

КОМПЬЮТЕРНАЯ ПРОГРАММА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ПОРИНЗАВИСИМОЙ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ

DOI: 10.17691/stm2021.13.6.02

УДК 615.015.8:579.25:004.42

Поступила 4.09.2021 г.

© Т.А. Савинова, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии¹;
А.А. Самченко, к.ф.-м.н., научный сотрудник лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем²;
Ю.А. Бочарова, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии¹;
Н.А. Маянский, д.м.н., профессор РАН, зав. Центром лабораторной диагностики
Российской детской клинической больницы¹;
И.В. Чеботарь, д.м.н., зав. лабораторией молекулярной микробиологии¹

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
ул. Островитянова, 1, Москва, 117997;

²Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
«Пушинский научный центр биологических исследований РАН», ул. Институтская, 3, Московская область,
Пушино, 142290

Цель исследования — разработать новую компьютерную программу для выявления мутаций в генах, детерминирующих неплазмидную антибиотикорезистентность у грамотрицательных бактерий, и оценить ее возможности на примере выявления порин-зависимой устойчивости к карбапенемам клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa*.

Материалы и методы. Алгоритм работы программы включает поиск соответствия между референсными и изучаемыми генами. При обнаружении в анализируемом геноме искомой нуклеотидной последовательности она сравнивается с референсной и анализируется. Полученные данные подтверждаются сравнением аминокислотных последовательностей, кодируемых референсными и изучаемыми генами. В качестве референсных нуклеотидных последовательностей генов поринов, обеспечивающих транспорт карбапенемов внутрь бактериальной клетки (OprD, OpdD и OpdP), были использованы гены чувствительного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, а для проверки возможностей предлагаемой программы — полные геномы клинических изолятов *P. aeruginosa* из базы данных PATRIC 3.6.9 и собственной коллекции ДНК клинических штаммов. Проанализированные штаммы были охарактеризованы фенотипически согласно критериям стандарта CLSI. Поиск генов карбапенемаз в исследованных геномах *P. aeruginosa* проведен с использованием ресурса ResFinder 4.1.

Результаты. Разработанная компьютерная программа для определения генетических детерминант неплазмидной антибиотикорезистентности позволила выявить в генах поринов клинических изолятов *P. aeruginosa* различные по типу и значимости мутации, приводящие к модификациям пептидной структуры продукта. В поринах OpdD и OpdP карбапенем-чувствительных и карбапенем-нечувствительных изолятов преобладали единичные аминокислотные замены. Ген порина OprD карбапенем-нечувствительных штаммов характеризовался большим разнообразием модификаций, включая инсерции и/или делеции, приводящие к преждевременной остановке синтеза порина. У нескольких нечувствительных к меропенему изолятов не выявлено мутаций генов в OprD, что может быть связано с наличием альтернативных механизмов устойчивости.

Заключение. Предлагаемый программный продукт способен стать эффективным инструментом расшифровки молекулярно-генетических механизмов хромосомной устойчивости бактерий к антибиотикам. Результаты апробации программы показали различия между распространенностью значимых для возникновения карбапенемрезистентности мутаций в генах *oprD*, *opdD* и *opdP*.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность; *Pseudomonas aeruginosa*; OpdP; OprD; OpdD; гены поринов; карбапенемы.

Как цитировать: Savinova T.A., Samchenko A.A., Bocharova Y.A., Mayansky N.A., Chebotar I.V. Computer program for detection and analyzing the porin-mediated antibiotic resistance of bacteria. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(6): 15–23, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.6.02>

Для контактов: Чеботарь Игорь Викторович, e-mail: nizarnn@yandex.ru

Computer Program for Detection and Analyzing the Porin-Mediated Antibiotic Resistance of Bacteria

T.A. Savinova, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology¹;
A.A. Samchenko, PhD, Researcher, Laboratory of Structure and Dynamics of Biomolecular Systems²;
Y.A. Bocharova, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology¹;
N.A. Mayansky, MD, DSc, Professor of the Russian Academy of Sciences,
 Head of the Center for Laboratory Diagnostics, Russian Children's Clinical Hospital¹;
I.V. Chebotar, MD, DSc, Head of the Laboratory of Molecular Microbiology¹

¹Pirogov National Research Medical University, 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia;

²Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences — Subdivision of the Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", 3 Institutskaya St., Moscow Region, Pushchino, 142290, Russia

The aim of this work was to develop a new software tool for identifying gene mutations that determine the porin-mediated resistance to antibiotics in gram-negative bacteria and to demonstrate the functionality of this program by detecting porin-mediated resistance to carbapenems in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods. The proposed algorithm is based on searching for a correspondence between the reference and the studied genes. When the sought nucleotide sequence is found in the analyzed genome, it is compared with the reference one and analyzed. The genomic analysis is then verified by comparing between the amino acid sequences encoded by the reference and studied genes. The genes of the susceptible *P. aeruginosa* ATCC 27853 strain were used as the reference nucleotide sequences encoding for porins (OprD, OpdD, and OpdP) involved in the transport of carbapenems into the bacterial cell. The complete genomes of clinical *P. aeruginosa* isolates from the PATRIC database 3.6.9 and our own collection were used to test the functionality of the proposed program. The analyzed isolates were phenotypically characterized according to the CLSI standard. The search for carbapenemase genes in the studied genomes of *P. aeruginosa* was carried out using the ResFinder 4.1.

Results. The developed program for detecting the genetic determinants of non-plasmid antibiotic resistance made it possible to identify mutations of various types and significance in the porin genes of *P. aeruginosa* clinical isolates. These mutations led to modifications of the peptide structure of porin proteins. Single amino acid substitutions prevailed in the OpdD and OpdP porins of carbapenem-susceptible and carbapenem-resistant isolates. In the carbapenem-resistant strains, the gene encoding for OprD porin was found heavily modified, including insertions and/or deletions, which led to premature termination of porin synthesis. In several isolates resistant to meropenem, no mutations were detected in the gene encoding for OprD, which might be associated with alternative mechanisms of resistance to carbapenems.

Conclusion. The proposed software product can become an effective tool for deciphering the molecular genetic mechanisms of bacterial chromosomal resistance to antibiotics. Testing the program revealed differences between the occurrences of mutations significant for carbapenem resistance in the *oprD*, *opdD*, and *opdP* genes.

Key words: antibiotic resistance; *Pseudomonas aeruginosa*; OpdP; OprD; OpdD; porin genes; carbapenems.

Введение

Глобально распространившаяся устойчивость к антимикробным препаратам, или антимикробная резистентность (АМР), стала одной из важнейших проблем современного здравоохранения [1]. Ситуация усугубляется тем, что в ближайшее время ожидается резкий скачок распространения АМР вследствие масштабного увеличения употребления антибиотиков, связанного с пандемией COVID-19 [2, 3]. Это ставит перед медицинской наукой задачу совершенствования методов оценки антибиотикорезистентности и расшифровки ее механизмов. На современном этапе развития медицины фенотипическое определение АМР является необходимым, но недостаточным для успешного противодействия резистентности, фенотипический профиль резистентных бактерий должен

быть дополнен описанием механизмов ее формирования [4].

К числу наиболее информативных способов определения механизмов АМР относятся методы выявления генетических детерминант резистентности. Основные детерминанты АМР традиционно подразделяются на плазмидные и хромосомные (хромосомальные). Плазмидные гены резистентности — это гены, которые могут передаваться от клетки к клетке горизонтальным путем, они могут быть локализованы как в плазмиде, так и в хромосоме [5–7]. Хромосомная резистентность связана с мутациями (точечные мутации, небольшие инсерции/делеции, обширные инсерции/делеции, в том числе вставки мобильных генетических элементов) в хромосомных генах, являющихся атрибутами данного вида бактерий [8–10].

Для поиска плазмидных генов АМР созданы и

успешно применяются программные онлайн-инструменты или программы, требующие локально установленной (standalone) версии. К их числу принадлежат ResFinder, CARD, ARDB, ARG-ANNOT и другие инструменты [11–14]. Они в первую очередь нацелены на поиск генов, передающихся в составе мобильных генетических элементов, например генов бета-лактамаз (устойчивость к бета-лактамам антибиотикам), аминогликозид-трансфераз (устойчивость к аминогликозидам и фторхинолонам), хлорамфеникол-ацетилтрансфераз (устойчивость к хлорамфениколу), глутатион-S-трансфераз (устойчивость к фосфомицину), генов белков рибосомальной защиты (устойчивость к тетрациклину) и других детерминант резистентности. Некоторые из существующих инструментов реализуют функцию поиска хромосомных детерминант резистентности (PointFinder, CARD).

К сожалению, функциональные возможности перечисленных инструментов не всегда позволяют выявить и проанализировать важные генетические детерминанты AMP, связанные с изменением поринов, отвечающих за проникновение антибиотиков в клетку, регуляторных генов глобальных эффлюкс-систем и генов, кодирующих мишени антибиотиков. В частности, это относится к расшифровке молекулярных механизмов устойчивости к антибиотикам последних поколений, включая карбапенемы.

Цель настоящей работы — разработать новый программный инструмент для определения мутаций генов, детерминирующих поринзависимую антимикробную резистентность у грамотрицательных бактерий, и продемонстрировать возможности этой программы на примере выявления поринзависимой устойчивости к карбапенемам клинических изолятов *P. aeruginosa*.

Материалы и методы

Общий дизайн исследования включал:

- 1) создание базы референсных генов поринов, обеспечивающих транспорт антибиотиков через наружную мембрану внутрь периплазматического пространства;
- 2) получение нуклеотидных последовательностей генов поринов и аминокислотных последовательностей соответствующих им поринов изучаемых клинических изолятов (по данным об их полных геномах);
- 3) использование разработанного программного продукта для определения генетических детерминант

неплазмидной антибиотикорезистентности [15], работающего по оригинальному алгоритму и выдающего заключение об отличиях анализируемой последовательности гена и его продукта (белка) от референсных последовательностей из базы данных; апробация работы программы на модели поринзависимой резистентности бактерий к меропенему и имипенему.

Программа включает базу референсных генов поринов, участвующих в формировании AMP у клинически значимых видов грамотрицательных бактерий, включая *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella enterica* и др. Последовательности референсных генов были получены из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) путем выбора последовательностей генов поринов у штаммов, которые рекомендуются международными стандартами EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) и CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, США) в качестве стандартов чувствительности к антибиотикам. В настоящем исследовании были использованы чувствительный референс-штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 и нуклеотидные последовательности генов его поринов OprD/OccD1, OprD/OccK7 и OprP/OccD3, участие которых в формировании резистентности к карбапенемам было подтверждено ранее (табл. 1).

В качестве отрицательного контроля (штаммы, не имеющие видоспецифичных для *P. aeruginosa* поринов) были проанализированы 10 геномов изолятов из базы данных PATRIC 3.6.9 (<https://www.patricbrc.org/>) пяти разных видов: *Acinetobacter baumannii* (SP5515, GML-KP48-AB-TR), *Klebsiella pneumoniae* (AR0361, AR438), *Escherichia coli* (AR435, AR0450), *Staphylococcus aureus* (AR464, AR0216), *Enterococcus faecium* (VREN1530, VREN2775).

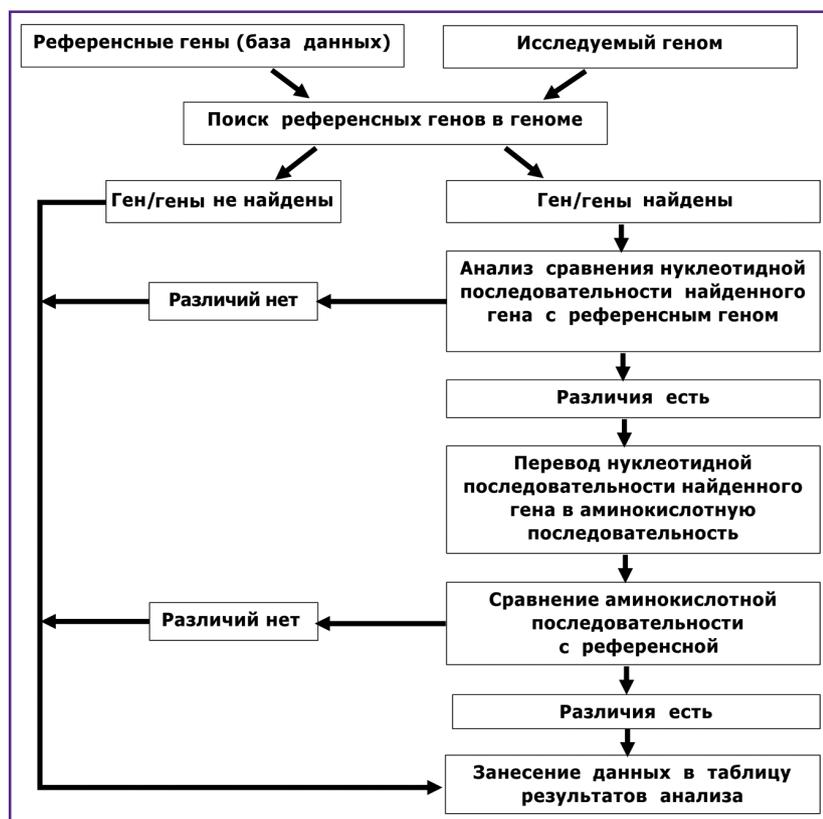
Для проверки возможностей предлагаемой программы были использованы полные геномы (полные сборки либо контиги) *P. aeruginosa* из двух источников. Первым источником стала база данных PATRIC 3.6.9, из которой были получены 15 геномов клинических штаммов *P. aeruginosa* и AMP-свойства этих изолятов. Вторым источником геномов (10 образцов) послужила собственная коллекция ДНК клинических штаммов, AMP-спектры (чувствительность к меропенему и имипенему) которых были предварительно охарактеризованы фенотипически согласно критериям стандарта CLSI, 2020 г. (<https://clsi.org/standards/>).

Поиск адаптивных генов карбапенемрезистентности

Т а б л и ц а 1

Порины *Pseudomonas aeruginosa*, участвующие в транспорте карбапенемов

Наименование порина	Альтернативное наименование	Субстрат	Литература
OprD	OccD1	Меропенем, имипенем, лизин, гистидин, аргинин, орнитин	[16–18]
OprD	OccK7	Меропенем	[18]
OprP	OccD3	Меропенем, глицин-глутамат, аргинин	[19, 20]



Алгоритм работы компьютерной программы для выявления и анализа поринзависимой антимикробной резистентности грамотрицательных бактерий

(генов карбапенемаз) в исследованных геномах *P. aeruginosa* был проведен при помощи ресурса ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

Работа программы строится по следующему алгоритму (см. рисунок). На первом этапе выполняется поиск соответствия между референсными и изучаемыми генами с помощью программы BLAST на основе выбора best-matching [21]. При обнаружении в анализируе-

мом геноме искомой нуклеотидной последовательности она сравнивается с референсной. В случае их различия данные анализируются программой и результат анализа автоматически выдается в текстовом либо табличном формате, отображающем обнаруженные изменения нуклеотидной последовательности гена. Значимость обнаруженных изменений нуклеотидной последовательности для возникновения АМР проверяется путем анализа синонимичности замен в аминокислотной последовательности порина. Анализ синонимичности выполняется автоматически, его алгоритм заложен в программном коде.

Результаты

Во всех проанализированных геномах изолятов *P. aeruginosa* ($n=25$) были обнаружены гены поринов OprD, OpdD и OpdP. В геномах всех изолятов, не относящихся к виду *P. aeruginosa* ($n=10$) и использованных в качестве негативного контроля, гены выбранных поринов, специфичных для *P. aeruginosa*, не обнаружены.

В геномах исследованных 25 изолятов выявлены различные по типу и значимости мутации. В гене *oprD* детектированы мутации у 15 изолятов, в гене *opdD* — у 22 изолятов, в гене *opdP* — у 13 изолятов (табл. 2). Всего обнаружено 4 группы мутаций, приводящих к модификациям пептидной структуры порина.

Наиболее частыми модификациями являлись аминокислотные замены в поринах OpdD и OpdP. Для поринов OprD и OpdD было характерно большее

Таблица 2

Варианты модификаций пептидной структуры порина в геномах *Pseudomonas aeruginosa* ($n=25$)

Варианты модификаций	Число геномов, в которых обнаружены мутации, соответствующие изменениям в поринах		
	OprD	OpdD	OpdP
Отсутствие изменений в продукте (гены идентичны референсным/синонимичные мутации в гене)	10	3	12
AAS	3	18	12
Stop / AAS + stop	1	—	—
Frameshift + stop / AAS + frameshift + stop	5	4	1
AAS + INS	6/25	—	—

Здесь: AAS — аминокислотная замена/замены (amino acid substitution); stop — стоп-кодон, приводящий к преждевременной остановке синтеза порина; frameshift — сдвиг рамки считывания; INS — инсерция аминокислот/аминокислоты без сдвига рамки считывания.

Таблица 3
Мутации в генах поринов *Pseudomonas aeruginosa* и фенотипические проявления антимикробной резистентности (n=25)

Наименование изолята	Фенотип резистентности (CLSI)		Молекулярная структура порина				Соответствие фенотипа и генотипа		Примечания
	меропленем	имипенем	OppD (меропленем, имипенем)	OppD (меропленем)	OppP (меропленем)	OppD (меропленем)	OppP (меропленем)		
PATRIC_MRSN8915	R	R	N43D E57S R59S V127L E185Q P186G V189T S267A T276A G310E G312R A315G L347M L359V K387S, frameshift и L432stop	WT	WT	R31S	Да	Обнаружен ген <i>bla_{OXA-395}</i>	
PATRIC_MRSN994	R	R	N107R, frameshift и D113stop	WT	WT	WT	Да	Обнаружен ген <i>bla_{OXA-396}</i>	
PATRIC_MRSN8139	I	R	N43D V127L E185Q, frameshift и D231stop	A10V S132T T247A D401N	A29E A424T P445T	Да	Да		
PATRIC_MRSN8912	R	R	N43D E57S R59S T103S K115T Q142stop	T247A A304G	A29E I159L	Да	Да		
PATRIC_MRSN4841	I	S	N43D E57S R59S T103S K115T F170L E185Q P186G V189T Q202E A210I K230E T240S T262N S267A G281A Q296K E301Q G310E A315G L359V V372M insS S374N S375N S376V S377G A379K G380N L381Y insG G423A	F19S L72S, frameshift и L117stop	A29E T30S	Не очевидно	Обнаружен ген <i>bla_{OXA-488}</i>		
PATRIC_MRSN443463	S	S	WT	A183T P245Q T247A	WT	Да	Да		
PATRIC_MRSN9718	R	S	WT	T247A R268H	A29E	Да	Обнаружен ген <i>bla_{OXA-396}</i>		
PATRIC_MRSN435288	S	I	WT	V77I	WT	Да	Обнаружен ген <i>bla_{OXA-50}</i>		
PATRIC_MRSN321	R	R	S278P	S132T T247A A301V	WT	Да	Обнаружен ген <i>bla_{OXA-396}</i>		
PATRIC_MRSN25678	I	S	N43D E57S R59S V127L	S132T D163G N182H V240M L246F T247A D249G S298T	WT	Да	Да		
PATRIC_MRSN373401	I	R	WT	V77I	WT	Да	Обнаружен ген <i>bla_{OXA-486}</i>		
PATRIC_MRSN29192	R	I	N43D E57S R59S Q202E A210I K230E T240S T262N S267A G281A Q296K E301Q G310S L359V V372M insS S374N S375N S376V S377G A379K G380N L381Y insG	V77I T247A	WT	Да	Обнаружены гены <i>bla_{OXA-465}</i> , <i>bla_{OXA-488}</i>		
PATRIC_MRSN409937	R	S	N43D E57S R59S Q202E A210I K230E T240S T262N S267A G281A Q296K E301Q G310R L359V V372M insS S374N S375N S376V S377G A379K G380N L381Y insG	WT	WT	Да	Обнаружен ген <i>bla_{OXA-50}</i>		
PATRIC_MRSN356800	R	R	N43D E57S R59S T103S K115T M141A, frameshift и D218stop	D231G T247A	A29E, frameshift и M81stop	Да	Да		
PATRIC_MRSN401528	S	S	WT	V77I H110Y	WT	Да	Да		
Pa_135-3	S	R	WT	V77I	WT	Да	Обнаружен ген <i>bla_{OXA-486}</i>		

Окончание табл. 3

Наименование изолята	Фенотип резистентности (CLSI)		Молекулярная структура порина				Соответствие фенотипа и генотипа	Примечания
	меропленем	имипенем	OrpD (меропленем)	OrpD (меропленем)	OrpD (меропленем)	OrpD (меропленем)		
Pa_212-2	S	R	N43D E57S R59S V127L E185Q P186G V189T S267A T276A G310E G312RA315G L347M L359V S401A Q422E	V77G	WT	WT	Да	
Pa_224-1	I	R	WT	A183T P245Q T247A	WT	WT	Да	Обнаружен ген <i>bla</i> _{OXA-50}
Pa_3-2	S	S	WT	V77I P202S T247A A304G	WT	WT	Да	
Pa_316-2	I	R	N43D E57S R59S T103S K115T F170L E185Q P186G V189T Q202E A210I K230E T240S T262N S267A G281A Q296K E301Q G310E A315G L359V V372M insS S374N S375N S376V S377G A379K G380N L381Y insG G423A	F19S L72S, frameshift и L117stop	A29E T30S	Да	Обнаружен ген <i>bla</i> _{IMP-2}	
Pa_124-1	S	R	WT	V77I S114N R173S V377M	N103K	N103K	Да	Обнаружен ген <i>bla</i> _{OXA-494}
Pa_124-2	R	R	Frameshift S153P и G193stop	V77I S114N R173S V377M	N103K	N103K	Да	Обнаружен ген <i>bla</i> _{OXA-396}
Pa_41728-1	S	R	WT	T247A T344I	N345D	N345D	Да	Обнаружен ген <i>bla</i> _{OXA-488}
Pa_41748-3	R	R	N43D E57S R59S T103S K115T F170L E185Q P186G V189T Q202E A210I K230E T240S T262N S267A G281A Q296K E301Q G310E A315G L359V V372M insS S374N S375N S376V S377G A379K G380N L381Y insG G423A	F19S L72S, frameshift и L117stop	A29E T30S	Да	Обнаружен ген <i>bla</i> _{IMP-2}	
Pa_98-3	R	R	N43D E57S R59S T103S K115T F170L E185Q P186G V189T Q202E A210I K230E T240S T262N S267A G281A Q296K E301Q G310E A315G L359V V372M insS S374N S375N S376V S377G A379K G380N L381Y insG G423A	F19S L72S, frameshift и L117stop	A29E T30S	Да	Обнаружен ген <i>bla</i> _{IMP-2}	

Примечания: изоляты из базы данных PATRIC (n=15) обозначены префиксом PATRIC, клинические изоляты из собственной коллекции (n=10) — префиксом Pa; R — резистентные изоляты; I — изоляты с промежуточным уровнем резистентности; S — чувствительные изоляты (в соответствии с критериями CLSI); frameshift — сдвиг рамки считывания; stop — замена кодирующего кодона на стоп-кодон, приводящая к остановке синтеза белка; insS — инсерция серина; insG — инсерция глицина; WT — порин дикого типа (wild-type), в котором отсутствуют аминокислотные замены по сравнению с референсным порином; жирным шрифтом выделены гены карбапенемаз (по данным ResFinder).

разнообразии модификаций, включая инсерции и/или делеции, сопровождающиеся появлением стоп-кодона.

Соответствие наличия мутаций в генах поринов либо наличия генов карбапенемаз с фенотипическим проявлением АМР (соотношение генотип/фенотип) оценивали исходя из участия поринов в транспорте антибиотиков через внешнюю мембрану (см. табл. 1; табл. 3). У 7 из 8 чувствительных к меропенему изолятов в поринах либо не наблюдалось аминокислотных замен (OprD и OpdP дикого типа), либо были выявлены от одной до четырех аминокислотных замен в OpdD и OpdP. Один чувствительный к меропенему изолят обладал мутантным порином OprD (16 аминокислотных замен). Наиболее частыми структурными мутациями в *oprD* у нечувствительных (резистентных и с промежуточным уровнем резистентности) к карбапенемам изолятов были замены аминокислот в сочетании с вставкой двух аминокислот (6/22) и мутацией сдвига рамки считывания, приводящей к преждевременной остановке синтеза порина (5/22). У 3 нечувствительных к меропенему изолятов мутаций в *oprD* не выявлено.

В поринах OpdD и OpdP преобладали единичные замены аминокислот (1–8 AAS), причем такие паттерны наблюдались как у карбапенем-чувствительных, так и у карбапенем-нечувствительных изолятов. Делеция одного нуклеотида в гене *opdD*, приводящая к преждевременной остановке синтеза порина, присутствовала у 4 карбапенем-нечувствительных изолятов (у 3 — резистентных к меропенему и имипенему, у 1 — с промежуточным уровнем резистентности к меропенему). Потеря функционального порина OpdP в результате возникновения стоп-кодона в позиции, соответствующей 81-й аминокислоте белка, наблюдалась у 1 резистентного к меропенему и имипенему изолята.

Обсуждение

В большинстве случаев у госпитальных изолятов *P. aeruginosa* наблюдается сочетание механизмов резистентности к бета-лактамам антибиотикам, включая карбапенемы [22, 23]. Методы детекции резистентности, опосредованной бета-лактамазами, достаточно просты и хорошо реализуются при помощи рутинных лабораторных методов [24, 25]. В то же время анализ хромосомных детерминант резистентности связан с определенными трудностями с точки зрения биоинформатической обработки. В настоящей статье представлены результаты применения разработанной нами программы для определения генетических детерминант неплазмидной антибиотикорезистентности с целью поиска мутаций в генах поринов, транспортирующих карбапенемы внутрь бактериальной клетки (*oprD*, *opdD*, *opdP*), и анализа изменения аминокислотных последовательностей соответствующих протеинов как основы формирования карбапенемрезистентности.

Программный анализ 35 геномов (25 геномов *P. aeruginosa* и 10 геномов пяти других видов бактерий) позволил сделать несколько важных наблюдений относительно эффективности программы в поиске генов *oprD*, *opdD* и *opdP* и их мутаций. Выявление генов указанных поринов в геномах всех изолятов *P. aeruginosa* и их отсутствие в геномах *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecium* свидетельствует о специфичности программного поиска целевых нуклеотидных последовательностей. Среди изолятов *P. aeruginosa* наиболее разнообразные изменения были обнаружены в гене *oprD*, что соответствует литературным данным о частой вовлеченности этого гена в формирование карбапенемрезистентного фенотипа у *P. aeruginosa* [26].

Программа позволила на практике выявить весь спектр теоретически возможных типов мутаций, включая мутации, ведущие к несинонимичным заменам аминокислот, нонсенс-мутации (ведущие к возникновению стоп-кодонов), инсерции и делеции, сдвиги рамки считывания.

Обнаружение резистентных к карбапенемам изолятов с OprD дикого типа можно объяснить с позиции альтернативных механизмов устойчивости и прежде всего — карбапенемаз групп ОХА (см. табл. 3). Не исключена возможность гиперэкспрессии эффлюкс-систем и мутаций генов пенициллинсвязывающих белков [23]. Для более полной расшифровки генетических основ резистентного фенотипа необходим дополнительный анализ молекулярных механизмов устойчивости.

Интересно, что в генах *oprD*, *opdD* и *opdP* были обнаружены разные варианты мутаций, а также их разное число. Этот интригующий статистический результат трудно объяснить на современном этапе. Корректное объяснение данного феномена требует знаний о механизмах репарации ДНК в геномах *P. aeruginosa*, которые еще не получены.

Несколько штаммов сохраняли чувствительность к меропенему при наличии резистентности к имипенему. Для объяснения этого факта нужно обратить внимание на то, что меропенем имеет несколько альтернативных путей поступления в бактериальную клетку: порины OprD, OpdD и OpdP. В случае наиболее часто встречающихся мутаций гена *oprD* меропенем может транспортироваться через более устойчивые к мутациям порины OpdD и OpdP. Имипенем имеет только одни «входные ворота» — порин OprD, поэтому несоответствие между профилями карбапенемрезистентности штаммов *P. aeruginosa* выглядит весьма логичным.

Предлагаемый программный продукт может иметь ограничения, связанные с ошибками секвенирования и/или сборки генома, в этом случае программа выдает результат «Ген не найден».

В целом разработанный алгоритм позволяет осуществлять одновременный поиск детерминант резистентности в полногеномных последовательностях,

количество которых лимитируется лишь возможностями используемого компьютера.

Заключение

Результаты апробации представленной новой компьютерной программы позволяют утверждать, что она может стать эффективным инструментом расшифровки молекулярно-генетических механизмов хромосомной устойчивости бактерий к антибиотикам. Ее использование позволило обнаружить различия между распространенностью значимых для возникновения карбапенемрезистентности мутаций в генах *oprD*, *opdD* и *opdP*. Гены *oprD* были более подвержены мутациям, гены *opdP* оказались консервативными. Из-за шунтированности поринзависимого транспорта меропенема выводы о резистентности штамма к этому антибиотику должны основываться не только на обнаружении поломок порина *OpdD*, но и на наличии значимых мутаций в генах *opdP* и *opdD*. Меропенем, имея несколько путей для поступления в бактериальную клетку, является более перспективным антибиотиком в борьбе со штаммами *P. aeruginosa*, карбапенемрезистентность которых обусловлена нарушением пориновой проницаемости.

Благодарности. Авторы благодарят Центр высококачественного редактирования и генетических технологий для биомедицины Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова за поддержку работы с методической частью исследования.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Talebi Bezmin Abadi A., Rizvanov A.A., Haertlé T., Blatt N.L. World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. *Bionanoscience* 2019; 9: 778–788, <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00658-4>.
2. Devi S. No time to lower the guard on AMR. *Lancet Microbe* 2020; 1(5): e198, [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30129-4](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30129-4).
3. Knight G.M., Glover R.E., McQuaid C.F., Oлару I.D., Gallandat K., Leclerc Q.J., Fuller N.M., Willcocks S.J., Hasan R., van Kleef E., Chandler C.I. Antimicrobial resistance and COVID-19: intersections and implications. *Elife* 2021; 10: e64139, <https://doi.org/10.7554/elife.64139>.
4. World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance*. WHO, Library Cataloguing-in-Publication Data; 2015. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>.
5. Bennett P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1(Suppl 1): S347–S357, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>.
6. Partridge S.R. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35(5): 820–855, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x>.
7. van Hoek H.A.M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2011; 2: 203, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>.
8. Woodford N., Ellington M.J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(1): 5–18, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x>.
9. Sultan I., Rahman S., Jan A.T., Siddiqui M.T., Mondal A.H., Haq Q.M.R. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Front Microbiol* 2018; 9: 2066, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>.
10. López-Causapé C., Sommer L.M., Cabot G., Rubio R., Ocampo-Sosa A.A., Johansen H.K., Figuerola J., Cantón R., Kidd T.J., Molin S., Oliver A. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international cystic fibrosis clone. *Sci Rep* 2017; 7(1): 5555, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05621-5>.
11. Bortolaia V., Kaas R.S., Ruppe E., Roberts M.C., Schwarz S., Cattoir V., Philippon A., Allesoe R.L., Rebelo A.R., Florensa A.F., Fagelhauer L., Chakraborty T., Neumann B., Werner G., Bender J.K., Stingl K., Nguyen M., Coppens J., Xavier B.B., Malhotra-Kumar S., Westh H., Pinholt M., Anjum M.F., Duggett N.A., Kempf I., Nykäsenoja S., Oikola S., Wiczorek K., Amaro A., Clemente L., Mossong J., Losch S., Ragimbeau C., Lund O., Aarestrup F.M. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75(12): 3491–3500, <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
12. Alcock B.P., Raphenya A.R., Lau T.T.Y., Tsang K.K., Bouchard M., Edalatmand A., Huynh W., Nguyen A.V., Cheng A.A., Liu S., Min S.Y., Miroshnichenko A., Tran H.K., Werfalli R.E., Nasir J.A., Oloni M., Speicher D.J., Florescu A., Singh B., Faltyn M., Hernandez-Koutoucheva A., Sharma A.N., Bordeleau E., Pawlowski A.C., Zubyk H.L., Dooley D., Griffiths E., Maguire F., Winsor G.L., Beiko R.G., Brinkman F.S.L., Hsiao W.W.L., Domselaar G.V., McArthur A.G. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 2020; 48(D1): D517–D525, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>.
13. Liu B., Pop M. ARDB — Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(Database issue): D443–D447, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn656>.
14. Gupta S.K., Padmanabhan B.R., Diene S.M., Lopez-Rojas R., Kempf M., Landraud L., Rolain J.M. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(1): 212–220, <https://doi.org/10.1128/aac.01310-13>.
15. Программа для ЭВМ «Компьютерная программа для определения генетических детерминант неплазмидной антибиотикорезистентности». Свидетельство Федеральной службы по интеллектуальной собственности (Роспатент) о государственной регистрации программы для ЭВМ №2021665744 от 01.10.2021 г.
16. Software “Computer program for the detection of genetic determinants of non-plasmid antibiotic resistance. Federal Service for Intellectual Property (Rospatent). Certificate of registration 2021665744. Oct 1, 2021.
17. Trias J., Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems

through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(1): 52–57, <https://doi.org/10.1128/aac.34.1.52>.

17. Quinn J.P., Darzins A., Miyashiro D., Ripp S., Miller R.V. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO: mapping of the OprD2 gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(4): 753–755, <https://doi.org/10.1128/aac.35.4.753>.

18. Chevalier S., Bouffartigues E., Bodilis J., Maillot O., Lesouhaitier O., Feuilloley M.G.J., Orange N., Dufour A., Cornelis P. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev* 2017; 41(5): 698–722, <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>.

19. Sonnleitner E., Pusic P., Wolfinger M.T., Bläsi U. Distinctive regulation of carbapenem susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* by Hfq. *Front Microbiol* 2020; 11: 1001, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01001>.

20. Soundararajan G., Bhamidimarri S.P., Winterhalter M. Understanding carbapenem translocation through OccD3 (OpdP) of *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol* 2017; 12(6): 1656–1664, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01150>.

21. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: 421, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.

22. Pang Z., Raudonis R., Glick B.R., Lin T.J., Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*:

mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* 2019; 37(1): 177–192, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>.

23. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Маянский Н.А. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2017; 19(4): 308–319.

Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Mayansky N.A. Mechanisms and regulation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Klinicheskaa mikrobiologia i antimikrobnaa himioterapia* 2017; 19(4): 308–319.

24. Saito R., Koyano S., Dorin M., Higurashi Y., Misawa Y., Nagano N., Kaneko T., Moriya K. Evaluation of a simple phenotypic method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods* 2015; 108: 45–48, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.008>.

25. Dallenne C., Da Costa A., Decré D., Favier C., Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(3): 490–495, <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>.

26. Suresh M., Skariyachan S., Narayanan N., Pullampara Rajamma J., Panickassery Ramakrishnan M.K. Mutational variation analysis of oprD porin gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 2020; 26(8): 869–879, <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0147>.