

Экспрессия генов бета-лактамаз у бактерий, характеризующихся множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам

А.А.Филиппова^{1,2}, М.Ю.Рубцова¹, М.М.Уляшова¹, Н.К.Фурсова²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», Москва, Российская Федерация;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Устойчивость микроорганизмов к антибактериальным препаратам является глобальной проблемой здравоохранения. В последние годы отмечается рост числа мультирезистентных бактерий, устойчивых одновременно к разным группам антибиотиков, в том числе бета-лактамам. Основным механизмом устойчивости грамотрицательных бактерий к этому классу антибиотиков является синтез разнообразных бета-лактамаз, гидролизующих молекулу антибиотика. Обзорная статья посвящена анализу данных об экспрессии генов бета-лактамаз у мультирезистентных бактерий и молекулярно-генетических методов их определения в РНК-транскриптах.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, транскриптом, молекулярно-генетические методы, бета-лактамазы

Для цитирования: Филиппова А.А., Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Фурсова Н.К. Экспрессия генов бета-лактамаз у бактерий, характеризующихся множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам. Бактериология. 2020; 5(3): 34–46. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-34-46

Expression of beta-lactamase genes in multidrug-resistant bacteria

A.A.Filippova^{1,2}, M.Yu.Rubtsova¹, M.M.Ulyashova¹, N.K.Fursova²

¹M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation

Antimicrobial resistance is a global public health problem. In recent years, increasing of multi-drug resistant bacteria has been noted, which are resistant to different antimicrobial groups simultaneously, including beta-lactams. The main mechanism of anti-beta-lactam resistance in gram-negative bacteria is synthesis of various beta-lactamases that hydrolyze the antibiotics. The review is devoted to the analysis of data on the expression of beta-lactamase genes by multi-drug resistant bacteria and molecular genetic methods for their determination in RNA transcripts.

Key words: antibiotic resistance, transcriptome, molecular genetic methods, beta-lactamases

For citation: Filippova A.A., Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Fursova N.K. Expression of beta-lactamase genes in multidrug-resistant bacteria. Bacteriology. 2020; 5(3): 34–46. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-34-46

Открытие антибиотиков в прошлом веке совершило революцию в лечении инфекционных заболеваний человека, вызванных бактериями. Многие микроорганизмы синтезируют антибиотики, препятствующие росту микроорганизмов-конкурентов в окружающей среде, подобный способ контроля численности популяций микроорганизмов распространен в различных природных системах [1].

Для корреспонденции:

Фурсова Надежда Константиновна, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279 Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, д. 24, Территория «Квартал А»
Телефон: (4967) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

Статья поступила 05.09.2020 г., принята к печати 12.10.2020 г.

Бактерии могут хорошо адаптироваться к различным факторам окружающей среды: для защиты от собственных антибиотиков и антибиотиков, продуцируемых другими микроорганизмами, у них выработаны различные механизмы устойчивости. С началом активного применения антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний начался экспоненциальный рост и масштабное распространение резистентности.

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, leading researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology Rospotrebnadzor

Address: 24 «Quarter A» Territory, 142279 Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region
Phone: (4967) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

The article was received 05.09.2020, accepted for publication 12.10.2020

стентных к антибиотикам патогенных бактерий. В настоящее время антибиотикорезистентность возбудителей инфекционных заболеваний человека является глобальной проблемой человечества [2, 3]. Развитие антибиотикорезистентности по скорости существенно превосходит появление новых антибиотиков. Быстрое распространение устойчивых к антибиотикам форм бактерий обусловлено локализацией генов резистентности на мобильных генетических элементах и способностью бактерий к горизонтальной передаче генов [4, 5].

Неконтролируемое и часто неоправданное использование антибиотиков в медицине, ветеринарии и особенно в сельском хозяйстве (более 80% от объема производимых антибиотиков применяется в ветеринарии и животноводстве) создает условия, при которых огромное количество антибактериальных препаратов попадает в окружающую среду. В воде, почве и других объектах происходит формирование резистентности у существующих там непатогенных микроорганизмов, которые могут затем передавать новые или измененные гены резистентности другим микроорганизмам [6–9]. В результате патогенные микроорганизмы вместе с микроорганизмами окружающей среды представляют огромный резервуар генетических детерминант резистентности.

Основными механизмами резистентности бактерий к антибиотикам являются: снижение проницаемости клеточной мембраны вследствие мутаций в поринах – белковых каналах в наружной мембране грамотрицательных бактерий для транспорта различных веществ [10], вывод антибиотиков из клетки благодаря системам эффлюкса [11, 12], ферментативная модификация антибиотиков или мишени их действия [13, 14]. Сочетание различных механизмов резистентности вместе с сочетанием генов устойчивости к разным антибиотикам приводит к формированию мультирезистентных, экстремально резистентных и панрезистентных патогенов [15–17].

Появление возбудителей инфекций, устойчивых одновременно к нескольким типам антибиотиков, существенно ограничивает выбор адекватной лекарственной терапии. Сдерживающим фактором развития резистентности должно явиться рациональное применение антибактериальных препаратов и выработка эффективных стратегий преодоления антибиотикорезистентности [18]. Для этого необходимо понимание молекулярных механизмов формирования резистентности и наличие адекватных высокотехнологичных методов идентификации бактерий, устойчивых к антибиотикам.

Более половины от всех используемых в медицине антибиотиков составляют бета-лактамы (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы), и устойчивость к этой функциональной группе препаратов является самой распространенной [19]. Преимущественным механизмом резистентности грамотрицательных бактерий к бета-лактамам является ферментативный гидролиз бета-лактамного кольца ферментами – бета-лактамазами. Гены бета-лактамаз чаще всего локализованы на мобильных генетических элементах, что позволяет им быстро и широко распространяться [20]. Клинические штаммы бактерий зачастую характеризуются наличием у них одновременно нескольких генов, кодирующих бета-лактамазы, отличающиеся строением активного центра, субстратной специфичностью и каталитической ак-

тивностью. Имеются данные, что гены бета-лактамаз могут быть обнаружены не только в геномах резистентных, но также и у чувствительных к антибиотикам бактерий как «молчащие», неэкспрессирующиеся [21].

Подробные исследования бета-лактамаз, проводимые с момента их выделения из клинических образцов, были в первую очередь направлены на исследования структуры, механизмов действия и эпидемиологии бета-лактамаз. В последнее время стали активно развиваться исследования по изучению механизмов регуляции экспрессии генов этих ферментов и изучению условий активации и подавления экспрессии. Данный обзор посвящен анализу данных об экспрессии генов бета-лактамаз у резистентных к антибиотикам бактерий и методам их определения.

Разнообразие и распространенность бета-лактамаз

К настоящему времени описано около 2800 бета-лактамаз, выделенных из патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний [22, 23]. По классификации, предложенной Амблер, на основании гомологии первичных последовательностей все суперсемейство ферментов подразделяется на 4 класса – А, В, С и D [24]. Ферменты классов А, С и D содержат серин в активном центре, а ферменты класса В являются металло-бета-лактамазами и содержат ионы Zn^{2+} в активном центре [25]. На основе различий в субстратной специфичности и способности гидролизовать бета-лактамы антибиотики, относящиеся к разным группам, различают бета-лактамазы широкого спектра (гидролизуют пенициллины и цефалоспорины I поколения), бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) (гидролизуют пенициллины и цефалоспорины I–IV поколений) и карбапенемазы (гидролизуют карбапенемы и другие бета-лактамы).

Наиболее распространены у клинических штаммов – возбудителей инфекционных заболеваний человека – сериновые бета-лактамазы молекулярного класса А [22]. Среди них до конца 1990-х гг. наиболее распространенными были бета-лактамазы TEM- и SHV-типов, которые образуют большие семейства, каждое более чем из 200 представителей. Они включают в себя фермент-родоначальник (TEM-1 и SHV-1) и наборы мутантных форм, некоторые из которых относятся к БЛРС. Позже преобладающими во многих регионах мира стали бета-лактамазы CTX-M-типа, все относящиеся к БЛРС [26, 27]. Наиболее часто встречающимся ферментом этого типа в странах Европы, Азии, Африки и США является CTX-M-15, в Кореи и Южной Америке – CTX-M-14. Наиболее распространенными карбапенемазами являются бета-лактамазы KPC-типа, относящиеся к классу А [28]. Известно более 20 вариантов данного фермента, наиболее распространенными среди них являются KPC-2 и KPC-3. Ферменты данного типа способны гидролизовать цефалоспорины, монобактамы и карбапенемы [29, 30]. Бактерии, содержащие ген данной бета-лактамазы, часто характеризуются множественной лекарственной устойчивостью [31]. В России описаны бактерии-продуценты бета-лактамазы KPC-2 [29].

Бета-лактамазы класса С, включающие AmpC-тип ферментов, характеризуются высокой активностью в отношении цефалоспоринов [32]. Среди ферментов класса D наибольшую клиническую значимость имеют бета-лактамаза OXA-48, распространенная у представителей семейства

Enterobacteriaceae, и бета-лактамаза ОХА-23, встречающаяся у *Acinetobacter baumannii* [33]. Бета-лактамазы данного типа гидролизуют оксациллин и карбапенемы [34, 35]. Карбапенемаза ОХА-48, впервые обнаруженная в 2001 г. в Турции, к настоящему времени широко распространена в Европе, Канаде, Корее, на ближнем Востоке, в том числе у мультирезистентных штаммов, реже встречается в Америке [34, 36].

Среди металло-бета-лактамаз (класс В) наиболее распространены ферменты VIM- и IMP-типов. Бета-лактамазы VIM-типа имеют широкую субстратную специфичность: они гидролизуют пенициллины, большинство цефалоспоринов и карбапенемы, но не гидролизуют азтреонам [37]. Ферменты этого типа были впервые обнаружены в Западной Европе в изолятах *Pseudomonas aeruginosa* [38], в настоящее время встречаются в различных регионах, в том числе у *Klebsiella pneumoniae*. Бета-лактамазы IMP-типа имеют похожую субстратную специфичность, впервые они были обнаружены в Японии в 1990 г., преимущественно в штаммах *Escherichia coli* и *K. pneumoniae*. Особенно угрожающим явилось распространение по всему миру металло-бета-лактамаз NDM-типа, продуценты которых получили название «супербактерий» из-за своей панрезистентности. Данная карбапенемаза, впервые обнаруженная в Индии в 2009 г. [39], затем была описана у многих видов патогенных бактерий *Enterobacteriales*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [40, 41]. Данный фермент имеет низкий уровень гомологии с другими ферментами класса В, например, с бета-лактамазами VIM-типа он составляет ~32% [42].

По данным ВОЗ, наибольшую угрозу для здравоохранения представляют мультирезистентные бактерии видов *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* [43]. В ряде стран, в том числе в России, доля таких штаммов составляет более 50%. При этом отмечается рост числа бактерий, устойчивых к карбапенемам, особенную среди *K. pneumoniae*. Гены эпидемически значимых бета-лактамаз в основном локализуются на плазмидах, что обеспечивает их быстрое распространение среди возбудителей как внутри-, так и внебольничных инфекций. У мульти- и панрезистентных бактерий на плазмидах располагаются также гены устойчивости к другим классам антибиотиков – аминогликозидам, фениколам, макролидам, хинолонам, сульфаниламидам. Описаны супербактерии, содержащие в геноме более 15 генов антибиотикорезистентности: гены бета-лактамаз TEM, ОХА-, СТХ-М-, CMY-, GIM-, VIM-, NDM-, KPC-типов; гены аминогликозид-модифицирующих ферментов Aac, Aad, Ant, Aph; гены эффлюксных насосов TetABC, MexABCDEF, а также большое количество IS-элементов и транспозонов [44].

Экспрессия генов бета-лактамаз у бактерий. Индукция экспрессии генов бета-лактамаз хромосомной локализации

Изучение механизмов регуляции экспрессии генов антибиотикорезистентности включает несколько направлений: определение факторов, влияющих на усиление или подавление экспрессии генов в зависимости от условий культивирования, и изучение особенностей строения генетического аппарата бактерий для осуществления этих процессов.

У многих видов бактерий экспрессия бета-лактамаз индуцируется в ответ на действие бета-лактаманых антибиотиков. При этом у грамположительных бактерий экспрессия бета-лактамаз индуцируется непосредственно бета-лактамами, в то время как у грамотрицательных бактерий чаще осуществляется косвенно (высвобождением муропептидов из пептидогликана после их взаимодействия с антибиотиком).

Путь *blaZ-blaR1-blal* у грамположительных бактерий

У грамположительных бактерий (например, *Staphylococcus aureus*) устойчивость к бета-лактамам часто обеспечивается экспрессией бета-лактамазы BlaZ [45, 46], которая индуцируется антибиотиком. Транскрипция гена *blaZ* контролируется системой *blaZ-blaR1-blal* [47], которая включает в себя гены бета-лактамазы BlaZ, ее ДНК-репрессора Blal и белка-преобразователя сигнала BlaR1, кластеризованные либо на бактериальной хромосоме, либо на плазмиде. В отсутствие бета-лактаманого антибиотика ДНК-репрессор Blal подавляет транскрипцию гена *blaZ* при связывании с консервативным фрагментом TACA/TGTA, расположенным в области промотора *blaZ* (рис. 1А). Экспрессия гена *blaZ* инициируется при необратимом связывании бета-лактама с мембрано-ассоциированным рецептором BlaR1 (рис. 1Б). Этот рецептор является трансмембранным белком с С-концевым сенсорным доменом BlaRS, расположенным на поверхности клетки. Сенсорный домен BlaRS структурно гомологичен сериновым бета-лактамазам класса D. Ацилирование белка BlaRS приводит к аутопротеолитическому расщеплению цитоплазматического домена BlaR1. Расщепленная форма BlaR1 является активной цинковой металлопротеазой, которая может инактивировать репрессор Blal, приводя к диссоциации Blal от промотора гена *blaZ* и последующей экспрессии этого гена [48, 49].

Путь *AmpG-AmpR-AmpC* у грамотрицательных бактерий

У многих бактерий порядка *Enterobacteriales* и у *P. aeruginosa* экспрессия бета-лактамаз класса С (AmpC-типа) индуцируется бета-лактаманых антибиотиками (рис. 2), и этот процесс тесно взаимосвязан с рециркуляцией клеточной стенки бактерий [50–53]. При связывании бета-лактаманых антибиотиков со своей мишенью, пенициллин-связывающими белками (ПСБ), активируются литические трансгликозилазы, в результате чего в периплазме начинается распад пептидогликана и накапливаются продукты его гидролиза – муропептиды GlcNAc-ангидро-MurNAc. Они переносятся в цитоплазму через трансмембранный белок-транспортер AmpG, где распадаются на 1,6-ангидромуро-три-, тетра- и пентапептиды с участием β -N-ацетилглюкозаминидазы NagZ. Эти пептиды при взаимодействии с регулятором AmpR являются индукторами экспрессии хромосомно-кодируемых бета-лактамаз AmpC-типа. AmpR является регулятором транскрипции типа LysR, кодируемый его ген располагается непосредственно перед геном *ampC* [54]. В отсутствие антибиотика во внешней среде активаторная функция AmpR ингибирована клеточным метаболитом – предшественником синтеза клеточной стенки, UDP-MurNAc-пентапептидом. Индуцирующие муропептиды вытесняют связанный UDP-MurNAc-пентапептид, вызывая конформационные изменения в молекуле AmpR, которые приводят к активации транскрипции гена *ampC*. Сайт связывания AmpR находится в об-

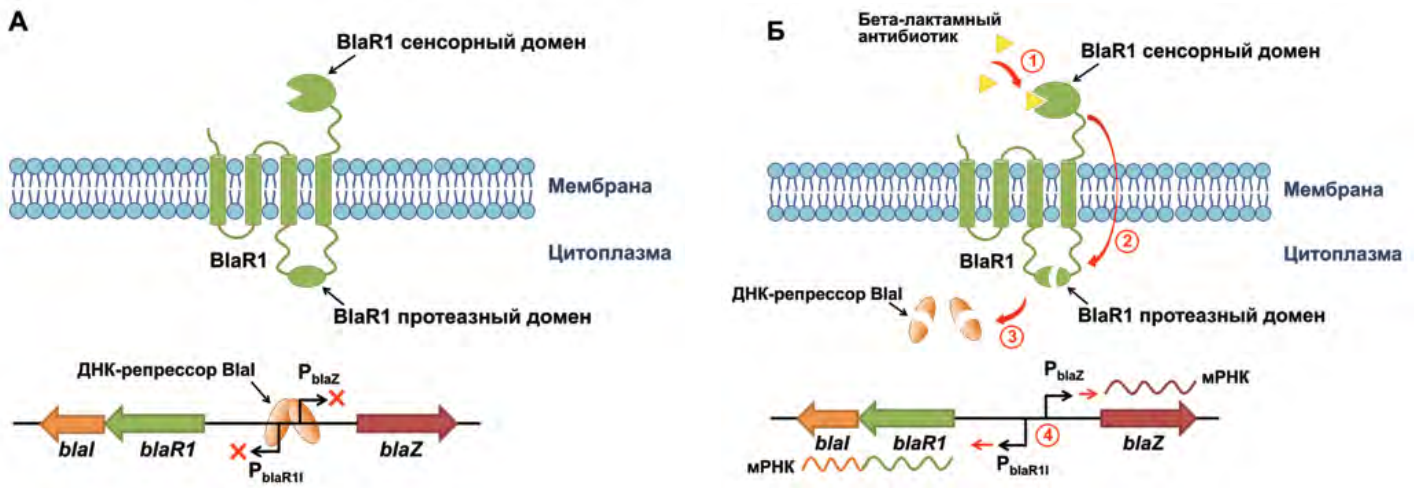


Рис. 1. Индукция экспрессии бета-лактамазы BlaZ бета-лактамами антибиотиками у грамположительных бактерий: А – в отсутствии бета-лактаманного антибиотика: ДНК-репрессор BlaI связан в области промоторов *blaZ/blaR1* и подавляет экспрессию генов в обоих направлениях; Б – в присутствии бета-лактаманного антибиотика: 1) связывание бета-лактаманного антибиотика с сенсорным доменом BlaR1, 2) аутопротеолитическое расщепление протеазного домена BlaR1, 3) протеолиз и последующая диссоциация ДНК-репрессора BlaI с промоторов *blaZ/blaR1*, 4) транскрипция генов *blaZ*, *blaR1* и *blaI* (Lautenschlager et al., 2020 [113], с изменениями).

ласти последовательности нуклеотидов на 39 п.н. выше сайта начала транскрипции *ampC* (от -40 до -88) [50].

У разных бактерий существуют разные варианты регуляторного пути AmpG-AmpR-AmpC. AmpR у *P. aeruginosa* является глобальным транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию генов бета-лактамаз, протеаз, сигналов кворума и ряда факторов вирулентности [55, 56]. У некоторых бактерий, например, *E. coli* и *Shigella* spp., отсутствует ген *ampR*, что приводит к низкому уровню конститутивной экспрессии гена *ampC*. Этот ген у *E. coli* в основном регулируется аттенуаторной последовательностью, расположенной в области промотора. Сверхэкспрессия *ampC* наблюдается либо при мутациях аттенуатора, либо при введении регулятора *AmpR* извне. У *Salmonella* spp. хромосомный тандем генов *ampC-ampR* обычно отсутствует, но клинические штаммы сальмонелл могут приобретать его в ходе горизонтального переноса генов [53]. Экспериментально было показано, что инактивация AmpG приводила к восстановлению чувствительности бактерий к бета-лактамам даже у панрезистентных клинических изолятов *P. aeruginosa* [57]. Мутации в гене *lagZ* также снижали уровень экспрессии генов *ampC*, что повышает чувствительность бактерий к бета-лактаманному антибиотику [58, 59].

Еще одним ключевым ферментом в данной многокомпонентной системе регуляции является цитоплазматическая N-ацетилмурамоил-L-аланинамидаза AmpD, которая может отщеплять створчатые пептиды от ангидро-MurNAc или GlcNAc-ангидро-MurNAc, снижая концентрацию индуцирующих муропептидов и уменьшая избыточную продукцию AmpC. Наиболее распространенным механизмом, приводящим к суперпродукции AmpC и резистентности к бета-лактамам у клинических штаммов *Enterobacteriales* и *P. aeruginosa*, являются мутации в гене *ampD* [60]. *P. aeruginosa* имеют три различных гомолога AmpD: AmpD, AmpDh2 и AmpDh3, их последовательная инактивация приводит к ступенчато повышающейся продукции AmpC [61, 62]. Удаление всех трех генов AmpD приводит к значительному увеличению уровней резистентности к бета-лактамам, включая це-

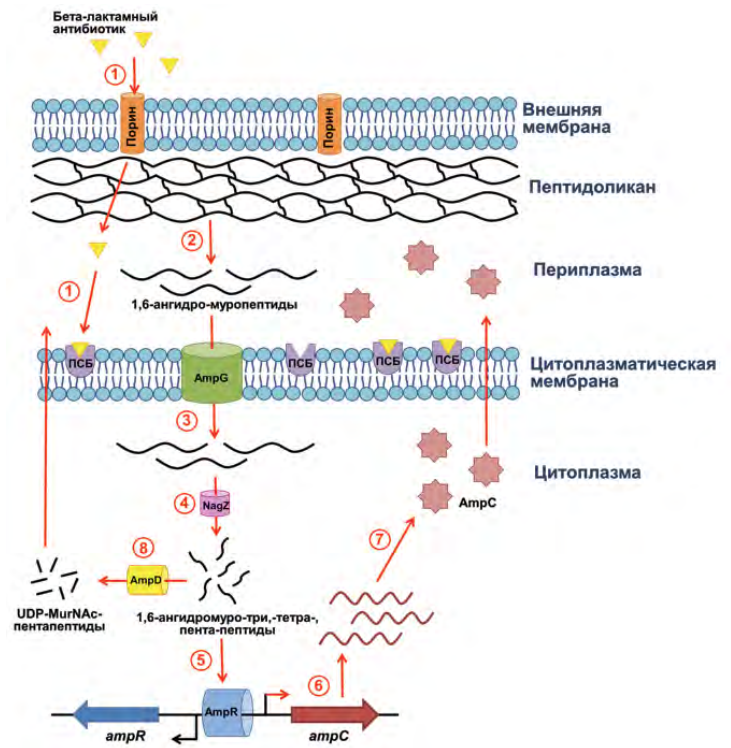


Рис. 2. Индукция экспрессии бета-лактамазы AmpC бета-лактаманми антибиотиками у грамотрицательных бактерий порядка *Enterobacteriales* и *P. aeruginosa*: 1 – проникновение в клетку и связывание бета-лактаманного антибиотика с ПСБ; 2 – активация литических трансгликозилаз, которые расщепляют пептидогликан до 1,6-ангидро-муропептидов; 3 – перенос 1,6-ангидро-муропептидов в цитоплазму через трансмембранный белок-транспортер AmpG; 4 – расщепление 1,6-ангидро-муропептидов до 1,6-ангидромуро-три-, тетра- и пентапептидов (индуцирующие муропептиды), катализируемое β -N-ацетилглюкозаминидазой NagZ; 5 – взаимодействие индуцирующих муропептидов с регулятором транскрипции AmpR; 6 – транскрипция *ampC*; 7 – синтез бета-лактамазы AmpC; 8 – расщепление индуцирующих муропептидов до UDP-MurNAc-пентапептидов, катализируемое N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазой AmpD (Lister et al., 2009 [114], с изменениями).

фалоспорины и монобактамы, из-за полной дерепрессии экспрессии гена *ampC* [63].

Двухкомпонентные регуляторные системы у грамотрицательных бактерий

Другой механизм индукции продукции бета-лактамаз у грамотрицательных бактерий реализуется через активность двухкомпонентных регуляторных систем (ДКРС) [53, 64, 65]. ДКРС присутствуют у многих видов бактерий и являются одними из основных механизмов реагирования бактерий на сигналы окружающей среды. Они состоят из сенсорного белка-рецептора – гистидиновой киназы (ГК) – и соответствующего регулятора ответа (РО). ГК, как правило, представляет собой гомодимерный трансмембранный белок, который имеет гистидин-содержащий фосфотрансферазный домен и АТФ-связывающий домен. РО является мультидоменным белком, содержащим домен-акцептор и эффекторный домен, часто обладающий ДНК-связывающей активностью. РО локализуется в цитоплазме. При стимуляции сигналом окружающей среды ГК аутофосфорилируется, перенося фосфатную группу с АТФ на консервативный остаток гистидина. Затем фосфатная группа переносится с ГК на консервативный аминокислотный остаток РО (как правило, аспартат). В фосфорилированном РО происходят конформационные изменения, активирующие его эффекторный домен. Этот домен, в свою очередь, действует в качестве фактора транскрипции, влияя на экспрессию генов посредством связывания со специфическими участками хромосомной ДНК или через другие косвенные механизмы (рис. 3).

С каждым годом появляется все больше данных о том, что ДКРС участвуют в формировании устойчивости бактерий к различным классам антибиотиков. У *E. coli*, например, осморегуляторная двухкомпонентная система *EnvZ/OmpR* контролирует дифференциальную экспрессию поринов внешней мембраны *OmpF* и *OmpC*, через которые осуществляется пассивная и неспецифическая диффузия низкомолекулярных гидрофильных веществ, в том числе антибиотиков [66]. Ряд ДКРС регулируют экспрессию бета-лактамаз и, следовательно, важны для формирования устойчивости к бета-лактамам. Примерами таким систем являются *BlrAB*, которая важна для регуляции экспрессии трех бета-лактамаз у *Aeromonas* spp.: карбапенемазы класса В (*CrpA*), цефалоспориныазы класса С (*Сер*) и пенициллиназы класса D (*Amp*) [67], а также *CreBC*, которая является регулятором экспрессии генов бета-лактамаз и других генов у *E. coli* и *P. aeruginosa* [68, 69]. Было показано, что степень гомологии между системами *CreBC* и *BlrAB* является достаточно высокой и составляет около 70%. Их компоненты-гомологи *CreB* и *BlrA* действуют как регуляторы ответа, воздействующего на сенсорные киназы *CreC* и *BlrB*. Большинство сенсорных киназ грамотрицательных бактерий реагируют на изменение концентрации периплазматического или цитоплазматического лиганда – либо непосредственно, либо через некоторый дополнительный белковый компонент [70]. Показано, что системы *BlrAB* и *CreBC* специфически реагируют на ингибирование низкомолекулярных ПСБ (например, ПСБ4) некоторыми бета-лактамами [71]. Скорее всего, как и в случае *AmpG-AmpR-AmpC*-регуляции, индукторами данных систем могут являться продукты распада пептидогликана, но без необходимости их переноса в цитоплазму [72]. В ряде ис-

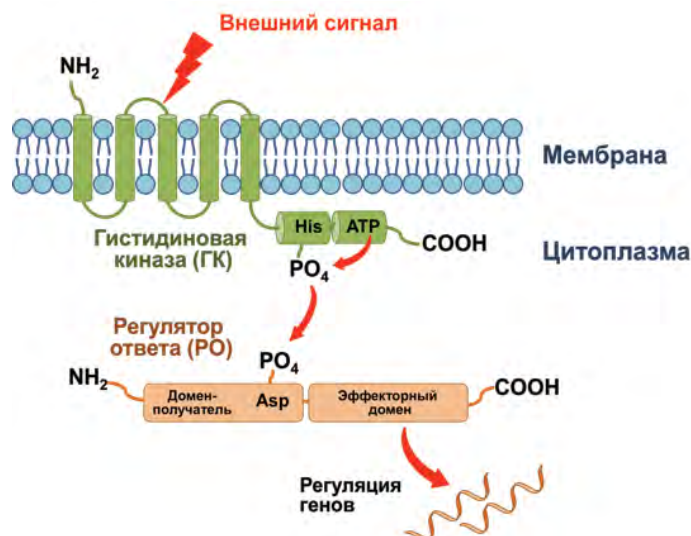


Рис. 3. Схема двухкомпонентной регуляторной системы (Podglajen et al., 2007 [115], с изменениями).

следований было показано, что регуляторы ответа систем *BlrAB* и *CreBC* запускают экспрессию бета-лактамаз путем распознавания определенных сигнальных последовательностей, расположенных в промоторе гена бета-лактамазы, при этом чем больше этих последовательностей, тем выше уровень экспрессии гена [73].

Еще один пример двухкомпонентной регуляторной системы был описан при изучении механизма регуляции экспрессии хромосомной карбенициллин-гидролизующей бета-лактамазы класса А (*CARB*) у *Vibrio parahaemolyticus* [74]. Было показано, что ген, кодирующий данную бета-лактамазу, является частью регулона новой ДКРС (*VbrK/VbrR*). Сенсорная гистидинкиназа *VbrK* связывается непосредственно с бета-лактамым антибиотиком и передает сигнал на регулятор ответа *VbrR*, который контролирует экспрессию гена бета-лактамазы *CARB*. Данный механизм был подтвержден следующими данными: делеция *VbrK* или *VbrR* значительно снижала экспрессию бета-лактамазы и устраняла устойчивость к бета-лактамам; активация *VbrK* специфически запускалась бета-лактамыми антибиотиками, но не другими лактамами; единичные аминокислотные замены в сенсорном домене *VbrK* изменяли его специфичность к бета-лактамам. При связывании бета-лактама с сенсорным доменом *VbrK* происходят конформационные изменения, которые приводят к более тесной ассоциации с доменом АТФазы и последующему фосфорилированию остатка гистидина. Таким образом, бактерии могут быстро реагировать на присутствие бета-лактамов в окружающей среде до того, как клеточная стенка бактерии будет повреждена. Такое прямое распознавание бета-лактамов гистидинкиназой без каких-либо затрат на целостность клеточной стенки может представлять собой новый эволюционно благоприятный механизм защиты от бета-лактаменных антибиотиков.

Индукция экспрессии генов бета-лактамаз плазмидной локализации

Эволюция бактериальных штаммов, приведшая к возникновению и распространению мульти-, экстремальной- и панрезистентности в большой степени обусловлена обменом генетическими детерминантами устойчивости благодаря

мобильным генетическим элементам (инсерционным вставкам, транспозонам, генным кассетам/интегронам, плазмидам и интегративным конъюгативным элементам), способным перемещаться внутри одной или между различными молекулами ДНК [75]. Эти элементы играют центральную роль в обеспечении горизонтального переноса генов и поэтому способствуют приобретению и распространению генов устойчивости. Инсерционные последовательности (IS-элементы) и транспозоны представляют собой дискретные сегменты ДНК, способные перемещать связанные с ними гены устойчивости практически случайным образом на новые участки в различных молекулах ДНК в одной клетке. Интегроны используют сайт-специфическую рекомбинацию для перемещения генов устойчивости между определенными сайтами. Поскольку данные типы мобильных элементов часто присутствуют в геноме клетки в нескольких экземплярах и расположены на различных участках, они также могут способствовать гомологичной рекомбинации (обмену последовательностями между идентичными или родственными сегментами нуклеотидной последовательности). Межклеточные механизмы генетического обмена включают конъюгацию/мобилизацию, опосредованную плазмидами и интегративными конъюгативными элементами; трансдукцию, осуществляемую посредством бактериофагов, и трансформацию вследствие захвата внеклеточной ДНК. Эволюция мультирезистентности в данном случае обусловлена взаимодействием различных типов мобильных генетических элементов и механизмов их обмена между бактериями.

IS-элементы наиболее часто локализируются перед генами бета-лактамаз, влияя на экспрессию данных генов [76–78]. Эти последовательности представляют собой небольшие мобильные генетические элементы, включающие один или два гена транспозазы, и делятся на группы в зависимости от типа ключевых аминокислот в активном центре транспозазы и механизма транспозиции. Он может быть консервативным, когда IS-элемент вырезается из донорного участка ДНК и вставляется в реципиентный, или репликативным – по принципу копирования и вставки.

Для некоторых оксациллинов, например OXA-58, установлено, что инсерционная вставка ISAb3 обуславливает гиперпродукцию этого фермента и обеспечивает устойчивость к карбапенемам [77, 79]. При изучении штамма *A. baumannii*, продуцента другой оксациллиназы – OXA95, было показано, что действие имипинема в концентрациях до 0,5 мг/л приводило к транспозиции ISAb1, расположенного перед геном бета-лактамазы [80]. В результате экспрессия гена бета-лактамазы увеличивалась в 20 раз по сравнению с экспрессией гена в отсутствие антибиотика. Данный механизм транспозиции IS-элементов играет регуляторную роль в формировании устойчивости к карбапенемам.

У грамотрицательных бактерий описаны примеры IS-элементов, несущих последовательность сильного промотора, обеспечивающего эффективную экспрессию одного или нескольких ассоциированных с ними генов антибиотикорезистентности. Инсерционные последовательности могут перемещать гены резистентности в составе единого составного транспозона – фрагмента ДНК, ограниченного двумя копиями IS-элементов. Так, гены бета-лактамаз TEM-типа, включая гены БЛРС и устойчивых к ингибиторам бета-

лактамаз вариантов, всегда обнаруживаются либо в составе транспозонов Tn1, Tn2, Tn3, либо в их фрагментах, либо в их гибридах [81]. Описан гибридный транспозон Tn1331, несущий гены антибиотикорезистентности, являющийся производным транспозона Tn3 и интегрона класса 1 [82]. Достаточно часто встречаются гибридные элементы, сходные в отдельных своих частях с транспозонами Tn1331, Tn1 или Tn2, в том числе в ассоциации с генами *blaKPC* [83]. Транспозон Tn4401, несущий разные варианты генов карбапенемаз KPC-типа, также принадлежит к большому семейству Tn3, но имеет низкую степень гомологии с другими представителями этого семейства. Известно несколько вариантов Tn4401, у которых описаны два промотора, управляющие экспрессией гена *blaKPC* [84]. Роль промоторов, расположенных перед генами бета-лактамаз, была показана и для экспрессии бета-лактамаз других типов [85].

Гены бета-лактамаз могут располагаться на плазмидах как независимые структуры, так и в составе сложных интегროнов. Показано, что основным фактором, индуцирующим экспрессию генов антибиотикорезистентности, является присутствие молекул антибиотиков [85, 86]. Экспериментально продемонстрирована индукция экспрессии генов бета-лактамаз различными группами бета-лактамов, включая цефалоспорины [85, 87], оксациллины [88] и карбапенемы [86]. Например, Zhao et al. в своей работе изучали регуляцию экспрессии клинически значимых пенициллиназ, БЛРС и карбапенемаз у штаммов *K. pneumoniae*. Было показано, что экспрессия ферментов TEM-1, CTX-M-14, SHV-11 и OXA-1 (но не KPC-2) в значительной степени индуцировалась цефотаксимом и пенициллином. Однако после дополнительной обработки клонантелом (салициланилидный антигельминтик, который является доказанным ингибитором бактериальных гистидинкиназ) уровни мРНК, соответствующие вышеперечисленным ферментам, резко снижались в зависимости от дозы препарата. На основе полученных результатов авторы сделали вывод, что экспрессия бета-лактамаз TEM-, SHV, CTX-M- и OXA-типов у клинических штаммов *K. pneumoniae* может быть индуцибельной и, вероятнее всего, регулируется посредством ГК-зависимых ДКРС [89].

Методы определения экспрессирующихся генов антибиотикорезистентности

Молекулярно-генетические методы, основанные на определении полной или частичной последовательности нуклеотидов генетических детерминант антибиотикорезистентности, широко применяются при изучении бактерий, резистентных к антибиотикам. Ограничением большинства из этих методов является то, что они выявляют определенные генетические детерминанты, ассоциированные с антибиотикорезистентностью, но не отвечают на вопрос, экспрессируются ли они. Это может приводить к ложноположительным результатам детекции антибиотикорезистентных бактерий. Например, недавно были описаны штаммы бактерий, несущих гены антибиотикорезистентности, в том числе хромосомные гены бета-лактамаз, но фенотипически чувствительных к антибиотикам [21, 90]. Такие гены могут быть ассоциированы с неактивными промоторами и поэтому не экспрессироваться. Но при этом бактерии могут передать гены ан-

тибиотикорезистентности другим бактериям, имеющим эффективные промоторы [91, 92]. Бактерии с «молчащими», неэкспрессирующимися генами устойчивости к антибиотикам пока мало исследованы.

Методы определения экспрессирующихся генов в большинстве своем основаны на выявлении транскриптов этих генов в пуле общей РНК, путем получения из нее библиотек кДНК (комплементарной ДНК) в реакции обратной транскрипции, с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Первые разработанные методы анализа РНК-транскриптов были основаны на электрофоретическом разделении продуктов амплификации с использованием дополнительных программ для анализа цифровых изображений [90, 92], однако чувствительность и точность этих методов была низкой. В таблице представлены примеры опубликованных научных работ, посвященных данной проблеме.

РНК-секвенирование

Для определения полных последовательностей экспрессируемых генов разработаны технологии РНК-секвенирования. Они используются для изучения структуры РНК, механизмов процессов трансляции, анализа дифференциальной экспрессии генов, включая механизмы экспрессии генов в единичных клетках [93]. Для обогащения фракции общей РНК можно проводить отбор поли-dATP-содержащих мРНК с помощью магнитных или целлюлозных бусин, на которых иммобилизованы праймеры, содержащие

олиго-dTTP-участки [94]. Библиотеки кДНК секвенируют с использованием различных высокопроизводительных платформ, например Illumina. Затем проводится обработка результатов, включающая выравнивание последовательностей, сборку транскриптома, нормализацию и статистический анализ значимости изменений в уровнях экспрессии отдельных генов или выбранной группы генов [95]. Основной проблемой РНК-секвенирования являются возможные ошибки, возникающие в процессе реакции обратной транскрипции, трудоемкость процедуры анализа математической обработки результатов и трудности выбора референсного генома для нормировки результатов. Эффективность секвенирования длинных РНК-транскриптов с поли-А-концом может снижаться в зависимости от удаленности гена от полинуклеотидной последовательности, что приводит к заниженным результатам и не позволяет определять слабо экспрессирующиеся гены.

В настоящее время появились технологии мономолекулярного прямого секвенирования РНК (Direct RNA Sequencing – DRSTM), развиваемые компанией Helicos [98]. Этот метод предполагает секвенирование РНК с использованием массово-параллельных технологий без дополнительной модификации образца в реакциях обратной транскрипции, лигирования, амплификации и др.

С помощью РНК-секвенирования была изучена экспрессия генов карбапенемаз KPC-2 и NDM-1 у гипервирулентных

Таблица. Молекулярно-генетические методы изучения экспрессии генов антибиотикорезистентности

Метод	Объекты и цель исследования	Полученные результаты	Ссылка
ПЦР в режиме реального времени	Оценивали измерение экспрессии генов карбапенемазы NDM и эффлюксных насосов MexAB-OprM у штаммов <i>P. aeruginosa</i> , содержащих названные генетические детерминанты в разных сочетаниях, при культивировании в присутствии меропенема (1 мг/мл). РНК выделяли из клеток каждые 45 мин в течение 6 ч	Показано, что эффлюксные насосы первыми реагируют на воздействие меропенема и обеспечивают выживание бактерий в присутствии меропенема	Choudhury, 2016 [100]
	Изучали экспрессию хромосомного гена <i>ampC</i> в клинических штаммах <i>E. coli</i>	Уровень экспрессии гена был увеличен в штаммах, содержащих мутации в промоторе гена <i>AmpC</i> , и умеренно увеличивался при наличии мутации в области Pribnow box гена <i>AmpC</i>	Coverc, 2003 [107]
	Были изучены штаммы <i>K. pneumoniae</i> с делецией размером 30 п.н., расположенной ниже промотора гена <i>blaSHV-1</i>	Обнаруженная делеция вызывала 15-кратное увеличение экспрессии гена бета-лактамазы <i>SHV-1</i> по сравнению с обычным промотором	Coverc, 2006 [108]
	Изучали ответ клеток штамма <i>E. coli</i> , продуцирующего бета-лактамазу CTX-M-1, на действие цефотаксима в концентрациях 0–512 мг/л в зависимости от фазы роста культуры, концентрации антибиотика и локализации гена	Экспрессия гена <i>blaCTX-M-1</i> увеличивалась при увеличении концентрации антибиотика. При хромосомной локализации гена уровень экспрессии бета-лактамазы был повышен по сравнению с таковым при плазмидной локализации	Kjeldsen, 2015 [85]
	Изучали формирование множественной лекарственной устойчивости у <i>A. baumannii</i> при пассировании на имипенеме. Всего было изучено 18 штаммов, включая 12 мутантных, полученных из чувствительных штаммов	Показаны различия в уровнях экспрессии генов <i>blaOXA-51</i> , <i>ampC</i> и эффлюксных насосов у трех мутантных штаммов. Установлено, что имипенем индуцирует формирование множественной лекарственной устойчивости у штаммов <i>A. baumannii</i>	Kuo, 2012 [86]
	Изучали механизм устойчивости к имипенему у штаммов <i>A. baumannii</i> , имеющих инсерционную вставку ISAb1 перед геном бета-лактамазы OXA-95	Экспрессия гена <i>blaOXA-95</i> увеличивалась в 200 раз при культивировании штамма в присутствии 0,5 мг/л имипенема по сравнению с уровнем экспрессии гена в отсутствие антибиотика	Kuo, 2014 [80]
	Определяли транскрипционный ответ у 169 штаммов <i>E. coli</i> , несущих нескольких генов бета-лактамаз, на воздействие цефалоспориновых антибиотиков	Ген <i>blaSHV-148</i> транскрибировался на базальном уровне в отсутствие антибиотического стресса. Экспрессия генов <i>blaCTX-M</i> и <i>blaSHV-148</i> увеличивалась в присутствии цефтриаксона; гена <i>blaPER-1</i> – в присутствии цефтазидима	Maurya, 2016 [87]
	Изучали связь гиперэкспрессии гена <i>ampC</i> в штаммах <i>E. coli</i> и механизм их устойчивости к цефалоспорином на выборке из 49 изолятов	Не было обнаружено связи между устойчивостью штаммов к цефокситину и гиперэкспрессией хромосомного гена бета-лактамазы <i>AmpC</i>	Paltansing, 2015 [109]
	Из 900 изолятов грамотрицательных бактерий (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>Acinetobacter</i> spp.) с помощью метода Carba NP были отобраны карбапенемрезистентные, несущие гены бета-лактамаз NDM-1 и NDM-5	Показано повышение экспрессии генов <i>blaNDM-1</i> и <i>blaNDM-5</i> при культивировании клеток в присутствии карбапенемов – имипенема, меропенема и эртапенема	Paul, 2017 [101]

РНК-секвенирование	Изучали экспрессию генов в гипервирулентном штамме <i>K. pneumoniae</i> , содержащем плазмиду p24835-NDM5 с геном карбапенемазы NDM-5	У 683 генов, отвечающих за метаболизм углеводов, биосинтез капсул и вирулентность, зафиксирована дифференциальная экспрессия: у 107 генов отмечено увеличение экспрессии, а у 576 – снижение	Long, 2019 [97]
	Изучали экспрессию генов при воздействии имипенема на штамм <i>E. coli</i> , в который была трансформирована плаزمиды из клинического штамма <i>K. pneumoniae</i> , содержащая гены антибиотикорезистентности	Наиболее экспрессируемы были гены, отвечающие за антибиотикорезистентность (<i>blaKPC-2</i> , <i>blaTEM</i> , <i>aph(3')-I</i>); наибольшее увеличение экспрессии было отмечено для хромосомных генов, отвечающих за окислительный стресс	Jousset, 2018 [96]
Биочипы	Изучали изменение экспрессии генов в биопленках <i>P. aeruginosa</i> под действием субингибирующих концентраций имипенема на биочипах высокой плотности	Идентифицированы 34 гена, экспрессия которых в биопленке снижалась или увеличивалась более чем в 5 раз после воздействия имипенема по сравнению с экспрессией в отсутствие антибиотика. Наиболее сильно увеличивалась экспрессия хромосомного гена <i>ampC</i> и генов, кодирующих биосинтез альгината	Bagge, 2004 [110]
	Изучали транскрипционный ответ бактерий <i>Burkholderia pseudomallei in vivo</i> в легких инфицированных мышей под действием цефтазидима по сравнению с таковым <i>in vitro</i>	Идентифицировано 1688 транскрипционно-активных бактериальных генов, уникальных для лечения <i>in vivo</i> , из них 591 генов дифференциально экспрессировались при лечении цефтазидимом, в том числе гены пенициллинсвязывающих белков и бета-лактамаз (<i>penA</i>). <i>In vitro</i> только 186 генов по-разному реагировали на обработку цефтазидимом	Cummings, 2017 [111]
Электрофоретическое определение ПЦР-продуктов	Изучали синергетическое действие байкалеина и цефотаксима против <i>K. pneumoniae</i>	Исследование показало, что байкалеин проявляет синергетическую активность в сочетании с цефотаксимом против некоторых штаммов <i>K. pneumoniae</i> , что связано с ингибированием экспрессии мРНК гена <i>blaCTX-M-1</i>	Cai, 2016 [112]
	Изучали причины отсутствия экспрессии генов антибиотикорезистентности <i>blaOXA-2</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> и <i>tetA</i> , находящихся под интактными промоторами штаммов <i>E. coli</i> на плазмиде pVE46	Показана обратимость процесса отсутствия экспрессии при перемещении плазмиды в другой штамм. Высказано предположение о существовании неизвестной формы контроля транскрипции, которая перекрывает стандартные транскрипционные сигналы, чтобы выключить экспрессию генов. Эти данные свидетельствуют о том, что неэкспрессируемые гены резистентности могут встречаться в дикой природе и, следовательно, иметь клинические последствия	Enne, 2006 [92]
	Изучали экспрессию гена <i>blaSHV</i> у изолятов <i>K. pneumoniae</i> , чувствительных к ампициллину	Показано, что чувствительные штаммы могут содержать неэкспрессирующиеся (молчащие) гены бета-лактамаз	Fu, 2007 [90]
Секвенирование ПЦР-продуктов	Оценивали влияние акрифлавина на перемещение инсерционной последовательности ISAba1 в клинических изолятах <i>A. baumannii</i> с акцентом на изменение уровней экспрессии генов <i>blaADC</i> и <i>blaOXA-51</i>	Зафиксировано встраивание ISAba1 выше генов бета-лактамаз, что вызывало увеличение экспрессии этих генов. Утрата ISAba1 из области выше генов <i>blaADC</i> и <i>blaOXA-51</i> приводила к значительному снижению экспрессии первого гена и, в меньшей степени, второго. Сделан вывод, что перемещение IS-элемента ISAba1 в хромосоме <i>A. baumannii</i> может быть важным регуляторным механизмом, используемым бактерией в определенных стрессовых условиях для повышения экспрессии генов антибиотикорезистентности	Lopes, 2011 [77]
	Изучали 224 чувствительных к антибиотикам штаммов <i>K. pneumoniae</i> на наличие неэкспрессирующихся генов антибиотикорезистентности	Неэкспрессирующийся ген бета-лактамазы SHV, находящийся под интактным промотором, был обнаружен в 5 чувствительных к бета-лактамам штаммах	Li, 2014 [21]

штаммов *K. pneumoniae* в присутствии карбапенема имипенема [96, 97].

ПЦР в режиме реального времени

Наиболее часто при изучении экспрессии генов антибиотикорезистентности используется метод ПЦР в режиме реального времени, который позволяет детектировать накопление продукта амплификации по активности флуоресцентных меток. Для мониторинга флуоресценции во время реакции используют неспецифические красители, включая SYBR Green или Eva Green, а также специфические последовательности праймеров, содержащие флуоресцентные красители. Количественную оценку проводят по определению порогового цикла (Ct) – количества циклов реакции амплификации, которое требуется для получения флуоресцентного сигнала, значимо отличающегося от фонового [99]. Метод характеризуется меньшим коэффициентом вариации

по сравнению с оценкой по конечной точке, которая принята в ПЦР классического формата. Основным отличительным преимуществом ПЦР в режиме реального времени является простота выполнения, отсутствие дополнительных манипуляций с ампликоном после окончания реакции, возможность совмещения амплификации с реакцией обратной транскрипции, однако эффективность определения мРНК при этом снижается. Несмотря на привлекательность данного метода, он обладает рядом сложностей в своей реализации: низкая воспроизводимость результатов при низких концентрациях ДНК-матрицы, фоновая флуоресценция образца, вследствие чего возникают трудности определения слабо экспрессирующихся генов. Специфичность амплифицированного ПЦР-продукта при использовании интеркалирующих красителей, таких как SYBR Green, подтверждают по наличию только одного пика его кривой плавления. Данный

метод позволяет выявлять различия в экспрессии генов на уровне 20–30%. Данный метод был использован во многих работах по изучению изменений уровней экспрессии генов бета-лактамаз NDM-, CTX-M-, SHV-типов [85, 87, 100, 101].

Гибридизационный анализ на ДНК-чипах

ДНК-чипы представляют собой носители небольшой площади, на которые нанесены в определенном порядке короткие олигонуклеотидные зонды, комплементарные участкам последовательностей определяемых генов [102, 103]. Существуют различные технологии идентификации нуклеотидных последовательностей, наиболее распространенной является аллель-специфическая гибридизация исследуемой ДНК-мишени с одним или несколькими иммобилизованными зондами. Данная технология с использованием ДНК-чипов высокой плотности, включающих десятки тысяч олигонуклеотидных зондов, показала свою эффективность в профилировании мРНК, мониторинге экспрессии большого количества генов и даже целых геномов [103, 104]. Впервые технология ДНК-чипов высокой плотности с использованием коротких олигонуклеотидных зондов была применена компанией Affymetrix. Она была основана на одновременном тестировании двух образцов, один из которых является образцом сравнения. Для сравнительного анализа использовали два типа флуоресцентных красителей, что позволяло определить соотношение уровней мРНК у двух образцов одновременно. Для повышения специфичности анализа при идентификации генов использовали до 10 различных олигонуклеотидных зондов. Результатом высокопроизводительного сравнительного анализа на ДНК-чипах высокой плотности является определение направления изменения экспрессии наборов генов (увеличение или подавление экспрессии) в тех или иных условиях. Результат не является количественным. ДНК-чипы применяются также для изучения механизмов действия лекарственных препаратов на клетки и изменения экспрессии определенных генов [103].

Ограничением метода гибридизационного анализа на ДНК-чипах является достаточно узкий динамический диапазон обнаружения, находящийся в интервале двух или трех порядков величины концентраций [102]. Данный метод, как и рассмотренные ранее, требует оптимизации нормировки экспериментальных данных для корректного сравнения результатов, полученных при тестировании разных образцов. Кроме того, неспецифическая гибридизация близкородственных генов может приводить к высоким фоновым значениям и снижать динамический диапазон регистрируемых сигналов. Однако возможность проведения мультиплексного анализа большого количества генов с полной автоматизацией процесса является явным преимуществом данной технологии.

Для определения экспрессии единичных генов возможно использование ДНК-чипов низкой плотности, содержащих до нескольких десятков специфических олигонуклеотидных зондов. Такие биочипы разработаны для идентификации генов бета-лактамаз [105, 106], однако для количественного определения экспрессии генов пока не применялись.

Заключение

Устойчивость бактерий к антибиотикам эволюционно возникла как защитная система от собственных и чужих антибактериальных соединений. Благодаря горизонтальному

переносу генов бактерии приобретали новые свойства и развивали свой потенциал устойчивости к внешним воздействиям. Встраивание генов устойчивости в хромосомы и плазмиды опосредовано участием мобильных и интегративных элементов. Активное применение антибиотиков человеком для лечения и профилактики инфекционных заболеваний человека и животных привело к экспоненциальному росту резистентности у бактерий, сочетанию различных механизмов резистентности и появлению множественной, экстремальной и панрезистентности. Появление патогенов, вооруженных множественными механизмами антибиотикорезистентности, существенно осложнило выбор адекватной антимикробной терапии. Понимание этих механизмов важно для поиска новых способов преодоления резистентности и повышения эффективности уже используемых в настоящее время антибиотиков.

При изучении мультирезистентных бактерий основными являются вопросы, все ли генетические детерминанты резистентности экспрессируются, какие механизмы использует для этого бактериальная клетка, как можно предотвратить индукцию генов резистентности. Для решения этих задач разрабатываются количественные методы определения экспрессии генов. Из-за многообразия и сложности механизмов резистентности они должны характеризоваться достаточно высокой мультиплексностью и производительностью. К наиболее высокопроизводительным относятся РНК-секвенирование и ДНК-чипы; метод ПЦР в режиме реального времени относится к среднепроизводительным. Несмотря на многообразие уже разработанных методов, существуют технические проблемы, не до конца решенные к настоящему времени: нестабильность образцов РНК; наличие в образцах РНК остаточных количеств ДНК; необходимость выбора адекватных референсных генов для нормирования результатов; необходимость оценки погрешности при количественных измерениях с учетом сложности пробоподготовки для анализа РНК-транскриптов; трудоемкость процесса; необходимость адаптации методов для применения в клинической практике. Поэтому актуальной остается разработка новых подходов для количественного определения экспрессирующихся генов резистентности в клетках бактерий – возбудителей инфекций.

Информация о финансировании

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Грант 19-34-50071), госзадания МГУ им. М.В.Ломоносова (AAAA-A16-116052010081-5) и отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг.

Financial support

This work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (Grant 19-34-50071), the state order of the Moscow State University. MV Lomonosov (AAAA-A16-116052010081-5) and the sectoral research program of Rosпотребнадзор for 2016–2020.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература/References

- Geetanjali JP. Antibiotic productions by rhizospheric soil microflora. A review. *Int J Pharm Sci Res.* 2016;7:4304-4314.
- Watkins RR, Bonomo RA. Overview: global and local impact of antibiotic resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):313-322. DOI: 10.1016/j.idc.2016.02.001
- Smith RA, M'ikanatha NM, Read AF. Antibiotic resistance: a primer and call to action. *Health Commun.* 2015;30(3):309-14.
- Hofer U. Stop that plasmid. *Nature Reviews Microbiology.* 2020;18:264-265. DOI: 10.1038/s41579-020-0349-4
- Von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolfs PFG. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front Microbiol.* 2016;7:173. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00173
- Tyrrell C, Burgess CM, Brennan FP, Walsh F. Antibiotic resistance in grass and soil. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(1):477-486. DOI: 10.1042/BST20180552
- Karkman A, Do TT, Walsh F, Virta MPJ. Antibiotic resistance genes in waste water. *Trends Microbiol.* 2018;26(3):220-228. DOI: 10.1016/j.tim.2017.09.005
- Hiltunen T, Virta M, Laine AL. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;372(1712):20160039. DOI: 10.1098/rstb.2016.0039
- Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors, influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(1):fux053.
- Rodríguez-Martínez J, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4783-8. DOI: 10.1128/AAC.00574-09
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67:593-656. DOI: 10.1128/mmb.67.4.593-656.2003
- Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases.* 2019;69(7):521-528. DOI: 10.1093/cid/ciz824
- Moya B, Beceiro A, Cabot G. Pan- β -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanism, penicillin-binding protein profiles and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4771-4778.
- Egorov AM, Ulyashova MM, Rubtsova MY. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta naturae.* 2018;10(4):33-48.
- Andersson D, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology.* 2014;12(7):465-478.
- Li L, Ge H, Gu D, Meng H, Li Y, Jia M, Zheng C, Zhou X. The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiological Research.* 2018;215:126-129.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol. Infect.* 2012;18(3):268-281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Weldhagen G. Integrons and β -lactamases – a novel perspective on resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2004;23:556-562.
- Brolund A. Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol.* 2014;4:24555.
- Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:487-9. DOI: 10.1093/jac/dks426.
- Li X, Yao Z, Yuan L, Qi W, Shuchang A, Jichao C, et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* strains harboring inactive extended-spectrum beta-lactamase antibiotic-resistance genes. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(17):3051-7.
- Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):1-20.
- Bonomo RA. β -lactamases: a focus on current challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(1):1-16.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289:321-31.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969-76.
- Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews.* 2020;33(2):1-37.
- Wilson H, Török ME. Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Microbial Genomics.* 2018;4:1-14.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-1161.
- Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Hackel M, Rabine S, de Jonge BLM, Bouchillon SK, et al. Global dissemination of blaKPC into bacterial species beyond *Klebsiella pneumoniae* and *in vitro* susceptibility to ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:4490-4500.
- Carpenter J, Neidig N, Campbell A, Thornsberry T, Truex T, Fortney T, et al. Activity of imipenem/relebactam against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with high colistin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74:3260-3263. DOI: 10.1093/jac/dkz354
- Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:470-482.
- Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3:15-21. DOI: 10.1177/2049936115621709
- Rodríguez CH, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol.* 2018;50:327-33. DOI: 10.1016/j.ram.2017.10.006
- Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:15-22.
- Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, et al. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy.* 2008;54:101-106.
- Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37:587-604. DOI: 10.1007/s10096-017-3112-7
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:891-897.
- Lauretti L, Riccio M, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1584-1590.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;60:5046-5054.
- Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, et al. Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:1067-1078. DOI: 10.1128/AAC.02379-15.
- Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:355-362.

42. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:821-830. DOI: 10.1111/1469-0691.12719
43. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2019/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2019>
44. Chakraborty AK, Maity M, Patra S, Mukherjee S, Mondal T. Complexity, Heterogeneity and Mutational Analysis of Antibiotic Inactivating Acetyl Transferases in MDR Conjugative Plasmids Conferring Multi-Resistance. *RR: J Microbiol Biotechnol.* 2017;6(2):28-44.
45. Carvajal LP, Rincon S, Echeverri AM, Porras J, Rios R, Ordoñez KM, et al. Novel Insights into the Classification of Staphylococcal β -Lactamases in Relation to the Cefazolin Inoculum Effect. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(5):e02511-19. DOI: 10.1128/AAC.02511-19
46. Silva V, Hermenegildo S, Ferreira C, Manaia CM, Capita R, et al. Genetic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Human Bloodstream Infections: Detection of MLSB Resistance. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(7):375. DOI: 10.3390/antibiotics9070375
47. Llarrull LI, Toth M, Champion MM, Mobashery S. Activation of BlaR1 protein of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, its proteolytic processing, and recovery from induction of resistance. *J Biol Chem.* 2011;286(44):38148-38158.
48. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science.* 2001;291(5510):1962-1965. DOI: 10.1126/science.1055144
49. Hao H, Dai M, Wang Y, Huang L, Yuan Z. Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2012;7(11):1315-1329. DOI: 10.2217/fmb.12.107
50. Jacobs C, Frère JM, Normark S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell.* 1997;88(6):823-832.
51. Fisher JF, Mobashery S. The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Chem.* 2014;56:41-48.
52. Dhar S, Kumari H, Balasubramanian D, Mathee K. Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* – their role in the development of resistance. *J Med Microbiol.* 2018;67(1):1-21. DOI: 10.1099/jmm.0.000636
53. Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol.* 2013;4:128. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00128
54. Caille O, Zincke D, Merighi M, Balasubramanian D, Kumari H, Kong KF, et al. Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* global regulator AmpR. *J Bacteriol.* 2014;196(22):3890-3902. DOI: 10.1128/JB.01997-14
55. Kong KF, Jayawardena SR, Indulkar SD, Del Puerto A, Koh CL, et al. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4567-4575. DOI: 10.1128/AAC.49.11.4567-4575.2005
56. Balasubramanian D, Schnepfer L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, Mathee K. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One.* 2012;7(3):e34067. doi: 10.1371/journal.pone.0034067
57. Zamorano L, Reeve TM, Juan C, Moyá B, Cabot G, Voadlo DJ, et al. AmpG inactivation restores susceptibility of pan-beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):1990-1996. DOI: 10.1128/AAC.01688-10.
58. Asgarali A, Stubbs KA, Oliver A, Voadlo DJ, Mark BL. Inactivation of the glycoside hydrolase NagZ attenuates antipseudomonal beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2274-2282.
59. Zamorano L, Reeve TM, Deng L, Juan C, Moyá B, Cabot G, et al. NagZ inactivation prevents and reverts beta-lactam resistance, driven by AmpD and PBP 4 mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3557-3563. DOI: 10.1128/AAC.00385-10
60. Babouee Flury B, Ellington MJ, Hopkins KL, Turton JF, Doumith M, Woodford N. The differential importance of mutations within AmpD in cephalosporin resistance of *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(5):555-558. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.07.021
61. Schmidtke AJ, Hanson ND. Role of ampD homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(11):3922-3927.
62. Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(5):1780-1787. DOI: 10.1128/AAC.50.5.1780-1787.2006
63. Moya B, Juan C, Albertí S, Pérez JL, Oliver A. Benefit of having multiple ampD genes for acquiring beta-lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3694-3700. DOI: 10.1128/AAC.00172-08
64. Lingzhi L, Haojie G, Dan G, Hongmei M, Yang L, et al. The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiol Res.* 2018;215:126-129. DOI: 10.1016/j.micres.2018.07.005
65. Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A. Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(6):781-815.
66. Buckler DR, Anand GS, Stock AM. Response-regulator phosphorylation and activation: a two-way street? *Trends Microbiol.* 2000;8(4):153-156.
67. Niumsup P, Simm AM, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM, Avison MB. Genetic linkage of the penicillinase gene, *amp*, and *blrAB*, encoding the regulator of beta-lactamase expression in *Aeromonas* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(6):1351-1358.
68. Avison MB, Horton RE, Walsh TR, Bennett PM. *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J Biol Chem.* 2001;276(29):26955-26961.
69. Zamorano L, Moyá B, Juan C, Mulet X, Blázquez J, Oliver A. The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to β -lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5084-5095. DOI: 10.1128/AAC.02556-14
70. West AH, Stock AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(6):369-376.
71. Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, Oliver A. β -Lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* 2009 Mar;5(3):e1000353. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000353
72. Tayler AE, Ayala JA, Niumsup P, et al. Induction of beta-lactamase production in *Aeromonas hydrophila* is responsive to beta-lactam-mediated changes in peptidoglycan composition. *Microbiology (Reading).* 2010;156(Pt 8):2327-2335.
73. Avison MB, Niumsup P, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM. Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* beta-lactamase regulator, BlrA. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(2):197-202.
74. Li L, Wang Q, Zhang H, Yang M, Khan MI, Zhou X. Sensor histidine kinase is a β -lactam receptor and induces resistance to β -lactam antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(6):1648-1653.
75. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 2018;31(4):e00088-17.
76. Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Virdi JS. Integrons in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2018;51:167-176. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004

77. Lopes BS, Hamouda J, Amyes F. Effect of frameshift mutagen acriflavine on control of resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology*. 2011;60:211-215.
78. Al-Hassan L, Opazo A, Lopes BS, Mahallawy HE, Amyes SGB. Variations in IS6 promoters alter the expression of carbapenem resistance in related strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2015;3:5-8. DOI: 10.1016/j.jgar.2014.10.003
79. Lopes BS, Gallego L, Amyes SGB. Multi-drug resistance profiles and genetic features of *Acinetobacter baumannii* isolates from Bolivia. *J Infect Dev Ctries*. 2013;7(4):323-328. DOI: 10.3855/jidc.2711
80. Kuo HY, Chang KC, Liu CC, Tang CY, Peng JH, Lu CW, et al. Insertion sequence transposition determines imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*. 2014 Oct;20(5):410-5. DOI: 10.1089/mdr.2014.0004
81. Nicolas E, Lambin M, Dandoy D, Galloy C, Nguyen N, Oger CA, Hallet B. The Tn3-family of replicative transposons. *Microbiol Spectr*. 2015;3:MDNA3-0060-2014.
82. Sarno R, McGillivray G, Sherratt DJ, Actis LA, Tolmasey ME. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3422-3427.
83. Partridge SR. What's in a name? ISSwi1 corresponds to transposons related to Tn2 and Tn3. *mBio*. 2015;6:e01344-15. DOI: 10.1128/mBio.01344-15
84. Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P. Role of ISKpn7 and deletions in *blaKPC* gene expression. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:4753-4759.
85. Kjeldsen TSB, Overgaard M, Nielsen SS, et al. CTX-M-1 β -lactamase expression in *Escherichia coli* is dependent on cefotaxime concentration, growth phase and gene location. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:62-70. DOI: 10.1093/jac/dku332
86. Kuo HY, Chang KC, Kuo JW, Yueh HW, Liou ML. Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39:33-38. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.08.016
87. Maurya AP, Chanda DD, Bora D, Talukdar AD, Chakravarty A, Bhattacharjee A. Transcriptional response of multiple ESBL gene within *Escherichia coli* under oxymino-cephalosporin stress. *Microbial Drug Resistance*. 2016;0:1-6.
88. Uddin MJ, Ahm J. Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol*. 2017;65(6):462-468. DOI: 10.1111/lam.12808
89. Zhao JF, Wang Q, Ge YM, Tan PL, Chen YM, Yan J. Distribution of β -lactamase genes of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Zhejiang province, China, and regulation of gene expression. *Arch Biol Sci*. 2017;69(3):399-407.
90. Fu Y, Zhang F, Zhang W, Chen X, Zhao Y, et al. Differential expression of *bla(SHV)* related to susceptibility to ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(3):344-7.
91. Zhang Z, Zhai Y, Li D, Wang Z, Wang J, Chen Y, et al. Characterization of unexpressed extended-spectrum beta-lactamase genes in antibiotic-sensitive *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Microb Drug Resist*. 2018;24(6):799-806.
92. Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):3003-10.
93. Emrich SJ, Barbazuk WB, Li L, Schnable PS. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Res*. 2007;17:69-73.
94. Fan HC, Fu GK, Fodor SPA. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*. 2015;347(6222):1258367.
95. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):631-656. DOI: 10.1038/s41576-019-0150-2
96. Jousset AB, Chupin IR, Takissian J, Glaser P, Bonnin RA, Naas T. Transcriptional landscape of a *bla* KPC-2 plasmid and response to imipenem exposure in *Escherichia coli* TOP10. *Front Microbiol*. 2018;9:2929. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02929
97. Long D, Zhu LI, Du F, Xiang T, Wan LG, Wei D, et al. Phenotypical profile and global transcriptomic profile of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* due to carbapenemase-encoding plasmid acquisition. *BMC Genomics*. 2019;20:480.
98. Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifenger JG, Sass LE, McInerney P, et al. Direct RNA sequencing. *Nature*. 2009;461(7265):814-818.
99. Shakeel M, Rodriguez A, Tahir UB, Jin F. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects. *Biotechnol Lett*. 2018;40(2):227-236. DOI: 10.1007/s10529-017-2465-4
100. Choudhury D, Paul D, Ghosh AS, Talukdar AD, Choudhury MD, Maurya AP, et al. Effect of single-dose carbapenem exposure on transcriptional expression of *blaNDV-1* and *mexA* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016;7:72-77. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.07.015
101. Paul D, Garg A, Bhattacharjee A. Occurrence of *blaNDM-1* and *blaNDM-5* in a tertiary referral hospital of north India. *Microbial Drug Resistance*. 2017 Oct;23(7):815-821. DOI: 10.1089/mdr.2016.0124
102. Segundo-Val IS, Sanz-Lozano CS. Introduction to gene expression analysis. *Methods Mol Biol*. 2016;1434:29-43. DOI: 10.1007/978-1-4939-3652-6_3
103. Katagiri F, Minnesota SP. Overview of mRNA expression profiling using DNA microarrays. *Curr Protoc Mol Biol*. 2009;22:uit 22.4.
104. Domingues A, Munoz E, Lopez MC, Martinez JP, Vinas M. Transcriptomics as a tool to discover new antibacterial targets. *Biotechnol Lett*. 2017;39(6):819-828. DOI: 10.1007/s10529-017-2319-0
105. Rubtsova MYu, Ulyashova MM, Edelstein MV, Egorov AM. Oligonucleotide microarrays with horseradish peroxidase-based detection for the identification of extended-spectrum β -lactamases. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;26:1252-1260.
106. Naas T, Cuzon G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. Evaluation of DNA microarray, the check-points ESBL/KPC Array, for rapid detection of TEM, SHV and CTX_M Extended-spectrum β -lactamases and KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(8):3086-3092.
107. Coverc S, Caroff N, Espaze E, Marrailac J, Drugeon H, Reynaud A. Comparison of two RT-PCR methods for quantifying *ampC* specific transcripts in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiology Letters*. 2003;228:187-191.
108. Coverc S, Caroff N, Cosano D, Dauvergne S, Drugeon H, Reynaud A. Increased resistance to β -lactams in a *Klebsiella pneumoniae* strain: role of deletion downstream of the Pribnow box in the *blaSHV-1* promoter. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28:308-312.
109. Paltansing S, Kraakman M, Boxtel R, Kors I, Wessels E, Goessens W, et al. Increased expression levels of chromosomal AmpC β -lactamase in clinical *Escherichia coli* isolates and their effect on susceptibility to Extended-spectrum cephalosporins. *Microbial Drug Resistance*. 2015 Feb;21(1):7-16. DOI: 10.1089/mdr.2014.0108
110. Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg E P, Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(4):1175-1187.
111. Cummings JE, Slayden RA. Transient *in vivo* resistance mechanisms of *Burkholderia pseudomallei* to ceftazidime and molecular markers for monitoring treatment response. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;12,11(1):e0005209.
112. Cai W, Fu Y, Zhang W, Chen X, Zhao J, et al. Synergistic effects of baicalein with cefotaxime against *Klebsiella pneumoniae* through inhibiting CTX-M-1 gene expression. *BMC Microbiology*. 2016;16:181. DOI: 10.1186/s12866-016-0797-1
113. Lautenschlager N, Popp PF, Mascher T. Development of a novel heterologous β -lactam-specific whole-cell biosensor in *Bacillus subtilis*. *J Biol Eng*. 2020;14:21. DOI: 10.1186/s13036-020-00243-4
114. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582-610. DOI: 10.1128/CMR.00040-09
115. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):79-114. DOI: 10.1128/CMR.00015-06.

Информация об авторах:

Филиппова Анна Андреевна, аспирантка кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»
Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3
Телефон: (495)939-2968
E-mail: iiffii@mail.ru

Рубцова Майя Юрьевна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»
Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3
Телефон: (495) 939-2727
E-mail: mrubtsova@gmail.com

Уляшова Мария Морисовна, кандидат химических наук, научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»
Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3
Телефон: (495) 939-2968
E-mail: mmulyashova@gmail.com

Information about authors:

Anna A. Filippova, PhD student, Div. Chem. Enzymology, Dept. Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University
Address: 1/3 Leninskie Gori, Moscow, 119991, Russian Federation
Phone: (495) 939-2968
E-mail: iiffii@mail.ru

Maya Yu. Rubtsova, PhD (Chemistry), leading researcher, Div. Chem. Enzymology, Dept. Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University
Address: 1/3 Leninskie Gori, Moscow, 119991, Russian Federation
Phone: (495) 939-2727
E-mail: mrubtsova@gmail.com

Mariya M. Ulyashova, Cand. Sci. (Chemistry), researcher, Div. Chem. Enzymology, Dept. Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University
Address: 1/3 Leninskie Gori, Moscow, 119991, Russian Federation
Phone: (495) 939-2968
E-mail: mmulyashova@gmail.com

НОВОСТИ НАУКИ

Эволюция микробных заболеваний

Геномы микробов принципиально отличаются от геномов многих животных и растений. Обычно 90% их генома кодирует белки или структурную РНК, тогда как только 1,1% генома человека представляет собой кодирующую последовательность.

По состоянию на 2011 г. было секвенировано более 1500 бактериальных и более 100 архейных геномов.

Развитие микробных заболеваний может происходить быстро и приводить к появлению различных штаммов одного и того же вида. Например, существуют как патогенные, так и непатогенные штаммы *Escherichia coli*. Штаммы могут различаться на 36%, т.е. больше, чем некоторые виды животных отличаются друг от друга.

Сравнительно быстрая и эффективная эволюция микробов возможна благодаря обычно небольшому размеру генома, скорости мутаций и горизонтальной передаче генов.

Хотя эволюция болезнетворных микробов обычно направлена на повышение их патогенности, патогенность может быть неожиданной. Потеря генов и сокращение генома произошли у нескольких специфичных для человека патогенов, таких как *Yersinia pestis*. У возбудителя чумы 3,7% генома неактивны. Другой пример – *Mycobacterium leprae*, вызывающая проказу, у которой примерно половина генома состоит из неактивных и фрагментированных генов. У ряда микробов локусы CRISPR работают как форма адаптивного иммунитета. Это позволяет микробам сохраняться.

Развитие новых микробных заболеваний обычно происходит двумя способами: смена хозяев и увеличение круга хозяев. Первый относится к микробам, которые эволюционируют с целью размножения в новом хозяине, второй относится к увеличению числа видов хозяев, которые микроб может заразить.

Анализ штаммов вида *Y. pestis* выявил его происхождение из Китая, с линиями, специфичными для стран и регионов, которые развиваются по мере распространения по миру. Первоначальный вид *Y. pestis* возник в результате редукции генома и потери генов от гораздо более генетически разнообразного предка.

В некоторых случаях можно спрогнозировать развитие микробных заболеваний, чтобы лучше управлять вспышками. Вирус гриппа следует модели прерывистого равновесия эволюции, что означает, что есть периоды стабильности, за которыми следуют периоды быстрой эволюции. Кроме того, отслеживание эволюционной истории штаммов показало, что штаммы, скорее всего, возникают в Юго-Восточной Азии, а не сохраняются локально в периоды стабильности. Знание этого может помочь в борьбе с распространением вируса и в быстрой разработке новых вакцин для борьбы с новыми штаммами.



*Understanding the Evolution of Microbial Disease [Electronic resource].
News-Medical.net. 2020.*

URL: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Understanding-the-Evolution-of-Microbial-Disease.aspx>