

# Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониевых фенотипов у *Staphylococcus aureus*

\*В. В. ГОСТЕВ<sup>1,2</sup>, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ<sup>1</sup>, О. С. СУЛЯН<sup>1</sup>,  
П. С. ЧУЛКОВА<sup>1</sup>, Ю. В. СОПОВА<sup>3,4</sup>, М. Е. ВЕЛИЖАНИНА<sup>3,5</sup>,  
В. Ю. ПЛЕШКОВ<sup>1,6</sup>, В. А. АГЕЕВЕЦ<sup>1</sup>, С. В. СИДОРЕНКО<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup> ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

## The Effect of Shock Gentamicin Concentrations on the Formation of Resistance and Small Colony Variants in *Staphylococcus aureus*

\*VLADIMIR V. GOSTEV<sup>1,2</sup>, OLGA S. KALINOGORSKAYA<sup>1</sup>, OFELIA S. SULIAN<sup>1</sup>,  
POLINA S. CHULKOVA<sup>1</sup>, JULIA V. SOPOVA<sup>3,4</sup>, MARIA E. VELIZHANINA<sup>3,5</sup>,  
VYACHESLAV Y. PLESHKOV<sup>1,6</sup>, VLADIMIR A. AGEEVETS<sup>1</sup>, SERGEY V. SIDORENKO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

<sup>4</sup> St. Petersburg branch of the Vavilov Institute of General Genetics, Saint-Petersburg, Russia

<sup>5</sup> All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

<sup>6</sup> St. Petersburg Research Institute of Emergency Medicine named after I. I. Dzhanelidze, Saint-Petersburg, Russia

### Резюме

Гентамицин является одним из компонентов комбинированной терапии инфекционных эндокардитов, вызванных *Staphylococcus aureus*, включая метициллинорезистентные штаммы (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA). Цель исследования — анализ влияния десяти 6-часовых циклов воздействия высоких концентраций (16 мкг/мл) гентамицина *in vitro* на изменение фенотипа и генотипа аминогликозидочувствительных штаммов *S. aureus*, относящихся к четырём сиквенс-типам: ST5 (ATCC 29213), ST8, ST97 и ST22 (MRSA). Для всех штаммов, кроме ATCC 29213, после селекции отмечалось увеличение МПК гентамицина до 8–64 мкг/мл. Один штамм (SA0937) диссоциировал на три морфотипа, включая мелкоколониевый вариант (small colony variant, SCV). Вариант производного штамма SA0937 с колониями нормального размера характеризовался ассоциированной устойчивостью к даптомицину за счёт мутации P314L в MprF. Формирование устойчивости не сопровождалось изменением скорости роста, кроме морфотипа SCV. Для штамма ATCC 29213 после селекции отмечалось появление толерантности, проявляющейся в увеличении эффективного киллинга до 14 ч в 24-часовом time-killing эксперименте с концентрацией антибиотика 16 мкг/мл. У штамма ATCC 29213 выявлены мутации в пептидил т-РНК гидролазе (Pth). У трёх штаммов были обнаружены делеции в гене *atpG*, входящим в состав АТФ-синтазного комплекса. У остальных производных штаммов были выявлены делеции и мутации в генах метаболизма менахинона *herS*, *menA* и трансляционном факторе элонгации G (*fusA*). Таким образом, использование гентамицина сопряжено с возможным быстрым формированием устойчивости и толерантности, не связанными с приобретением генов аминогликозид-модифицирующих ферментов. Выявление SCV ассоциировано с неблагоприятными клиническими исходами. При использовании комбинированной терапии необходимо учитывать, что существует возможность формирования устойчивости к даптомицину на фоне селекции гентамицином.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus aureus*; гентамицин; устойчивость; селекция; мелкоколониевые варианты; мутации; биосинтез менахинона

**Для цитирования:** Гостев В. В., Калиногорская О. С., Сулян О. С., Чулкова П. С., Сопова Ю. В., Велижанина М. Е., Плешков В. Ю., Агеевец В. А., Сидоренко С. В. Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониевых фенотипов у *Staphylococcus aureus*. Антибиотики и химиотер. 2023; 68 (9–10): 25–33. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-25-33>.

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: ул. Профессора Попова, д. 9, ДНКЦИБ, г. Санкт-Петербург, Россия, 197022.  
E-mail: guestvv11@gmail.com

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 9 Prof. Popova st., Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint-Petersburg, 197022 Russia. E-mail: guestvv11@gmail.com

## Abstract

Gentamicin is one of the components of combination therapy for infective endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The purpose of this study was to analyze the effect of ten 6-hour cycles of exposure to high concentrations (16 µg/ml) of gentamicin *in vitro* on the phenotype and genotype changes of aminoglycoside-susceptible *S. aureus* strains belonging to four sequence types (ST): ST5 (ATCC 29213), ST8, ST97, and ST22 (MRSA). After selection, an increase in the MIC of gentamicin to 8–64 µg/ml for all strains except ATCC 29213 was observed. One strain (SA0937) dissociated into three morphotypes, including a small colony variant (SCV). A derivative strain SA0937 variant with normal colony size was characterized by associated resistance to daptomycin due to the P314L mutation in MprF. Except for the SCV morphotype, there was no change in growth rate in response to the formation of resistance. After selection, the emergence of the ATCC 29213 strain tolerance was noted. It manifested by an increase in effective killing up to 14 hours in a 24-hour time-killing test with 16 µg/ml of antibiotic concentration. It was revealed that the ATCC 29213 strain has mutations in peptidyl-tRNA hydrolase (Pth). Deletions in the *atpG* gene, which is part of the ATP synthase complex, were found in three strains. Deletions and mutations in the menaquinone metabolism genes *hepS*, *menA*, and translation elongation factor G (*fusA*) were identified in the remaining derivative strains. Thus, the use of gentamicin is linked to possible rapid development of resistance and tolerance, which is not associated with the acquisition of aminoglycoside-modifying enzyme genes. Detection of SCV is associated with adverse clinical outcomes. It is important to consider the possibility of developing resistance to daptomycin due to gentamicin selection when using combination therapy.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; gentamicin; resistance; selection; small colony variants; mutations; menaquinone biosynthesis

**For citation:** Gostev V. V., Kalinogorskaya O. S., Sulian O. S., Chulkova P. S., Sopova Y. V., Velizhanina M. E., Pleshkov V. Y., Ageevets V. A., Sidorenko S. V. The effect of shock gentamicin concentrations on the formation of resistance and small colony variants in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 25–33. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-25-33>.

## Введение

Аминогликозидные антибиотики являются препаратами широкого спектра действия и характеризуются выраженным бактерицидным действием в отношении *Staphylococcus aureus*, включая метициллинорезистентные штаммы (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), опосредуя необратимое нарушение биосинтеза белка [1]. Аминогликозиды проникают в клетку через цитоплазматическую мембрану за счёт протон-движущей силы с затратой энергии в виде молекул АТФ. Устойчивость к аминогликозидам обусловлена несколькими механизмами. Наиболее распространённый из них — это наличие аминогликозид-модифицирующих ферментов, которые распространяются достаточно быстро, путём горизонтального переноса генов. Другие механизмы, такие как мутации в рибосомальных РНК и изменение работы электрон-транспортной цепи, дыхательного и энергетического метаболизма [2], путём накопления мутаций в соответствующих генах, встречаются реже.

Одна из особенностей, описанная у *S. aureus*, это образование особого морфотипа — мелкоколониевых вариантов (Small Colony Variants, SCV), ассоциированных с устойчивостью к гентамицину. SCV фенотипы представляют собой очень мелкие колонии, часто без пигментации, с крайне низкой и линейной скоростью роста. Это связано с появлением ауксотрофности по некоторым кофакторам. Так, зависимость роста от наличия гема, менадиона, менахинона ассоциирована с воздействием гентамицина [3]; зависимость от тимидина ассоциирована с воздействием триметоприма-сульфаметоксазола [4]. Выделяют также и CO<sub>2</sub>-зависимые фенотипы SCV [5]. Делеции и

мутации в ключевых генах биосинтеза кофакторов (Men, Hem, ThyA) являются основной причиной появления ауксотрофности. Выявление SCV фенотипов ассоциировано с неблагоприятными клиническими исходами [5]. Несмотря на высокую частоту встречаемости устойчивости к аминогликозидам среди *S. aureus*, гентамицин является одной из альтернатив для терапии тяжёлых инфекций, в частности в комбинированной терапии инфекционных эндокардитов [6, 7].

Для гентамицина, как и для других аминогликозидов, характерен концентрационно-зависимый киллинг, что обосновывает однократное введение всей суточной дозы, приводящее к относительно кратковременному воздействию на микроорганизмы высоких концентраций антибиотика [8]. Целью настоящего исследования стал анализ влияния циклического воздействия высоких концентраций гентамицина *in vitro* на изменение фенотипа и генотипа аминогликозидочувствительных штаммов *S. aureus*. Данный подход был впервые применён при воздействии ампициллина на *Escherichia coli* [9], когда авторам удалось получить производные изоляты с неизменным уровнем чувствительности, но проявляющие признаки толерантности. В настоящее время этот метод широко используется в экспериментальных работах для других сочетаний микроб-антибиотик.

## Материал и методы

**Бактериальные изоляты.** В работу были включены три клинических изолята *S. aureus* из коллекции бактериальных культур ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, а также штамм ATCC 29213, сиквенс-типа — ST5. Клинические изоляты включали SA0707 (ST8, MSSA), SA0937 (ST97, MSSA) и SA01037 (ST22, MRSA).

**Воздействие шоковыми концентрациями гентамицина.** За основу эксперимента был взят опыт O. Fridman и со-

авт. [9]. Согласно предложенной схеме, изначально получали ночной инокулом исследуемых изолятов, далее делали разведения клеточной биомассы в соотношении 1:100 в сердечно-мозговом бульоне ВНИ (Brain-heart infusion, Bio-Rad, Франция). При этом оценивали плотность клеточной биомассы с подсчётом КОЕ/мл. После в среду (100 мл) добавляли антибиотик гентамицин (Molekula, Англия) в конечной концентрации 16 мкг/мл, с последующей инкубацией в течение шести часов при 37°C и орбитальном шейкировании 250 об/мин. После шести часов воздействия антибиотиком снова проводили оценку плотности клеточной биомассы с подсчётом КОЕ на плотной питательной среде. Далее весь объём среды и клеток (100 мл) дважды отмывали от антибиотика в PBS-буфере, получали клеточный осадок и ресуспендировали в свежем бульоне ВНИ для получения ночного инокулома. Все вышеописанные манипуляции составляли один цикл селекции. Всего было проведено десять циклов селекции. В каждом цикле была подсчитана доля выживших клеток, исходя из разности значений КОЕ/мл до и после шестичасового воздействия гентамицином.

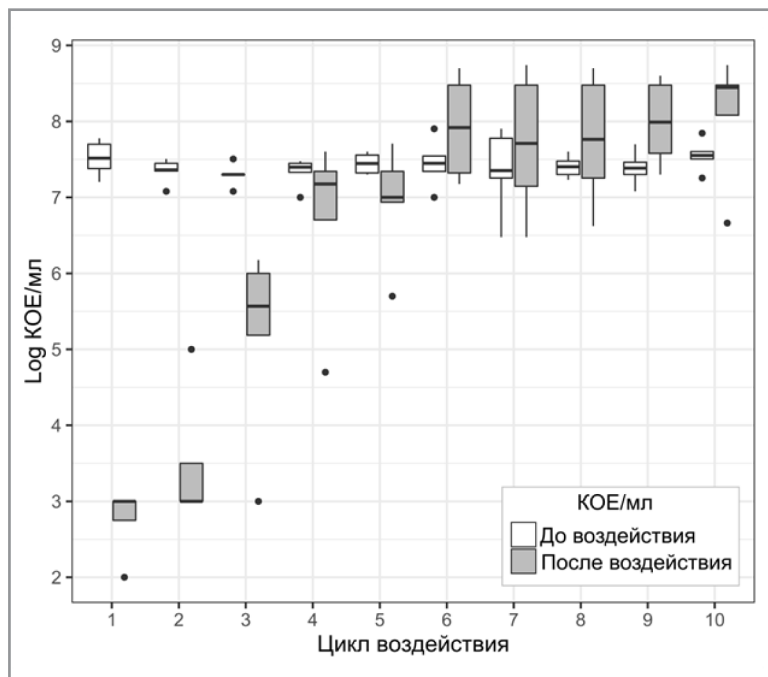
**Оценка чувствительности к антибиотикам.** Минимальные подавляющие концентрации (МПК) определяли методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона (Bio-Rad, Франция) в соответствии со стандартом ISO 20776-1:2019. Интерпретацию результатов проводили согласно EUCAST (версия 13.0, 2023). Для диско-диффузионного метода (ДДМ) использовали диски гентамицина (10 мкг) и амикацина (30 мкг) производства Bio-Rad (Франция). Для градиентного-диффузионного метода (ГДМ) использовали полоски ETEST® (bioMérieux, Франция). Скорость отмирания бактериальных культур (Time-killing) с гентамицином (16 мкг/мл) осуществляли в среде Мюллера–Хинтона со стартовым инокуломом  $10^8$ – $10^9$  КОЕ/мл. Высев культур осуществляли через 3, 6, 9, 14, 18 и 24 ч. За MDK (minimal duration of killing) принимали время, необходимое

для киллинга 99,99% клеток (КОЕ/мл), что соответствовало снижению КОЕ/мл на ~3–4 логарифма.

**Оценка скорости роста.** Относительную скорость роста ( $\mu$ , мин<sup>-1</sup>), время удвоения клеток (мин), ЛАГ-фазу (мин) оценивали путём измерения оптической плотности (OD600), используя планшетный ридер-шейкер инкубатор Infinite 200 Pro (Tecan, Австрия) в 96-луночном плоскодонном планшете в объёме 100 мкл среды ВНИ. Считывание OD600 проводили каждые 10 мин в течение 14 ч. Анализ кривых роста проводили с помощью R пакета Growthcurver [10].

**Полногеномное секвенирование.** Геномную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen™, Германия) с предварительным лизисом клеток в буфере, содержащем 5 мг/мл лизостафина (Sigma-Aldrich, США) и 50 мг/мл лизоцима (Amresco, США). Для подготовки ДНК-библиотек использовался набор DNA Prep (Illumina, Сан-Диего, США) в соответствии с протоколом производителя. ДНК-библиотеки секвенировали на приборе MiSeq (Illumina, США) с получением парных ДНК-прочтений длиной 300 п. н. ДНК-прочтения депонированы в публичный депозитарий данных секвенирования NCBI Sequence Read Archive (SRA) под номером BioProject PRJNA996487. Риды контрольных штаммов (до селекции) доступны под номерами SRR14216098, SRR14216103 (BioProject PRJNA721282), SRR11196766 (BioProject PRJNA609231), SRR5100333 (PRJNA325350).

**Биоинформатический анализ.** Удаление адаптерных последовательностей и фильтрация низкокачественных прочтений проводили с помощью программ FastQC [11] и trimomatic [12]. Геномы контрольных штаммов были собраны *de novo* с использованием SPAdes [13]. Для выявления генетических изменений, риды штаммов после селекции с гентамицином, выравнивали на контиги геномов контрольных штаммов с использованием программы Breseq [14].



**Рис. 1.** Влияние шоковых концентраций гентамицина (16 мкг/мл) на чувствительные *S. aureus* в течение 10 циклов воздействия.

**Примечание.** Представлено соотношение клеток (КОЕ/мл) до и после каждого цикла воздействия (медиана и межквартильный интервал).

**Fig. 1.** Effect of shock concentrations of gentamicin (16 µg/ml) on sensitive *S. aureus* during 10 cycles of exposure.

**Note.** Cell ratio (CFU/ml) before and after each exposure cycle (median and interquartile range) is presented.

## Результаты

**Фенотипические изменения.** При воздействии шоковыми концентрациями гентамицина стартовое значение инокулома в каждом цикле для каждого штамма составляло 7,4 (7,2–7,5) log КОЕ/мл. При этом в первые три цикла воздействия уровень выживших клеток составлял не более 1%, что соответствовало 4,5 (2,5–5) log КОЕ/мл (рис. 1). Уже к пятому циклу уровень выживших клеток составлял 7,0 (6,6–7,2) log КОЕ/мл; в последующие шестой–десятый циклы подавление роста отсутствовало. После десятого цикла воздействия для штамма SA0937 отмечалась фенотипическая диссоциация, были выявлены колонии трёх типов: мелкие колонии с выраженным жёлтым цветом (рис. 2, A2), очень мелкие прозрачно-беловатые колонии (рис. 2, A3, A4), и колонии нормального размера (рис. 2, A5), не отличающиеся от оригинальных до селекции (рис. 2, A1). У остальных штаммов не было выявлено диссоциации.

Для большинства штаммов после десятого цикла воздействия было выявлено увеличение уровня МПК с 0,25–0,5 мкг/мл до 8–64 мкг/мл к гента-



Фенотипические и генотипические изменения у штаммов после воздействия шоковыми концентрациями гентамицина  
Phenotypic and genotypic changes in strains after exposure to shock concentrations of gentamicin

Штаммы	До воздействия						После воздействия						Мутации	
	МПК, мкг/мл			Фен			МПК, мкг/мл			скорость роста				
	GEN	ACN	DAP	Lag	Dt	ОСР	GEN	ACN	DAP	Lag	Dt	ОСР		
ATCC29213	0,5	4	0,5	110	23±0,5	1		1	4	0,5	110	24±1	0,98	Pth (Y79S + G44D)  atpG (Δ15 п. н.), SACOL2260 (Δ126 п.н.)
SA0707	0,25	4	0,25	120	30±1	1		8	16	0,25	120	32±1	0,87	
SA0937	0,5	4	0,5	120	24±0,5	1	Y	8	16	0,5	140	28±1	0,90	hepS (Δ13 п. н.)
							SCV	16	32	0,5	—	—	—	MenA (D205A, Δ21 п. н., L17*)
							N	32	64	4	120	25±2	0,95	MprF (P314L), atpG (Δ19 п. н.)
SA1037	0,5	4	0,5	120	24±0,5	1		64	64	0,5	120	26±0,5	0,90	atpG (Δ15 п.н.), Fusa (G507S)

ATCC 29213	0,5	4	0,5	110	23±0,5	1	1	4	0,5	110	24±1	0,98	Pth (Y79S + G44D)
SA0707	0,25	4	0,25	120	30±1	1	8	16	0,25	120	32±1	0,87	atrG (Δ15 п. н.), SACOI2260 (Δ126 п. н.)
SA0937	0,5	4	0,5	120	24±0,5	1	8	16	0,5	140	28±1	0,90	hepS (Δ13 п. н.)
							16	32	0,5	—	—	—	MenA (D205A, Δ21 п. н., L17*)
							32	64	4	120	25±2	0,95	MprF (P314L), atrG (Δ19 п. н.)
SA1037	0,5	4	0,5	120	24±0,5	1	64	64	0,5	120	26±0,5	0,90	atrG (Δ15 п. н.), FusA (C507S)

**Примечание.** Антибиотики и используемые критерии оценки чувствительности: GEN — гентамицин ( $S \leq 2$  мкг/мл); ACN — амикацин ( $S \leq 16$  мкг/мл); DAP — даптомицин ( $S \leq 1$  мкг/мл). Скорость роста: Lag — ЛАГ-фаза роста (мин); Dt — время удвоения клеток (мин); ОСР — относительная скорость роста. Фен — фенотипическая диссоциация штамма SA0937; Y — колонии жёлтого цвета; SCV — мелкоколониевые варианты (скорость роста не была определена); N — колонии обычного размера. Мутации: Δ — делеции; \* — стоп-кодон.

**Note.** Antibiotics and sensitivity assessment criteria used: GEN — gentamicin ( $S \leq 2$  µg/ml); ACN — amikacin ( $S \leq 16$  µg/ml); DAP — daptomycin ( $S \leq 1$  µg/ml). Growth rate: Lag — lag phase of bacterial growth (min); Dt — cell doubling time (min); ОСР — relative growth rate. Фен — phenotypic dissociation of SA0937 strain; Y — yellow colonies; SCV — small-colony variants (growth rate was not determined); N — normal-sized colonies. Mutations: Δ — deletions; \* — stop codon.

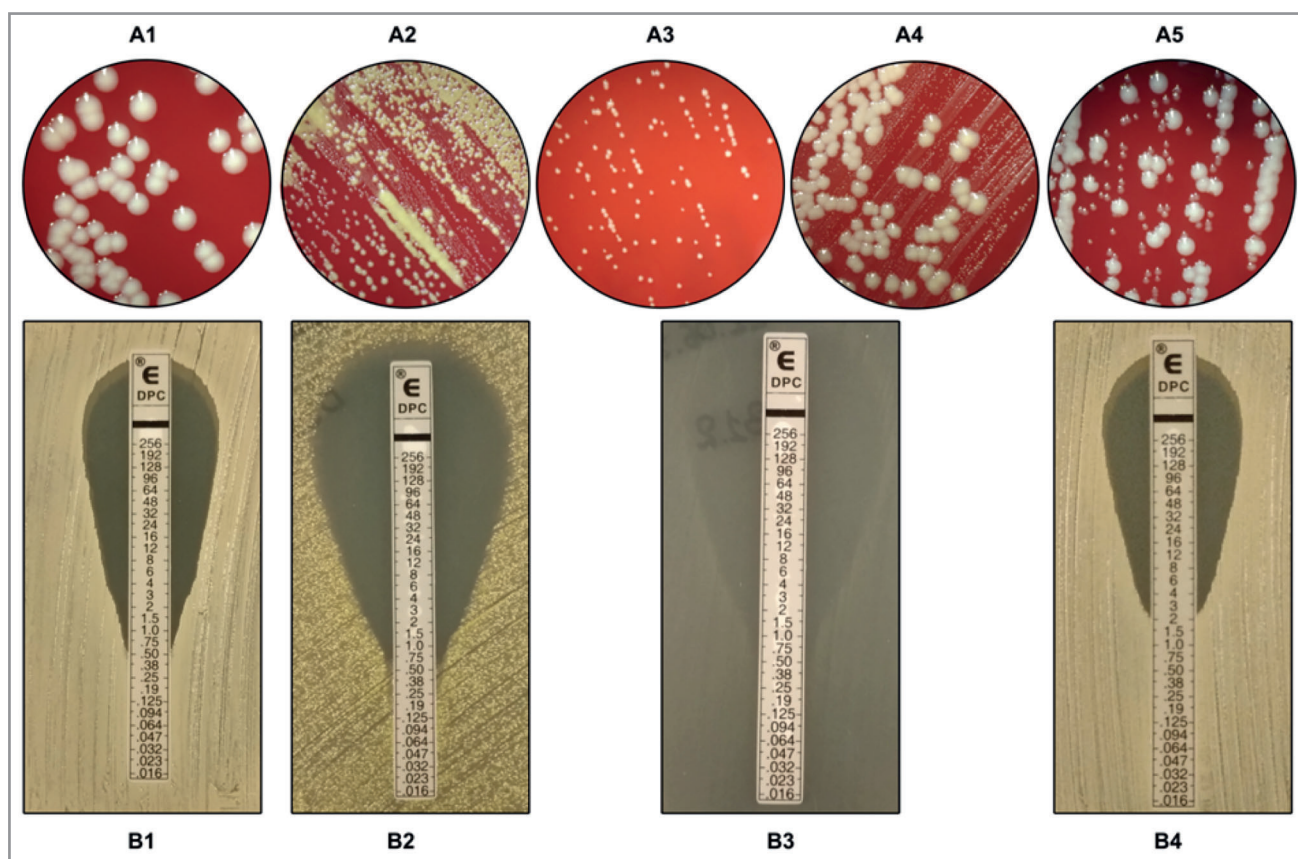
мицину и амикацину (таблица). При постановке диско-диффузионного метода (ДДМ), для штаммов с высокими значениями МПК наблюдалась двойная зона роста (рис. 3), при этом диаметр внутренней зоны составлял 11–16 мм для гентамицина и 12–14 мм для амикацина. При постановке ДДМ с колониями из внутренней зоны эффект двойной зоны сохранялся. Штамм ATCC 29213 после селекции сохранял чувствительность к аминогликозидным антибиотикам (см. таблицу).

Для оценки возможного влияния гентамицина на формирование толерантности для штамма ATCC 29213 был проведён «Time-killing» эксперимент, по результатам которого отмечалось увеличение времени эффективного киллинга (MDK<sub>99,99</sub>). Так, для штамма до воздействия гентамицином, было характерно снижение клеточной плотности с 9,0 до 5,0 log КОЕ/мл за 3 ч; в то время как для штамма после воздействия на такое же снижение клеточной плотности потребовалось 14 ч.

Не было выявлено изменения уровня МПК после воздействия гентамицином при оценке чувствительности к 21 антибиотику других классов, за исключением диссоциированного штамма SA0937, представленного колониями нормального размера. Данный вариант характеризовался устойчивостью к даптомицину (см. таблицу), при этом уровень МПК составлял 4 мкг/мл. На рис. 2, B1–B4 представлено сравнение оценки чувствительности к даптомицину с помощью метода ГДМ для всех вариантов диссоциированного штамма SA0937, колонии нормального размера имели уровень МПК 2 мкг/мл. При оценке скорости роста не было выявлено статистически значимых изменений (см. таблицу) у штаммов после воздействия гентамицином, ЛАГ-фаза роста, время удвоения клеток и относительная скорость роста изменялись не более чем на 13%. Для мелкоколониевых вариантов штамма SA0937 измерить скорость не удалось ввиду очень плохого роста культуры в бульонной среде.

**Генотипические изменения.** У штаммов после воздействия гентамицином были выявлены различные мутации (см. таблицу). Делеции в гене *atrG*, входящим в состав АТФ-синтазного комплекса, и кодирующего гамма цепь, были обнаружены у трёх штаммов. У штамма ATCC 29213 выявлена мутация в пептидил т-РНК гидролазе (Pth), участвующей в реакции присоединения аминокислот к растущей пептидной цепочке, в процессе трансляции. У жёлтых колоний штамма SA0937 выявлена делеция в гене *hepS*, который кодирует субъединицу фермента гептапренил-дифосфат синтазы, участвующей в метаболизме менахинона, одного из ключевых соединений, которые не могут синтезировать SCV варианты *S. aureus*.

Мелкоколониевые варианты штамма SA0937 характеризовались несколькими мутациями в 1,4-



**Рис. 2.** Фенотипическая диссоциация изолята SA0937 после воздействия гентамицином (А) и оценка устойчивости к даптомицину с помощью градиентных-диффузионных тестов (В).

A1 — штамм до воздействия, типичные колонии *S. aureus* на кровяном агаре; A2 — штамм Y после воздействия, изменение пигментации колоний с выраженным жёлтым цветом; A3 — штамм SCV фенотип; A4 — SCV фенотип в смешанной культуре с колониями нормального размера; A5 — штамм N, представлен колониями нормального и мелкого размера (Ув.  $\times 1,25$ , стереомикроскоп STEMI 2000-C (ZEISS)).

**Примечание.** Соответствующие результаты чувствительности к даптомицину, B1–B3 — чувствительные штаммы; B4 — устойчивый штамм.

**Fig. 2.** Phenotypic dissociation of SA0937 isolate after exposure to gentamicin (A) and assessment of daptomycin resistance using gradient diffusion tests (B).

A1 — strain before exposure, typical colonies of *S. aureus* on blood agar; A2 — strain Y after exposure, change in pigmentation of colonies with a pronounced yellow color; A3 — SCV phenotype strain; A4 — SCV phenotype in a mixed culture with colonies of normal size; A5 — strain N, represented by colonies of normal and small size (magnification  $\times 1,25$ , Stereomicroscope STEMI 2000-C (ZEISS)).

**Note.** The corresponding daptomycin sensitivity results, B1–B3 are susceptible strains; B4 is a resistant strain.

диокси-2-нафтоат пренилтрансферазе (MenA), участвующей в биосинтезе менахинона. Вариант с нормальной морфологией колоний штамма SA0937 имел делецию в гене *atpG*, а также аминокислотную замену P314L в лизил-фосфатидил-глицерол синтазе (MpfF), ферменте, участвующем в биосинтезе мембранных фосфолипидов. У штамма SA1037 выявлены две мутации: в *aptG* и трансляционном факторе элонгации G (*FusA*). У штамма SA0707, помимо мутации в *aptG*, выявлена делеция в гене, кодирующем гипотетический протеин SACOL2260 (локус в референс-геноме *S. aureus* COL). Локус SACOL2260 (533 п.н.) характеризуется низкой консервативностью и локализован между геном, кодирующим транскрипционный регулятор *SarV* и геном *moaA*, продукт

которого участвует в метаболизме молибдена. У всех штаммов до и после воздействия гентамицином не было выявлено генов, кодирующих аминокликозид-модифицирующие белки.

## Обсуждение

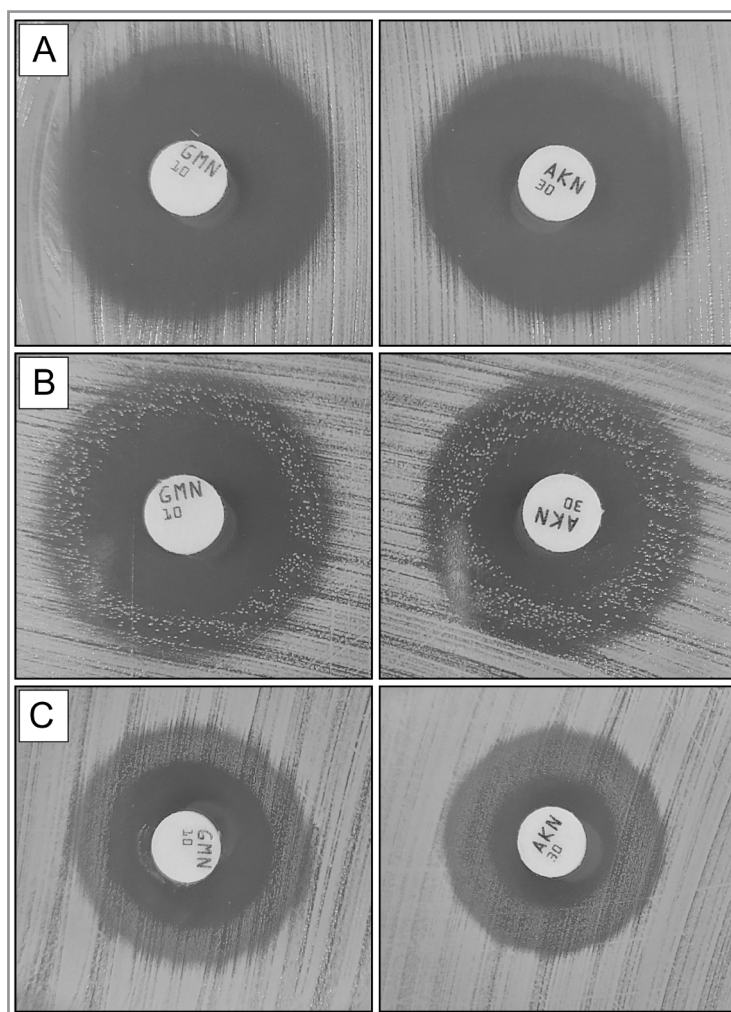
В данном исследовании был использован метод кратковременного циклического воздействия высокими концентрациями антибиотика, что позволяет получить толерантность к антибиотикам. Ранее нами, используя эту же экспериментальную модель, при воздействии ванкомицином на MRSA, были получены гетерорезистентные изоляты, где гетерорезистентность была обусловлена формированием мутаций в системе WalKR,



регулирующей биосинтез клеточной стенки [15]. Воздействие аминогликозидов на штаммы *S. aureus* при таком варианте селекции устойчивости *in vitro*, не изучалось. В настоящем исследовании воздействие шоковой концентрацией гентамицином, в 32 раза превышающую уровень МПК у исследуемых штаммов, приводило к появлению разных фенотипов и разных механизмов устойчивости. Необходимо отметить, что выбранная в эксперименте концентрация близка к максимальной сывороточной концентрации (20 мкг/мл) при стандартной дозировке 7 мг/кг. Выбранное время воздействия (6 ч) также близко к пограничной зоне 10–12 ч, при соблюдении условия  $AUC > MPK \cdot 2$  мкг/мл [16]. Таким образом, выбранная модель эксперимента частично моделирует фармакокинетику гентамицина.

Прежде всего, следует отметить, что результат воздействия гентамицина на стафилококки во многом зависел от генотипа микроорганизма. Так, при воздействии гентамицина на штамм ST5 (ATCC 29213) не было получено повышения МПК к аминогликозидам, но при этом отмечалось формирование толерантности, проявлявшейся в увеличение периода времени эффективного киллинга. У данного штамма выявлена мутация в гене *pth*, участвующего в процессе трансляции. Ранее было показано, что мутации в данном гене опосредуют универсальную толерантность у *Escherichia coli* к бактерицидным антибиотикам разных групп [17]. Мутации, влияющие на скорость рибосомального биосинтеза белка, по всей видимости, опосредуют формирование антибиотикотолерантности. У штаммов с другими генотипами (ST8, ST97 и ST22) устойчивость формировалась достаточно быстро, и уже к четвёртому-пятому циклу селекции для большинства штаммов отмечался рост в присутствии гентамицина. Формирование устойчивости не сопровождалось изменением скорости роста, что свидетельствует о низком «fitness cost» при формировании устойчивости к аминогликозидам.

В настоящем исследовании после воздействия гентамицином только один производный штамм, характеризующийся очень мелкими колониями и мутациями в гене биосинтеза менахинона (*menA*), обладал истинным фенотипом SCV, при этом высокий уровень устойчивости к аминогликозидам сформировался у подавляющего большинства производных штаммов. Связь влияния аминогли-



**Рис. 3. Пример учёта результатов диско-диффузионного метода определения чувствительности к гентамицину (GMN) и амикацину (AKN).**

А — штамм SA1037 до селекции; В — после пятого цикла воздействия гентамицином; С — после десятого цикла.

**Fig. 3. An example of recording the results of the disc diffusion method for determining sensitivity to gentamicin (GMN) and amikacin (AKN).**

А — SA1037 strain before selection; В — after the fifth cycle of exposure to gentamicin; С — after the tenth cycle.

козидов на формирование мелкоколониевых вариантов достаточно хорошо изучена [18, 19], описаны клинические примеры формирования SCV фенотипов на фоне терапии гентамицином [3]. Устойчивость к аминогликозидам, независимо от наличия генов аминогликозид-модифицирующих ферментов, является одним из свойств мелкоколониевых вариантов. Стоит также отметить, что SCV варианты, сформированные без индукции антибиотиками, также могут характеризоваться устойчивостью к гентамицину [5].

Отличительной фенотипической особенностью всех производных штаммов было формирование двойной зоны роста вокруг диска с антибиотиком при постановке ДДМ. Как правило,

при наличии аминокликозид-модифицирующих ферментов задержка роста при постановке ДДМ имеют одну чёткую зону. Таким образом, обнаружение такого фенотипа среди клинических изолятов, может свидетельствовать о наличии SCV вариантов и альтернативных механизмов устойчивости к аминокликозидам и гетерорезистентности. Большинство штаммов имели делеции в гене *atpG*, кодирующего гамма субъединицу АТФ-синтазного комплекса, участвующего в системе электрон-транспортной цепи. Ранее было показано, что мутации и делеции в этом гене опосредуют формирование устойчивости к гентамицину у *E. coli* [20] и *Listeria monocytogenes* [21]. Ещё одно интересное наблюдение было сделано в экспериментальных работах по направленному мутагенезу генов оперона *atp*. Так, в исследовании M. Vestergaard и соавт. [22] было показано, что делеции в *atp* генах приводят к формированию чувствительности к полимиксинам у *S. aureus*, который характеризуется природной устойчивостью к данной группе препаратов. В исследовании L. Liu и соавт. [23], используя аналогичный экспериментальный подход, выявлено появление высокой чувствительности к противомикробным пептидам человека. Влияние мутаций в генах *atp* оперона на чувствительность к гентамицину у *S. aureus* была экспериментально верифицирована в работе M. Vestergaard и соавт. [24].

Существует предположение, что изменение клеточного дыхания за счёт изменения работы электрон-транспортной цепи влияет на электрический потенциал мембраны, что в свою очередь, влияет на пенетрацию аминокликозидов внутрь клетки [25]. Мутации в гене *fusA*, обуславливают устойчивость к фузидиевой кислоте, а также к аминокликозидам [26]. В настоящем исследовании только у одного штамма была выявлена мутация в *fusA*, без изменений чувствительности к фузидиевой кислоте. Производные жёлтые колонии штамма SA0937 имели делецию в гене *herS*, участвующем в биосинтезе менахинона [27]. Необычный эффект был отмечен для одного из морфотипов штамма SA0937. У мор-

фотипа, представленного колониями нормального размера, на фоне воздействия гентамицином, появилась устойчивость к даптомицину за счёт мутации в *MprF*. Мутации в *MprF* являются одним из основных механизмов устойчивости к даптомицину; роль аминокислотных замен в бифункциональном домене *MprF* (с 250 по 360 аминокислотный остаток) в повышении МПК достаточно хорошо изучена [28, 29]. Появление ассоциированной устойчивости к даптомицину на фоне формирования устойчивости к гентамицину ранее не было описано. Полученные данные необходимо учитывать, поскольку гентамицин может быть использован в комбинации с даптомицином, например, для лечения эндокардитов [30]. В настоящее время использование гентамицина для лечения стафилококковых инфекций целесообразно использовать в комбинациях с другими антибиотиками. Это обусловлено высокой вероятностью быстрого формирования устойчивости, а также SCV фенотипов, выявление которых ассоциировано с неблагоприятными исходами, такими как затяжные и рецидивирующие стафилококковые инфекции [5].

## Заключение

Таким образом, аминокликозиды остаются одной из опций для лечения стафилококковых инфекций, включая инфекции, вызванные MRSA. Однако их использование сопряжено с возможным быстрым формированием устойчивости и толерантности, не связанными с приобретением генов аминокликозид-модифицирующих ферментов, что важно учитывать при назначении данной группы антибиотиков. Целесообразно проводить корректное выявление SCV фенотипов в рутинных лабораториях, особенно у пациентов, которые находятся на терапии гентамицином, а также пациентов с инфекционными эндокардитами и остеомиелитами.

**Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда 18-75-10114-П.**

## Литература/References

1. Serio A. W., Keepers T., Andrews L., Krause K. M. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus*. 2018; 8 (1). doi 10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018.
2. Radlinski L. C., Rowe S. E., Brzozowski R. et al. Chemical Induction of Aminoglycoside Uptake Overcomes Antibiotic Tolerance and Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell Chem Biol*. 2019; 26 (10): 1355–1364 e4. doi 10.1016/j.chembiol.2019.07.009.
3. Balwit J. M., van Langevelde P., Vann J. M., Proctor R. A. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis*. 1994; 170 (4): 1033–1037. doi 10.1093/infdis/170.4.1033.
4. Kriegeskorte A., Lore N. I., Bragonzi A. et al. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are induced by trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and have increased fitness during SXT challenge. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59 (12): 7265–7272. doi 10.1128/AAC.00742-15.
5. Kahl B. C., Becker K., Löffler B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin Microbiol Rev*. 2016; 29 (2): 401–427. doi 10.1128/CMR.00069-15.
6. Brown N. M., Goodman A. L., Horner C. et al. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK. *JAC Antimicrob Resist*. 2021; 3 (1): dlaa114. doi 10.1093/jacamr/dlaa114.
7. Davis J. S., Van Hal S., Tong S. Y. Combination antibiotic treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015; 36 (1): 3–16. doi 10.1055/s-0034-1396906.
8. Nicolau D. P., Freeman C. D., Belliveau P. P. et al. Experience with a once-daily aminoglycoside program administered to 2,184 adult patients.

- Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39 (3): 650–655. doi 10.1128/AAC.39.3.650.
9. Fridman O., Goldberg A., Ronin I. et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*. 2014; 513 (7518): 418–421. doi 10.1038/nature13469.
  10. Sprouffske K., Wagner A. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics*. 2016; 17: 172. doi 10.1186/s12859-016-1016-7.
  11. Brown J., Pirrung M., McCue L. A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*. 2017; 33 (19): 3137–3139. doi: 10.1093/bioinformatics/btx373.
  12. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30 (15): 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
  13. Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012; 19 (5): 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
  14. Barrick J. E., Colburn G., Deatherage D. E. et al. Identifying structural variation in haploid microbial genomes from short-read resequencing data using breseq. *BMC Genomics*. 2014; 15: 1039. doi: 10.1186/1471-2164-15-1039.
  15. Гостев В. В., Сопова Ю. В., Калиногорская О. С. et al. Влияние шоковых концентраций ванкомицина на формирование гетерорезистентности *Staphylococcus aureus*. Антибиотики и химиотер. 2020; 65 (9–10): 3–7. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-9-10-3-7>. [Gostev V. V., Sopova Yu. V., Kalinogorskaya O. S., Velizhanina M. E., Lazareva I. V., Starkova P. S., Sidorenko S. V. The Effects of shock vancomycin concentrations on the formation of heteroresistance. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2020; 65 (9–10): 3–7. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-9-10-3-7>. (in Russian)]
  16. Hodiadmont C. J., van den Broek A. K., de Vroom S. L. et al. Clinical pharmacokinetics of gentamicin in various patient populations and consequences for optimal dosing for gram-negative infections: an updated review. *Clin Pharmacokinet*. 2022; 61 (8): 1075–1094. doi: 10.1007/s40262-022-01143-0.
  17. Khare A., Tavazoie S. Extreme Antibiotic persistence via heterogeneity-generating mutations targeting translation. *mSystems*. 2020; 5 (1): doi: 10.1128/mSystems.00847-19.
  18. Schaaff F., Bierbaum G., Baumert N. et al. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2003; 293 (6): 427–435. doi: 10.1078/1438-4221-00282
  19. Tuchscher L., Kreis C. A., Hoerr V. et al. *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71 (2): 438–448. doi: 10.1093/jac/dkv371.
  20. Ibacache-Quiroga C., Oliveros J. C., Couce A., Blazquez J. Parallel evolution of high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* under low and high mutation supply rates. *Front Microbiol*. 2018; 9: 427. doi: 10.3389/fmicb.2018.00427.
  21. Ng J. M. L., Ngeow Y. E., Saw S. H. et al. Mutations in atpG2 may confer resistance to gentamicin in *Listeria monocytogenes*. *J Med Microbiol*. 2022; 71 (12). doi: 10.1099/jmm.0.001618.
  22. Vestergaard M., Nohr-Meldgaard K., Bojer M. S. et al. Inhibition of the ATP synthase eliminates the intrinsic resistance of *Staphylococcus aureus* towards polymyxins. *mBio*. 2017; 8 (5). doi: 10.1128/mBio.01114-17.
  23. Liu L., Beck C., Nohr-Meldgaard K. et al. Inhibition of the ATP synthase sensitizes *Staphylococcus aureus* towards human antimicrobial peptides. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 11391. doi: 10.1038/s41598-020-68146-4.
  24. Vestergaard M., Leng B., Haaber J. et al. Genome-Wide Identification of antimicrobial intrinsic resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*. 2016; 7: 2018. doi: 10.3389/fmicb.2016.02018.
  25. Lobritz M. A., Belenky P., Porter C. B. et al. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112 (27): 8173–8180. doi: 10.1073/pnas.1509743112.
  26. Rodriguez de Evgrafov M. C., Faza M., Asimakopoulou K., Sommer M. O. A. Systematic investigation of resistance evolution to common antibiotics reveals conserved collateral responses across common human pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 65 (1). doi: 10.1128/AAC.01273-20.
  27. Desai J., Liu Y. L., Wei H. et al. Structure, function, and inhibition of *Staphylococcus aureus* heptaprenyl diphosphate synthase. *ChemMedChem*. 2016; 11 (17): 1915–1923. doi: 10.1002/cmdc.201600311.
  28. Kang K. M., Mishra N. N., Park K. T. et al. Phenotypic and genotypic correlates of daptomycin-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Microbiol*. 2017; 55 (2): 153–159. doi: 10.1007/s12275-017-6509-1.
  29. Steed M. E., Hall A. D., Salimnia H. et al. Evaluation of daptomycin non-susceptible *Staphylococcus aureus* for stability, population profiles, mprf mutations, and daptomycin activity. *Infect Dis Ther*. 2013; 2 (2): 187–200. doi: 10.1007/s40121-013-0021-7.
  30. Jiang J. H., Peleg A. Y. Daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*: the role of combination therapy with daptomycin and gentamicin. *Genes (Basel)*. 2015; 6: 4: 1256–67. doi: 10.3390/genes6041256.

## Информация об авторах

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»; доцент кафедры, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России. Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. Scopus Author ID: 55614534400

Калиногорская Ольга Серафимовна — к. м. н., научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-1419-9068. WOS Researcher ID: AAW-3832-2020. Scopus Author ID: 56525317800

Сулян Офелия Спартаковна — младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-3493-0583. WOS Researcher ID: AAB-3314-2021. Scopus Author ID: 57219423522

Чулкова Полина Сергеевна — младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных бо-

## About the authors

Vladimir V. Gostev — Ph. D. in Biology, Senior Research Fellow, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency; Associate Professor of the Department, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. Scopus Author ID: 55614534400

Olga S. Kalinogorskaya — Ph. D. in Medicine, Research Fellow, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-1419-9068. WOS Researcher ID: AAW-3832-2020. Scopus Author ID: 56525317800

Ofeliia S. Sulian — Junior Research Fellow, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-3493-0583. WOS Researcher ID: AAB-3314-2021. Scopus Author ID: 57219423522

Polina S. Chulkova — Junior Research Fellow, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia.



лезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-6279-944X. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

*Сопова Юлия Викторовна* — к. б. н., ведущий научный сотрудник, Санкт-Петербургский государственный университет; научный сотрудник, Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-7825-273X. WOS Researcher ID: N-5112-2015. Scopus Author ID: 57203508462

*Велижанина Мария Евгеньевна* — младший научный сотрудник, Санкт-Петербургский государственный университет; младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-9005-527X. Scopus Author ID: 57204238529

*Плешков Вячеслав Юрьевич* — врач-бактериолог, ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе»; лаборант-исследователь, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

*Агеев Владимир Андреевич* — к. б. н., научный сотрудник, Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900

*Сидоренко Сергей Владимирович* — д. м. н., профессор, чл.-корр РАН, заведующий научно-исследовательским отделом, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-3550-7875. WOS Researcher ID: 7875 E-5870-2011. Scopus Author ID: 7102484509

ORCID: 0000-0002-6279-944X. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

*Julia V. Sopova* — Ph. D. in Biology, Leading Research Fellow, St. Petersburg State University; Research Fellow, St. Petersburg Branch of the Vavilov Institute of General Genetics, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-7825-273X, WOS Researcher ID: N-5112-2015, Scopus Author ID: 57203508462

*Maria E. Velizhanina* — Junior Research Fellow, St. Petersburg State University; Junior Research Fellow, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-9005-527X, Scopus Author ID: 57204238529

*Vyacheslav Yu. Pleshkov* — Physician-Bacteriologist, St. Petersburg Research Institute of Emergency Medicine named after I. I. Dzhanelidze; Laboratory Assistant-Researcher, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

*Vladimir A. Ageevets* — Ph. D. in Biology, Research Fellow, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900

*Sergey V. Sidorenko* — D. Sc. in Medicine, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Research Department, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency; Professor of the Department, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-3550-7875. WOS Researcher ID: 7875 E-5870-2011. Scopus Author ID: 7102484509