЛ-Е-тест	Процент гидролиза меропенема	VIM	Активность цефалоспоринов	Другие механизмы резистентности
49-436	32	32	-	1,04	-	0	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
49-453	128	64	-	0	-	0,14	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
49-467	32	16	-	0	-	0,01	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
49-550	128	64	-	3,31	-	0,15	<i>oprD</i> -инактивация
56-883	8	16	-	1,5	-	0,01	<i>oprD</i> -инактивация
52-162	16	16	-	2,05	-	0,04	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
52-3482	4	1	-	0	-	0,11	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
49-621	64	16	-	3,31	-	0,14	<i>oprD</i> -инактивация, гиперэффлюкс
Карба-Ч штаммы (контроль)							
Референс-штамм <i>E. coli</i> ATCC 25922 ³						0	
1202	0,5	1	-	0	-	0	Не обнаружено
42-1739	1	2	-	2,07	-	0	Не обнаружено
44-1189	0,5	0,75	-	2,3	-	0	Не обнаружено
44-906	2	0,5	-	4,19	-	0	Не обнаружено
46-2027	0,5	0,5	-	0	-	0	Не обнаружено

Продолжение таблицы 8

Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	МБЛ-Е-тест	Процент гидролиза меропенема	VIM	Активность цефалоспориноз	Другие механизмы резистентности
46-2491	1	2	-	0	-	0	Не обнаружено
48-757	0,25	0,25	-	0	-	0	Не обнаружено
66-89	1	1	-	0	-	0,01	Не обнаружено
АТСС 27853	1	1	-	0	-	0	Не обнаружено

Примечания:

¹ - в качестве положительного контроля для определения карбапенемаз с помощью МБЛ-Е-теста, ПЦР в реальном времени и МАЛДИ-ВП МС и выявления гиперпродукции цефалоспориноз использовали референсный штамм *P. aeruginosa* VIM-2;

² - активность цефалоспориноз определяли только у МБЛ-отрицательных штаммов в связи с тем, что все известные МБЛ обладают сильной цефалоспоринозной активностью;

³ - в качестве негативного бактериального контроля для определения активности цефалоспориноз использовали референс-штамм *E. coli* АТСС 25922

Результаты, полученные с помощью МАЛДИ-ВП МС, генетического анализа (выявление генов карбапенемаз) и МБЛ-Е-теста характеризовались высокой степенью согласованности (рис. 9). Статистический показатель согласованности (каппа Коэна) результатов, полученных тремя методами, подтверждал их максимальную согласованность ($\kappa = 1, p = 0,001$).

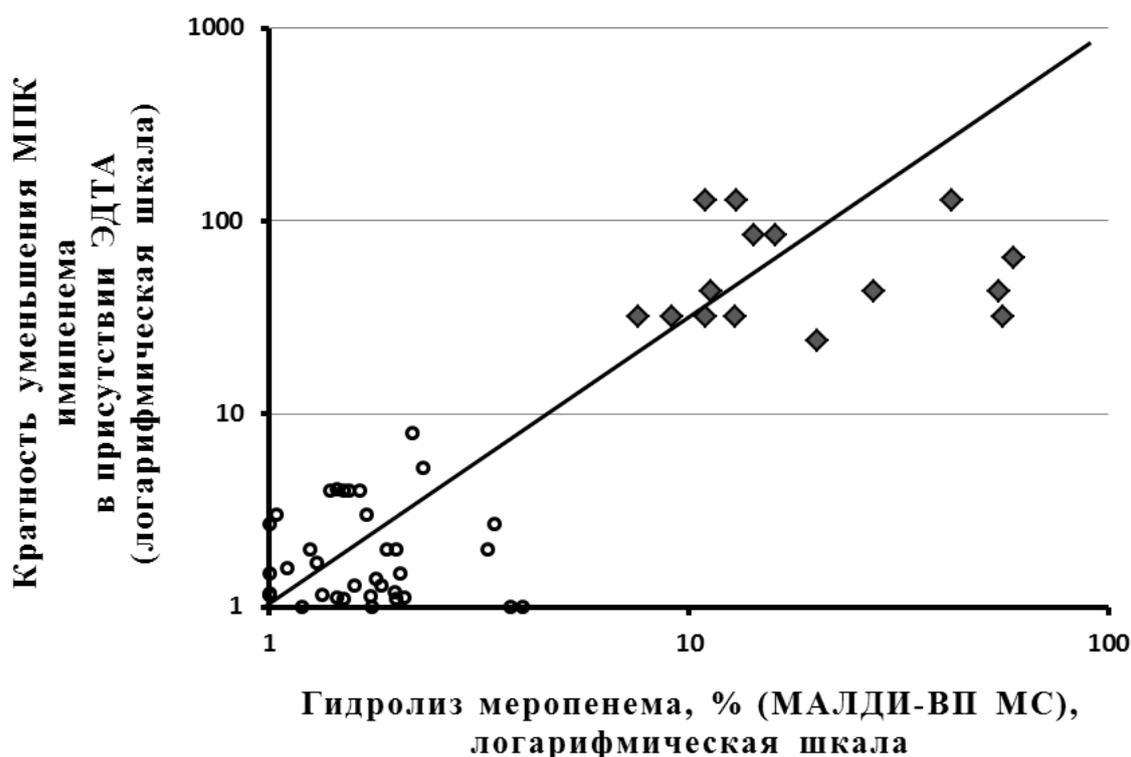


Рисунок 9. Карбапенемазная активность изолятов *P. aeruginosa*: результаты, полученные тремя методами (МБЛ-Е-тест, определение наличия генов карбапенемаз, гидролиз меропенема по результатам МАЛДИ-ВП МС)

Примечание. Белыми кругами показаны VIM-отрицательные штаммы, серыми ромбами – VIM-положительные штаммы.

Пример результатов выявления цефалоспоринозной активности у изолятов *P. aeruginosa* с помощью нитроцефина представлен на рис. 10.

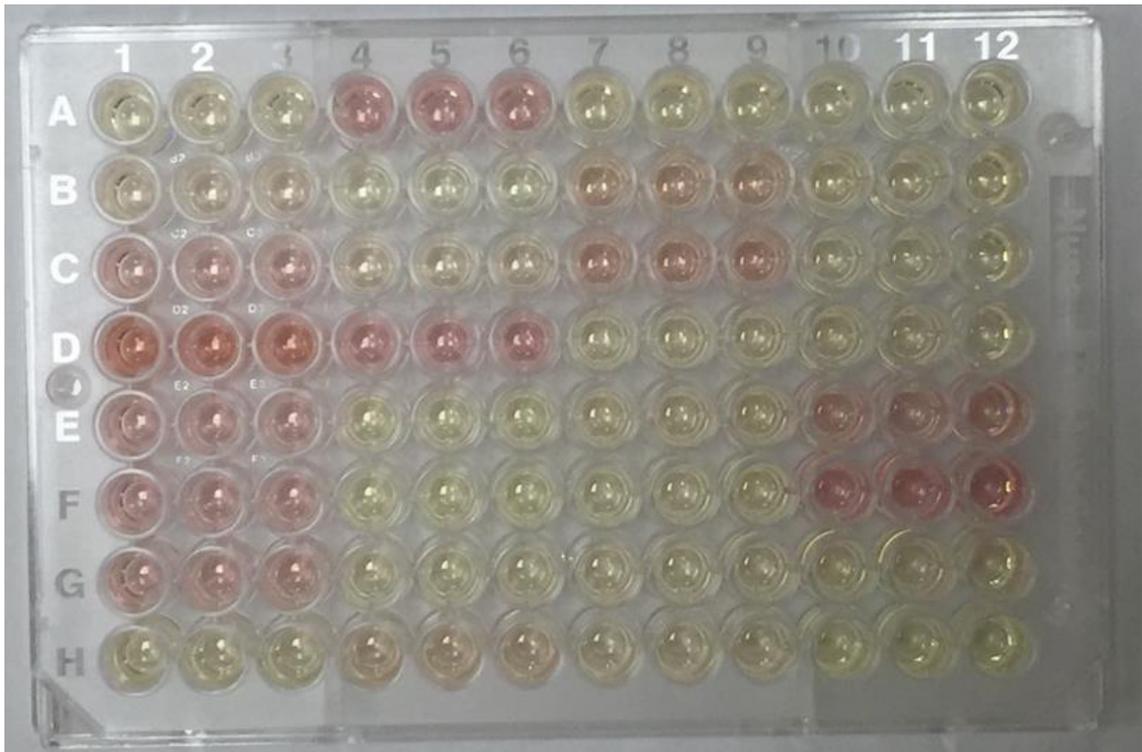


Рисунок 10. Пример результатов выявления цефалоспориновой активности у изолятов *P. aeruginosa* с помощью нитроцефина

Примечание. Лунки А1, А2, А3 – отрицательный бактериальный контроль *Escherichia coli* ATCC 25922, активность цефалоспориназ равна 0 ед. ОП; лунки А4, А5, А6 – положительный бактериальный контроль *P. aeruginosa* VIM-2, активность цефалоспориназ равна 0,14 ед. ОП; лунки Н10, Н11, Н12 - негативный контроль (бумажные диски без антибиотика); штаммы с гиперпродукцией цефалоспориназ (активность цефалоспориназ > 0,08 ед. ОП): *P. aeruginosa* 36-1071 (лунки В7, В8, В9), *P. aeruginosa* 36-3185 (лунки С1, С2, С3), *P. aeruginosa* 46-3109 (лунки С7, С8, С9), *P. aeruginosa* 46-1619 (лунки D1, D2, D3), *P. aeruginosa* 46-604 (лунки D4, D5, D6), *P. aeruginosa* 46-814 (лунки E1, E2, E3), *P. aeruginosa* 48-2049 (лунки E10, E11, E12), *P. aeruginosa* 46-3122 (лунки F1, F2, F3), *P. aeruginosa* 49-550 (лунки F10, F11, F12), *P. aeruginosa* 36-1747 (лунки G1, G2, G3); в остальных триплетах лунок - штаммы без гиперпродукции цефалоспориназ.

Результаты выявления цефалоспориновой активности исследованных штаммов представлены в таб. 8. Показатели гидролиза нитроцефина у всех МБЛ-негативных изолятов *P. aeruginosa* (n = 45) колебались в диапазоне от 0 до

0,19 ед. ОП, Me = 0,02 (0,00; 0,08). В качестве порога («cut off») для оценки гиперпродукции AmpC было установлено значение верхнего процентиля, равное 0,08 ед. ОП.

Показатели гидролиза нитроцефина карба-НЧ МБЛ-негативных изолятов (n = 36) регистрировались в диапазоне от 0 до 0,19 ед. ОП, Me = 0,03 (0,01; 0,1). Всего среди МБЛ-негативных изолятов было выявлено 44,6% (15/36) изолятов с гиперпродукцией цефалоспоринов. Гидролиз нитроцефина у референсного VIM-2-позитивного изолята *P. aeruginosa* составлял 0,14 ед. ОП. Негативный по цефалоспориновым референс-штамм *E. coli* ATCC 25922 демонстрировал нулевую активность гидролиза нитроцефина. Значения МПК меропенема у штаммов с гиперпродукцией цефалоспоринов регистрировались в диапазоне от 4 до 512 мкг/мл (Me = 128 (16; 256)), имипенема – от 1 до 256 мкг/мл (Me = 64 (32; 128)). На рис. 11 показано распределение изолятов *P. aeruginosa* в зависимости от МПК меропенема и активности гидролиза нитроцефина. Корреляционная связь между уровнем МПК изолята и гиперпродукцией цефалоспоринов была статистически значимой: коэффициент корреляции Кендела для меропенема был равен 0,78 ($p = 0,001$), для имипенема – 0,81 ($p = 0,001$).

Среди генов карбапенемаз у изученных штаммов *P. aeruginosa* были обнаружены лишь гены металло-бета-лактамаз группы VIM. Их несли почти 30% карба-НЧ изолятов. Эти же изоляты демонстрировали фенотипические признаки наличия МБЛ. Изоляты, не обладающие *bla*_{VIM}-генами, фенотипически не проявляли МБЛ-активность. Следовательно, опосредованная каноническими карбапенемазами устойчивость к карбапенемам среди исследованных штаммов была связана исключительно с МБЛ VIM-типа. Следует признать, что VIM-карбапенемазы являются доминирующими среди карбапенемрезистентных клинических изолятов, циркулирующих в России. Доля МБЛ-положительных изолятов среди всех нозокомиальных изолятов,

нечувствительных к карбапенемам, в 2002-2010 годах составила 28,7%, среди которых носительство *bla*_{VIM-2}-генов достигало 99,6% [75].

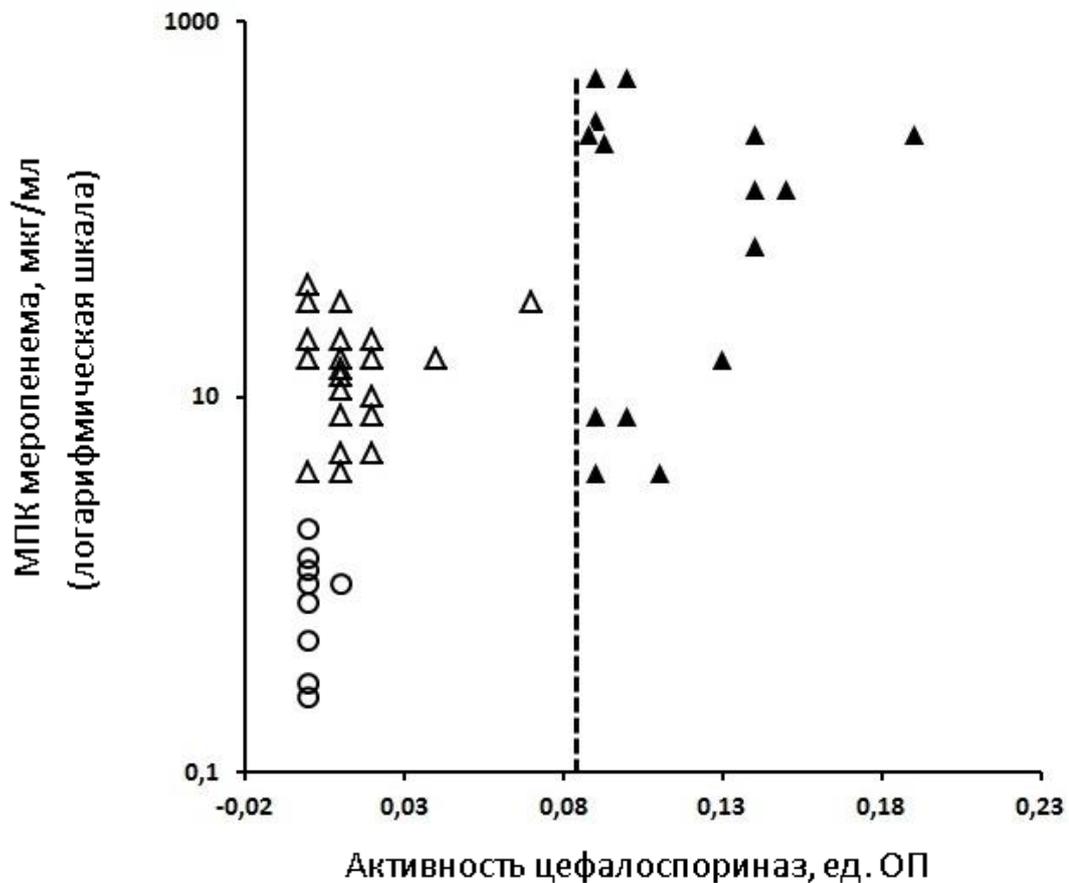


Рисунок 11. Активность цефалоспоринов и значения МПК меропенема карба-Ч и карба-НЧ МБЛ-отрицательных изолятов *P. aeruginosa*

Примечание. Белыми кругами показаны карба-Ч изоляты; белыми треугольниками – карба-НЧ изоляты без гиперпродукции цефалоспоринов; серыми треугольниками – карба-НЧ изоляты с гиперпродукцией цефалоспоринов; пунктирной линией обозначено пороговое значение для оценки гиперпродукции цефалоспоринов.

Данные о наличии карбапенемаз, полученные традиционными методами, были подтверждены путем обнаружения продуктов гидролиза меропенема при помощи МАЛДИ-ВП МС. Хотя масс-спектрометрия и признана надежным инструментом для детекции бета-лактамаз у отдельных групп бактерий, ее эффективность для определения карбапенемаз у *P. aeruginosa*, до настоящего

времени оставалась под сомнением. Некоторые методики, успешные для энтеробактерий, оказываются неподходящими для тестирования *P. aeruginosa*. Примером этого является МС-оценка карбапенемаз у *K. pneumoniae* в работе A. Johansson et al.: все штаммы, продуцирующие карбапенемазы KPC, VIM и NDM, выявляются с помощью МАЛДИ-ВП МС. Однако, данный подход не позволяет достоверно определять продуцентов карбапенемаз среди штаммов *P. aeruginosa*: лишь у 6 из 11 VIM-продуцирующих изолятов были получены положительные результаты [116]. Для повышения достоверности результатов необходим правильный подбор условий анализа: антибиотик-индикатор и его концентрация, время инкубации, матрица для МАЛДИ-ВП МС.

Для подтверждения эффективности метода МАЛДИ-ВП МС при оценке карбапенемазной активности у *P. aeruginosa* мы синтезировали подход, объединив методику Hrabak J. et al. (2011) и статистическую обработку результатов Monteferrante C.G. et al. (2016) [106, 159]. В первой из этих работ было установлено, что оптимальным антибиотиком-индикатором зависимо от карбапенемаз гидролиза для *P. aeruginosa* является меропенем, а оптимальной матрицей - ДНВ. Выбор матрицы связан с тем, что целевые пики нативного меропенема и продуктов его гидролиза скрываются шумами, создаваемыми сигналами стандартной матрицы для масс-спектрометрии - α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Матрица ДНВ не создает шумов, критично маскирующих целевые пики. Однако, при данных условиях возникают случаи ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Следовательно, учет наличия/отсутствия сигналов нативного антибиотика и продуктов его гидролиза не позволяет правильно оценить карбапенемазную активность тестируемых штаммов и требуется дополнительная статистическая обработка сигналов. Такая обработка была предложена Monteferrante C.G., et al. (2016) для оценки бета-лактамазной активности энтеробактерий [159]. Проведенные эксперименты показали полное соответствие результатов, полученных при помощи МАЛДИ-ВП МС и посредством традиционных методов. Это

доказывает перспективность использования масс-спектрометрии для оценки продукции карбапенемаз клиническими штаммами *P. aeruginosa*.

Анализ полученных в настоящем разделе результатов позволяет сделать следующие выводы: 1) в формировании устойчивости *P. aeruginosa* к карбапенемам важнейшая роль принадлежит металло-бета-лактамазам группы VIM, присутствие которых определяет высокие уровни МПК карбапанемов; 2) МАЛДИ-ВП МС является перспективным методом в практике клинической микробиологии для выявления изолятов *P. aeruginosa*, продуцирующих карбапенемазы; 3) формирование устойчивости к карбапенемам может происходить при участии цефалоспоринов, гиперпродукция которых детектируется по интенсивности гидролиза нитроцефина; 4) инактивация карбапанемов при помощи бета-лактамаз – МБЛ и цефалоспоринов – в 96% случаев сочетается у *P. aeruginosa* с альтернативными механизмами формирования карбапанемрезистентности, включая нарушение пориновой проницаемости и/или гиперактивностью эффлюкс-помп; 5) для полного понимания механизмов нечувствительности синегнойной палочки к карбапанемам, необходимо комплексное исследование, приоритет которого должен быть нацелен на выявление карбапанем-гидролизующей активности бета-лактамаз *P. aeruginosa*.

Глава 4. Роль порина OprD в формировании нечувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам группы карбапенемов

4.1. Введение к главе

Один из важнейших механизмов резистентности бактерий реализуется за счет нарушения транспорта антибиотика до своей мишени [14]. Для воздействия на синегнойную палочку карбапенемы должны попасть в периплазматическое пространство, то есть проникнуть через наружную мембрану. Как уже говорилось, карбапенемы используют для этого естественно существующие в мембране протеиновые каналы, которые называют поринами (см. «Обзор литературы»).

По данным зарубежных исследователей, от 30 до 90% карбапенемрезистентных штаммов *P. aeruginosa* имеют значимые повреждения структуры *oprD*-гена и/или отличаются снижением его экспрессии [200, 204, 241]. О нарушениях *oprD* среди штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих на российской территории, информации нет.

Настоящая глава посвящена анализу роли генов *oprD* в формировании нечувствительности клинических изолятов *P. aeruginosa* к карбапенемам.

4.2. Материалы и методы, использованные для оценки роли порина OprD в формировании нечувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам

Генетическую структуру поринов обычно оценивают с помощью секвенирования последовательностей генов исследуемых штаммов и последующего сравнения полученных сиквенсов с последовательностью гена контрольного штамма [179, 241]. На основе секвенирования гена *oprD* производят построение 3D-модели порина с указанием локализации поврежденных участков [169]. Данные методы позволяют выявлять

полиморфизмы и структурные изменения OprD, но не дают представления о его функциональной полноценности.

О функционировании порина можно судить по уровню экспрессии *oprD*-гена [188]. Фенотипически функцию порина OprD оценивают по проникновению внутрь клетки специфических для OprD субстратов, например, аргинина [125]. Кинетика роста нормальных и OprD-дефектных штаммов *P. aeruginosa* на среде, содержащей L-аргинин в качестве единственного источника углерода, указывает на отставание в росте штаммов с поврежденным порином OprD. Метод позволяет выявить сниженную функциональную активность порина или ее полное отсутствие.

В настоящем исследовании дизайн оценки генов *oprD* включал два этапа. На первом этапе у изолятов *P. aeruginosa* определяли генетические нарушения путем секвенирования гена *oprD* и фланкирующих его областей с последующим сравнением полученных нуклеотидных последовательностей с *oprD*-геном музейного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853. На втором этапе исследовали только изоляты, у которых на первом этапе не были обнаружены мутации, ведущие к обрыву синтеза OprD. У них определяли уровень экспрессии *oprD*-гена. При анализе результатов проводили сопоставление структурных нарушений гена *oprD* и нарушений его экспрессии с уровнями МПК меропенема и имипенема, а также с наличием альтернативных механизмов резистентности.

Объектом исследования были 60 штаммов *P. aeruginosa*. Штаммы отбирали из коллекции лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» в соответствии с критериями, описанными выше (см. главу «Материалы и методы исследования»). В качестве референсного изолята использовали штамм из Американской коллекции типовых клеточных культур *P. aeruginosa* ATCC 27853. Процедуры выявления альтернативных (бета-лактамазных и эффлюкс-зависимых) механизмов резистентности описаны в Главах 3 и 5, соответственно.

Для всех изолятов проводили секвенирование гена *oprD* и фланкирующих его областей, включая регион промотора. Методики получения ампликонов и секвенирования *oprD* описаны в главе «Материалы и методы исследования». Размеры ампликонов контролировали методом электрофореза в агарозном геле по методике, изложенной в главе «Материалы и методы исследования». Для секвенирования вставочных элементов, которые были обнаружены в гене *oprD*, использовали праймеры, последовательности которых указаны в таб. 9. Их последовательности отбирали с помощью программ Oligo 7 (Molecular Biology Insights) и Vector NTI Advance (Thermo Fisher Scientific, США). Идентификацию IS-элементов проводили на основе базы данных «IS-finder» [212].

Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, включая 10 мкл реагента iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad, США), 0,5 мкМ каждого праймера, 5 нг исследуемой ДНК. Условия амплификации: преинкубация при 95°C в течение 5 мин, 37 циклов трехшаговой амплификации (95°C - 30 с, 60°C - 30 с, 72°C - 1 мин 15 с).

Ампликоны очищали с помощью набора реагентов «Shrimp Alkaline Phosphatase» и Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Секвенирование по методу Сэнгера проводили на секвенаторе 3500xL (Applied Biosystems, США) с помощью набора реагентов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу фирмы-изготовителя. IS-элементы ISPsmel секвенировали с помощью праймеров IS 81_1 F и IS 81_2 F, ISPa1328 – с помощью праймеров IS 678 F, IS 678_1 R и IS 678_2 R, ISPa26 – с помощью праймеров IS 66_1F и IS 66_2F, ISPst2 – с помощью праймеров IS 701_1R, IS 701_2R, IS 701_1F, IS 701_2F, IS 701_3R, IS 701_4R, ISPa195 – с помощью праймеров IS 195_1 F и IS 195_2 F (таб. 9).

Праймеры для секвенирования IS-элементов

Название	Последовательность
IS 81_1 F	5' – ТААТСГСГТАТСГАТААССГА – 3'
IS 81_2 F	5' – АГСССГСГАГСГТСТАГГТГАТТ – 3'
IS 195_1 F	5' – ААГТКАТКААТГАСГТТГАСГА – 3'
IS 195_2 F	5' – ТКАТГКАТАААГТССАТТГАССАА – 3'
IS 678 F	5' – ТСГАТСТСГААГСГГГССАСТТКА – 3'
IS 678_1 R	5' - СКААТСГГСАГГТАГТСГТКАТСС – 3'
IS 678_2 R	5' - ТТГГТГГТГАТАТКАССТТТСГГ – 3'
IS 66_1F	5' - ТГТГСАКААГСССГГАСТКАТСГТ – 3'
IS 66_2F	5' - ТГАСГТТТГГСАССГААГАТА – 3'
IS 701_1R	5' - АГААГСГСТССТТГТГСТСГА – 3'
IS 701_2R	5' - АТГГТГГСТАТССАСТСГТССА – 3'
IS 701_1F	5' - ТТГААТГТКАТСТКААСТССАА – 3'
IS 701_2F	5' - ТСТКААСТССААГАСГСТСТА – 3'
IS 701_3R	5' - ГТГГАТГГГСАГАТКАСГАТА – 3'
IS 701_4R	5' - ТТГСАГГСССГГСАГГТГАТ – 3'

Сравнение полученных последовательностей *oprD* с последовательностью гена *oprD* чувствительного референс-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 осуществляли с помощью программы Vector NTI Advance (Thermo Fisher Scientific, США).

У изолятов без мутаций, ведущих к обрыву синтеза OprD, определяли уровень экспрессии данного гена. Методика выделения РНК, а также технология определения количества РНК и расчет показателя экспрессии описаны в главе «Материалы и методы исследования». Оценку уровня экспрессии проводили следующим образом. Для выборки, состоящей из

чувствительных изолятов, были определены медиана (Me) и процентиля (0,25; 0,75) значений показателя экспрессии. Значения показателя экспрессии, которые были меньше нижнего процентиля, считали пониженными. Значения показателя экспрессии, равные или превышающие 0,25-процентиль, считали нормальными.

Статистическую и биоинформационную обработку полученных результатов проводили при помощи программных пакетов IBM SPSS Statistics 20.0 и Vector NTI Advance (Thermo Fisher Scientific, США).

4.3. Результаты и обсуждение

Подробные количественные характеристики устойчивости к карбапенемам у исследованных изолятов *P. aeruginosa* были описаны выше (см. Главу 3).

В результате проведенного электрофореза ампликонов гена *oprD* и сравнения полученных ампликонов с референсными маркерами длин ДНК было установлено, что 47/60 (78,3%) ампликонов имели размеры порядка 1300 п. н. (нормальный ген имеет длину 1332 п. н.). У 13/60 (21,7%) полученных ампликонов размеры значительно превышали норму, имея длину более 2000 п. н. (рис. 12).

В результате секвенирования ампликонов были получены данные о последовательностях нуклеотидов в генах *oprD* у 60 исследуемых штаммов. Было обнаружено два типа повреждений генетической структуры. К первой группе (тип 1) были отнесены изоляты с заменами аминокислот в *oprD*. Ко второй группе (тип 2) – изоляты с мутациями, ведущими к обрыву синтеза *OprD* (преждевременным стоп-кодоном, сдвигом рамки считывания вследствие делеции или инсерции нуклеотидов, а также изоляты с IS-элементом в гене *oprD*).

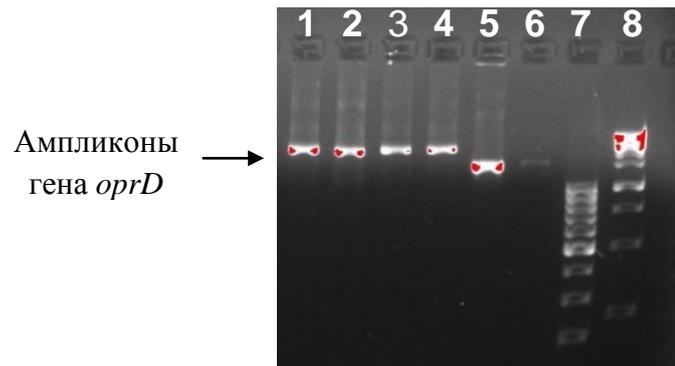


Рисунок 12. Пример электрофореза продуктов амплификации гена *oprD*

Примечание. 1 – 4 – «удлиненные» ампликоны *oprD* (> 2000 п. н.); 5 – ампликон *oprD* нормальной длины контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 (порядка 1300 п. н.); 6 – отрицательный контроль амплификации (проба без ДНК); 7 – 8 – маркеры длин ДНК.

Число изолятов в первой группе составило 16/60 (27%), из них у четырех изолятов выявлена замена одной аминокислоты, у 12 – замены двух и более аминокислот. Во второй группе число изолятов составило 44/60 (73%), при этом преждевременный стоп-кодон обнаружен у 16/44 (36%) изолятов, сдвиг рамки считывания вследствие делеции или инсерции нуклеотидов – у 15/44 (34%) изолятов, повреждение *oprD* IS-элементом – у 13/44 (30%) изолятов. Всего обнаружено 24 вида повреждений гена второго типа, в том числе 7 разновидностей стоп-кодонов, 5 разновидностей инсерций, 7 разновидностей делеций и 5 разновидностей IS-элементов (таб. 10). IS-элементы ISPa195, ISPsme1 и ISPst2 были обнаружены у *P. aeruginosa* впервые. ISPa195 не имел гомологии с описанными вставочными последовательностями и был зарегистрирован в базе данных GenBank под номером MF770250, депонирован в базах данных BioProject (режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/436637>) и IS-finder (режим доступа: <https://isfinder.biotoul.fr/scripts/ficheIS.php?name=ISPa195>). Уровень показателя экспрессии *oprD* у карба-Ч штаммов колебался от 0,6 до 1,3 (Me = 1,0 (0,8; 1,2)), поэтому в качестве нижней границы нормального уровня экспрессии гена было выбрано значение 0,8.

Значение типа структуры гена *oprD* в формировании карбапенемнечувствительности у *P. aeruginosa*

Тип <i>oprD</i>	Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	Классификация по типу <i>oprD</i>	Замены аминокислот ¹ и мутации, ведущие к обрыву синтеза OprD	Показатель экспрессии	Наличие других механизмов резистентности
	ATCC 27853	1	1	Нет нарушений	Нет нарушений	1	Не обнаружено
1				Замены аминокислот			
1a	1202	0,5	1	Замена одной аминокислоты	D ₅₂ N	0,80	Не обнаружено
	66-89	1	1			0,60	Не обнаружено
	46-2491	1	2			0,91	Не обнаружено
	44-906	2	0,5			1,20	Не обнаружено
16	46-3122	8	2	Замены нескольких аминокислот	D ₅₂ N, G ₁₈₃ D	1,10	Гиперэффлюкс, гиперпродукция ЦФ
	46-2598	4	8			D ₅₂ N, R ₁₅₄ C	0,64
	44-1189	0,5	0,25		N ₄₃ D, D ₅₂ N, V ₁₂₇ L, E ₁₈₅ Q, P ₁₈₆ G, V ₁₈₉ T, S ₂₆₇ A, T ₂₇₆ A, G ₃₁₀ E, A ₃₁₅ G, L ₃₄₇ M, L ₃₅₉ V, S ₄₀₁ A, Q ₄₂₂ E	0,96	Не обнаружено
	42-1739	1	2			1,30	Не обнаружено

Продолжение таблицы 10

Тип <i>oprD</i>	Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	Классификация по типу <i>oprD</i>	Замены аминокислот ¹ и мутации, ведущие к обрыву синтеза <i>OpnD</i>	Показатель экспрессии	Наличие других механизмов резистентности
16	36-2170	32	8	Замены нескольких аминокислот	N ₄₃ D, D ₅₂ N, V ₁₂₇ L, E ₁₈₅ Q, P ₁₈₆ G, V ₁₈₉ T, S ₂₆₇ A, T ₂₇₆ A, G ₃₁₀ E, A ₃₁₅ G, L ₃₄₇ M, L ₃₅₉ V, S ₄₀₁ A, Q ₄₂₂ E, L ₄₃₂ P	0	Гиперэффлюкс
	46-814	4	32		D ₅₂ N, E ₅₇ S, R ₅₉ S, T ₁₀₃ S, K ₁₁₅ T, F ₁₇₀ L, Q ₂₀₂ E, A ₂₁₀ I, K ₂₃₀ E, T ₂₄₀ S, T ₂₆₂ N, S ₂₆₇ A, G ₂₈₁ A, Q ₂₉₆ K, E ₃₀₁ Q, G ₃₁₀ R, L ₃₅₉ V, ³⁷² (VDSSSS-YAGL) ₃₈₃ ²	0,40	Гиперэффлюкс, гиперпродукция ЦФ
	46-2027	0,5	0,5		N ₄₃ D, D ₅₂ N, , R ₅₉ S, T ₁₀₃ S, K ₁₁₅ T, F ₁₇₀ L, Q ₂₀₂ E, A ₂₁₀ I, K ₂₃₀ E, T ₂₄₀ S, T ₂₆₂ N, S ₂₆₇ A, G ₂₈₁ A, Q ₂₉₆ K, E ₃₀₁ Q, G ₃₁₀ R, L ₃₅₉ V, ³⁷² (VDSSSS-YAGL) ₃₈₃	1,25	Не обнаружено
	49-621	64	16		N ₄₃ D, D ₅₂ N, E ₅₇ S, R ₅₉ S, F ₁₄₈ C, A ₁₄₉ G, A ₁₅₀ T, Q ₂₀₂ E, A ₂₁₀ I, K ₂₃₀ E, T ₂₄₀ S, T ₂₆₂ N, S ₂₆₇ A, G ₂₈₁ A, Q ₂₉₆ K, E ₃₀₁ Q, G ₃₁₀ R, L ₃₅₉ V, ³⁷² (VDSSSS-YAGL) ₃₈₃	0,08	Гиперэффлюкс, гиперпродукция ЦФ

Продолжение таблицы 10

Тип <i>oprD</i>	Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	Классификация по типу <i>oprD</i>	Замены аминокислот ¹ и мутации, ведущие к обрыву синтеза <i> OprD</i>	Показатель экспрессии	Наличие других механизмов резистентности
16	48-757	0,25	0,25	Замены нескольких аминокислот	N ₄₃ D, D ₅₂ N, E ₅₇ S, R ₅₉ S, T ₁₀₃ S, K ₁₁₅ T, F ₁₇₀ L, E ₁₈₅ Q, P ₁₈₆ G, V ₁₈₉ T, Q ₂₀₂ E, A ₂₁₀ I, K ₂₃₀ E, T ₂₄₀ S, T ₂₆₂ N, S ₂₆₇ A, G ₂₈₁ A, Q ₂₉₆ K, E ₃₀₁ Q, G ₃₁₀ E, A ₃₁₅ G, L ₃₅₉ V, ³⁷² (VDSSSS-YAGL) ₃₈₃ , G ₄₂₃ A	1,15	Не обнаружено
	46-2068	128	128			1,29	КП
	46-732	64	128			0	Гиперэффлюкс, КП
2				Мутации, ведущие к обрыву синтеза <i> OprD</i>			
2а	49-550	128	64	Преждевременный стоп-кодон (TAG) вследствие замены нуклеотидов	nt 375,376CC→AG	Не показано ³	Гиперпродукция ЦФ
	46-3463	8	16		nt 629G→T	Не показано	Гиперэффлюкс
	48-1626	16	8		nt 962C→T	Не показано	Гиперэффлюкс
	58-3816	512	512		nt 1092G→A	Не показано	КП
	46-1976	16	32		nt 1094C→T	Не показано	Гиперэффлюкс

Тип <i>oprD</i>	Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	Классификация по типу <i>oprD</i>	Замены аминокислот ¹ и мутации, ведущие к обрыву синтеза <i>OpnD</i>	Показатель экспрессии	Наличие других механизмов резистентности
2а	46-2032	16	32	Преждевременный стоп-кодон (TAG) вследствие замены нуклеотидов	nt 1094C→T	Не показано	Гиперэффлюкс
	49-436	32	32			Не показано	Гиперэффлюкс
	49-118	512	512		nt 1274C→T	Не показано	КП
	36-1747	512	128		nt 1321G→A	Не показано	Гиперэффлюкс, гиперпродукция ЦФ
	36-1071	256	128			Не показано	Гиперпродукция ЦФ
	46-3109	256	256			Не показано	Гиперпродукция ЦФ
	46-3126	256	128			Не показано	Гиперэффлюкс, гиперпродукция ЦФ
	52-3482	4	1			Не показано	Гиперэффлюкс, гиперпродукция ЦФ
	48-2049	256	256			Не показано	Гиперпродукция ЦФ
	36-3185	256	128			Не показано	Гиперпродукция ЦФ
	46-1619	256	128			Не показано	Гиперпродукция ЦФ
2б	46-36	512	512	Сдвиг рамки считывания вследствие инсерции или делеции нуклеотидов		nt 308Ant 309	Не показано
	58-348	512	512		Не показано		КП
	49-315	512	512		Не показано		КП
	49-453	128	64		nt 492Gnt 493	Не показано	Гиперэффлюкс, гиперпродукция ЦФ
	52-162	16	16			Не показано	Гиперэффлюкс

Тип <i>oprD</i>	Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	Классификация по типу <i>oprD</i>	Замены аминокислот ¹ и мутации, ведущие к обрыву синтеза <i>OpnD</i>	Показатель экспрессии	Наличие других механизмов резистентности
26	48-1558	4	16	Сдвиг рамки считывания вследствие инсерции или делеции нуклеотидов	nt 646Gnt 647	Не показано	Гиперэффлюкс
	57-213	256	256		nt 711Gnt 712	Не показано	КП
	46-306	32	16		nt 1275Cnt 1276	Не показано	Гиперэффлюкс
	68-158	256	256		nt 131,132ΔCA	Не показано	Гиперэффлюкс, КП
	48-1223	256	512		nt 400ΔG	Не показано	Гиперэффлюкс, КП
	46-1611	8	4		nt 584-nt620Δ37 п. н.	Не показано	Гиперэффлюкс
	48-1330	8	2		nt 602-nt612Δ11 п. н.	Не показано	Не обнаружено
	29-572	256	256		nt 619,620ΔCG	Не показано	КП
	36-1758	16	32		nt 786ΔA	Не показано	Гиперэффлюкс
	49-467	16	16		nt 1377ΔT	Не показано	Гиперэффлюкс
2в	29-528	256	512	IS-элементы	ISP _{sme1}	Не показано	Гиперэффлюкс, КП
	39-381	256	512			Не показано	Гиперэффлюкс, КП
	39-648	256	512			Не показано	Гиперэффлюкс, КП
	49-442	128	512			Не показано	Гиперэффлюкс, КП
	46-1510	8	16		ISP _{a1328}	Не показано	Не обнаружено
	48-1231	8	16			Не показано	Не обнаружено
	46-818	8	16			Не показано	Не обнаружено
	46-665	16	16			Не показано	Не обнаружено
	56-883	8	16			Не показано	Не обнаружено

Тип <i>oprD</i>	Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	Классификация по типу <i>oprD</i>	Замены аминокислот ¹ и мутации, ведущие к обрыву синтеза <i>OpnD</i>	Показатель экспрессии	Наличие других механизмов резистентности
2в	48-1299	4	16	IS-элементы	ISPa1328	Не показано	Не обнаружено
	36-989	16	32		ISPa195	Не показано	Гиперпродукция ЦФ
	46-604	8	8		ISPa26	Не показано	Гиперэффлюкс, гиперпродукция ЦФ
	48-2374	8	8		ISPst2	Не показано	Не обнаружено

Примечание:

¹ - Подстрочным шрифтом выделены позиции аминокислот, слева от позиции указана аминокислота референсного штамма, справа – аминокислота исследуемого штамма;

² - дивергентная последовательность 10 аминокислот [74];

³ - оценка экспрессии *oprD* не проводилась, так как выявлены мутации, ведущие к обрыву синтеза порина

Обозначения аминокислот: «G» - глицин; «A» - аланин, «V» - валин, «L» - лейцин, «I» - изолейцин, «P» - пролин, «F» - фенилаланин, «Y» - тирозин, «W» - триптофан, «S» - серин, «T» - треонин, «D» - аспарагиновая кислота, «E» - глутаминовая кислота, «N» - аспарагин, «Q» - глутамин, «C» - цистеин, «M» - метионин, «H» - гистидин, «K» - лизин, «R» - аргинин; «nt» – позиции нуклеотидов; «→» - замены нуклеотидов; «Δ» - делеция нуклеотидов; «п. н.» - пара нуклеотидов; обозначения нуклеотидов: «A» - аденин, «T» - тимин, «G» - гуанин, «C» - цитозин; ЦФ - цефалоспорины; КП - карбапенемазы.

В группе изолятов без мутаций, ведущих к обрыву синтеза *OprD* (изоляты первой группы – 16 штаммов), показатель экспрессии варьировал в диапазоне от 0 до 1,3 ($Me = 0,9$ (0,6; 1,2)) (таб. 10). В целом, между показателями экспрессии у карба-Ч изолятов из первой группы и показателями экспрессии у карба-НЧ изолятов из той же группы не было выявлено статистически значимых различий ($p > 0,05$) (рис. 13). Если говорить более детально, то в группе изолятов без мутаций, ведущих к обрыву синтеза *OprD*, среди карба-НЧ изолятов (7/16) уровень экспрессии был снижен у 5 изолятов. Все они обладали дополнительными механизмами устойчивости к карбапенемам.

Все изоляты, чувствительные к меропенему и имипенему, попали в группу без мутаций, ведущих к обрыву синтеза *OprD*. У 4 из 9 чувствительных изолятов присутствовала замена лишь одной аминокислоты в гене *oprD*, у остальных пяти изолятов обнаружены замены нескольких аминокислот. Карба-НЧ изоляты распределились по разным группам: у 16/51 (31%) изолятов найден преждевременный стоп-кодон, у 13/51 (25%) изолятов обнаружено повреждение *oprD* вставочными элементами (*ISP_{sme1}*, *ISP_{a1328}*, *ISP_{a195}*, *ISP_{a26}*, *ISP_{st2}*), у 7/51 (14%) изолятов найдены замены нескольких аминокислот в *oprD* (при этом пониженный уровень экспрессии гена обнаружен только у 5 из них), у 7/51 (14%) изолятов – сдвиг рамки считывания вследствие делеции нуклеотидов, и у 8/51 (16%) – сдвиг рамки считывания вследствие инсерции нуклеотидов.

Мутации, ведущие к обрыву синтеза *OprD*, были найдены у 44/51 (86%) карба-НЧ изолятов. 82% из них (36/44) обладали дополнительными механизмами нечувствительности к карбапенемам. Всего среди карба-НЧ изолятов обнаружено 49/51 (96%) штаммов *oprD*-инактивацией (мутации, ведущие к обрыву синтеза *OprD*, или снижение уровня экспрессии *oprD*). Значения МПК меропенема данных изолятов регистрировались в диапазоне от 4 до 512 мкг/мл ($Me = 32$ (8; 256)), имипенема – от 1 до 512 мкг/мл ($Me = 32$ (16; 256)).

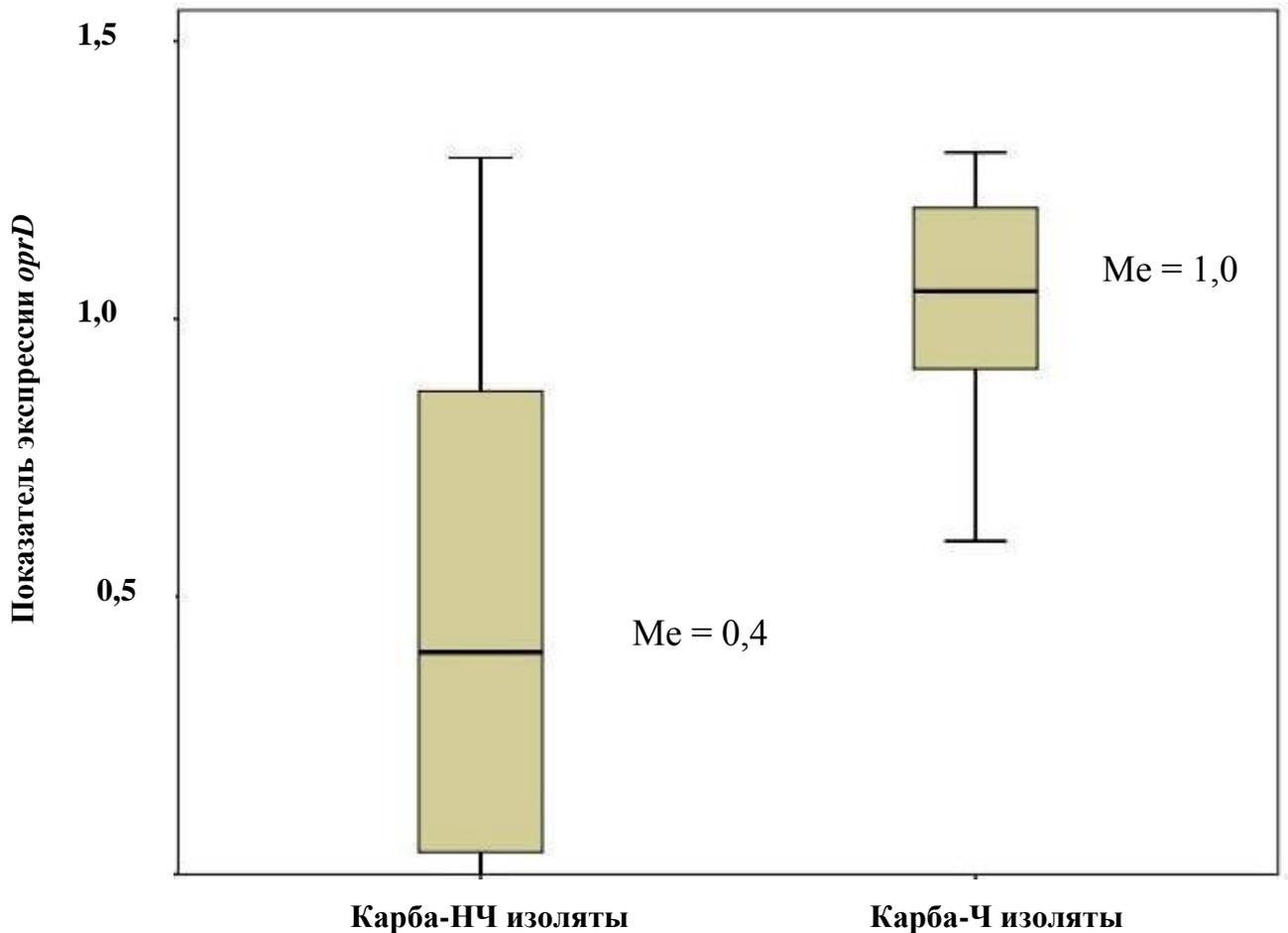


Рисунок 13. Показатели экспрессии *oprD* у карба-Ч и карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa*

Большинство из них (41/49, 84%) обладали дополнительными механизмами нечувствительности к карбапенемам. Лишь у 8 исследованных штаммов *oprD*-инактивация была единственным механизмом резистентности к карбапенемам (карбапенемазы, гиперэффлюкс и гиперпродукция цефалоспоринов отсутствовали). В структуре *oprD*-гена данных штаммов обнаруживали сдвиг рамки считывания вследствие делеции нуклеотидов (nt 602-nt612Δ11 п. н. (у одного штамма) или IS-элементы (ISPa1328 - у 6 штаммов, ISPst2 - у одного штамма). МПК меропенема у перечисленных изолятов варьировала от 4 до 16 мкг/мл, МПК имипенема - от 2 до 16 мкг/мл (таб. 9).

Всего у 51 карба-НЧ изолята *P. aeruginosa* было обнаружено 30 различных структурных вариантов *oprD*-гена. Это свидетельствует о высоком разнообразии адаптационных изменений гена, детерминирующего один из важнейших механизмов формирования нечувствительности к карбапенемам. Логично предположить, что разные изменения по-разному влияют на фенотип резистентности. Считается, что функциональная значимость структурных изменений гена зависит от их местоположения. В формировании «аминокислотной лестницы», обеспечивающей направленное в сторону периплазматического пространства движение субстрата по каналу OprD, участвуют 14 аминокислотных остатков (таб. 11) [38]. Обрыв последовательности гена в результате мутации, затрагивающей триплеты нуклеотидов, соответствующих перечисленным аминокислотам, приводит к повреждениям OprD-порины с полным нарушением его функции [204].

В нашем исследовании было обнаружено 24 варианта мутаций гена, которые затрагивали синтез «аминокислотной лестницы» (таб. 11): ISP_{smel}; ISP_{a26}; nt 131,132ΔCA; ISP_{a195}; nt 308Ant 309; nt 375,376CC→AG; nt 400ΔG; nt 492Gnt 493; nt 584-nt 620Δ37 п. н.; nt 602-nt 612Δ11 п. н.; nt 619,620ΔCG; nt 629G→T; nt 646Gnt 647; ISP_{a1328}; ISP_{st2}; nt 711Gnt 712; nt 786ΔA; nt 962C→T; nt 1092G→A; nt 1094C→T; nt 1274C→T; nt 1275Cnt 1276; nt1321G→A; nt1377ΔT. Однако, корреляции между длиной синтезированной полипептидной цепи OprD и МПК меропенема и имипенема обнаружено не было (для меропенема и имипенема $p > 0,05$). Отсутствие корреляции можно объяснить двумя причинами. Не исключено, что проницаемость OprD для карбапенемов осуществляется по принципу «все или ничего». Иными словами, дистальный обрыв полипептидной цепи порина блокирует его функцию в такой же степени, как и проксимальный.

Таблица 11

Влияние мутации в гене *oprD* на синтез порина OprD

Позиция аминокислоты ¹	Схематическая длина полипептидной цепи OprD в зависимости от уровня мутации в <i>oprD</i> -гене (количество аминокислот)													
	30	39	129	130	296	297	302	304	305	307	375	389	391	410
Мутация ²														
ISPsmel	<30													
ISPa26	<30													
nt 131,132ΔCA	<30													
ISPa195	40													
nt 308Ant 309	75													
nt375,376CC→AG	100													
nt 400ΔG	108													
nt492Gnt 493	139													
nt584-nt620Δ37 п.н.	169													
nt602-nt612Δ11 п.н.	175													
nt619,620ΔCG	181													
nt629G→T	184													
nt646Gnt 647	190													
ISPa1328	201													
ISPst2	208													
nt711Gnt 712	212													
nt786ΔA	237													
nt962C→T	295													
nt1092G→A	339													
nt1094C→T	340													
nt1274C→T	399													
nt1275Cnt 1276	400													
nt1321G→A	415													
nt1377ΔT	434													

Примечание: ¹ - перечислены позиции аминокислот, формирующих «аминокислотную лестницу»; ² - перечислены мутации, ведущие к обрыву синтеза OprD

Вторая причина отсутствия корреляции кроется в неоднородности выборки: подавляющее большинство штаммов с мутациями, ведущими к обрыву синтеза OprD (36/44, 82%), обладали разными сочетаниями механизмов нечувствительности. Информация о несогласованности между уровнем МПК меропенема и имипенема и генетической структурой порина OprD говорит о необходимости комплексной оценки механизмов формирования нечувствительности к карбапенемам. В литературе имеются многочисленные предупреждения о некорректности анализа резистентности только за счет пориновой проницаемости без учета альтернативных механизмов [169]. Более подробно анализ сложности многообразных сочетаний различных механизмов резистентности и ее влияние на фенотип резистентности изложен в Главе 6.

Показатели МПК меропенема у изолятов с *oprD*-инактивацией в качестве единственного механизма резистентности варьируют от 4 до 16 мкг/мл (Me = 8 (6; 12)), имипенема – от 2 до 16 мкг/мл (Me = 16 (16; 16)). Даже такое серьезное повреждение генетической структуры как встраивание IS-элемента не дает повышения МПК меропенема более 16 мкг/мл.

Относительно низкие МПК при OprD-зависимой нечувствительности могут говорить о наличии альтернативных путей поступления карбапенемов в периплазматическое пространство. Установлено, что меропенем проникает в периплазматическое пространство *P. aeruginosa* через два дополнительных порина – OprP и OprD [60, 216]. Можно предположить, что именно наличие дополнительных поринов для меропенема обуславливает более низкие МПК меропенема по сравнению МПК имипенема в случае, когда порин-зависимый механизм является единственным механизмом резистентности к карбапенемам. Не исключается способность карбапенемов при очень высоких концентрациях проникать через наружную мембрану, используя неспецифический транспорт [251].

Наши выводы об относительно низких уровнях МПК карбапенемов при избирательной недостаточности OprD согласуются с литературными данными.

Установлено, что пониженный уровень экспрессии *oprD*-гена увеличивает МПК имипенема лишь до величин от 4 до 8 мкг/мл [102].

Что касается снижения уровня экспрессии у карба-НЧ изолятов, то он регистрировался только в комплексе с другими механизмами резистентности – вместе с гиперактивностью эффлюкс-систем (у двух штаммов), в комплексе с гиперактивностью эффлюкс-систем и гиперпродукцией цефалоспоринов (у двух штаммов), в сочетании с гиперактивностью эффлюкс-систем и продукцией карбапенемаз (у одного штамма). Хотя его индивидуальный вклад в формирование резистентности оценить непросто, можно предположить, что снижение экспрессии *oprD* является важной составной частью формирования нечувствительности к карбапенемам при участии других механизмов, включая гиперактивность эффлюкс-систем и гиперпродукцию цефалоспоринов (подробнее см. Главу 6).

В целом, мутации, ведущие к обрыву синтеза OprD были обнаружены нами у 86% от всех карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa*, что соответствует данным зарубежных авторов – от 30 до 90% [200, 204, 241]. Самым важным результатом, полученным при исследовании структуры *oprD*, было открытие новых IS-элементов у синегнойной палочки. Впервые в *oprD*-гене *P. aeruginosa* были найдены вставочные элементы ISP_{smc1} и ISP_{st2}, до этого носителем ISP_{smc1} считалась *Pseudomonas mendocina*, а носителем ISP_{st2} - *Pseudomonas stutzeri* [42, 221]. Данное наблюдение свидетельствует о возможности межвидового транспорта вставочных последовательностей по крайней мере внутри рода *Pseudomonas*.

Еще более значимым было обнаружение нового, ранее не описанного IS-элемента. Он не имеет гомологии с известными вставочными последовательностями. Нужно отметить, что существующие базы данных МГЭ регулярно пополняются записями о вновь обнаруженных IS-элементах в генах поринов *P. aeruginosa* [241,81]. Открытие вставочного элемента ISP_{a195}

свидетельствует о получении новых знаний в области возникновения и распространения антибиотикорезистентности.

Высокая частота встречаемости IS-элементов в генах *oprD* (у 25% клинических карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa*) вызывает опасения. IS-элементы, как и все виды МГЭ, способны переноситься горизонтально в пределах родственных таксонов. Следовательно, они могут активно перемещаться между госпитальными штаммами, обеспечивая распространение *oprD*-зависимой нечувствительности к карбапенемам. Можно предположить, что вставочные последовательности, повреждающие *oprD*, являются маркерами эпидемиологической значимости *oprD*-зависимой карбапенемнечувствительности.

Анализ полученных в настоящем разделе результатов позволяет сделать несколько выводов. Во-первых, нарушение генетической структуры и/или снижение экспрессии гена порина OprD может приводить к возникновению устойчивости *P. aeruginosa* к карбапенемам. 86% карба-НЧ изолятов имеют мутации, ведущие к обрыву синтеза порина OprD. У карба-НЧ изолятов без мутаций, ведущих к обрыву синтеза OprD, наблюдается пониженный уровень экспрессии гена порина. Во-вторых, мутации, ведущие к обрыву синтеза порина OprD, отличаются большим разнообразием и представлены преждевременными стоп-кодонами, сдвигами рамки считывания в результате делеции или инсерции нуклеотидов, IS-элементами. Один из вариантов мутаций - нарушение последовательности *oprD*-гена IS-элементом - особенно значим из-за способности IS-элементов к горизонтальному переносу, а, следовательно, - распространению *oprD*-зависимой нечувствительности к карбапенемам среди госпитальных штаммов. В настоящем исследовании выявлено, что IS-зависимое повреждение гена *oprD* является достаточно распространенным среди карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa* и обнаруживается у 25% из них. Важным открытием, сделанным в процессе исследования OprD-поринов, стало обнаружение не типичных для синегнойной палочки IS-элементов, два из которых (ISP_{sm1} и

ISPst2) были описаны ранее у других видов рода *Pseudomonas*, а один тип (ISPa195) был неизвестен ранее. В-третьих, у большинства карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa* оценка вклада OprD-зависимого механизма в общий уровень резистентности представляется затруднительной из-за того, что у 84% штаммов с *oprD*-инактивацией были выявлены множественные механизмы нечувствительности. При отсутствии дополнительных механизмов устойчивости к карбапенемам OprD-зависимый механизм не приводит к повышению МПК карбапенемов более, чем до 4 – 16 мкг/мл. В-четвертых, для полного понимания механизмов нечувствительности *P. aeruginosa* к карбапенемам, необходимо комплексное исследование, в обязательном порядке включающее оценку состояния OprD-поринов.

Глава 5. Роль эффлюкс-систем в формировании нечувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам группы карбапенемов

5.1. Введение к главе

Эффлюкс-система (или эффлюкс-насос, или эффлюкс-помпа) бактериальной клетки – это сложно организованный молекулярный комплекс, обеспечивающий активное выведение антибактериальных препаратов и других токсичных для микробной клетки веществ из внутриклеточного пространства во внешнюю среду.

Гиперактивность эффлюкс-системы является клинически значимой – она может приводить к увеличению МПК карбапенемов до достаточно высоких значений (64 – 128 мкг/мл) [58]. Распространенность штаммов с эффлюкс-опосредованной резистентностью среди карбапенемрезистентных изолятов варьирует от 20 до 60% [55, 199, 223].

Целью данного раздела исследования является определение вклада эффлюкс-системы в формирование нечувствительности к карбапенемам у *P. aeruginosa*.

5.2. Материалы и методы, использованные для оценки роли эффлюкс-системы в формировании нечувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам

Для оценки структуры и функции MexAB-OprM используют протеомные, генетические и фенотипические методы.

Наличие или отсутствие у исследуемого штамма экспрессии белков системы MexAB-OprM определяют с помощью PAGE-электрофореза и иммуноблоттинга. Для проведения PAGE-электрофореза осуществляют экстракцию белков наружной мембраны и их разделение в полиакриламидном геле. Затем проводят реакцию иммуноблоттинга со специфическими

антителами. При этом в качестве маркера экспрессии выбирают только один из белков системы (MexA, MexB или OprM) [148, 216]. Идентификация белков MexAB-OprM *P. aeruginosa* с помощью масс-спектрометрии не проводилась, однако данная технология широко используется для детекции эффлюкс-систем у других бактерий [93, 248].

Активность экспрессии генов, кодирующих белки эффлюкс-системы MexAB-OprM, исследуют методом ПЦР с обратной транскрипцией, нарушения генетической структуры выявляют с помощью секвенирования генов белков MexAB-OprM и сравнения генетических последовательностей с последовательностями генов контрольного штамма [188].

Функционирование эффлюкс-системы можно оценить двумя способами. Первый способ предполагает использование ингибитора эффлюксной системы — EPI (от англ. «*efflux pump inhibitor*» – ингибитор эффлюксной помпы). Второй способ детектирует перемещение системой какого-либо субстрата.

Тесты с использованием EPI заключаются в определении наличия или отсутствия синергизма ингибитора эффлюкс-системы с антибактериальным препаратом. Наличие активного эффлюкса подтверждается в случае уменьшения МПК антибиотика в присутствии ингибитора. EPI описаны для многих видов микроорганизмов [225]. Наиболее общим ингибитором эффлюкс-систем семейства RND считается ингибитор протонных каналов карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон - CCCP (от англ. «*carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*»). Его влияние на изменение МПК антибактериальных препаратов исследовалось у *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [22, 30]. Реже для инактивации эффлюкс-систем *P. aeruginosa* используют пептидомиметик фенилаланин аргинил β-нафтиламид — PaβN (от англ. «*phenylalanine arginyl β-naphthylamide*») [32].

Принцип определения активности эффлюксной системы с помощью детекции перемещения субстрата заключается в инкубации микроорганизма с субстратом и последующем измерении его концентрации внутри и вне

бактериальной клетки. Существует несколько вариантов данного теста, отличающихся веществом-субстратом и способом измерения его концентрации. Для измерения концентрации применяют хромато-масс-спектрометрию, высокоэффективную жидкостную хроматографию или детекцию флуоресценции [74]. В случае выбора последнего способа измерения концентрации необходимой характеристикой субстрата является способность к флуоресценции. Например, бромистый этидий флуоресцирует только в комплексе с молекулой ДНК. При активном эффлюксе он будет выбрасываться из клетки и, следовательно, уровень флуоресценции будет снижаться [156]. В качестве субстратов используют антибиотики группы фторхинолонов, обладающие естественной флуоресценцией. Описаны случаи использования веществ, уровень флуоресценции которых увеличивается или снижается при взаимодействии с компонентами или ферментами бактериальной клетки [41, 144, 160, 196, 234]. Например, 1-анилинонафталин-8-сульфонат флуоресцирует при контакте с гидрофобными структурами бактериальной клетки. Динафтиламин начинает флуоресцировать при взаимодействии с липидным бислоем. Краситель Хехст флуоресцирует при образовании комплексов с молекулами ДНК, резазурин - при окислении под действием оксидоредуктазы. Уровень флуоресценции таких веществ, как доксорубицин и пиронин Y, напротив, снижается при связывании с внутриклеточными структурами [144, 166].

В настоящем исследовании оценка эффлюкс-систем изолятов *P. aeruginosa* проводилась с помощью протонного ингибитора RND эффлюкс-помп СССР [30]. При анализе результатов проводили сравнение активности эффлюкс-системы с уровнями МПК меропенема и имипенема, а также с наличием альтернативных механизмов резистентности.

Объектом исследования были 60 штаммов *P. aeruginosa*. Штаммы отбирали из коллекции лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» в соответствии с критериями, описанными выше (см. главу «Материалы

и методы исследования»). МПК меропенема и имипенема определяли при помощи метода серийных разведений (см. главу «Материалы и методы исследования»). Процедуры выявления альтернативных (бета-лактамазных и порин-зависимых) механизмов резистентности описаны в Главах 3 и 4, соответственно.

В 96-луночных планшетах с круглым дном делали двукратные разведения меропенема (Sigma-Aldrich, США) в бульоне Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США). В лунки планшета вносили инокуляты тестируемых штаммов (суспензия бактериальных клеток в бульоне Мюллера-Хинтона с мутностью 0,5 единиц по шкале МакФарланда): опытный инокулят (с добавлением СССР) и контрольный инокулят (с добавлением эквивалентного объема диметилсульфоксида - растворителя для СССР). Конечная концентрация СССР в опытных лунках составляла 25 мкг/мл, конечные концентрации меропенема в опытных и контрольных лунках - от 1 до 1024 мкг/мл.

Планшеты инкубировали при 37°C, результаты учитывали через 24 часа. Сравнивали концентрацию отсутствия роста (КОР) в контрольных и опытных рядах. Оценку активности эффлюкс-помп проводили согласно известным рекомендациям [22]. Считали, что штамм демонстрирует значимую для формирования устойчивости активность эффлюкса (гиперактивность) в тех случаях, когда наблюдалось уменьшение КОР в присутствии СССР в 4 и более раз по сравнению с контрольными пробами без СССР.

5.3. Результаты и обсуждение

Пример результатов выявления гиперактивности эффлюкс-системы показан на рис. 14.

Гиперактивность эффлюкса была выявлена у 28 из 51 (55%) карба-НЧ изолятов. Кратность уменьшения КОР, равную 4, демонстрировали 16 из 28 изолятов (57%) с гиперактивностью эффлюкса, у 6/28 (21%) изолятов данный

показатель был равен 16, у 3 (3/28, 11%) изолятов – кратность уменьшения КОР была равна 8.

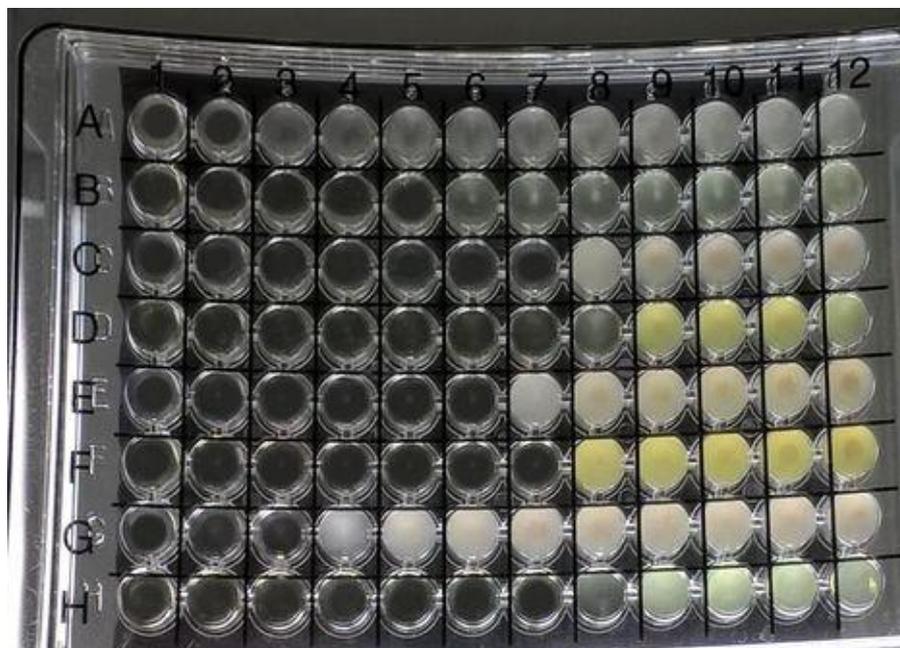


Рисунок 14. Пример результатов выявления гиперактивности эффлюкс-системы для штаммов *P. aeruginosa*

Примечание. Лунки планшета 1 – 11 – разведения меропенема в диапазоне концентраций от 1 до 1024 мкг/мл, лунка 1 – максимальная концентрация (1024 мкг/мл), лунка 11 – минимальная концентрация (1 мкг/мл), лунка 12 – контроль роста тестируемого штамма (без антибиотика); исследуемые штаммы расположены в рядах планшета А – Н: ряд А - *P. aeruginosa* 46-604 (контроль), КОР = 512 мкг/мл, ряд В - *P. aeruginosa* 46-604 (опыт), КОР = 64 мкг/мл; ряд С - *P. aeruginosa* 36-989 (контроль), КОР = 16 мкг/мл, ряд D - *P. aeruginosa* 36-989 (опыт), КОР = 16 мкг/мл; ряд Е - *P. aeruginosa* 46-818 (контроль), КОР = 32 мкг/мл, ряд F - *P. aeruginosa* 46-818 (опыт), КОР = 16 мкг/мл; ряд G - *P. aeruginosa* 36-1758 (контроль), КОР = 256 мкг/мл, ряд Н - *P. aeruginosa* 36-1758 (опыт), КОР = 16 мкг/мл.

Три остальных штамма имели кратность уменьшения КОР, равную 32, 64 и 128 (таб. 12).

**Значение гиперактивности эффлюкс-системы в формировании
нечувствительности к карбапенемам у *P. aeruginosa***

Группа штаммов	Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	Кратность уменьшения КОР	Гипер-активность эффлюкса	Наличие других механизмов резистентности
Штаммы с гиперактивностью эффлюкса	46-1611	8	4	128	+	<i>oprD</i> -инактивация
	46-814	4	32	64	+	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	52-162	16	16	32	+	<i>oprD</i> -инактивация
	36-1758	16	32	16	+	<i>oprD</i> -инактивация
	46-1976	16	32	16	+	<i>oprD</i> -инактивация
	46-2032	16	32	16	+	<i>oprD</i> -инактивация
	48-1626	16	8	16	+	<i>oprD</i> -инактивация
	49-436	32	32	16	+	<i>oprD</i> -инактивация
	49-467	32	16	16	+	<i>oprD</i> -инактивация
	46-604	8	8	8	+	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	49-621	64	16	8	+	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	68-158	256	256	8	+	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	29-528	256	512	4	+	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	36-1747	512	128	4	+	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	36-2170	32	8	4	+	<i>oprD</i> -инактивация
	39-381	256	512	4	+	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	39-648	256	512	4	+	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	46-2598	4	8	4	+	<i>oprD</i> -инактивация
	46-306	32	16	4	+	<i>oprD</i> -инактивация
	46-3122	8	2	4	+	Гиперпродукция ЦФ

Продолжение таблицы 12

Группа штаммов	Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	Кратность уменьшения КОР	Гипер-активность эффлюкса	Наличие других механизмов резистентности
	46-3126	256	128	4	+	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	46-3463	8	16	4	+	<i>oprD</i> -инактивация
	46-732	64	128	4	+	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	48-1223	256	512	4	+	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	48-1558	4	16	4	+	<i>oprD</i> -инактивация
	49-442	128	512	4	+	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	49-453	128	64	4	+	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	52-3482	4	1	4	+	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
Штаммы без гиперактивности эффлюкса	29-572	256	256	2	-	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	36-1071	256	128	1	-	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	36-3185	256	128	2	-	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	36-989	16	32	1	-	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	46-1510	8	16	2	-	<i>oprD</i> -инактивация
	46-1619	256	128	1	-	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	46-2068	128	128	2	-	КП
	46-3109	512	256	2	-	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация

Продолжение таблицы 12

Группа штаммов	Номер штамма	МПК меропенема, мкг/мл	МПК имипенема, мкг/мл	Кратность уменьшения КОР	Гипер-активность эффлюкса	Наличие других механизмов резистентности
Штаммы без гиперактивности эффлюкса	46-36	512	512	1	-	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	46-665	16	16	1	-	<i>oprD</i> -инактивация
	46-818	8	16	2	-	<i>oprD</i> -инактивация
	48-1231	8	16	2	-	<i>oprD</i> -инактивация
	48-1299	4	16	2	-	<i>oprD</i> -инактивация
	48-1330	8	2	1	-	<i>oprD</i> -инактивация
	48-2049	256	256	2	-	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	48-2374	8	8	2	-	<i>oprD</i> -инактивация
	49-118	512	512	2	-	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	49-315	512	512	2	-	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	49-550	128	64	2	-	Гиперпродукция ЦФ, <i>oprD</i> -инактивация
	56-883	8	16	2	-	<i>oprD</i> -инактивация
	57-213	256	256	2	-	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	58-348	512	512	2	-	КП, <i>oprD</i> -инактивация
	58-3816	512	512	2	-	КП, <i>oprD</i> -инактивация
Чувствительные изоляты	1202	0,5	1	1	-	Не обнаружено
	42-1739	1	1	1	-	Не обнаружено
	44-1189	0,5	0,25	1	-	Не обнаружено
	44-906	2	0,5	1	-	Не обнаружено
	46-2027	0,5	0,5	1	-	Не обнаружено
	46-2491	1	2	1	-	Не обнаружено
	48-757	0,25	0,25	1	-	Не обнаружено
	АТСС 27853	1	1	1	-	Не обнаружено
	66-89	1	1	1	-	Не обнаружено

Примечание: КП – карбапенемаза, ЦФ – цефалоспорины.

У 23/51 (45%) карба-НЧ изолятов и у всех карба-Ч штаммов не было выявлено гиперактивности эффлюкса. Значения МПК меропенема у штаммов с гиперактивностью эффлюкса регистрировались в диапазоне от 4 до 512 мкг/мл (Me = 32 (8; 128)), имипенема – от 1 до 512 мкг/мл (Me = 32 (16; 128)). Корреляции между наличием гиперактивности эффлюкса и значениями МПК меропенема и имипенема выявлено не было (для меропенема и имипенема $p > 0,05$).

Гиперактивность эффлюкса в качестве единственного механизма нечувствительности не была выявлена ни у одного штамма. Она сочеталась с *oprD*-инактивацией (мутации, ведущие к обрыву синтеза OprD, или снижение экспрессии *oprD*) у 13/28 (46%) изолятов, МПК меропенема и имипенема данных штаммов составляли от 4 до 32 мкг/мл. Гиперактивность эффлюкса в сочетании с *oprD*-инактивацией и продукцией карбапенемаз наблюдалась у 7/28 (25%) изолятов (МПК меропенема составляла от 64 до 256 мкг/мл, МПК имипенема – от 128 до 512 мкг/мл), в сочетании с *oprD*-инактивацией и гиперпродукцией цефалоспоринов – у 7/28 (25%) изолятов (значения МПК меропенема варьировали от 4 до 512 мкг/мл, МПК имипенема – от 2 до 128 мкг/мл). У одного штамма гиперактивность эффлюкса сочеталась только с гиперпродукцией цефалоспоринов (МПК меропенема была равна 8 мкг/мл, МПК имипенема – 2 мкг/мл).

У 55% карба-НЧ изолятов была выявлена гиперактивность эффлюкс-систем. Эта цифра не противоречит общемировой статистике, которая говорит о 20 - 60% клинических карбапенемрезистентных изолятах, которые обладают повышенной активностью эффлюкс-помп [55, 199, 223].

В нашем исследовании все изоляты с гиперактивностью эффлюкс-системы имели дополнительные механизмы резистентности: она сочеталась с *oprD*-инактивацией у 46% изолятов, с *oprD*-инактивацией и продукцией карбапенемаз - у 25% изолятов, с *oprD*-инактивацией и гиперпродукцией

цефалоспориноз – также у 25% изолятов, с гиперпродукцией цефалоспориноз - у одного штамма.

По данным литературы в результате усиления работы эффлюкс-систем МПК меропенема и имипенема могут повышаться до значений 128 и 32 мкг/мл, соответственно [58]. Наличие дополнительных механизмов не позволяет в полной мере оценить значение гиперактивности эффлюкс-систем в формировании нечувствительности к карбапенемам. Однако оценка функции эффлюкс-систем может быть очень важной, так как гиперфункция эффлюкс-помп играет потенцирующую роль для других механизмов резистентности, включая функциональное подавление экспрессии OprD-поринов и гиперпродукцию цефалоспориноз [188].

Как уже было сказано в главе 3, все штаммы, обладающие карбапенемазами, имели МПК меропенема ≥ 64 мкг/мл, МПК имипенема - ≥ 128 мкг/мл. В группе штаммов с сочетанием гиперактивности эффлюкса и *oprD*-инактивацией (13 штаммов) МПК меропенема и имипенема варьировали в пределах от 4 до 32 мкг/мл. Пять штаммов имели МПК меропенема больше, чем МПК имипенема, у шести штаммов, напротив, МПК меропенема были меньше, чем МПК имипенема, у двух штаммов значения МПК имипенема и меропенема были равны. В описанных в литературе случаях, когда гиперактивность эффлюкса обнаруживалась в качестве единственного механизма карбапенемрезистентности, результатом становились более высокие значения МПК меропенема по сравнению с МПК имипенема [123]. Этот результат был ожидаемым, так как субстратом эффлюкс системы MexAB-OprM является меропенем, но не имипенем [123]. С другой стороны, меропенем в отличие от имипенема, поступающего в периплазматическое пространство только через OprD, имеет альтернативные порыны для поступления в бактериальную клетку (см. Главу 4). Вследствие этого наличие нарушений порина OprD может нивелировать различия МПК меропенема и имипенема, возникающие в результате гиперактивности эффлюкс-помп. Именно с позиции

сочетания эффлюкс- и поринзависимых механизмов резистентности и можно объяснить разнонаправленные отклонения среди значений МПК меропенема и имипенема.

В целом, можно сказать, что гиперактивность эффлюкс-систем является распространенным явлением среди карбапенемнечувствительных штаммов *P. aeruginosa*: она встречается более, чем у половины изолятов с потерей чувствительности к карбапенемам. Отсутствие усиления функции эффлюкс-помп у чувствительных к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa* доказывает важность активации эффлюкса для развития карбапенемрезистентности. Гиперактивность эффлюкс-систем в 100% случаев сочетается с другими механизмами нечувствительности к карбапенемам, включая продукцию карбапенемаз, гиперпродукцию цефалоспоринов и нарушения пориновой проницаемости. Оценка вклада эффлюкс-помп в развитие устойчивости к карбапенемам является сложной задачей, не исключается потенцирующая роль эффлюкса в синергетических взаимоотношениях с альтернативными механизмами резистентности.

Для полного понимания механизмов нечувствительности *P. aeruginosa* к карбапенемам, необходимо комплексное исследование, включающее оценку активности RND-эффлюкс-систем.

Глава 6. Комплексная оценка механизмов резистентности

Pseudomonas aeruginosa к карбапенемам

Как было сказано выше, потеря чувствительности синегнойной палочки к антибиотикам группы карбапенемов формируется за счет трех механизмов: гидролиза антибиотика бета-лактамазами, инактивации порина OprD, гиперактивности эффлюкс-систем. Теоретически, механизмы устойчивости могут присутствовать у *P. aeruginosa* по отдельности и в разных сочетаниях [218]. В связи с этим, возникают вопросы: (1) какие из механизмов вызывают наиболее значимый рост МПК карбапенемов и (2) какое влияние оказывают на рост МПК карбапенемов различные сочетания механизмов резистентности?

Главная задача настоящего раздела исследования - оценить степень влияния каждого из трех изученных механизмов резистентности, а также их сочетаний, на уровень устойчивости *P. aeruginosa* к карбапенемам. Напомним, что объектами диссертационного исследования были 60 штаммов *P. aeruginosa*. Критерии отбора штаммов и методы их исследования описаны в главе «Материалы и методы исследования». Процедуры выявления изолятов с карбапенемазами и гиперпродукцией цефалоспоринов, *oprD*-инактивацией, гиперактивностью эффлюкс-систем описаны в Главах 3, 4 и 5, соответственно. Для сравнения МПК карбапенемов (меропенема и имипенема) у штаммов с различными сочетаниями механизмов нечувствительности использовали статистический критерий Манна-Уитни. Данный критерий предназначен для оценки различий между двумя выборками по уровню какого-либо количественного признака [3].

У карба-НЧ изолятов ($n = 51$) *P. aeruginosa* выявлено 8 вариантов сочетаний механизмов нечувствительности. Сочетание «карбапенемаза + *oprD*-инактивация» выявлено у 14% (7/51) изолятов, сочетание «карбапенемаза + гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация» – у 14% (7/51), сочетание «гиперпродукция цефалоспоринов + *oprD*-инактивация» – у 14% (7/51),

сочетание «гиперпродукция цефалоспоринов + гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация» – у 14% (7/51), сочетание «гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация» – у 25% (13/51), *oprD*-инактивация – у 15% (8/51) изолятов (рис. 15).

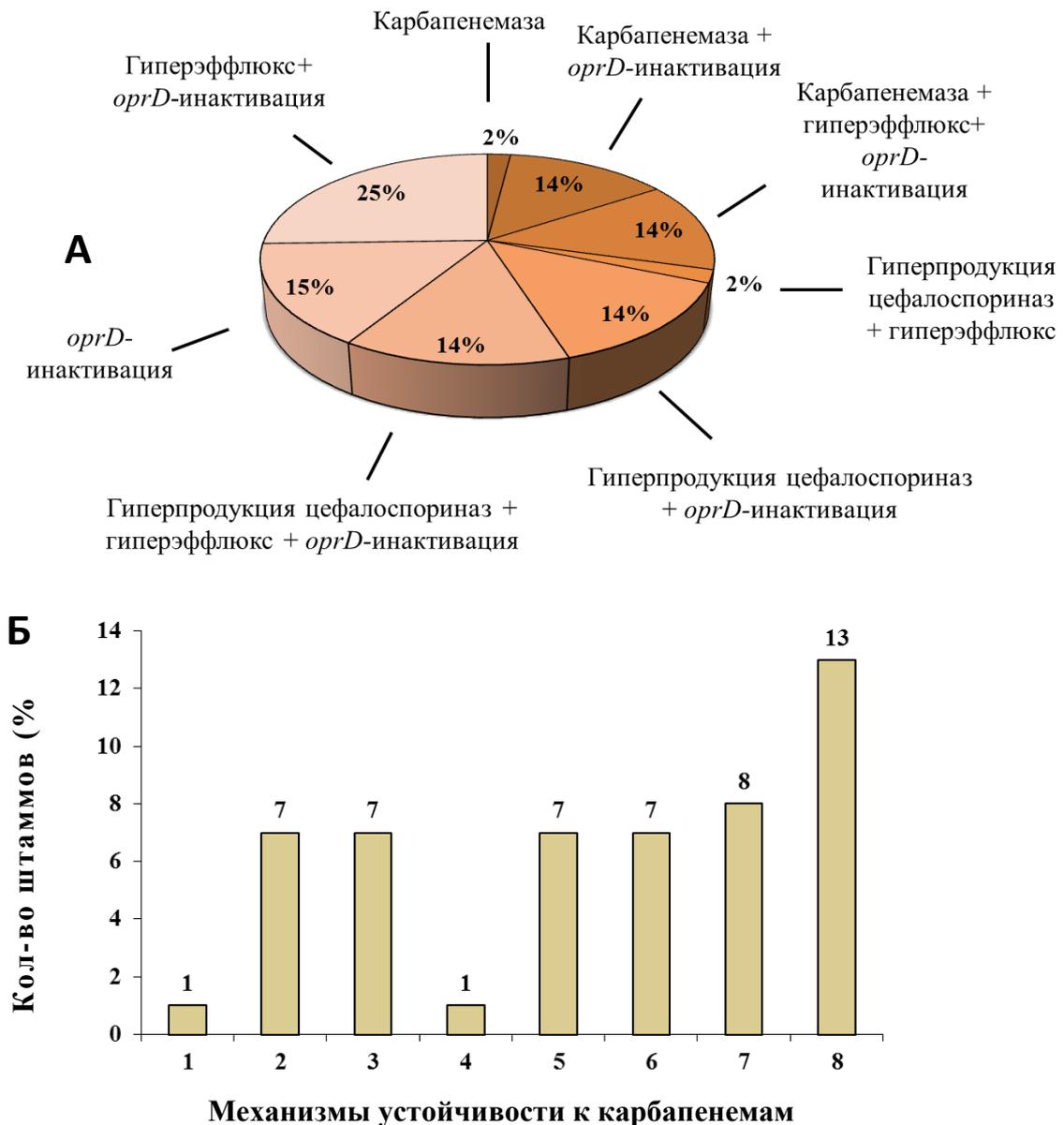
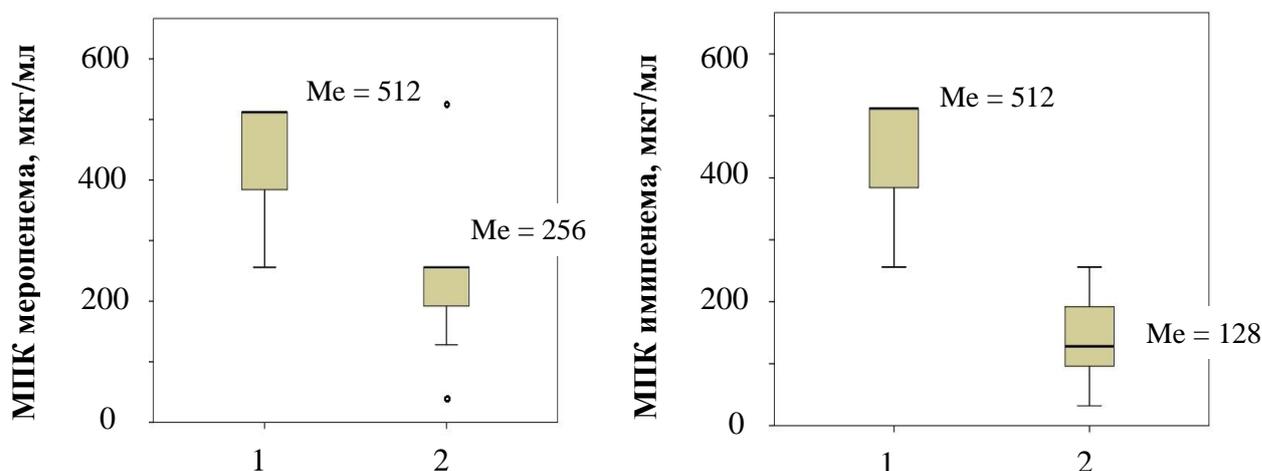


Рисунок 15. Варианты сочетаний механизмов устойчивости у карба-НЧ штаммов *P. aeruginosa*

Примечание. А – количество штаммов в процентах; Б – количество штаммов в абсолютных числах. По оси абсцисс: 1 – карбапенемаза; 2 – карбапенемаза + *oprD*-инактивация; 3 – карбапенемаза + гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация; 4 – гиперпродукция цефалоспоринов + гиперэффлюкс; 5 – гиперпродукция цефалоспоринов + *oprD*-инактивация; 6 – гиперпродукция цефалоспоринов + гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация; 7 – *oprD*-инактивация; 8 – гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация.

Был обнаружен один изолят с наличием только карбапенемазы и один изолят с сочетанием «гиперпродукция цефалоспоринов + гиперэффлюкс», поэтому для этих механизмов отсутствовала возможность статистической обработки данных.

При сравнении МПК карбапенемов (меропенема и имипенема) между группой штаммов с сочетанием «карбапенемаза + *oprD*-инактивация» и группой штаммов с сочетанием «гиперпродукция цефалоспоринов + *oprD*-инактивация» были выявлены статистически значимые различия (рис. 16).



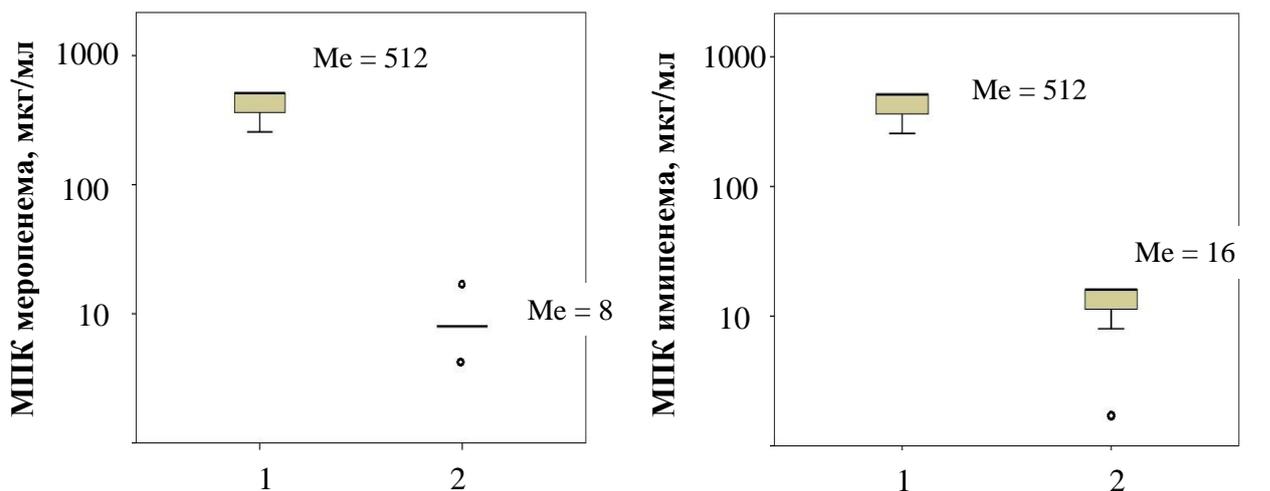
	Уровень значимости, <i>p</i>	Вывод
МПК меропенема	0,038	Различия статистически значимы
МПК имипенема	0,002	Различия статистически значимы

Рисунок 16. Различия между МПК карбапенемов у групп штаммов с сочетаниями механизмов «карбапенемаза + *oprD*-инактивация» и «гиперпродукция цефалоспоринов + *oprD*-инактивация»

Примечание. По оси ординат указаны значения МПК меропенема (график слева) и имипенема (график справа). По оси абсцисс – сочетания механизмов резистентности: 1 - «карбапенемаза + *oprD*-инактивация», 2 - «гиперпродукция цефалоспоринов + *oprD*-инактивация». Точки – значения МПК, не входящие в диапазон средних значений.

Значения МПК в группе штаммов с первым вариантом сочетания были выше, чем значения в группе со вторым сочетанием. Это говорит о том, что наличие карбапенемаз приводит к повышению МПК до более высоких показателей, чем гиперпродукция цефалоспоринов.

При сравнении МПК карбапенемов (меропенема и имипенема) между группой штаммов с *oprD*-инактивацией и группой штаммов с сочетанием «карбапенемаза + *oprD*-инактивация» также были выявлены статистически значимые различия (рис. 17). Значения МПК в группе штаммов с сочетанием «карбапенемаза + *oprD*-инактивация» были выше, чем значения в группе с *oprD*-инактивацией.



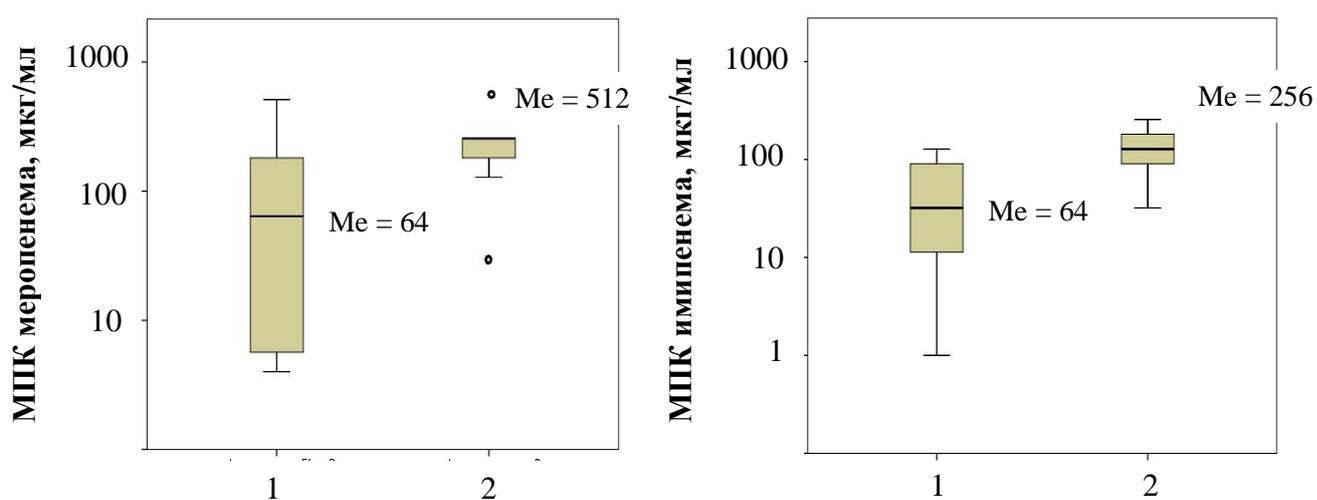
	Уровень значимости, <i>p</i>	Вывод
МПК меропенема	0,001	Различия статистически значимы
МПК имипенема	0,001	Различия статистически значимы

Рисунок 17. Различия между МПК карбапенемов у групп штаммов с механизмами «карбапенемаза + *oprD*-инактивация» и «*oprD*-инактивация»

Примечание. По оси ординат (логарифмическая шкала) указаны значения МПК меропенема (график слева) и имипенема (график справа). По оси абсцисс – сочетания механизмов резистентности: 1 - «карбапенемаза + *oprD*-инактивация», 2 - «*oprD*-инактивация». Точки – значения МПК, не входящие в диапазон средних значений.

На основании полученных результатов можно утверждать, что карбапенемазы вносят существенный вклад в формирование устойчивости к карбапенемам, приводя к увеличению МПК до самых высоких значений.

Между МПК карбапенемов у группы штаммов с сочетанием механизмов «гиперпродукция цефалоспоринов + *oprD*-инактивация» и группы штаммов с сочетанием «гиперпродукция цефалоспоринов + гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация» не было выявлено статистически значимых различий (рис. 18).



	Уровень значимости, <i>p</i>	Вывод
МПК меропенема	0,165	Различия статистически незначимы
МПК имипенема	0,053	Различия статистически незначимы

Рисунок 18. Сравнение МПК карбапенемов между группами штаммов с сочетаниями механизмов «гиперпродукция цефалоспоринов + гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация» и «гиперпродукция цефалоспоринов + *oprD*-инактивация»

Примечание. По оси ординат (логарифмическая шкала) указаны значения МПК меропенема (график слева) и имипенема (график справа). По оси абсцисс – сочетания механизмов резистентности: 1 - «гиперпродукция цефалоспоринов + гиперактивность эффлюкса + *oprD*-инактивация», 2 - «гиперпродукция цефалоспоринов + *oprD*-инактивация». Точки - значения МПК, не входящие в диапазон средних значений.

При сравнении МПК карбапенемов между группой штаммов с *oprD*-инактивацией и группой штаммов с сочетанием «гиперпродукция

цефалоспориноз + *oprD*-инактивация» были выявлены статистически значимые различия (рис. 19).

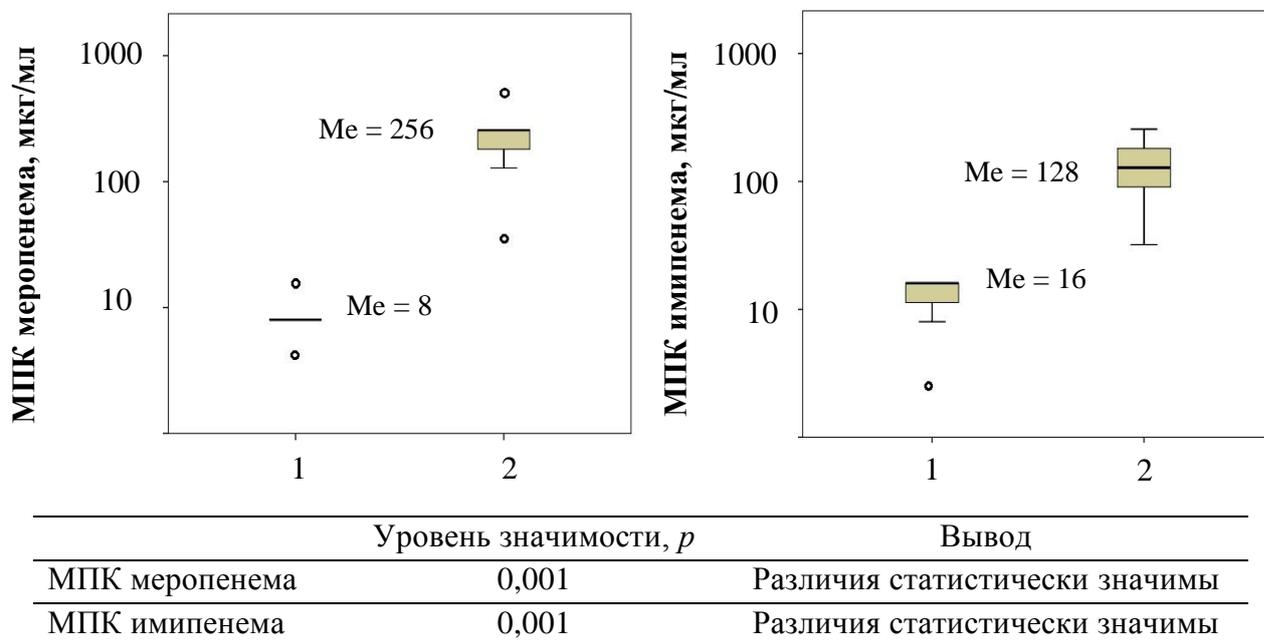


Рисунок 19. Различия между МПК карбапенемов у групп штаммов с механизмами «*oprD*-инактивация» и «гиперпродукция цефалоспориноз + *oprD*-инактивация»

Примечание. По оси ординат (логарифмическая шкала) указаны значения МПК меропенема (график слева) и имипенема (график справа). По оси абсцисс – сочетания механизмов резистентности: 1 - «*oprD*-инактивация», 2 - «гиперпродукция цефалоспориноз + *oprD*-инактивация». Точки - значения МПК, не входящие в диапазон средних значений.

Значения МПК в группе штаммов с сочетанием «гиперпродукция цефалоспориноз + *oprD*-инактивация» были выше, чем значения в группе с *oprD*-инактивацией, следовательно, гиперпродукция цефалоспориноз вносит существенный вклад в формирование устойчивости к карбапенемам и определяет высокие значения МПК.

Между МПК карбапенемов у группы штаммов с *oprD*-инактивацией и группы штаммов с сочетанием «гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация» не было выявлено статистически значимых различий, что подтверждает незначительную

роль гиперактивности эффлюкс-систем в формировании устойчивости к карбапенемам при данном сочетании механизмов (рис. 20).

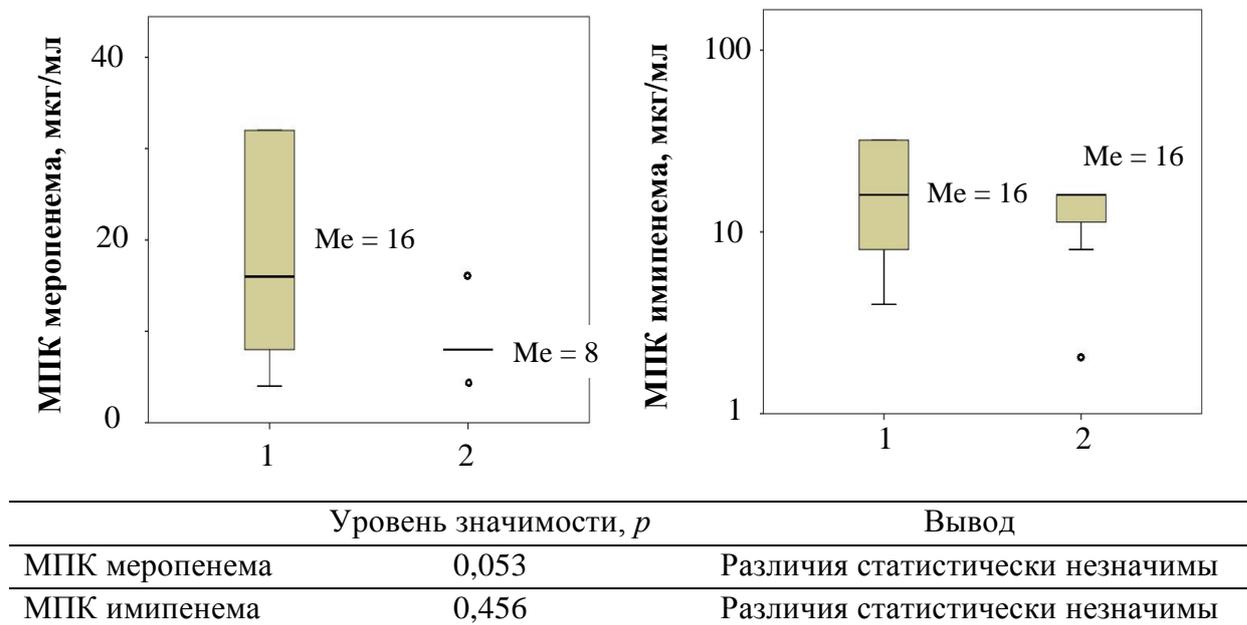


Рисунок 20. Сравнение МПК карбапенемов между группами штаммов с механизмами «гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация» и «*oprD*-инактивация»

Примечание. По оси ординат (логарифмическая шкала) указаны значения МПК меропенема (график слева) и имипенема (график справа), по оси абсцисс – сочетания механизмов резистентности: 1 - «гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация», 2 - «*oprD*-инактивация», точками на графиках обозначены значения МПК, не входящие в диапазон средних значений.

Между значениями МПК карбапенемов у групп штаммов с сочетаниями механизмов, включающих продукцию карбапенемаз («карбапенемаза + гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация», «карбапенемаза + *oprD*-инактивация»), не было выявлено статистически значимых различий ($p > 0,05$). Различия между значениями МПК карбапенемов у штаммов, продуцирующих карбапенемазы, и штаммов без карбапенемаз («*oprD*-инактивация», «гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация», «гиперпродукция цефалоспоринов + гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация») были статистически значимы (см. главу 3).

Практически у всех изолятов, у которых в качестве единственного механизма резистентности обнаружена *oprD*-инактивация, значения МПК имипенема превышали значения МПК меропенема. Как уже говорилось в Главе 4, меропенем проникает в периплазматическое пространство *P. aeruginosa* не только через порин OprD, но и через два дополнительных порина – OprP и OprD [60, 215]. Можно предположить, что именно наличие дополнительных трансмембранных путей для меропенема обуславливает более низкие МПК меропенема по сравнению МПК имипенема в случае, когда порин-зависимый механизм является единственным механизмом резистентности к карбапенемам.

В группе штаммов с сочетанием гиперактивности эффлюкс-систем и *oprD*-инактивацией МПК меропенема и имипенема варьировали в пределах от 4 до 32 мкг/мл. Пять штаммов имели МПК меропенема больше, чем МПК имипенема, у шести штаммов МПК меропенема были меньше, чем МПК имипенема, у двух штаммов значения МПК имипенема были равны значениям МПК меропенема. Разнонаправленные отклонения среди значений МПК меропенема и имипенема можно объяснить действием разных, иногда противонаправленных в отношении имипенема и меропенема, механизмов резистентности. Например, у изолятов с нарушением проницаемости OprD наблюдают более выраженную чувствительность к меропенему и устойчивость - к имипенему (причины, связанные с альтернативными поринами, подробно описаны выше). У изолятов с обратным фенотипом резистентности, т.е. чувствительных к имипенему, но резистентных к меропенему, наблюдают гиперактивность эффлюкс-системы MexAB-OprM, транспортирующей меропенем, но не имипенем [185].

Вероятно, значимость механизмов карбапенемрезистентности можно классифицировать по двум критериям: частоте встречаемости и влиянию на уровень МПК карбапенемов.

Полученные в настоящем исследовании результаты говорят, что наиболее частым сочетанием механизмов резистентности (25% штаммов)

является сочетание «гиперэффлюкс + *oprD*-инактивация». Этот вывод не противоречит литературным данным, которые свидетельствуют о том, что нарушения функции OprD являются самым частым механизмом устойчивости *P. aeruginosa* к карбапенемам: среди карба-НЧ изолятов его распространенность доходит до 95% [55].

Самые высокие уровни МПК карбапенемов определяются наличием карбапенемаз: МПК групп штаммов с карбапенемазами и МПК групп штаммов без них имеют статистически значимые различия. Считается, что у штаммов, продуцирующих МБЛ, значения МПК карбапенемов не опускается ниже 64 мкг/мл [197]. Присутствие карбапенемаз является мощным, но не самым частым механизмом резистентности. В настоящем исследовании носителями карбапенемаз были порядка 30% изолятов, нечувствительных к карбапенемам. Это соответствует литературным данным, согласно которым карбапенемазы МБЛ-типа обнаруживаются примерно у 20% карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa* [197]. Следующими по значимости для повышения уровня МПК являются сочетания механизмов резистентности, включающие гиперпродукцию цефалоспоринов. Мировая статистика подтверждает этот факт [188].

Выявленные в работе случаи *oprD*-инактивации (без карбапенемаз и гиперпродукции цефалоспоринов) и сочетания *oprD*-инактивации с гиперактивностью эффлюкса приводят к формированию невысоких значений МПК, что тоже соответствует литературным данным. Chalhoub H. et al. (2016) показали, что при наличии у *P. aeruginosa* дефектов OprD или гиперактивности эффлюкс-систем значения МПК карбапенемов колеблются в диапазоне от 4 до 64 мкг/мл [58]. Можно предположить, что при наличии у изолята *P. aeruginosa* карбапенемаз данные механизмы играют второстепенную роль в формировании нечувствительности к карбапенемам у *P. aeruginosa*.

Проведенный статистический анализ, направленный на сравнение влияния отдельных механизмов резистентности *P. aeruginosa*, а также их сочетаний, на уровень МПК карбапенемов, позволяет сделать несколько

выводов. Во-первых, механизмы резистентности, присутствующие у клинических изолятов синегнойной палочки, неодинаково влияют на уровень МПК карбапенемов для клинических изолятов *P. aeruginosa*. Во-вторых, продукция синегнойной палочкой карбапенемаз вызывала самое сильное повышение МПК меропенема и имипенема, независимо от наличия других механизмов резистентности. В-третьих, вторыми по значимости для повышения уровня МПК являются сочетания механизмов резистентности, включающие гиперпродукцию цефалоспоринов. В-четвертых, самым часто встречающимся сочетанием механизмов резистентности к карбапенемам является наличие гиперактивности эффлюкс-систем и инактивация *oprD*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синегнойная палочка *P. aeruginosa* – один из самых значимых оппортунистических патогенов – обладает способностью быстро приобретать резистентность ко многим группам антибиотиков [8]. Учитывая факт высокого распространения резистентности *P. aeruginosa* к фторхинолонам, аминогликозидам и антисинегнойным цефалоспорином, можно утверждать, что наиболее эффективными антибиотиками для лечения синегнойной инфекции остаются лишь карбапенемы и полимиксины (колистин) [21]. Однако, статистика показывает, что среди клинических изолятов *P. aeruginosa* в последние годы существует тенденция распространения устойчивости к карбапенемам [55, 199, 223]. В связи с этим расшифровка молекулярно-генетических механизмов карбапенемрезистентности *P. aeruginosa*, основанная на новых бактериологических, генетических и масс-спектрометрических технологиях, является актуальной задачей современной медицинской науки.

В настоящем исследовании были проанализированы бета-лактамазные (продукция карбапенемаз и гиперпродукция цефалоспориноаз), порин-зависимые и эффлюкс-зависимые механизмы резистентности *P. aeruginosa* к карбапенемам.

Полученные результаты показали, что почти 60% карба-НЧ клинических изолятов обладают бета-лактамазными механизмами резистентности к карбапенемам, они продуцируют VIM-карбапенемазы или гиперпродуцируют цефалоспориноазы. Почти 30% карба-НЧ изолятов демонстрируют фенотипические признаки наличия МБЛ. У каждого из МБЛ-позитивных изолятов обнаружены гены металло-бета-лактамаз группы VIM (*bla*_{VIM}-гены). Изоляты, не обладающие *bla*_{VIM}-генами, фенотипически не проявляют МБЛ-активность. Следовательно, устойчивость к карбапенемам, вызываемая продукцией карбапенемаз, связана исключительно с карбапенемазами VIM-типа. В целом наши результаты соответствуют данным, полученным в других

исследованиях. По данным Edelstein et al. (2014) в России в 2011-14 гг. МБЛ-позитивные штаммы *P. aeruginosa* встречались у 21,3 - 28,3% нозокомиальных изолятов [15, 21]. В странах СНГ - России, Беларуси и Казахстане - МБЛ-позитивные штаммы *P. aeruginosa* чаще продуцируют карбапенемазу VIM-2 (99,6 %), и всего в 0,4 % случаев — IMP [75]. Естественно, что наши выводы являются корректными только для локальных клинических штаммов *P. aeruginosa*, в отдаленных от России географических регионах возможна циркуляция синегнойной палочки с иными детерминантами карбапенемрезистентности. Например, у карбапенемаза-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* из стран Азии нередко встречаются *bla*_{IMP}-гены [211]. В Германии весьма распространенной является группа генов *bla*_{GIM} [239]. В странах Южной и Центральной Америки часто встречаются изоляты *P. aeruginosa*, несущие гены *bla*_{GES} [89, 213]. Согласно общемировой статистике, около 40% карбапенемрезистентных штаммов *P. aeruginosa* являются продуцентами карбапенамаз, среди которых чаще встречаются ферменты классов А (KPC) и В (IMP, VIM, NDM) [26, 53, 143, 176, 198, 209].

Между наличием у исследуемого изолята VIM-металло-бета-лактамазы и высокими показателями МПК имипенема и меропенема обнаружена положительная корреляция. Значения МПК меропенема и имипенема у VIM/МБЛ-позитивных штаммов находятся на самых высоких уровнях – от 64 (меропенем) и 128 (имипенем) до 512 мкг/мл. Это логично объясняется тем, что карбапенемазы VIM-типа обладают очень сильной гидролитической активностью в отношении карбапенемов, уступающей в количественном отношении лишь NDM-металло-бета-лактамазам [128]. Продукцию карбапенамаз считают наиболее значимым механизмом в формировании высоких значений (> 64 мкг/мл) МПК карбапенемов у *P. aeruginosa*, при этом штаммы с карбапенемазами встречаются довольно часто и составляют от 30 до 40% карба-НЧ изолятов [201]. Полученные результаты соответствуют данным мировой статистики и подтверждают, что карбапенемазы вносят наиболее

значимый вклад в формирование нечувствительности к карбапенемам [197]. Важность обнаружения МБЛ-позитивных штаммов обусловлена не только высокой степенью их антикарбапенемной активности. Гены *bla_{VIM}* являются адаптивными, а, следовательно, - являются генетической основой горизонтальной передачи признака. Это говорит о негативном эпидемиологическом значении VIM/МБЛ-позитивных штаммов. Активное выявление таких штаммов должно стать составной частью работы всех лабораторий клинической микробиологии.

Следовательно, в практическом здравоохранении существует потребность активного выявления штаммов-продуцентов карбапенемаз.

Существует широкий набор методик для выявления штаммов-продуцентов карбапенемаз. Они включают молекулярные, фенотипические и аналитические подходы. МАЛДИ-ВП масс-спектрометрия считается простым, быстрым и достоверным способом детекции бета-лактамазной активности, основанным на детекции продуктов гидролиза антибиотиков-бета-лактамов. Однако масс-спектрометрический подход требует тщательного подбора индивидуальных условий анализа для разных видов бактерий. Ранее эффективность масс-спектрометрического обнаружения бета-лактамаз была подтверждена для *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *A. baumannii* [91]. Для выявления продуцентов карбапенемаз с помощью МАЛДИ-ВП МС среди изолятов *P. aeruginosa* до настоящего времени не было разработано оптимальной методики масс-спектрометрического анализа.

Апробированная в настоящем исследовании методика оригинальным образом совместила использование (1) нестандартной матрицы для МАЛДИ-ВП МС, в качестве которой применялась 2,5-дигидроксibenзойная кислота, (2) меропенема в качестве антибиотика-индикатора гидролиза и (3) оригинальной статистической обработки полученных масс-спектров гидролиза меропенема, которая позволяет избежать ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Проведенные эксперименты показали полное соответствие

результатов, полученных при помощи МАЛДИ-ВП МС и посредством традиционных методов (определения наличия генов карбапенемаз и МБЛ-Е-теста). Адаптация масс-спектрометрического способа выявления карбапенемаз для работы с *P. aeruginosa* важна для клинической микробиологии, так как МАЛДИ-ВП МС имеет ряд преимуществ по сравнению с другими способами определения карбапенемазной активности. Масс-спектрометрия позволяет быстрее (за несколько часов), чем молекулярные методы, определить наличие карбапенемазы у тестируемого штамма. В отличие от фенотипических методов (МБЛ-Е-тест, метод двойных дисков), масс-спектрометрия детектирует любой тип карбапенемазы, в то время как фенотипические методы дают положительный результат только при наличии карбапенемаз определенных молекулярных классов и характеризуются большой вероятностью ошибки. Еще одно преимущество масс-спектрометрии заключается в том, что она способна давать результат при работе непосредственно с клиническим материалом без выделения чистой культуры, что значительно сокращает время анализа [174]. Вышеизложенное доказывает перспективность использования масс-спектрометрии для оценки карбапенемазной активности у клинических штаммов *P. aeruginosa*.

Помимо продукции карбапенемаз бета-лактамазные механизмы резистентности к карбапенемам у *P. aeruginosa* включают гиперпродукцию природных цефалоспориноаз: AmpC и RoxB [197]. Природные цефалоспориноазы способны осуществлять медленный гидролиз карбапенемов. В синергизме с другими механизмами (нарушение проницаемости OprD и гиперактивность эффлюкс-систем) – данные ферменты способны вызвать устойчивость к карбапенемам [188, 257].

Количество штаммов с гиперпродукцией цефалоспориноаз среди карба-НЧ изолятов по данным зарубежных авторов не превышает 40% [201]. В нашем исследовании были получены сопоставимые результаты: число штаммов с гиперпродукцией цефалоспориноаз среди карба-НЧ МБЛ-негативных изолятов

составило 42% или 29% от общего числа карба-НЧ изолятов. Все они обладали дополнительными механизмами резистентности к карбапенемам (нарушение проницаемости OprD и/или гиперактивность эффлюкс-систем). Между наличием гиперпродукции цефалоспоринов и уровнями МПК карбапенемов у тестируемых изолятов обнаружена положительная корреляция. МПК изолятов, гиперпродуцирующих цефалоспорины, достигали уровней 512 мкг/мл для меропенема и 256 мкг/мл для имипенема. Полученные результаты свидетельствуют, что продукция карбапенемаз является не единственной причиной формирования высоких уровней МПК карбапенемов. Гиперпродукция цефалоспоринов при наличии дополнительных механизмов резистентности также приводит к увеличению МПК карбапенемов до высоких значений. Такой вывод говорит о необходимости тестирования клинических изолятов *P. aeruginosa* в отношении цефалоспориновой активности.

Результаты исследований позволяют предложить два практических алгоритма выявления бета-лактамаз *P. aeruginosa*, участвующих в формировании устойчивости к карбапенемам. Упрощенный вариант (рис. 21) включает определение у изучаемого изолята МБЛ-активности по результатам фенотипического исследования с МБЛ-Е-тестами. В случае отсутствия МБЛ-фенотипа, следует провести количественную оценку продукции цефалоспоринов в тесте с нитроцефином (рис. 21).

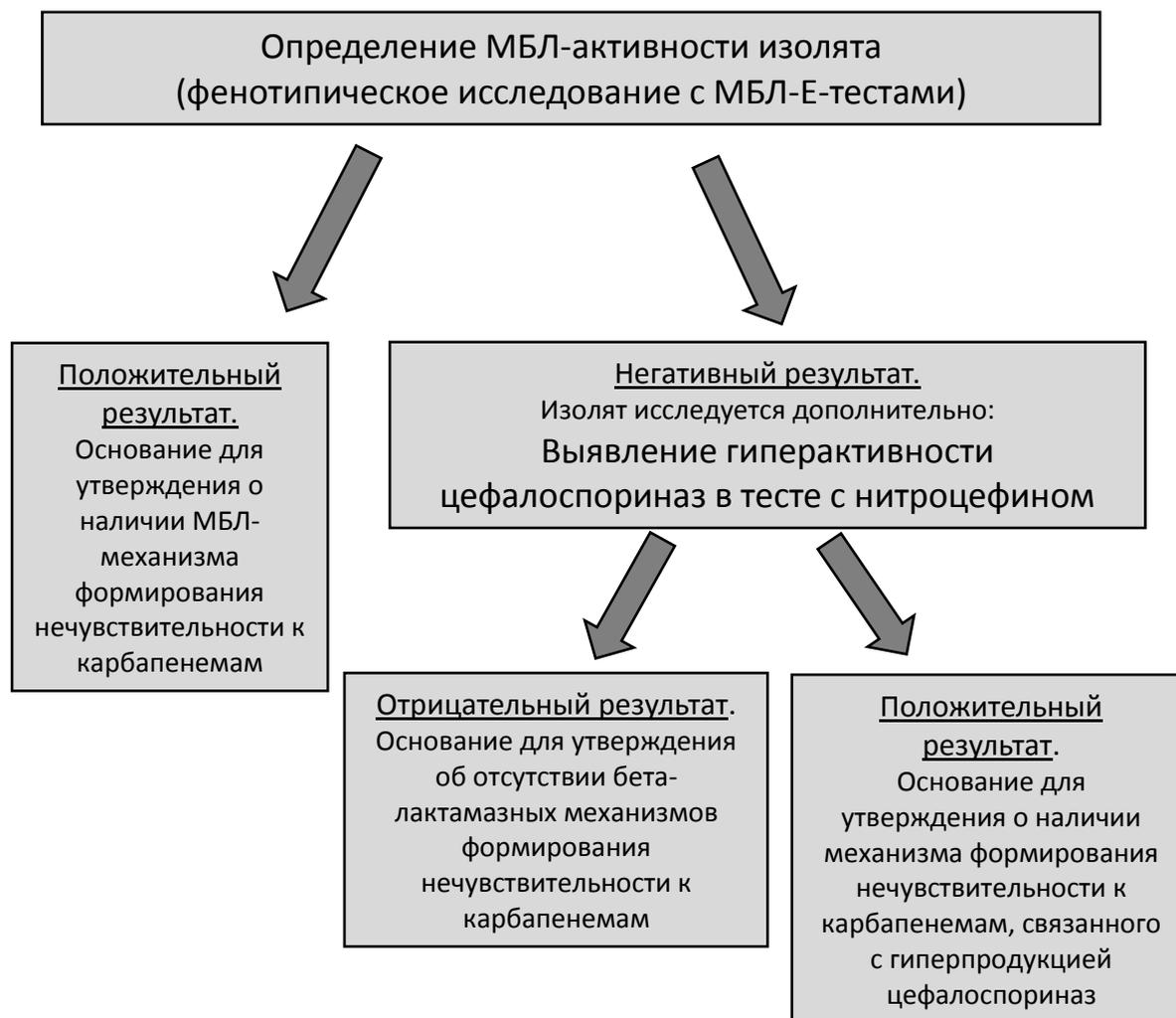


Рисунок 21. Упрощенный методический алгоритм выявления бета-лактамаз *P. aeruginosa*, участвующих в формировании устойчивости к карбапенемам

Развернутый алгоритм осуществляется при помощи трех методических подходов (рис. 22) и отличается от упрощенного алгоритма тем, что предполагает получение информации о генах-детерминантах резистентности в случае положительных результатов фенотипического определения карбапенемаз.

На первом этапе следует провести оценку карбапенемазной активности исследуемого изолята по степени гидролиза меропенема при помощи МАЛДИ-ВП МС. В зависимости от результатов первого этапа изоляты должны быть рассортированы на 2 группы: позитивные и негативные.



Рисунок 22. Развернутый методический алгоритм выявления бета-лактамаз *P. aeruginosa*, участвующих в формировании устойчивости к карбапенемам

Позитивные изоляты следует направить на генетическое исследование, нацеленное на выявление генов-детерминант резистентности (*bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMI}, *bla*_{OXA} и др.). У негативных изолятов следует провести количественную оценку продукции цефалоспориноаз в тесте с нитроцефином. Выявление *bla*-генов позволяет не только оптимизировать лечебный процесс, но и делать полезные выводы об эпидемиологических свойствах циркулирующих штаммов синегнойной палочки.

Нарушение проницаемости порина OprD приводит к снижению поступления карбапенемов в бактериальную клетку и является одним из часто встречающихся механизмов формирования резистентности к карбапенемам у *P. aeruginosa*. Нарушение проницаемости OprD может возникать вследствие двух причин: 1) мутаций в области гена *oprD*, которая кодирует «аминокислотную лестницу», определяющую транспорт карбапенема через порин; 2) снижения уровня экспрессии *oprD*.

В настоящем исследовании мутации, ведущие к обрыву синтеза OprD, были обнаружены нами у 86% карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa*. Корреляции между длиной синтезированной полипептидной цепи OprD и МПК карбапенемов обнаружено не было. В связи с этим можно предположить, что дистальный обрыв полипептидной цепи порина блокирует его функцию в такой же степени, как и проксимальный.

Отсутствие корреляции может быть результатом неоднородности выборки: подавляющее большинство штаммов с мутациями, ведущими к обрыву синтеза OprD (82%), обладали дополнительными механизмами резистентности. У всех карба-НЧ изолятов без обрывающих OprD мутаций и не продуцирующих МБЛ и цефалоспориназы, наблюдался пониженный уровень экспрессии *oprD*. Снижение уровня экспрессии *oprD* у карба-НЧ изолятов в большинстве случаев сочеталось с другими механизмами резистентности.

У 8 карба-НЧ изолятов нарушение проницаемости OprD было единственным механизмом резистентности к карбапенемам. Показатели МПК меропенема у данных изолятов варьировали от 4 до 16 мкг/мл (Me = 8 (6; 12)), имипенема – от 2 до 16 мкг/мл (Me = 16 (16; 16)). Практически у всех изолятов значения МПК имипенема превышали значения МПК меропенема. Полученные результаты соответствуют данным зарубежных исследователей, в которых число штаммов с нарушением проницаемости OprD составило от 30 до 90% от всех карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa*. При этом значения МПК карбапенемов находились на невысоких уровнях (8 – 16 мкг/мл) [200, 204, 241].

Невысокие значения МПК карбапенемов при нечувствительности, обусловленной нарушением проницаемости OprD, свидетельствуют о наличии дополнительных путей поступления карбапенемов в периплазматическое пространство. В частности, транспорт меропенема осуществляют два дополнительных порина – OprP и OprD [60, 216]. В настоящем исследовании обнаружены расхождения между значениями МПК меропенема и имипенема, которые косвенно подтверждают наличие альтернативных путей проникновения меропенема в клетку *P. aeruginosa*. При наличии *oprD*-инактивации значения МПК меропенема ($Me = 8$) были значительно меньше ($p < 0,05$), чем значения МПК имипенема ($Me = 16$). Можно предположить, что именно наличие дополнительных поринов обуславливает более низкие МПК меропенема по сравнению МПК имипенема в случае, когда порин-зависимый механизм является единственным механизмом резистентности к карбапенемам. Это наблюдение может иметь практическую значимость для оптимизации противомикробной терапии. Оно говорит о том, что расхождение между МПК меропенема и имипенема в сторону уменьшения МПК меропенема является признаком *oprD*-инактивации. В этих случаях использование меропенема для лечения синегнойной инфекции предпочтительнее.

Всего у 51 карба-НЧ изолята *P. aeruginosa* было обнаружено 30 различных структурных вариантов *oprD*-гена. Это подтверждает высокое разнообразие адаптационных изменений *oprD*, описанное другими исследователями [179]. Самым важным результатом, полученным при исследовании структуры *oprD*, было открытие новых IS-элементов у синегнойной палочки. Впервые в *oprD*-гене *P. aeruginosa* были найдены вставочные элементы IS_{Psm1} и IS_{Pst2}, которые ранее были описаны у *Pseudomonas mendocina* и *Pseudomonas stutzeri*, соответственно [42, 221]. IS-элемент IS_{Pa195}, обнаруженный в ходе нашего исследования, не имеет гомологии с известными вставочными последовательностями. Характеристики нового IS-элемента были внесены в базы данных BioProject (режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/436637>)

и IS-finder (режим доступа: <https://isfinder.biotoul.fr/scripts/ficheIS.php?name=ISPa195>) под номером MF770250.

Данное наблюдение является крайне важным. Способность IS-элементов к горизонтальному переносу, а, следовательно, распространению *oprD*-зависимой нечувствительности к карбапенемам среди госпитальных штаммов рода *Pseudomonas*, свидетельствует об эпидемиологической значимости этого механизма резистентности. IS-зависимое повреждение гена *oprD* является достаточно распространенным среди клинических штаммов *P. aeruginosa*: в настоящем исследовании выявлено, что вставочные элементы в составе *oprD* обнаруживаются у 25% карба-НЧ изолятов синегнойной палочки.

У 55% (28/51) карба-НЧ изолятов была выявлена гиперактивность эффлюкс-систем. Все изоляты с гиперактивностью эффлюкс-систем имели дополнительные механизмы резистентности (продукция карбапенемаз, гиперпродукция цефалоспоринов или нарушение проницаемости OprD). Сочетание гиперэффлюкса с другими механизмами затрудняет избирательную оценку вклада этого механизма в общий уровень карбапенемрезистентности. Тем не менее, эффлюкс-насосы являются важным инструментом реализации устойчивости к бета-лактамам. Об этом говорят не только литературные данные [58, 188]. Косвенным доказательством роли эффлюкс-помп, полученном в настоящем исследовании, является отсутствие усиления эффлюкс-процессов у чувствительных к карбапенемам штаммов.

Наиболее частым сочетанием механизмов резистентности, выявленном в нашем исследовании, стало сочетание гиперактивности эффлюкс-систем и *oprD*-инактивации. Такое сочетание механизмов было обнаружено у 25% карба-НЧ изолятов. В группе штаммов с данными механизмами (13 штаммов) МПК меропенема и имипенема варьировали в пределах от 4 до 32 мкг/мл. В описанных в литературе случаях, когда гиперактивность эффлюкса обнаруживалась в качестве единственного механизма резистентности,

результатом становились более высокие значения МПК меропенема по сравнению с МПК имипенема, так как основным субстратом эффлюкс-системы MexAB-OprM является именно меропенем. Однако, как уже было сказано выше, меропенем в отличие от имипенема, поступающего в периплазматическое пространство только через OprD, имеет несколько альтернативных поринов для поступления в бактериальную клетку. Вследствие этого наличие нарушений порина OprD может нивелировать различия МПК меропенема и имипенема, возникающие в результате гиперактивности эффлюкс-помп.

Несколько упрощенным, но весьма наглядным итогом исследования может стать таблица, отражающая влияние механизмов карбапенемрезистентности на общий уровень устойчивости к карбапенемам (по значениям МПК), а также показывающая частоту встречаемости указанных механизмов среди карба-НЧ изолятов *P. aeruginosa* (таб. 13). Как видно из этой таблицы, самые высокие уровни МПК карбапенемов встречаются у изолятов с менее распространенными механизмами. Это можно объяснить с позиции энергозатрат, которые синегнойная палочка расходует на реализацию того или иного механизма резистентности. Бета-лактамазы являются наиболее эффективными инактиваторами карбапенемов, но они имеют белковую структуру, а значит, их постоянный синтез (они продуцируются конституитивно) требует максимальных энергозатрат. Это снижает конкурентоспособность бактерий в отсутствие антибиотиков, поэтому такой механизм не может получить максимального распространения. Альтернативные механизмы (гиперэффлюкс, *oprD*-инактивация), напротив, не требуют синтеза дополнительных протеинов. Более того, они могут работать за счет угнетения синтеза белка (снижение экспрессии *oprD*), следовательно, являются более экономичными. И хотя они не приводят к росту МПК карбапенемов до максимальных значений, уровень резистентности, генерируемый за счет этих механизмов, способен обеспечить выживание в условиях воздействия терапевтических доз антибиотика, не нанося ущерба энергетическим потребностям синегнойной палочки. Отсюда логичным

выглядит более широкое распространение среди карба-НЧ-изолятов гиперактивности эффлюкс-систем и инактивации порина OprD.

Таблица 13

Механизмы карбапенемрезистентности, частота их встречаемости и повышение общего уровня устойчивости к карбапенемам у клинических изолятов *P. aeruginosa*

		Механизмы, включающие:		Механизмы, включающие <i>oprD</i> -инактивацию	Механизмы, включающие гиперэффлюкс
		продукцию карбапенемаз	гиперпродукцию цефалоспоринов		
МПК, Ме (0,25; 0,75)	меропенем	256 (256; 512)	128 (16; 256)	32 (8; 256)	32 (8; 128)
	имипенем	512 (256;512)	64 (32; 128)	32 (16; 256)	32 (16; 128)
Частота встречаемости (% от всех карба-НЧ изолятов)		29%	29%	96%	55%

Вероятно, отбор механизмов резистентности и выживание успешных клонов *P. aeruginosa* с определенными сочетаниями механизмов зависит от многих условий, включая экологические особенности, воздействие антибактериальных препаратов, микроокружение (наличие потенциальных бактерий-доноров генов резистентности – *bla*-генов и IS-элементов, способных к горизонтальному переносу). Всё это определяет сложность молекулярно-генетических механизмов устойчивости *P. aeruginosa* к карбапенемам, которая продемонстрирована и расшифрована в настоящем диссертационном исследовании.

ВЫВОДЫ

1. В осуществлении ферментативной инактивации карбапенемов (меропенема и имипенема) у карбапенемнечувствительных изолятов *P. aeruginosa* принимает участие два типа бета-лактамаз: цефалоспорины в сочетании с другими механизмами устойчивости (гиперэффлюкс и/или *oprD*-инактивация) и металло-бета-лактамазы группы VIM. Наличие инактивирующих карбапенемы бета-лактамаз (металло-бета-лактамазы VIM-группы и гиперпродукция цефалоспорины) ассоциируется у клинических изолятов *P. aeruginosa* с формированием наиболее высоких значений МПК меропенема и имипенема.

2. Факт продукции карбапенемаз (металло-бета-лактамаз группы VIM) у карбапенемнечувствительных изолятов *P. aeruginosa* быстро и достоверно выявляется с помощью матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии.

3. Инактивация порина OprD (мутации в гене *oprD*, ведущие к обрыву синтеза порина OprD, а также снижение экспрессии *oprD*) является наиболее распространенным механизмом нечувствительности к карбапенемам у клинических изолятов *P. aeruginosa*. Мутации в гене *oprD* у нечувствительных к карбапенемам изолятов *P. aeruginosa* отличаются высокой степенью разнообразия и представлены преждевременными стоп-кодонами, сдвигами рамки считывания и вставкой мобильных генетических элементов (IS).

4. У штаммов *P. aeruginosa* с инактивацией порина OprD, не сочетающейся с продукцией карбапенемаз и гиперпродукцией цефалоспорины, регистрируется более низкий уровень резистентности к карбапенемам, чем у штаммов, продуцирующих металло-бета-лактамазы группы VIM или гиперпродуцирующих цефалоспорины.

5. Гиперактивность RND-эффлюкс-систем является часто встречающимся свойством карбапенемнечувствительных изолятов и не регистрируется у карбапенемчувствительных штаммов *P. aeruginosa*.

6. Различия между уровнями устойчивости к карбапенемам среди клинических изолятов *P. aeruginosa* с разными сочетаниями механизмов возникают лишь благодаря продукции металло-бета-лактамаз группы VIM или гиперпродукции цефалоспоринов, которые статистически значимо повышают уровни резистентности к меропенему и имипенему.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оптимизации антибактериальной терапии синегнойной инфекции, вызванной карбапенемнечувствительными штаммами, необходимо проводить расшифровку механизмов устойчивости изолята-возбудителя *P. aeruginosa* к карбапенемам при помощи фенотипических, молекулярно-генетических и масс-спектрометрических методов.

2. Для ускоренного выявления карбапенемазных механизмов устойчивости у клинических изолятов *P. aeruginosa* предлагается использовать вариант матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии, описанный в настоящем диссертационном исследовании.

3. Для детального определения бета-лактамазных механизмов резистентности *P. aeruginosa* к карбапенемам целесообразно применение упрощенного (с использованием МБЛ-Е-теста и теста с нитроцефином) или развернутого (с использованием МАЛДИ-ВП МС, детекции генов карбапенемаз и теста с нитроцефином) лабораторно-диагностических алгоритмов, предложенных в диссертационном исследовании.

4. Для повышения эффективности эпидемиологических исследований, направленных на изучение циркуляции карбапенемрезистентных штаммов *P. aeruginosa*, в качестве эпидемиологических маркеров следует использовать вставочные элементы, отвечающие за формирование OprD-зависимой устойчивости к карбапенемам и выявляемые с помощью молекулярно-генетических методов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Перспективным направлением дальнейших исследований по теме диссертационной работы является разработка фенотипических способов определения порин- и эффлюкс-зависимых механизмов резистентности *P. aeruginosa* к карбапенемам.

2. Планируется разработка способов оценки участия порин- и эффлюкс-зависимых механизмов в формировании карбапенемрезистентности у клинических изолятов *P. aeruginosa* при помощи матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии.

3. Планируется адаптация способа масс-спектрометрической детекции карбапенемаз у *P. aeruginosa*, направленная на возможность его использования для обнаружения карбапенемаз непосредственно в клиническом материале (кровь, ликвор) от пациента.

4. Планируется проведение молекулярно-генетического исследования генов *opdD* и *opdP* у карбапенемнечувствительных изолятов *P. aeruginosa*; указанные гены кодируют порины наружной мембраны OpdD и OpdP, являющиеся потенциальными транспортерами карбапенемов внутрь бактериальной клетки, а следовательно, их инактивация может рассматриваться в качестве механизма карбапенемрезистентности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
Карба-НЧ	- карбапенемнечувствительный
Карба-Ч	- карбапенемчувствительный
КОР	- концентрация отсутствия роста
КП	- карбапенемаза
ЛПС	- липополисахарид
МАЛДИ-ВП МС	- матрично-активированная лазерная десорбционно-ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия
МБЛ	- металло-бета-лактамаза
МГЭ	- мобильный генетический элемент
МПК	- минимальная подавляющая концентрация
п. н.	- пара нуклеотидов
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ЦФ	- цефалоспориноаза
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота
DHB	- 2,5-Dihydroxybenzoic acid, 2,5-Дигидроксибензойная кислота
EPI	- efflux pump inhibitor
EUCAST	- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам
IS	- insertion sequence, вставочная последовательность

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акатов, А.К. Внутрибольничная инфекция, вызываемая синегнойной палочкой / А.К. Акатов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1966. – № 5. – С. 38–41.
2. Баранов, А.А. Новая эпоха в медицинской микробиологии / А.А. Баранов, А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь, Н.А. Маянский // Вестник Российской академии наук. – 2015. – Т. 85, № 11. – С. 1011–1018.
3. Герасимов, А.Н. Медицинская статистика / А.Н. Герасимов. – М.: Медицинское информационное агентство, 2007. – 310 с.
4. ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни. – Введ. 2012-03-01. – М. : Госстандарт России : Изд-во стандартов, 2012. – 6 с.
5. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. – Введ. 2015-22-05. – Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, 2016. – 47 с.
6. Калошин, А.А. Получение слитных рекомбинантных белков OPRF-ΔOPRI. ΔOPRF-ΔOPRI и OPRF-ATOX-ΔOPRI *Pseudomonas aeruginosa* / А.А. Калошин, А.В. Солдатенкова, Е.М. Зиминая, Н.А. Михайлова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – №5. – С. 32–38.
7. Козлов, Р.С. Антибиотикорезистентность грамотрицательных возбудителей осложнённых интраабдоминальных инфекций в России / Р.С. Козлов, А.В. Голуб, А.В. Дехнич, М.В. Сухорукова, исследовательская группа SMART // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 227–234.
8. Лазарева, А.В. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // А.В. Лазарева, И.В. Чеботарь, О.А. Крыжановская, В.И. Чеботарь, Н.А.

- Маянский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2015. – Т. 17, № 3. – С. 170–186.
9. Лазарева, И.В. Распространение и антибактериальная резистентность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, в Санкт-Петербурге и некоторых других регионах Российской Федерации / И.В. Лазарева, В.А. Агеевец, Т.А. Ершова, Л.П. Зуева, А.Е. Гончаров, М.Г. Дарьина, Ю.С. Светличная, А.Н. Усков, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – № 11–12. – С. 28–38.
 10. Лисицына, Е.С. Обнаружение генетических маркеров резистентности к бета-лактамам антибиотикам у грамотрицательных микроорганизмов с помощью ПЦР-диагностики / Е.С. Лисицына, Т.В. Черненькая, Е.Н. Ильина, И.В. Лазарева, В.А. Агеевец, С.В.Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т. 60., № 9–10. – С. 17–22.
 11. Поболелова, Ю.И. Мультиплексная ПЦР для совместной амплификации генов бактериальных ферментов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D / Ю.И. Поболелова, М.М. Уляшова, М.Ю. Рубцова, А.М. Егоров // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 6. – С. 718–723.
 12. Савочкина, Ю.А. Выявление наиболее значимых генетических маркеров антибиотикорезистентности грам-отрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций / Ю.А. Савочкина, О.Ю. Тимошина, И.А. Александрова // Дезинфекционное дело. – 2017. – Т 1, №99. – С. 59–60.
 13. Попов, Д.А. Определение продукции карбапенемаз *P. aeruginosa* в рутинной практике / Д.А.Попов, Т.Ю. Вострикова, Е. Рогальская // Дезинфекционное дело. – 2017. – Т. 1, №99. – С. 57.
 14. Страчунский, Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусов, С.Н. Козлов. – Смоленск: НИИАХ СГМА, 2002. – 55 с.
 15. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового

- эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. Тимохова, Е.А. Шек, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов и исследовательская группа «МАРАФОН» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. - Т. 16, №4. – С. 273–279.
16. Тапальский, Д.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции / Д.В. Тапальский, В.А. Осипов, С.В. Жаворонок / Медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 10–15.
17. Тарасевич, Л.А. Медицинская микробиология / Л.А. Тарасевич. – СПб—Киев, 1912. – С. 155–162.
18. Тихомиров, Д.С. Мультиплексная ПЦР как новый метод определения генов устойчивости к карбапенемам / Д.С. Тихомиров, С.А. Катрыш, Ю.А. Савочкина, Т.А. Гаранжа, Т.А. Туполева, Ф.П. Филатов, Г.М. Галстян // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № S1. – С. 123.
19. Чеботарь, И. В. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова, А.В. Лазарева, В.П. Чистякова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, №. 1. – С. 51–58.
20. Шагинян, И.А. Молекулярные основы фенотипической гетерогенности бактерий *P. aeruginosa*, вызывающих хроническую инфекцию легких у больных муковисцидозом // И.А. Шагинян, Л.Р. Аветисян, М.Ю. Чернуха, Е.А. Сиянова, Т.В. Припутневич, Д.Ю. Трофимов, А.В. Гордеев, Е.И. Кондратьева, С.А. Красовский, А.Л. Гинцбург // Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017». – Москва, 2017. – С. 250–251.
21. Эйдельштейн, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2013–2014 гг. / М.В. Эйдельштейн, М.В. Сухорукова, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В.

- Микотина, Е.А. Шек, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов и исследовательская группа «МАРАФОН» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 1. – С. 37–41.
22. Adabi, M. Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an efflux pump inhibitor / M. Adabi, M. Talebi-Taher, L. Arbabi, M. Afshar, S. Fathizadeh, S. Minaeian, N. Moghadam-Maragheh, A. Majidpour // Infection and Chemotherapy. – 2015. – Vol. 47, № 2. – P. 98–104.
23. Adewoye, L. The MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity Sutherland / L. Adewoye, A. Sutherland, R. Srikumar, K. Poole // Journal of Bacteriology. – 2002. – Vol. 184, №15. – P. 4308–4312.
24. Akama, H. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end / H. Akama, M. Kanemaki, M. Yoshimura, T. Tsukihara, T. Kashiwagi, H. Yoneyama // Journal of Biological Chemistry – 2004. – Vol. 279, № 51. – P. 52816–52819.
25. Akama, H. Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa* / H. Akama, T. Matsuura, S. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. Narita, T. Tsukihara, A. Nakagawa, T. Nakae // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279, № 25. – P. 25939–25942.
26. Al Bayssari, C. Emergence of VIM-2 and IMP-15 carbapenemases and inactivation of *oprD* gene in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Lebanon / C. Al Bayssari, S.M. Diene, L. Loucif, S.K. Gupta, F. Dabboussi, H. Mallat, M. Hamze, J.M. Rolain // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2014. – № 8. – P. 4966–4970.
27. Al-Nayyef, H. Relation between insertion sequences and genome rearrangements in *Pseudomonas aeruginosa* // H. Al-Nayyef, C. Guyeux, M. Petitjean, D. Hocquet,

- J.M. Bahi // *Bioinformatics and Biomedical Engineering*. – 2015. - Lecture Notes in Computer Science. – № 9043. – P. 426–437.
28. Alvarez-Ortega, C. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics / C. Alvarez-Ortega, I. Wiegand, J. Olivares, R.E.W. Hancock, J.L. Martinez // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – № 54. – P. 4159–4167.
29. Ambler, R.P. The structure of β -lactamases / R.P. Ambler // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. – 1980. – № 289. – P. 321–331.
30. Ardebili, A. Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates / A. Ardebili, A.R. Lari, M. Talebi // *Annals of Laboratory Medicine*. – 2014. – Vol. 34, № 6. – P. 433–438.
31. Arzanlou, M. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria // M. Arzanlou, W.C. Chai, H. Venter // *Essays In Biochemistry*. – 2017. – Vol. 61, № 1. – P. 49–59.
32. Askoura, M. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* [Электронный ресурс] / M. Askoura, W. Mottawea, T. Abujamel, I. Taher // *The Libyan Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 13, № 6. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21594004>.
33. Avlami, A. Detection of metallo- β -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system / A. Avlami, S. Bekris, G. Ganteris, E. Kraniotaki, E. Malamou-Lada, M. Orfanidou, O. Paniara, A. Pantazatou, C.C. Papagiannitsis, E. Platsouka, I. Stefanou, E. Tzelepi, H. Vagiakou, V. Miriagou // *Journal of Microbiological Methods*. – 2010. – Vol. 83, № 2. – P. 185–187.
34. Barrow, K. Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / K. Barrow, D.H. Kwon // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. – № 53. – P. 5150–5154.
35. Bellido, F. Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability / F. Bellido, N.L.

- Martin, R.J. Siehnel, R.E. Hancock // *Journal of Bacteriology*. – 1992. – Vol. 174, № 16. – P. 5196–5203.
36. Bernabeu, S. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae / S. Bernabeu, L. Poirel, P. Nordmann // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2012. – Vol. 74, № 1. – P. 88–90.
37. Biddlecome, S. Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: a new 3-N-acetylating enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate / S. Biddlecome, M. Haas, J. Davies, G.H. Miller, D.F. Rane, P.J. Daniels // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1976. – № 9. – P. 951–955.
38. Biswas, S. Structural insight into OprD substrate specificity / S. Biswas, M.M. Mohammad, D.R. Patel, L. Movileanu, B. van den Berg // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 14. – № 11. – P. 1108–1109.
39. Bogaerts, P. Detection and characterization of VIM-31, a new variant of VIM-2 with Tyr224His and His252Arg mutations, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* / P. Bogaerts, C. Bebrone, T.D. Huang, W. Bouchahrouf, Y. Degheldre, A. Deplano, K. Hoffmann, Y. Glupczynski // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2012. – Vol. 56, № 6. – P. 3283–3287.
40. Bogaerts, P. Evaluation of a DNA microarray for rapid detection of the most prevalent extended-spectrum β -lactamases, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter / P. Bogaerts, G. Cuzon, S. Evrard, M. Hoebeke, T. Naas, Y. Glupczynski // *International journal of antimicrobial agents*. – 2016. – Vol. 48, № 2. – P. 189–193.
41. Bohnert, J.A. Determination of real-time efflux phenotypes in *Escherichia coli* AcrB binding pocket phenylalanine mutants using a 1,2'-dinaphthylamine efflux assay / J.A. Bohnert, S. Schuster, M. Szymaniak-Vits, W.V. Kern // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 6. – e21196.
42. Bolognese, F. Activation and inactivation of *Pseudomonas stutzeri* methylbenzene catabolism pathways mediated by a transposable element / F. Bolognese, C. Di

- Lecce, E. Galli, P. Barbieri // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – Vol. 65, №5. – P. 1876–1882.
43. Boucher, H.W. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America / H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett // *Clinical Infection Disease*. – 2009. – Vol. 48, № 1. – P. 1–12.
44. Boutoille, D. Detection of an IS21 insertion sequence in the mexR gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing beta-lactam resistance / D. Boutoille, S. Corvec, N. Caroff, C. Giraudeau, E. Espaze, J. Caillon, P. Plesiat, A. Reynaud // *FEMS Microbiology Letters*. – 2004. – Vol. 230, №1. – P. 143–146.
45. Braz, V.S. Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / V.S. Braz, J.P. Furlan, A.F. Fernandes, E.G. Stehling // *FEMS Microbiology Letters*. – 2016. – Vol. 363, № 16. – fnw166.
46. Breidenstein, E.B. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility / E.B. Breidenstein, B.K. Khaira, I. Wiegand, J. Overhage, R.E.W. Hancock // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – № 52. – P. 4486–4491.
47. Breidenstein, E.B. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance / E.B. Breidenstein, C. de la Fuente-Nunez, R.E. Hancock // *Trends in microbiology*. – 2011. – Vol. 19, № 8. – P. 419–426.
48. Brewer, S.C. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* / S.C. Brewer, R.G. Wunderink, C.B. Jones, K.V. Leeper // *CHEST*. – 1996. – № 109. – P. 1019–1029.
49. Buscher, K.H. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein / K.H. Buscher, W. Cullmann, W. Dick, W. Opferkuch // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1987. – Vol. 31, № 5. – P. 703–708.

50. Bustin, S.A. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments / S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer // *Clinical Chemistry*. – 2009. – Vol. 55, № 4. – P. 611–622.
51. Cai, J.C. Detection of OmpK36 Porin Loss in *Klebsiella* spp. by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry / J.C. Cai, Y.Y. Hu, R. Zhang, H.W. Zhou, G.X. Chen // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol. 50, №6. – P. 2179–2182.
52. Caille, O. A Copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / O. Caille, C. Rossier, K. Perron // *Journal of Bacteriology*. – 2007. – Vol. 189, № 13. – P. 4561–4568.
53. Carrara-Marroni, F.E. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital // F.E. Carrara-Marroni, R. Cayo, A.P. Streling, A.C. da Silva, R.L. Palermo, P. Romanin, E. Venancio, M.R. Perugini, M. Pelisson, A.C. Gales // *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. – 2015. – Vol. 3, № 4. – P. 304–306.
54. Carrer, A. Use of ChromID extended-spectrum beta-lactamase medium for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae // A. Carrer, N. Fortineau, P. Nordmann // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – Vol. 48, № 5. – P. 1913–1914.
55. Castanheira, M. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries / M. Castanheira, L.M. Deshpande, A. Costello, T.A. Davies, R.N. Jones // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2014. – Vol. 69, № 7. – P. 1804–1814.
56. Cayci, Y.T. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates / Y.T. Cayci, A.Y. Coban, M. Gunaydin // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2014. – Vol. 32, № 3. – P. 285–289.

57. Centers for Disease Control and Prevention [Электронный ресурс] // Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. – P. 69–71. – URL: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html> (дата обращения: 15.12.2017).
58. Chalhoub, H. High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations / H. Chalhoub, Y. Saenz, H. Rodriguez-Villalobos, O. Denis, B.C. Kahl, P.M. Tulkens, F. Van Bambeke // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2016. – Vol. 48, № 6. – P. 740–743.
59. Chevalier, S. Sequence diversity of the OprD protein of environmental *Pseudomonas* strains / S. Chevalier, J. Bodilis, T. Jaouen, S. Barray, M.G.J. Feuilloley, N. Orange // Environmental Microbiology. – 2007. – № 9. – P. 824–835.
60. Chevalier, S. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins // S. Chevalier, E. Bouffartigues, J. Bodilis, O. Maillot, O. Lesouhaitier, M.G.J. Feuilloley, N. Orange, A. Dufour, P. Cornelis // FEMS Microbiology Reviews. – 2017. – Vol. 41, № 5. – P. 698–722.
61. Chong, P.M. MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of Enterobacteriaceae spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay / P.M. Chong, S.J. McCorrister, M.S. Unger, D.A. Boyd, M.R. Mulvey, G.R. Westmacott // Journal of Microbiological Methods. – 2015. - № 111. – P. 21–23.
62. Cohen Stuart, J. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae / J. Cohen Stuart, M.A. Leverstein-Van Hall // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2010. – Vol. 36, № 3. – P. 205–210.
63. Colomb-Cotinat, M. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012 [Электронный ресурс] / M. Colomb-Cotinat, J. Lacoste, C. Brun-Buisson, V. Jarlier, B. Coignard,

- S. Vaux // *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. – 2016. – Vol. 5, № 56. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27999665>.
64. Cox, G. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions / G. Cox, G.D. Wright // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2013. – Vol. 303, №. 6. – P. 287–292.
65. Dallenne, C. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae / C. Dallenne, A. Da Costa, D. Decre, C. Favier, G. Arlet // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2010. – Vol. 65, №3. – P. 490–495.
66. Daugelavicius, R. Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope / R. Daugelavicius, E. Bakiene, D.H. Bamford // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – № 44. – P. 2969–2978.
67. Delmar, J.A. Bacterial multi-drug efflux transporters / J.A. Delmar, C.C. Su, E.W. Yu // *Annual review of biophysics*. – 2014. – № 43. – P. 93–117.
68. Diene, S.M. ISPa46, a novel insertion sequence in the *oprD* porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a cystic fibrosis patient in Marseille, France / S.M. Diene, T. L'homme, S. Bellulo, N. Stremmer, J.C. Dubus, L. Mely, S. Leroy, N. Degand, J.M. Rolain // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2013. – Vol. 42, № 3. – P. 268–271.
69. Dieppois, G. The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // G. Dieppois, V. Ducret, O. Caille, K. Perron // *PLoS One*. – 2012. – V. 7, №5. – e38148.
70. Djordjevic, Z. Nosocomial urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species: Sensitivity to antibiotics and risk factors / Z. Djordjevic, M. M. Folic, Z. Zivic, V. Markovic, S.M. Jankovic // *American journal of infection control*. – 2013. – Vol. 41, № 12. – P. 1182–1187.
71. Doi, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides / Y. Doi, Y. Arakawa // *Clinical Infectious Diseases*. – 2007. – № 45. – P. 88–94.

72. Doring, G. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus / G. Doring, S.P. Conway, H.G. Heijerman, M.E. Hodson, N. Hoiby, A. , D.J. Touw // *European Respiratory Journal*. – 2000. – Vol. 16, № 4. – P. 749–767.
73. Dotsch A. Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / A. Dotsch, T. Becker, C. Pommerenke, Z. Magnowska, L.S. Jansch Haussler // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. – № 53. – P. 2522–2531.
74. Dreier, J. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* [Электронный ресурс] / J. Dreier, P. Ruggerone // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6, № 660. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4495556/>.
75. Edelstein, M.V. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study / M.V. Edelstein, E.N. Skleenova, O.V. Shevchenko, J.W. D'souza, D.V. Tapalski, I.S. Azizov, M.V. Sukhorukova, R.A. Pavlukov, R.S. Kozlov, M.A. Toleman, T.R. Walsh // *Lancet Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 13, №10. – P. 867–876.
76. Ehmman, D.E. Kinetics of avibactam inhibition against class A, C, and D β -Lactamases / D.E. Ehmman, H. Jahic, P.L. Ross, R.F. Gu, J. Hu, T.F. Durand-Reville, S. Lahiri, J. Thresher, S. Livchak, N. Gao, T. Palmer, G.K. Walkup, S.L. Fisher // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288, № 39. – P. 27960–27971.
77. Epp, S.F. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem / S.F. Epp, T. Kohler, P. Plesiat, M. Michea-Hamzhepour, J. Frey, J.C. Pechere *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 45, № 6. – P. 1780 – 1787.
78. Eren, E. Substrate specificity within a family of outer membrane carboxylate channels / E. Eren, J. Vijayaraghavan, J. Liu, B.R. Cheneke, D.S. Touw, B.W.

- Lepore, M. Indic, L. Movileanu, B. van den Berg // PLoS Biology. – 2012. – Vol. 10, № 1. – e1001242.
79. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [электронный ресурс] // EUCAST Experts rules, 2016. – P. 143 – URL: http://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/ (дата обращения: 15.12.2017).
80. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [электронный ресурс] // Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. – P. 11. – URL: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (дата обращения: 10.01.2018).
81. Evans, J.C. Novel Insertion sequence, ISPa26, in *oprD* of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with carbapenem resistance / J.C. Evans, H.A. Segal // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2007. – Vol. 51. – № 10. – P. 3776-3777.
82. Fernandez, L. Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS / L. Fernandez, W.J. Gooderham, M. Bains, J.B. McPhee, I. Wiegand, R.E. Hancock // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2010. – № 54. – P. 3372–3382.
83. Fernandez, L. Characterization of the Polymyxin B resistome of *Pseudomonas aeruginosa* / L. Fernandez, C. Alvarez-Ortega, I. Wiegand, J. Olivares, D. Kocincova, J.S. Lam, J.L. Martinez, R.E.W. Hancock // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2013. – Vol. 57, № 1. – P. 110–119.
84. Fernando, D.M. Resistance-Nodulation-Division multidrug efflux pumps in gram-negative bacteria: role in virulence / D.M. Fernando, A. Kumar // Antibiotics. - 2013. – Vol. 2, №1. – P. 163–181.
85. Fleiss, J.L. Statistical methods for rates and proportions / J.L. Fleiss, Levin B., Paik M.C. - New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1981. - P.768.
86. Foster, T. J. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria / T.J. Foster // Microbiological reviews. – 1983. – Vol. 47, № 3. – P. 361–409.

87. Francisco, J.A. Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli* // J.A. Francisco, C.F. Earhart, G. Georgiou // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – Vol. 89, № 7. – P. 2713–2717.
88. Galimand, M. Characterization of the aac(6')-Ib gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase in *Pseudomonas aeruginosa* BM2656 / M. Galimand, T. Lambert, G. Gerbaud, P. Courvalin // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1993. – № 37. – P. 1456–1462.
89. Garza-Ramos, U. Widespread of ESBL-and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals / U. Garza-Ramos, H. Barrios, F. Reyna-Flores, E. Tamayo-Legorreta, J.C. Catalan-Najera, R. Morfin-Otero, J. Gaytan-Martinez // Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2015. – Vol. 81, № 2. – P. 135–137.
90. Gazin, M. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- β -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae / M. Gazin, F. Paasch, H. Goossens, S. Malhotra-Kumar // Journal of Clinical Microbiology. – 2012. – Vol. 50, № 4. – P. 1140–1146.
91. Ghebremedhin, B. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials [Электронный ресурс] / B. Ghebremedhin, A. Halstenbach, M. Smiljanic, M. Kaase, P. Ahmad-Nejad // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2016. – Vol. 15, № 5. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4736273>.
92. Ghosh, S. Chlorinated phenols control the expression of the multi-drug resistance efflux pump MexAB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* by activating NalC / S. Ghosh, C.M. Cremers, U. Jakob, N.G. Love // Molecular microbiology. – 2011. – Vol. 79, № 6. – P. 1547–1556.
93. Grobner, S. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tubingen, Germany / S. Grobner, D. Linke, W. Schütz, C. Fladerer, J. Madlung, I.B.

- Autenrieth, W. Witte, Y. Pfeifer // *Journal of Medical Microbiology*. – 2009. – Vol. 58, № 7. – P. 912–922.
94. Guillard, T. Rapid detection of *aac(6′)-Ib-cr* quinolone resistance gene by pyrosequencing / T. Guillard, V. Duval, H. Moret, L. Brasme, V. Vernet-Garnier, C. de Champs // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – Vol. 48, № 1. – P. 286–289.
95. Gurung, M. Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla_{IMP-1}* in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea / M. Gurung, D.C. Moon, M.D. Tamang, J. Kim, Y.C. Lee, S.Y. Seol, D.T. Cho, J.C. Lee // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2010. – № 68. – P. 468–470.
96. Gutu, A.D. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* *phoQ* mutants is dependent on additional two-component regulatory systems / A.D. Gutu, N. Sgambati, P. Strasbourger, M.K. Brannon, M.A. Jacobs, E. Haugen, R.K. Kaul, H.K. Johansen, N. Hoiby, S.M. Moskowitz // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 57, №5. – P. 2204–2215.
97. Haas, M. Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: a new 6′-N-acetylating enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate / M. Haas, S. Biddlecome, J. Davies, C.E. Luce, P. Daniels // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1976. – № 9. – P. 945–950.
98. Hammoudi, D. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods / D. Hammoudi, C.A. Moubareck, D.K. Sarkis // *Journal of Microbiological Methods*. – 2014. – № 107. – P. 106–118.
99. Hancock, R.E.W. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria / R.E.W. Hancock // *Clinical Infectious Diseases*. – 1998. – Vol. 27, №. 1. – P. S93–S99.
100. Henrichfreise, B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation / B. Henrichfreise, I. Wiegand, W. Pfister, B. Wiedemann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2007. – Vol. 51, № 11. – P. 4062–4070.

101. Hidron, A.I. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007 / A.I. Hidron, J.R. Edwards, J. Patel, T.C. Horan, D.M. Sievert, D.A. Pollock, National Healthcare Safety Network Team // *Infection Control Hospital Epidemiology*. – 2008. – № 29. – P. 996–1011.
102. Hirabayashi, A. Risk factors for and role of OprD protein in increasing minimal inhibitory concentrations of carbapenems in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / A. Hirabayashi, D. Kato, Y. Tomita, M. Iguchi, K. Yamada, Y. Kouyama, T. Yagi // *Journal of Medical Microbiology*. – 2017. – Vol. 66, № 11. – P. 1562–157.
103. Hocquet, D. Relationship between antibiotic use and incidence of MexXY-OprM overproducers among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / D. Hocquet, A. Muller, K. Blanc, P. Plesiat, D. Talon, D.L. Monnet, X. Bertrand // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – № 52. – P. 1173–1175.
104. Hong, D.J. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* // D.J. Hong, I.K. Bae, I. Jang, S.H. Jeong, H. Kang, K. Lee // *Infection and chemotherapy*. – 2015. – Vol. 47, № 2. – P. 81-97.
105. Hoyos-Mallecot, Y. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp / Y. Hoyos-Mallecot, J.J. Cabrera-Alvargonzalez, C. Miranda-Casas, M.D. Rojo-Martin, C. Liebana-Martos, J.M. Navarro-Mari // *Letters in Applied Microbiology*. – 2014. – Vol. 58, № 4. – P. 325–329.
106. Hrabak, J. Carbapenemase activity detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry / J. Hrabak, R. Walkova, V. Studentova, E. Chudackova, T. Bergerova // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. – Vol. 49, № 9. – P. 3222–3227.
107. Hrabak, J. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from

- research to routine diagnosis / J. Hrabak, E. Chudackova, R. Walkova // *Clinical microbiology reviews*. – 2013. – Vol. 26, № 1. – P. 103–114.
108. Huang, H. Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD / H. Huang, D. Jeanteur, F. Pattus, R.E. Hancock // *Molecular Microbiology*. – 1995. – Vol. 16, №5. – P. 931–941.
109. Imperi, F. Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen / F. Imperi, F. Ciccocanti, A.B. Perdomo, F. Tiburzi, C. Mancone, T. Alonzi, P. Ascenzi, M. Piacentini, P. Visca, G.M. Fimia // *Proteomics*. – 2009. – Vol. 9, № 7. – P. 1901–1915.
110. Ishii, Y. Localization of cephalosporinase in *Enterobacter cloacae* by immunocytochemical examination / Y. Ishii, M. Ichikawa, K. Yamaguchi, K. Takano, M. Inoue // *The Journal of antibiotics*. – 1991. – Vol. 44, № 10. – P. 1088–1095.
111. Jacoby, G.A. Mechanisms of resistance to quinolones / G.A. Jacoby // *Clinical Infectious Diseases*. – 2005. – Vol 41, № 2. – P. 120–126.
112. Jacoby, G.A. AmpC β -Lactamases / G.A. Jacoby // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2009. – Vol. 22, № 1. – P. 161–182.
113. Jalal, S. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients / S. Jalal, O. Ciofu, N. Hoiby, N. Gotoh, B. Wretling // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – № 44. – P. 710–712.
114. Jana, S. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance / S. Jana, J.K. Deb // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – № 70. – P. 140–150.
115. Jin, J.S. Emergence of 16S rRNA methylase rmtA in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea / J.S. Jin, K.T. Kwon, D.C. Moon, J.C. Lee // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2009. – № 33. – P.490–491.
116. Johansson, A. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight

- [Электронный ресурс] / A. Johansson, J. Ekelof, C.G. Giske, M. Sundqvist // ВМС Microbiology. – 2014. – Vol. 14, № 89. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24720586>.
117. Jovcic, B. Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia / B. Jovcic, Z. Lepsanovic, V. Suljagic, G. Rackov, J. Begovic, L. Topisirovic, M. Kojic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2011. – Vol. 55, № 8. – P. 3929–3931.
118. Kettner, M. Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates / M. Kettner, P. Milosovic, M. Hletkova, J. Kallova // Infection. – 1995. – № 23. – P. 380–383.
119. Kim, J.Y. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study / J.Y. Kim, Y.J. Park, H.J. Kwon, K. Han, M.W. Kang, G.J. Woo // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. – № 62. – P. 479–483.
120. Kipnis, E. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis / E. Kipnis, T. Sawa, J. Wiener-Kronish // Medecine et Maladies Infectieuses. – 2006. – № 36. – P. 78–91.
121. Kitao, T. Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo- β -lactamases that mediate carbapenem resistance in *Pseudomonas* / T. Kitao, T. Miyoshi-Akiyama, M. Tanaka, K. Narahara, M. Shimojima, T. Kirikae // Journal of Microbiological Methods. – 2011. – Vol. 87, № 3. – P. 330–337.
122. Knox, J. Phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Carba NP test / J. Knox, S. Jadhav, D. Seviour, A. Agyekum, M. Whipp, L. Waring, J. Iredell, E. Palombo // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – № 52. – P. 4075–4077.
123. Kohler, T. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems / T. Kohler, M. Michea-Hamzhepour, S.F.

- Epp, J.C. Pechere // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1999. – Vol. 43, № 2. – P. 424–427.
124. Kong, K.F. Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase / K.F. Kong, S.R. Jayawardena, A. Del Puerto, L. Wiehlmann, U. Laabs, B. Tummler, K. Mathee // *Gene*. – 2005. – № 358. – P. 82–92.
125. Kos, V.N. Identification of unique in-frame deletions in OprD among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / V.N. Kos, R.E. McLaughlin, H.A. Gardner // *Pathogens and Disease*. – 2016. – Vol. 74. – № 4. – ftw031.
126. Kumar, A. Evidence of MexT-independent overexpression of MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in presence of metabolic stress // A. Kumar, H.P. Schweizer. – *PLoS One*. – 2011. – № 6. - e26520.
127. Lahiri, S.D. Molecular basis of selective inhibition and slow reversibility of avibactam against class D carbapenemases: a structure-guided study of OXA-24 and OXA-48 / S.D. Lahiri, S. Mangani, H. Jahic, M. Benvenuti, T.F. Durand-Reville, F. De Luca, D.E. Ehmman, G.M. Rossolini, R.A. Alm, J.D. Docquier // *ACS Chemical Biology*. – 2015. – Vol. 10, № 2. – P. 591–600.
128. Lassaux, P. Biochemical and structural characterization of the subclass B1 metallo- β -lactamase VIM-4 / P. Lassaux, D.A.K. Traore, E. Loisel, A. Favier, J.D. Docquier, J.S. Sohier // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 55, № 3. – P. 1248–1255.
129. Lasserre, C. Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes / C. Lasserre, L. De Saint Martin, G. Cuzon, P. Bogaerts, E. Lamar, Y. Glupczynski, T. Naas, D. Tande // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2015. – № 53. – P. 2163–2171.
130. Lee, H. Insertion sequence-caused large-scale rearrangements in the genome of *Escherichia coli* // H. Lee, T.G. Doak, E. Popodi, P.L. Foster, H. Tang // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44. – № 15. – P. 7109–7119.

131. Li, H. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies / H. Li, Y.F. Luo, B.J. Williams, T.S. Blackwell, C.M. Xie // International journal of medical microbiology. – 2012. – Vol. 302, № 2. – P. 63–68.
132. Li, L. A toluene-tolerant mutant of *Pseudomonas aeruginosa* lacking the outer membrane protein F / L. Li, T. Komatsu, A. Inoue, K. Horikoshi // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 1995. – Vol. 59, № 12. – P. 2358–2359.
133. Li, Y. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Li, T. Mima, Y. Komori, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima, T.J. Tsuchiya // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – № 52. – P. 572–575.
134. Lister, P.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms / P.D. Lister, D.J. Wolter, N.D. Hanson // Clinical microbiology reviews. – 2009. – Vol. 22, № 4. – P. 582–610.
135. Liu, Y.Y. Structural modification of lipopolysaccharide conferred by mcr-1 in Gram-negative ESKAPE pathogens / Y.Y. Liu, C.E. Chandler, L.M. Leung, C.L. McElheny, R.T. Mettus, R.M. Shanks, Y. Doi // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2017. – Vol. 61, № 6. – e00580-17.
136. Llanes C. Diversity of β -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study / C. Llanes, C. Pourcel, C. Richardot, P. Plesiat, G. Fichant, J.D. Cavallo, A. Merens, GERPA Study Group // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2013. – Vol. 68, № 8, P. 1763–1771.
137. Lopez, C.A. Dynamics of intact MexAB-OprM efflux pump: focusing on the MexA-OprM interface [Электронный ресурс] / C.A. Lopez, T. Travers, K.M. Pos, H.I. Zgurskaya, S. Gnanakaran // Scientific Reports. – 2017. – № 16521. – режим доступа: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16497-w>.
138. Lopez-Causape, C. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone [Электронный ресурс] / C.

- Lopez-Causape, L.M. Sommer, G. Cabot, R. Rubio, A.A. Ocampo-Sosa, H.K. Johansen, J. Figuerola, R. Canton, T.J. Kidd, S. Molin, A. Oliver // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, № 5555. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5514035/>.
139. Lorenz, A. Insights into host-pathogen interactions from state-of-the-art animal models of respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infections / A. Lorenz, V. Pawar, S. Haussler, S. Weiss // *FEBS Letters*. – 2016. – V. 590, №21. – P. 3941-3959.
140. Lu, S. Nanomechanical response of bacterial cells to cationic antimicrobial peptides / S. Lu, G. Walters, R. Parg, J.R. Dutcher // *Soft Matter*. – 2014. – № 10. – P. 1806–1815.
141. Macia, M.D. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections / M.D. Macia, D. Blanquer, B. Togores, J. Sauleda, J.L. Perez, A. Oliver // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49, № 8. – P. 3382–3386.
142. MacLeod, D.L. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment / Nelson L.E., Shawar R.M., Lin B.B., Lockwood L.G., Dirk J.E., Miller G.H., Burns J.L., Garber R.L. // *Journal of Infectious Diseases* – 2000. – № 181. – P. 1180–1184.
143. Mano, Y. Molecular analysis of the integrons of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan [Электронный ресурс] / Y. Mano, T. Saga, Y. Ishii, A. Yoshizumi, R.A. Bonomo, K. Yamaguchi, K. Tateda // *BMC Microbiology*. – 2015. – Vol. 15, № 41. – режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881168>.
144. Mao, W. On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition / W. Mao, M.S. Warren, D.S. Black, T. Satou, T. Murata, T. Nishino, N. Gotoh, O. Lomovskaya // *Molecular Microbiology*. – 2002. – Vol. 46, № 3. – P. 889–901.

145. Martinez, J.A. Approach to directed therapy after knowledge of the isolate: carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* / J.A. Martinez // Revista Espanola De Quimioterapia. – 2016. – V. 29, № 1. – P. 31–34.
146. Maseda, H. Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa* / H. Maseda, K. Saito, A. Nakajima, T. Nakae // FEMS Microbiology Letters – 2000. – Vol. 192, № 1. – P. 107–112.
147. Maseda, H. Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-oprN efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa* / H. Maseda, I. Sawada, K. Saito, H. Uchiyama, T. Nakae, N. Nomura // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2004. – Vol. 48, № 4. – P. 1320–1328.
148. Masuda, N. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* // N. Masuda, E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, T. Nishino // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2000. – Vol. 44, № 12. – P. 3322–3327.
149. Mathew, A. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases / A. Mathew, A.M. Harris, M.J. Marshall, G.W. Ross // Journal of General Microbiol. – 1975. – Vol. 88, № 1. – P. 169–178.
150. Mayr, F.B. Epidemiology of severe sepsis / F.B. Mayr, S. Yende, D.C. Angus // Virulence. – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. 4–11.
151. McCoy, L.S. Polymyxins and analogues bind to ribosomal RNA and interfere with eukaryotic translation in vitro / L.S. McCoy, K.D. Roberts, R.L. Nation, P.E. Thompson, T. Velkov, J. Li, Y. Tor // European journal of chemical biology. – 2013. – № 14. – P. 2083–2086.
152. McDaniel, C. A putative ABC transporter permease is necessary for resistance to acidified nitrite and EDTA in *Pseudomonas aeruginosa* under aerobic and anaerobic planktonic and biofilm conditions / C. McDaniel, S. Su, W. Panmanee,

- G.W. Lau, T. Browne, K. Cox, A.T. Paul, S.H. Ko, J.E. Mortensen, J.S. Lam, D.A. Muruve, D.J. Hassett // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 1, №7. – P. 291.
153. McPhee, J.B. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa* / J.B. McPhee, S. Lewenza, R.E. Hancock // *Molecular Microbiology*. – 2003. – № 50. – P. 205–217.
154. Meisenberg, G. Principles of medical biochemistry / G. Meisenberg, W.H. Simmons. - Chicago: Elsevier, 2017. – P. 134.
155. Meyer, J.M. Exogenous siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: possible involvement of porin OprF in iron translocation / J.M. Meyer // *Journal of General Microbiology*. – 1992. – Vol. 138, № 5. – P. 951–958.
156. Mine, T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa* / T. Mine, Y. Morita, A. Kataoka, T. Mizushima, T. Tsuchiya // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1999. – Vol. 43, № 2. – P. 415–417.
157. Mirande, C. Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS / C. Mirande, I. Canard, S. Buffet Croix Blanche, J.P. Charrier, A. van Belkum, M. Welker, S. Chatellier // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 34, № 11. – P. 2225–2234.
158. Mogi, T. Polymyxin B identified as an inhibitor of alternative NADH dehydrogenase and malate: Quinone oxidoreductase from the Gram-positive bacterium *Mycobacterium smegmatis* / T. Mogi, Y. Murase, M. Mori, K. Shiomi, S. Omura, M.P. Paranagama, K. Kita // *The Journal of Biochemistry*. – 2009. – № 146. – P. 491–499.
159. Monteferrante, C.G. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF / C.G. Monteferrante, S. Sultan, M.T. Ten Kate, L.J. Dekker, K. Sparbier, M. Peer, M. Kostzrewa, T.M. Luider, W.H. Goessens, P.C. Burgers // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 71, № 10. – P. 2856–2867.

160. Mortimer, P.G. A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* / P.G. Mortimer, L.J. Piddock // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 1991. – Vol. 28, № 5. – P. 639–653.
161. Moskowitz, S.M. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients / S.M. Moskowitz, M.K. Brannon, N. Dasgupta, M. Pier, N. Sgambati, A.K. Miller, S.E. Selgrade, S.I. Miller, M. Denton, S.P. Conway, H.K. Johansen, N. Hoiby // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2012. – Vol. 56, № 2. – P. 1019-1030.
162. Moubareck, C. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii* / C. Moubareck, S. Bremont, M.C. Conroy, P. Courvalin, T. Lambert // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. - Vol. 53, № 8. – P. 3579–3581.
163. Muller, C. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -Lactams in *Pseudomonas aeruginosa* / C.A. Muller, P. Plesiat, K. Jeannot // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – № 55. – P. 1211–1221.
164. National Center for Biotechnology Information [электронный ресурс] // URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (дата обращения: 20.12.2017).
165. Nichols, W.W. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate / W.W. Nichols, S.M. Dorrington, M.P. Slack, H.L. Walmsley // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1988. – Vol. 32, № 4. – P. 518-523.
166. Nishino, K. EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli* / K. Nishino, A. Yamaguchi // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – Vol. 184, № 8. – P. 2319–2323.
167. Nordmann, P. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae / P. Nordmann, L. Poirel // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 68, № 3. – P. 487–489.

168. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28, №12. – P. E63.
169. Ocampo-Sosa, A.A. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish Multicenter Study / A.A. Ocampo-Sosa, G. Cabot, C. Rodriguez, E. Roman, F. Tubau, M. Macia, B. Moya, L. Zamorano, C. Suarez, C. Pena, M.A. Dominguez; G. Moncalian, A. Oliver, L. Martinez-Martinez // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2012. – Vol. 56, № 4. – P. 1703–1713.
170. Ochs, M.M. Amino acid-mediated induction of the basic amino acid-specific outer membrane porin OprD from *Pseudomonas aeruginosa* / M.M. Ochs, C.D. Lu, R.E. Hancock, A.T. Abdelal // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – Vol. 181, №17. – P. 5426–5432.
171. Ochs, M.M. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids / M.M. Ochs, M.P. McCusker, M. Bains, R.E. Hancock // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1999. – № 43. – P. 1085–1090.
172. Olaitan, A.O. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria [Электронный ресурс] / A.O. Olaitan, S. Morand, J.M. Rolain // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – Vol. 5, № 643. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244539/>.
173. Ooka, T. Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes / T. Ooka, Y. Ogura, M. Asadulghani, M. Ohnishi, K. Nakayama, J. Terajima, H. Watanabe, T. Hayashi // *Genome Research*. – 2009. – Vol. 19, №10. – P. 1809–1816.
174. Oviano, M. Rapid direct detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis / M.

- Oviano, C.L. Ramirez, L.P. Barbeyto, G. Bou // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 72, № 5. – P. 1350–1354.
175. Pasteran, F. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae / F. Pasteran, T. Mendez, L. Guerriero, M. Rapoport, A. Corso // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2009. – Vol. 47, № 6. – P. 1631-1639.
176. Paul, D. Occurrence of co-existing bla VIM-2 and bla NDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India [Электронный ресурс] / D. Paul, D. Dhar, A.P. Maurya, S. Mishra, G.D. Sharma, A. Chakravarty, A. Bhattacharjee // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2016. – Vol. 15, № 31. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27154587>.
177. Perez-Perez, F.J. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR / F.J. Perez-Perez, N.D. Hanson // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002. – Vol. 40, № 6. – P. 2153–2162.
178. Pfeifer, Y. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens / Y. Pfeifer, A. Cullik, W. Witte // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2010. – Vol. 300, № 6. – P. 371–379.
179. Pirnay, J.P. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates / J.P. Pirnay, D. De Vos, D. Mossialos, A. Vanderkelen, P. Cornelis, M. Zizi // *Environmental Microbiology*. – 2002. – Vol. 4, № 12. – P. 872–882.
180. Poirel, L. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes / L. Poirel, T.R. Walsh, V. Cuvillier, P. Nordmann // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2011. – Vol. 70, № 1. – P. 119–123.
181. Poole, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria / K. Poole // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – Vol. 44, № 9. – P. 2233–2241.

182. Poole, K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms / K. Poole // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2001. – Vol. 3, №2. – P. 255–264.
183. Poole, K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / K. Poole // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2005. – № 49. – P. 479–487.
184. Poole, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max [Электронный ресурс] / K. Poole // Frontiers in microbiology. – 2011. – Vol. 2, № 65. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3128976/>.
185. Pragasam, A.K. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* with discrepant carbapenem susceptibility profile [Электронный ресурс] / A.K. Pragasam, M. Raghavivedha, S. Anandan, B. Veeraraghavan // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2016. – Vol 15, № 12. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4765188/>.
186. Pustelny, C. Contribution of *Veillonella parvula* to *Pseudomonas aeruginosa*-mediated pathogenicity in a murine tumor model system / C. Pustelny, U. Komor, V. Pawar, A. Lorenz, A. Bielecka, A. Moter, B. Gocht, D. Eckweiler, M. Musken, C. Grothe, H. Lunsdorf, S. Weiss, S. Haussler // Infection and Immunity. – 2015. – V. 83, №1. – P. 417-429.
187. Qi, J. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the multidrug-resistance gene *cfr* / J. Qi, Y. Du, R. Zhu, X. Zhu, H. Bai, M. Hu, Y. Luo, X. Hu, C. Wu, J. Shen, Y. Liu // Gene. – 2012. – Vol. 504, № 1. – P. 140–143.
188. Quale, J. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates / J. Quale, S. Bratu, J. Gupta, D. Landman // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2006. – Vol. 50, № 5 – P. 1633–1641.
189. Queenan, A.M. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases / A.M. Queenan, K. Bush // Clinical Microbiology Reviews. – 2007. – Vol. 20, № 3. – P. 440–458.
190. Quinn, J.P. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections / J.P. Quinn, E.J. Dudek, C.A. DiVincenzo,

- D.A. Lucks, S.A. Lerner // *Journal of infectious diseases*. – 1986. – Vol. 154, № 2. – P. 289–294.
191. Quinn, J.P. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: mapping of the OprD2 gene / J.P. Quinn, A. Darzins, D. Miyashiro, S. Ripp, R.V. Miller // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1991. – Vol. 35, № 4. – P. 753-755.
192. Ramirez, M.S. Aminoglycoside modifying enzymes / M.S. Ramirez, M.E. Tolmasky // *Drug Resistance Updates*. – 2010. – № 13. – P.151–171.
193. Rello, J. Survival in patients with nosocomial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiologic agent / J. Rello, M. Rue, P. Jubert, G. Muses, R. Sonora, J. Valles, M.S. Niederman // *Critical Care Medicine*. – 1997. – № 25. – P. 1862–1867.
194. Riccio, M.L. In70 of plasmid pAX22, a blaVIM-1-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette / M.L. Riccio, L. Pallecchi, R. Fontana, G.M. Rossolini // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. – № 45. – P. 1249–1253.
195. Rice, L.B. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones / L.B. Rice // *Mayo Clinic Proceedings*. – 2012. – Vol. 87, № 2. – P. 198–208.
196. Richmond, G.E. Efflux in *Acinetobacter baumannii* can be determined by measuring accumulation of H33342 (bis-benzamide) / G.E. Richmond, K.L. Chua, L.J. Piddock // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2013. – Vol. 68, № 7. – P. 1594–1600.
197. Riera, E. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem / E. Riera, G. Cabot, X. Mulet, M. Garcia-Castillo, R. del Campo, C. Juan, R. Canton, A. Oliver // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 66, № 9. – P. 2022–2027.
198. Rodriguez, M.C. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Cantabria, Spain, producing VIM-2 metallo-beta-lactamase / M.C. Rodriguez, B. Ruiz del Castillo, C. Rodriguez-Mirones, M. Romo, I. Monteagudo,

- L. Martinez-Martinez // *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica*. – 2010. – Vol. 28, № 2. – P. 99–103.
199. Rodriguez-Martinez, J.M. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / J.M. Rodriguez-Martinez, L. Poirel, P. Nordmann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. – Vol. 53, №11. – P. 4783–4788.
200. Rojo-Bezares, B. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons / B. Rojo-Bezares, V. Estepa, R. Cebollada, M. de Toro, S. Somalo, C. Seral, F.J. Castillo, C. Torres, Y. Saenz // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2014. – Vol. 304, № 3. – P. 405–414.
201. Rostami, S. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients / S. Rostami, A. Farajzadeh Sheikh, S. Shoja, A. Farahani, M.A. Tabatabaiefar, A. Jolodar, R. Sheikhi // *Journal of the Chinese Medical Association*. – 2017. – S1726–4901.
202. Safaei, H.G. Distribution of the strains of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burn patients [Электронный ресурс] / H.G. Safaei, S. Moghim, B. N. Isfahani, H. Fazeli, F. Poursina, S. Yadegari, S.A. Nodoushan // *Advanced Biomedical Research*. – 2017. – Vol. 6, № 74. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28706882>.
203. Samra, Z. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae / Z. Samra, J. Bahar, L. Madar-Shapiro, N. Aziz, S. Israel, J. Bishara // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2008. – Vol. 46, № 9. – P. 3110–3111.
204. Sanbongi, Y. Classification of OprD sequence and correlation with antimicrobial activity of carbapenem agents in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates collected in Japan / Y. Sanbongi, A. Shimizu, T. Suzuki, H. Nagaso, T. Ida, K. Maebashi, N. Gotoh // *Microbiology and Immunology*. – 2009. – Vol. 53, № 7. – P. 361–367.

205. Sanchez, P. Transcriptional regulation of mexR, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa* mexAB-oprM multidrug efflux pump / P. Sanchez, F. Rojo, J.L. Martinez // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – V. 207. – № 1. – P. 63–68.
206. Santella, G. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates: an example of interaction between different mechanisms / G. Santella, S. Pollini, J.D. Docquier, M. Almuzara, G. Gutkind, G.M. Rossolini, M. Radice // Revista Panamericana de Salud Publica. – 2011. – Vol. 30, №6. – P. 545–548.
207. Sauget, M. Rapid, sensitive and specific detection of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / M. Sauget, N. Cabrolier, M. Manzoni, X. Bertrand, D. Hocquet // Journal of Microbiological Methods. – 2014. – № 105. – P. 88–91.
208. Schurek, K.N. Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / K.N. Schurek, A.K. Marr, P.K. Taylor, I. Wiegand, L. Semenec, B.K. Khaira, R.E.W. Hancock // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2008. – № 52. – P. 4213–4219.
209. Sedighi, M. Molecular detection of metallo- β -lactamase gene blaVIM-1 in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in the hospitals of Isfahan [Электронный ресурс] / M. Sedighi, H. Vaez, M. Moghoofeie, S. Hadifar, G. Oryan, J. Faghri // Advanced Biomedical Research. – 2015. – Vol. 4, № 57. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802826>.
210. Sekiya, H. Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, mexHI-opmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant / H. Sekiya, T. Mima, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima, T. Tsuchiya // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2003. – № 47. – P. 2990–2992.
211. Shirani, K. Antibiotic resistance pattern and evaluation of metallo-beta lactamase genes (VIM and IMP) in *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBL enzyme, isolated from patients with secondary immunodeficiency [Электронный ресурс] / K. Shirani, B. Ataei, F. Roshandel // Advanced biomedical

- research. – 2016. – Vol. 5, № 124. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27563634>.
212. Siguier, P. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity // P. Siguier, E. Gournayre, M. Chandler // FEMS microbiology reviews. – 2014. – Vol. 38, № 5. – P. 865–891.
213. Silva Junior, V.V.D. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-11} in Recife, Brazil / V.V.D. Silva Junior, L.D. Ferreira, L.R. Alves, A.B. Cabral, P.R. Jacome, P.S. Araujo, M.A.V. Maciel // Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. – 2017. – Vol. 50, № 6. – P. 764–768.
214. Song, W. Carbapenem inactivation method: accurate detection and easy interpretation of carbapenemase production in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp / W. Sng, H. Kim, J. Kim, H.S. Kim, D.H. Shin, S. Shin, M. Park // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2016. – Vol. 19, № 4. – P. 83-87.
215. Soundararajan, G. Understanding carbapenem translocation through OccD3 (OpdP) of *Pseudomonas aeruginosa* / G. Soundararajan, S.P. Bhamidimarri, M. Winterhalter // ACS Chemical Biology. – 2017. – Vol. 12, № 6. – P. 1656-1664.
216. Srikumar, R. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain / R. Srikumar, T. Kon, N. Gotoh, K. Poole // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1998. – Vol. 42, № 1. – P. 65–71.
217. Stover, C. K. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen / C. K. Stover, X.Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M.J. Hickey, F.S. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E. Hancock, S. Lory, M.V. Olson // Nature. – 2000. – Vol. 406, № 6799. – P. 959-964.

218. Strateva, T. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance / T. Strateva, D. Yordanov // *Journal of Medical Microbiology*. – 2009. – Vol. 58, № 9. – P. 1133–1148.
219. Suci, P.A. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // P.A. Suci, M.W. Mittelman, F.P. Yu, G.G. Geesey // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1994. – Vol. 38, № 9. – P. 2125–2133.
220. Sun, Q. Insertion sequence ISRP10 inactivation of the *oprD* gene in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates / Q. Sun, Z. Ba, G. Wu, W. Wang, S. Lin, H. Yang // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2016. – Vol. 47, № 5. – P. 375–379.
221. Szuplewska, M. Mobility and generation of mosaic non-autonomous transposons by Tn3-derived inverted-repeat miniature elements (TIMEs) / M. Szuplewska, M. Ludwiczak, K. Lyzwa, J. Czarnecki, D. Bartosik // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 8. – e105010.
222. Tam, V.H. Prevalence of AmpC over-expression in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / V.H. Tam, A.N. Schilling, M.T. LaRocco, L.O. Gentry, K. Lolans, J.P. Quinn, K.W. Garey // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2007. – Vol. 13, № 4. – P. 413–418.
223. Tam, V.H. Prevalence, mechanisms, and risk factors of carbapenem resistance in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* // V.H. Tam, K.T. Chang, M.T. LaRocco, A.N. Schilling, S.K. McCauley, K. Poole, K.W. Garey // *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. – 2007. – Vol. 58, № 3. – P. 309–314.
224. Tamber, S. Role of the novel OprD family of porins in nutrient Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* / S. Tamber, M.M. Ochs, R.E.W. Hancock // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – Vol. 188, № 1. – P. 45-54.
225. Tegos, G.P. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies / G.P. Tegos, M. Haynes, J.J. Strouse, M.T. Khan, C.G. Bologna, T.I. Oprea, L.A. Sklar // *Current pharmaceutical design*. – 2011. – Vol. 17, № 13. – P. 1291–1302.

226. The Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) [Электронный ресурс] // Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th Edition, 2018. – P. 38. - URL: <http://em100.edaptivedocs.info/dashboard.aspx> (дата обращения: 10.01.2018).
227. Thomson, K.S. Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. / K.S. Thomson // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2010. – Vol. 48, № 4. – P. 1019–1025.
228. Tomas, M. Efflux pumps, OprD porin, AmpC β -lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients / M. Tomas, M. Doumith, M. Warner, J.F. Turton, A. Beceiro, G. Bou, D.M. Livermore, N. Woodford // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – Vol. 54, № 5. – P. 2219–2224.
229. Trias, J. Decreased outer membrane permeability in imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* / J. Trias, J. Dufresne, R.C. Levesque, H. Nikaido // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1989. – Vol. 33, № 8. – P. 1202–1206.
230. Trias, J. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* / J. Trias, H. Nikaido // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1990. – Vol. 34, №1. – P. 52–57.
231. Trimble, M.J. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance / M.J. Trimble, P. Mlynarcik, M. Kolar, R.E. Hancock // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* – 2016. – Vol. 6, № 10. – a025288.
232. Uwate, M. Two routes of MexS-MexT-mediated regulation of MexEF-OprN and MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* / M. Uwate, Y.K. Ichise, A. Shirai, T. Omasa, T. Nakae, H. Maseda // *Microbiology and Immunology*. – 2013. – Vol. 57, №4. – P. 263–272.
233. Valentini, M. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. M. Valentini, D. Gonzalez, D.A. Mavridou, A. Filloux / *Current Opinion in Microbiology*. – 2017. – V. 18, №41. – P. 15–20.

234. Vidal-Aroca, F. Use of resazurin to detect mefloquine as an efflux-pump inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* / F. Vidal-Aroca, A. Meng, T. Minz, M.G. Page, J. Dreier // *Journal of Microbiology Methods*. – 2009. – Vol. 79, № 2. – P. 232–237.
235. Vollan, H.S. In silico structure and sequence analysis of bacterial porins and specific diffusion channels for hydrophilic molecules: conservation, multimericity and multifunctionality / H.S. Vollan, T. Tannas, Vriend ., G. Bukholm // *International Journal of Molecular Sciences* – 2016. – Vol. 17, № 4. – pii: E599.
236. Walther-Rasmussen, J. OXA-type carbapenemases // J. Walther-Rasmussen, N. Hoiby // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2006. – Vol. 57, № 3. – P. 373–383.
237. Wei, W.J. New Delhi metallo- β -lactamase-mediated carbapenem resistance: origin, diagnosis, treatment and public health concern / W.J. Wei, H.F. Yang, Y. Ye, J.B. Li // *Chinese medical journal*. – 2015. – Vol. 128, №14. – P. 1969–1976.
238. Weiner, L.M. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014 / L.M. Weiner, A. K. Webb, B. Limbago, M.A. Dudeck, J. Patel, A.J. Kallen, D. M. Sievert // *Infection control and hospital epidemiology*. – 2016. – Vol. 37, № 11. – P. 1288–1301.
239. Wendel, A.F. Detection and termination of an extended low-frequency hospital outbreak of GIM-1–producing *Pseudomonas aeruginosa* ST111 in Germany / A.F. Wendel, S. Kolbe-Busch, S. Ressina, R. Schulze-Robbecke, D. Kindgen-Milles, C. Lorenz, C.R. MacKenzie // *American journal of infection control*. – 2015. – Vol. 43, № 6. – P. 635–639.
240. Wöckel, W. *Pseudomonas aeruginosa* (Bacterium pyocyaneum) infection / W. Wöckel // *Ergebnisse der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie*. – 1967. – № 48. – P. 102–170.

241. Wolkowicz, T. Distribution of carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates among hospitalised children in Poland: Characterisation of two novel insertion sequences disrupting the *oprD* gene / T. Wolkowicz, J.A. Patzer, W. Kaminska, R. Gierczynski, D. Dzierzanowska // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2016. – № 7. – P. 119–125.
242. Wolter, D.J. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance / D.J. Wolter, N.D. Hanson, P.D. Lister // FEMS Microbiology Letters. - 2004. – Vol. 236, № 1. – P. 137–143.
243. Wolter, D.J. Mechanisms of β -lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa* / D.J. Wolter, P.D. Lister // Current pharmaceutical design. – 2013. – Vol. 19, № 2. – P. 209–222.
244. Woodford, N. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae / N. Woodford, A.T. Eastaway, M. Ford, A. Leanord, C. Keane, R.M. Quayle, J.A. Steer, J. Zhang, D.M. Livermore // Journal of Clinical Microbiology. – 2010. – Vol. 48, № 8. – P. 2999–3002.
245. Woods, D.E. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence / D.E. Woods. – Trends in Microbiology. – 2004. – № 12. – P. 437–439.
246. Xavier, D.E. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil [Электронный ресурс] / D.E. Xavier, R.C. Picao, R. Girardello, L.C. Fehlberg, A.C. Gales // BMC microbiology. – 2010. – Vol. 10, № 217. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20704733>.
247. Xipell, M. Successful treatment of three severe MDR or XDR *Pseudomonas aeruginosa* infections with ceftolozane/tazobactam / M. Xipell, M. Bodro, F. Marco, J.A. Martinez, A. Soriano // Future Microbiology. – 2017. – №12. – P. 1323–1326.

248. Xu, C. Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline / C. Xu, X. Lin, H. Ren, Y. Zhang, S. Wang, X. Peng // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6, № 2. – P. 462–473.
249. Yamane, K. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates / K. Yamane, Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2004. – № 48. – P.2069–2074.
250. Yan, A. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* / A. Yan, Z. Guan, C.R. Raetz // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – № 282. – P. 36077–36089.
251. Yoneyama, H. Nucleotide sequence of the protein D2 gene of *Pseudomonas aeruginosa* / H. Yoneyama, E. Yoshihara, T. Nakae // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1992. – № 36. – P. 1791–1793.
252. Yoon, S.S. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis / S.S. Yoon, R.F.Hennigan, G.M. Hilliard, U.A. Ochsner, K. Parvatiyar, M.C. Kamani, H.L. Allen, T.R. DeKievit, P.R. Gardner, U. Schwab, J.J. Rowe, B.H. Iglewski, T.R. McDermott, R.P.Mason, D.J. Wozniak, R.E.W. Hancock, M.R. Parsek, T.L. Noah, D.J. Hassett // *Developmental Cell*. – 2002. – Vol. 3, №4. – P. 593–603.
253. Yoshihara, E. Protein D2 porin of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane bears the protease activity / E. Yoshihara, N. Gotoh, T. Nishino, T. Nakae. – *FEBS Letters*. – 1996. – Vol. 394, № 2. – P. 179–182.
254. Yu, Y.S. Integrons containing the VIM-2 metallo- β -lactamase gene among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from different chinese hospitals / Y.S. Yu, T.T. Qu, J.Y. Zhou, J. Wang, H.Y. Li, T.R. Walsh // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 44, №11. – P. 4242–4245.
255. Zhang, L. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa* / L. Zhang, P. Dhillon, H.

- Yan, S. Farmer, R.E.W Hancock // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – № 44. – P. 3317–3321.
256. Zhou, Y. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides / Y. Zhou, H. Yu, Q. Guo, X. Xu, X. Ye, S. Wu, Y. Guo, M. Wang // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2010. – № 29. – P. 1349–1353.
257. Zincke, D. Characterization of a carbapenem-hydrolyzing enzyme, PoxB, in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / D. Zincke, D. Balasubramanian, L.L. Silver, K. Mathee // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2016. – Vol. 60, № 2. – P. 936–945.