

2  
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>

# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Оренбургская область  
Гора Змеиная  
Вельмовский П.В.



2023

**УЧРЕДИТЕЛЬ**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Коллектив авторов, 2023

УДК. 579.61:616-093/-098:616-095:616-094

Л.Р. Аветисян, М.Ю. Чернуха, Е.М. Бурмистров, Е.А. Сиянова,  
О.С. Медведева, Е.В. Русакова

**ПЕРСИСТЕНЦИЯ И АДАПТАЦИЯ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*,  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *BURKHOLDERIA CEPACIA COMPLEX*,  
*ACHROMOBACTER* spp. ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ ЛЕГКИХ У  
ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ**

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

*Цель.* Изучить основные механизмы адаптации бактерий *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia complex*, *Achromobacter* spp., способствующие персистенции в дыхательных путях пациентов с муковисцидозом.

*Материалы и методы.* Образцы мокроты от детей и взрослых пациентов с МВ исследовали до и после антибиотикотерапии с интервалом 15-45 дней и более 6 месяцев. Исследовали фенотипические и генотипические свойства выделенных в динамике изолятов доминирующих бактерий с помощью микробиологических и молекулярно-генетических методов (RAPD-PCR, полногеномное секвенирование).

*Результаты.* Среди изолятов *S. aureus* мультирезистентными были 34%, *P. aeruginosa* – 69%, среди *Burkholderia cepacia complex* и *Achromobacter* spp. – 100%. Формировать биопленку были способны 67,1% изолятов *S. aureus*, 63% изолятов *P. aeruginosa* и 100% изолятов *Burkholderia cepacia complex* и *Achromobacter* spp. Гипермутабельными были 13 и 7% изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от детей и взрослых больных соответственно, и 59% изолятов *Achromobacter* spp. Фенотипическая гетерогенность популяции и микроэволюционные изменения при персистенции наблюдали у представителей всех изучаемых видов. Мутации были обнаружены в генах, участвующих в регуляции антибиотикорезистентности, генах ответственных за продукцию факторов патогенности и в генах, регулирующих экспрессию факторов патогенности.

*Заключение.* К свойствам бактерий, способствующим персистенции в макроорганизме, относятся свойства, направленные на обеспечение устойчивости к действию иммунной системы макроорганизма и антибиотиков: способность образовывать биопленки, гипермутабельность и мультирезистентность, которые бактерии приобретают в результате адаптивной эволюции, обусловленной мутагенезом и горизонтальным переносом генов в процессе персистенции в легких больного МВ. Фенотипическая гетерогенность, в частности одновременное присутствие субпопуляций бактерий с различной антибиотикорезистентностью, также является фактором, способствующим персистенции бактерий, ограничивающим эффективность антибиотикотерапии и формированию хронической инфекции легких у больных МВ.

*Ключевые слова:* муковисцидоз, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia complex*, *Achromobacter* spp., персистенция, адаптация, антибиотикорезистентность, гипермутабельность, фенотипическая гетерогенность.

L.R. Avetisyan, M.Yu. Chernukha, E.M. Burmistrov, E.A. Siyanova,  
O.S. Medvedeva, E.V. Rusakova

**ADAPTATION OF BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *BURKHOLDERIA CEPACIA* COMPLEX, *ACHROMOBACTER SPP.* DURING CHRONIC LUNG INFECTION IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS**

National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

*Aim.* To study the main mechanisms of adaptation of bacteria *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter* spp., contributing to persistence in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis.

*Materials and methods.* Sputum samples from children and adults with CF were examined before and after antibiotic therapy at intervals of 15-45 days and more than 6 months. The phenotypic and genotypic properties of the dominant bacteria isolated over time were studied using microbiological and molecular genetic methods (RAPD-PCR, whole genome sequencing).

*Results.* Among *S. aureus* isolates, 34% were multidrug-resistant, among *P. aeruginosa* – 69%, among *Burkholderia cepacia* complex and *Achromobacter* spp. - 100%. 67.1% of *S. aureus* isolates, 63% of *P. aeruginosa* and 100% of *Bcc* and *Achromobacter* spp. isolates were able to form a biofilm. Hypermutable were 13 and 7% of *P. aeruginosa* strains isolated from children and adults, respectively, and 59% of *Achromobacter* spp. isolates. Phenotypic heterogeneity and microevolutionary changes during persistence were observed in representatives of all studied species. Mutations were found in the genes involved in antibiotic resistance and in the genes responsible for the production and for regulating the expression of pathogenicity factors.

*Conclusion.* The properties of bacteria that contribute to persistence in the macroorganism include properties aimed at ensuring resistance to the action of the immune system of the macroorganism and antibiotics: the ability to form biofilms, hypermutability and multiresistance, which bacteria acquire as a result of adaptive evolution due to mutagenesis and horizontal gene transfer in the process of persistence in lungs of a CF patient. Phenotypic heterogeneity, in particular the simultaneous presence of bacterial subpopulations with different antibiotic resistance, is also a factor contributing to the persistence of bacteria, limiting the effectiveness of antibiotic therapy and the formation of chronic lung infection in CF patients.

*Key words:* cystic fibrosis, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter* spp., persistence, adaptation, antibiotic resistance, hypermutability, phenotypic heterogeneity.

## **Введение**

Одним из основных факторов, влияющих на продолжительность жизни у больных муковисцидозом (МВ), является хроническая инфекция легких (ХИЛ), доминирующими возбудителями которой являются *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter* spp. [1]. Больные МВ периодически при обострениях получают антибиотикотерапию, но, несмотря на проводимую адекватную терапию, элиминировать возбудителя не удается.

Одним из ключевых патогенетических звеньев в формировании хронической инфекции является персистенция микроорганизмов, которая также

опасна в эпидемическом плане как способ распространения инфекций. Адаптация бактерий к условиям дыхательных путей больного МВ определяется неблагоприятными для них факторами окружающей среды – нехватка важных для жизнедеятельности бактерий элементов, например, таких как железо и цинк, высокая концентрация радикалов кислорода, различные уровни антибиотиков, гуморальных и клеточных факторов иммунной системы, другие микроорганизмы, которые конкурируют за одни и те же питательные вещества и могут напрямую атаковать бактериоцинами [2]. В таких условиях бактерии, обладающие селективным преимуществом, способны увеличивать адаптационные возможности и, аккумулируя новые свойства, становятся более приспособленными к персистенции.

Выявление особенностей персистенции основных возбудителей в легких больных МВ необходимо для выработки тактики лечения пациентов и решения ряда важных вопросов эпидемиологии ХИЛ у больных МВ.

Цель – изучить основные механизмы адаптации бактерий *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter* spp., способствующие персистенции в дыхательных путях пациентов с муковисцидозом.

#### **Материалы и методы**

В динамике с 2008 по 2017 гг. было обследовано 300 детей с МВ, большинство из которых проходили лечение в отделении медицинской генетики Российской детской клинической больницы (РДКБ) или лечились в Московском центре муковисцидоза на базе ГДКБ № 13 им. Н.Ф. Филатова, и 100 взрослых пациентов с данной патологией, проходивших лечение НИИ пульмонологии ФМБА России (Москва).

Образцы мокроты брали до и после антибиотикотерапии с интервалом от 15 до 45 дней и более 6 месяцев. Длительность микробиологического мониторинга некоторых больных составляла от 4 месяцев до 10 лет. Исследование биоматериала и идентификацию бактерий проводили согласно разработанному в лаборатории молекулярной эпидемиологии алгоритму микробиологической диагностики ХИЛ у больных муковисцидозом [3].

Антибиотикочувствительность определяли с помощью диско-диффузионного метода и метода серийных разведений. Интерпретацию результатов проводили согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к antimикробным препаратам» (Версия 2015-02). Штаммы генотипировали методом RAPD-ПЦР со случайным праймером Sh1 –

AATCGGGCTG и с помощью мультилокусного секвенирования [4-6].

Проводили полногеномное секвенирование штаммов *S. aureus*, *B. ceracia* complex, *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp. [7, 8]. Первичная аннотация геномов осуществлялась с помощью программы RAST (<http://rast.nmpdr.org>).

Гипермутабельность штаммов оценивалась с использованием метода серийных разведений на агаре Мюллера – Хинтон с добавлением рифампицина согласно Oliver и соавт. [9].

### Результаты и обсуждение

Данные микробиологического мониторинга при трехкратном посеве отделяемого дыхательных путей пациентов с МВ до антибиотикотерапии (АБТ), после АБТ с интервалом 14-45 дней и в течение 6 месяцев после АБТ, а также дальнейшего генотипирования выделенных в течение мониторинга бактериальных изолятов, свидетельствовали, что у 66,7% пациентов хроническая стафилококковая инфекция была обусловлена персистенцией *S. aureus* одного генотипа, а в 33,3% случаях происходила его смена. При инфекциях, вызванных *Achromobacter* spp., смену генотипа бактерий наблюдали у 27,3% больных, а в остальных случаях (72,7%) наблюдали персистенцию одного генотипа. Установлено, что при хронической инфекции, вызванной *P. aeruginosa* и *B. ceracia* complex, смены генотипа не происходит в течение 6 месяцев (табл. 1). Более длительный мониторинг ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, показал, что в течение более 6 месяцев также может иметь место смена генотипа *P. aeruginosa*.

Таблица 1. Смена генотипов *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. ceracia* complex, *Achromobacter* spp. в течение хронической инфекции

Возбудитель	Кол-во больных	Мониторинг до 6 месяцев. Генотип не менялся	Максимальная длительность циркуляции	Мониторинг более 6 месяцев. Генотип не менялся	Минимальный промежуток времени, за который наблюдали смену генотипа
<i>S. aureus</i>	39	26 (66,7%)	4 года 2 мес.	23 (59%)	14 дней
<i>P. aeruginosa</i>	22	22 (100%)	9 лет 5 мес.	20 (91%)	1 год 9 мес.
<i>B. ceracia</i> complex	40	40 (100%)	8 лет 6 мес.	40 (100%)	-
<i>Achromobacter</i> spp.	11	10 (90,9%)	5 лет 5 мес.	8 (72,7%)	3 месяца

Доказана длительная персистенция в легких больного МВ бактерий одного генотипа: *S. aureus* – 4 года 2 мес., *P. aeruginosa* – 9 лет 5 мес., *B. ceracia* complex – 8 лет, *Achromobacter* spp. – 5 лет 5 мес..

Для выяснения свойств бактерий, влияющих на их способность к длительному сохранению в организме больного МВ, были исследованы ряд фенотипических и генотипических характеристик возбудителей.

Фенотипические данные по антибиотикорезистентности доминирующих у больных МВ бактерий, показали, что среди изолятов *S. aureus* и *P. aeruginosa*, выделенных от детей и взрослых больных МВ, доля мультирезистентных штаммов больше, чем среди изолятов, выделенных от пациентов с острой инфекцией различной локализации, и составил 34% (*S. aureus*) и 69% (*P. aeruginosa*) против 18 и 40%, соответственно ( $p < 0,05$ ). Среди бактерий *B. ceracia* complex и *Achromobacter* spp. мультирезистентными были все изоляты.

Исследование способности бактерий к биопленкообразованию показало, что 67,1% изолятов *S. aureus*, выделенных от больных МВ, способны формировать биопленки, но среди них эта способность была выражена только у 1,7% штаммов. У изолятов *P. aeruginosa* выраженной способностью образовывать биопленки обладали 63% культур. Практически все изоляты *B. ceracia* complex и *Achromobacter* spp., выделенные от больных нашей выборки, обладали способностью к биопленкообразованию, среди которых у 30% изолятов *B. ceracia* complex и 14,5% культур *Achromobacter* spp. эта способность была выраженной.

Формирование биоплёнки создаёт преимущества для жизнедеятельности бактерий в лёгких пациента с МВ, поскольку они могут быть защищены как от антибиотиков, так и от факторов иммунной защиты хозяина. Устойчивость к антибиотикам в биопленках обусловлена неспособностью проникновения антимикробного препарата в матрицу биопленки и измененным ростом («персистирующий фенотип») микроорганизмов в биоплёнке. Биоплёнки дают возможность микроорганизмам персистировать в организме хозяина и вызывать хроническую инфекцию.

Еще одним свойством, способствующим персистенции бактерий, является гипермутабельность. К гипермутабельным относили изоляты, у которых клетки бактерий, имеют повышенную частоту мутаций (в 100-1000 раз). Частота мутаций таких клеток составляет  $10^{-6}$ -  $10^{-7}$ , в то время как у нормальных клеток вероятность мутаций составляет до  $10^{-9}$ .

Среди изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от детей и взрослых больных МВ, гипермутабельными были 13 и 7% штаммов, соответственно, тогда как среди изолятов от пациентов с острой инфекцией гипермутабельные штаммы отсутствовали. Среди изолятов *Achromobacter* spp. гипермутабельными были 59% штаммов. Данные о присутствии среди *P. aeruginosa* и *Achromobacter* spp., выделенных от больных МВ, гипермутабельных представителей приводятся также в работах ряда зарубежных авторов [10-12]. Данные о присутствии гипермутабельных *S. aureus* среди изолятов от больных МВ являются противоречивыми [13]. Среди проверенных нами штаммов *S. aureus* гипермутаторы не были выявлены.

Обнаружение гипермутабельных изолятов может свидетельствовать о способности этих бактерий к быстрой адаптации в измененных условиях окружающей среды и объяснять их фенотипическую гетерогенность при применении антибиотикотерапии.

Фенотипическая гетерогенность – проявление разного фенотипа у разных бактериальных клеток одного клона – может быть связана как с присутствием гипермутабельного фенотипа, так и с активизацией покоящихся форм, отличающихся на данной стадии от клеток исходной культуры экспрессией того или иного белка. Также она может быть обусловлена микроэволюционными изменениями, происходящими при длительной персистенции, что приводит к появлению и селекции клеток с различным «набором» генетических изменений вследствие мутаций и горизонтального-переноса генов (ГПГ).

Фенотипическая гетерогенность повышает гарантию того, что какая-то субпопуляция хорошо подготовлена к изменениям окружающей среды. Способность образовывать фенотипически неоднородную клональную популяцию клеток, направленную на выживание и размножение в разнообразной и меняющейся окружающей среде, микроорганизмы приобрели в процессе эволюции. В англоязычной литературе данное явление принято называть «bet hedging» («страховка ставок»), то есть выбор стратегии выживания [14].

Бактериальные клетки, выделенные из одного образца мокроты, с разной чувствительностью к антибиотикам были обнаружены у всех изучаемых нами видов.

Результаты анализа полного генома изолятов доминирующих возбудителей ХИЛ показали, что микроорганизмы при персистенции в легких больного МВ, благодаря ГПГ (приобретение плазмид, интегронов, фагов) и мутациям

подвергаются микроэволюции. При этом микроэволюция может происходить по разным направлениям, и в различные периоды инфекции могут преобладать различные субпопуляции с разным «набором» мобильных генетических элементов, мутаций и, соответственно, адаптационными возможностями.

Микроэволюционные изменения наблюдали у представителей всех изученных нами видов бактерий. Исследование 3-х изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в динамике в течение 10 лет, показало, что в процессе ХИЛ у *P. aeruginosa* происходили мутации в генах, участвующих: 1) в антибиотикорезистентности, например, в мишени действия фторхинолонов *gyrB*, в результате чего бактерии при персистенции приобретают резистентность к фторхинолонам, что было показано также фенотипическими методами; в генах, регулирующих работу эффлюкс-насосов, например, в гене, кодирующем белок *MexZ* (отрицательный регулятор *MexXY* насоса, обеспечивающего резистентность к аминогликозидам), что приводит к гиперфункции *MexXY* насоса; в гене, детерминирующем порин наружной мембраны *OprD*, что ведет к редуцированной проницаемости наружной мембраны; 2) в генах, ответственных за продукцию факторов патогенности, например, в генах секреторной системы третьего типа (ССТТ); в генах оперона биосинтеза сидерофора - пиохейлина (*pchDCBA*) и формированию пиохейлин-дефектных популяций; дефектные по пиохейлину *P. aeruginosa* являются менее вирулентными по сравнению с дикими штаммами; и 3) в генах регулирующих экспрессию факторов патогенности, например, в генах системы кворум-сенсинг (*lasR*); в генах, регулирующих продукцию экзополисахарида – алгината (*mucA*), что обуславливало гиперпродукцию алгината и появление мукоидного фенотипа – резистентного к антибиотикам; в генах системы MMR – *mutS* и/или *mutL* (DNA mismatch repair systems), которая выработана в процессе эволюции для подавления мутаций и сохранения вида. Мутации в генах системы MMR приводят к ее инактивации, выключается каскад MMR, нарушается её функция, что влияет на скорость возникновения мутаций в геноме микроорганизмов (гипермутабельный фенотип), то есть увеличиваются адаптационные способности бактерий к окружающим условиям.

Возникшие в результате мутаций изменения приводят к тому, что бактерии постепенно теряют способность экспрессировать различные вирулентные факторы, становятся более резистентными и у них появляются свойства, способствующие персистенции.

Кроме мутаций мы наблюдали также ГПГ, в результате которого изолят *P. aeruginosa* приобрел два дополнительных гена, кодирующих резистентность к цефалоспорином (*blaTem*) и аминогликозидам (*aph(3')-IIa*). Показано, что резистентность у персистирующего клона появляется по отношению именно к тем антибиотикам, которыми проводили профилактические курсы и лечение при обострениях у больного [15].

Также нами обнаружена возможность ГПГ у бактерий комплекса *B. cenocepacia* и *A. ruhlandii* – приобретение интегрона с геном резистентности к бисептолу (*sulI*) и генами резистентности *aadA*, *strA*, *strB*, *sulI*, соответственно, у *S. aureus* – приобретение *Scstmc*-кассеты, то есть формирование в процессе персистенции *MRSA* (метициллин-резистентного золотистого стафилококка) из *MSSA*.

### Заключение

Таким образом, ХИЛ у больных МВ – динамический патологический процесс, обусловленный вегетированием бактерий с меняющимися генотипами или длительной персистенцией возбудителя одного генотипа с высокой степенью фенотипической и генотипической изменчивости, которые определяют чередование выделения чувствительных и резистентных штаммов от одного больного МВ при мониторинге.

Исследование показало, что к характеристикам бактерий, способствующим персистенции в макроорганизме, относятся свойства, направленные на обеспечение устойчивости к действию иммунной системы макроорганизма и антибиотиков: способность образовывать биопленки, гипермутабельность и мультирезистентность. Наличие таких признаков у бактерий также свидетельствует об их эпидемической значимости. Эти свойства бактерии приобретают в результате адаптивной эволюции, обусловленной мутагенезом и ГПГ, в процессе персистенции в дыхательных путях больного МВ в условиях постоянного стресса, связанного с воздействием антибиотиков, иммунной системы хозяина, дефицита кислорода и питательных веществ.

Как показали наши данные, микроэволюция направлена, прежде всего, на способность бактерий к выживанию в легких больного, в результате чего у бактерий повышается устойчивость к действию иммунной системы макроорганизма, усиливается способность к формированию биопленок и теряется способность к продукции факторов вирулентности.

Персистирующие микроорганизмы представляют собой так называемые

мый эволюционный резервуар, из которого образуются резистентные микроорганизмы уже со стойкими наследуемыми генетически обусловленными механизмами резистентности.

Показанная нами, фенотипическая гетерогенность, в частности одновременное присутствие субпопуляций бактерий одного вида (и одного генотипа) с различной резистентностью, является фактором, имеющим не только клиническое, но и эпидемиологическое значение, и должна рассматриваться как фактор, способствующий персистенции бактерий и формированию ХИЛ у больного МВ и ограничивающий эффективность АБТ.

Генетически детерминированная фенотипическая гетерогенность указывает на необходимость применения комбинированной АБТ при лечении ХИЛ у больных МВ. В связи с этим для достижения успеха в терапии инфекции у больных МВ необходим постоянный мониторинг изменчивости фенотипических и генотипических свойств штаммов в процессе хронической инфекции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю. и др. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010. 1: 15–20.
2. Lagrange-Puget M., Durieu I., Ecochard R. et al. Longitudinal study of oxidative status in 312 cystic fibrosis patients in stable state and during bronchial exacerbation. *Pediatr Pulmonol.* 2004. Jul; 38(1): 43-9. doi: 10.1002/ppul.20041. PMID: 15170872.
3. Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А. и др. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. 16 (4): 312–324.
4. Воронина О.Л., Чернуха М.Ю., Шагинян И.А. и др. Характеристика генотипов штаммов *Burkholderia cerasacia* complex, выделенных от больных в стационарах Российской Федерации. Молекулярная генетика. Микробиология и Вирусология. 2013. 2: 22–30.
5. Curran B., Jonas D., Grundmann H., Pitt T., Dowson C.G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004. 42(12): 5644-5649. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004.
6. Enright M.C., Day N.P., Davies C.E. et al. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000. 38(3): 1008-15.
7. Дубоделов Д.В., Любасовская Л.А., Шубина Е.С. и др. Генетические детерминанты резистентности к бета-лактамам антибиотикам госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных. Генетика. 2016. 52(9): 1097-1102. DOI: 10.1134/S1022795416090040.
8. Buermans H.P., den Dunnen J.T. Next generation sequencing technology: advances and application. *Biochim Biophys Acta.* 2014. 1841(10): 932-1941. DOI: 10.1016/j.Bbadis.2014.06.015.
9. Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* 2000. 288: 1251-1254. DOI: 10.1126/science.288.5469.1251.

10. Feliziani S., Marvig R.L., Luján A.M., Moyano A.J. *et al.* Coexistence and within-host evolution of diversified lineages of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in long-term cystic fibrosis infections. *PLoS Genet.* 2014. 10: e1004651.
11. Colque C.A., Albarracín Orio A.G., Feliziani S. *et al.* Hypermutator *Pseudomonas aeruginosa* exploits multiple genetic pathways to develop multidrug resistance during long-term infections in the airways of cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020. 64: e02142-19.
12. Veschetti L, Sandri A, Johansen HK, Lleò MM, Malerba G. Hypermutation as an Evolutionary Mechanism for *Achromobacter xylosoxidans* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Pathogens.* 2020 Jan 21; 9(2): 72. doi: 10.3390/pathogens9020072.
13. Rumpf C., Lange J., Schwartbeck B., Kahl B.C. *Staphylococcus aureus* and Cystic Fibrosis—A Close Relationship. What Can We Learn from Sequencing Studies? *Pathogens.* 2021 Sep 13; 10(9): 1177. doi: 10.3390/pathogens10091177.
14. Jong I.G., Haccou P., Kuipers O.P. Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *Bioessays.* 2011. 33(3): 215-223.
15. Шагинян И.А., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю. и др. Эпидемиологическая значимость молекулярной изменчивости генома изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих хроническую инфекцию легких у больных муковисцидозом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2019. 21(4): 340-351. 10.36488/смач.2019.4.340-351.

Поступила 27 июня 2023 г.

(Контактная информация: Аветисян Лусине Ремуальдовна – д.м.н., заведующий лабораторией эпидемиологии оппортунистических инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; адрес: 123098 Российская Федерация, г. Москва ул. Гамалеи 18; тел.: +7(905)5977727; E-mail: lusavr@mail.ru)

---

---

## REFERENCES

1. Shaginyan, I.A., Kapranov, N.I., Chernukha, M.Yu., Kashirskaya N. Yu., Semykin S. Yu., Alekseeva G. V. *et al.* Microbial population of lower respiratory tract in children from different age groups with cystic fibrosis. *Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology.* 2010. 1: 15–20.
2. Lagrange-Puget M, Durieu I, Ecochard R. *et al.* Longitudinal study of oxidative status in 312 cystic fibrosis patients in stable state and during bronchial exacerbation. *Pediatr Pulmonol.* 2004. Jul; 38(1): 43-9. doi: 10.1002/ppul.20041. PMID: 15170872.
3. Chernukha M.Yu., Avetisyan L.R., Shaginyan I.A. *et al.* Microbiological diagnosis algorithm for chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2014. 16 (4): 312–324.
4. Voronina O. L., Chernukha M. Yu., Shaginyan I. A. Kunda M. S., Avetisyan L. R., Orlova A. A. *et al.* Characterization of genotypes for *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from patients in hospitals of the Russian federation. *Molecular Genetic, Microbiology, and Virology.* 2013. 2: 22–30.
5. Curran B., Jonas D., Grundmann H., Pitt T., Dowson C.G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004. 42(12): 5644-5649. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004.
6. Enright MC, Day NP, Davies CE *et al.* Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000. Mar; 38(3): 1008-15.
7. Dubodelov D.V., Lubasovskaya L.A., Shubina E.S. *et al.* Genetic determinants of resistance of hospital-associated strains of *Klebsiella pneumoniae* to  $\beta$ -lactam antibiotics isolated in

- neonates. *Genetika*. 2016. 52(9): 1097-1102.
8. Buermans H.P., den Dunnen J.T. Next generation sequencing technology: advances and application. *Biochim Biophys Acta*. 2014. 1841(10): 932-1941. DOI: 10.1016/j.Bbadis.2014.06.015.
  9. Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000. 288: 1251-1254. DOI: 10.1126/science.288.5469.1251.
  10. Feliziani S, Marvig RL, Luján AM, Moyano AJ, et al. Coexistence and within-host evolution of diversified lineages of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in long-term cystic fibrosis infections. *PLoS Genet*. 2014. 10: e1004651.
  11. Colque C.A., AlbarracínOrío AG, Feliziani S. et al. Hypermutator *Pseudomonas aeruginosa* exploits multiple genetic pathways to develop multidrug resistance during long-term infections in the airways of cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020. 64: e02142-19.
  12. Veschetti L, Sandri A, Johansen HK, Lleò MM, Malerba G. Hypermutation as an Evolutionary Mechanism for *Achromobacter xylosoxidans* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Pathogens*. 2020. Jan 21; 9(2): 72. doi: 10.3390/pathogens9020072.
  13. Rumpf C, Lange J, Schwartbeck B, Kahl BC. *Staphylococcus aureus* and Cystic Fibrosis-A Close Relationship. What Can We Learn from Sequencing Studies? *Pathogens*. 2021. Sep 13; 10(9): 1177. doi: 10.3390/pathogens10091177.
  14. Jong I.G., Haccou P., Kuipers O.P. Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *Bioessays*. 2011. 33(3): 215-223.
  15. Shaginyan I.A., Avetisyan L.R. Chernukha M.Yu. et al. Epidemiological significance of genome variations in *Pseudomonas aeruginosa* causing chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019. 21(4): 340-351. 10.36488/cmac.2019.4.340-351.

**Образец ссылки на статью**

Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Бурмистров Е.М., Сиянова Е.А., Медведева О.С., Русакова Е.В. Персистенция и адаптация бактерий *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter* spp. при хронической инфекции легких у пациентов с муковисцидозом. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2023. 2. 11 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-2/Articles/LPA-2023-2.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2023-12002