

УДК: 616.34

doi:

## Резистом микробиоты кишечника как источник формирования лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний человека

Ильина Е.Н., Олехнович Е.И., Павленко А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, дом 1а

С течением времени подходы к изучению резистентности к антибиотикам трансформировались от сосредоточения на выделенных в виде чистой культуры патогенных микроорганизмах к исследованию резистентности на уровне микробных сообществ, составляющих биотопы человека и окружающей среды. По мере того, как продвигается изучение устойчивости к антибиотикам, возникает необходимость использования комплексного подхода для улучшения информирования мирового сообщества о наблюдаемых тенденциях в этой области. Все более очевидным становится то, что, хотя не все гены резистентности могут географически и филогенетически распространяться, угроза, которую они представляют, действительно серьезная и требует комплексных междисциплинарных исследований. В настоящее время резистентность к антибиотикам среди патогенов человека стала основной угрозой в современной медицине, и существует значительный интерес к определению ниши, в которых бактерии могут получить гены антибиотикорезистентности, и механизмов их передачи. В данном обзоре мы рассматриваем проблемы, возникшие на фоне широкого использования человечеством антибактериальных препаратов, в свете формирования микрофлорой кишечника резервуара генов резистентности.

**Ключевые слова:** резистентность к антибиотикам, антибактериальные препараты, микробиота, резистом, потенциал резистентности

**Для цитирования:** Ильина Е.Н., Олехнович Е.И., Павленко А.В. Резистом микробиоты кишечника как источник формирования лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний человека. Патогенез. 2017; 15(3): 20—32.

**Для корреспонденции:** Ильина Елена Николаевна, доктор биол. наук, профессор РАН, заместитель генерального директора по научной работе, e-mail: ilinaen@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности:** авторы выражают искреннюю признательность Самойлову А.Е., Стариковой Е.В., Глушценко О.Е., Пряничникову Н.А., Синицыной А.А. за помощь в подготовке настоящего обзора

Поступила 27.03.2017

## The gut microbiota resistome provides development of drug resistance in causative agents of human infectious diseases

Ilyina E.N., Olekhovich E.I., Pavlenko A.V.

Federal State Budgetary Institution «Federal Scientific and Clinical Center for Physical and Chemical Medicine» of the Federal Medical and Biological Agency, house 1a, ul. Malaya Pirogovskaya, Moscow, 119435, Russia

Over the time, studies of antibiotic resistance have transformed from focusing on pathogenic microorganisms isolated as a pure culture to analysis of resistance at the level of microbial communities that constitute human and environmental biotopes. Advancing studies of antibiotic resistance require an integrated approach to enhance availability of information about observed tendencies in this field to the global community. It becomes increasingly obvious that, even though not all resistance genes can geographically and phylogenetically spread, the threat they pose is indeed serious and requires complex interdisciplinary research. Currently, the antibiotic resistance of human pathogens has become a challenge to modern medicine, which is now focusing on determining a potential source for bacterial genes of drug resistance and mechanisms for the gene transmission. In this review, we discussed problems generated by the widespread use of antibacterial drugs in the light of forming a reservoir of resistance genes by gut microflora.

**Key words:** resistance to antibiotics, antibacterial drugs, microbiota, resistome, resistance potential.

**For citation:** Ilyina E.N., Olekhovich E.I., Pavlenko A.V. The gut microbiota resistome provides development of drug resistance in causative agents of human infectious diseases. Pathogenesis. 2017; 15(3): 20—32 (In Russian).

**For correspondence:** Ilyina Elena Nikolaevna, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director General for Research, e-mail: ilinaen@gmail.com

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments:** The authors are sincerely grateful to Samoilov A.E., Starikova E.V., Glushchenko O.E., Pryanichnikova N.A., Sinityna A.A. for assisting in the preparation of this review.

Received 27.03.2017

## Введение

Начальные этапы использования антибиотиков в клинической практике характеризовались акцентом в изучении резистентности исключительно патогенных микроорганизмов, а также разработкой новых видов антибиотиков с разнообразными механизмами действия. В эту эпоху, черпая вдохновение в постулатах Коха [57, 58], приоритетным направлением научных изысканий было, в первую очередь, выделение чистой культуры патогенных микроорганизмов, устойчивых к какому-либо одному препарату, и изучение генов резистентности. На следующем витке исследований ученые переключили свое внимание с отдельных представителей микрофлоры на микробные сообщества. В этот период для выявления антибиотикорезистентности как комменсальных, так и патогенных бактерий из различных мест обитания были использованы метагеномные подходы. Именно к этому периоду относится возникновение термина «резистом», отражающего совокупность всех детерминант резистентности, обнаруживаемых в метагеномном образце. Наряду с исследованием метагеномов образцов окружающей среды как потенциальных источников разнообразия генов резистентности, особое внимание было уделено изучению совокупного потенциала резистентности микробиоты кишечника, как основного биотопа человека. Сегодня, опираясь на накопленную мировым сообществом информацию, мы вынуждены признать, что микробиота кишечника человека является наиболее вероятной нишей для обмена генетическим материалом между комменсалами и патогенами, приводя, в том числе, к формированию мультирезистентных штаммов бактерий. В настоящем обзоре мы проводим краткий экскурс в историю исследований резистомы и приводим собственные данные по оценке потенциала резистентности различных групп населения. Стоит отметить, что сейчас мы вступаем в новую эпоху исследований резистентности к антибиотикам, признавая повсеместность ее распространения, что заставляет предпринять серьезные усилия в разработке новых схем применения антибактериальных препаратов и увеличить интенсивность наблюдений за возникающими угрозами, сосредоточив внимание на распространение генов антибиотикорезистентности.

## Антибиотики — величайшее открытие XX века

Открытие антибиотиков по праву расценивают как наиболее значимое в XX веке в сфере здравоохранения. Действительно, эти жизненно важные препараты неопределимы в силу их способности убивать или подавлять рост оппортунистических микроорганизмов без повреждения клеток и тканей хозяина. Применение антибиотиков в медицине очень быстро привело к беспрецедентному снижению детской смертности и увеличению продолжительности жизни взрослого населения на 10–15 лет. Помимо непосредственной терапии смертельно опасных инфекционных заболеваний, антибиотики позволили медикам разработать новые инвазивные средства лечения, которые ранее были невозможны или небезопасны ввиду

высокого сопутствующего риска заражения. Большинство антибиотиков являются природными продуктами или их производными, выделенными от культивируемых почвенных микроорганизмов [20], в частности принадлежащих к *Streptomyces* spp. [120].

Период с 40-х по 90-е годы XX века называют «золотым веком» антибиотиков, поскольку именно тогда были открыты основные группы антибактериальных препаратов, большинством которых мы продолжаем использовать в медицинской практике и по сей день. С «золотым веком» антибиотиков непосредственно связана первая эпоха исследований антибиотикорезистентности.

Одним из первых сообщений о резистентности к антибиотикам было обнаружение того, что свободный от клеточек экстракт из культуры *Escherichia coli*, которая не подвергалась воздействию антибактериальных препаратов, способен инактивировать пенициллин, что указывает на его ферментативную деградацию [2]. Широкое использование пенициллина в больницах привело в 1953 году к пандемии, вызванной пенициллин-устойчивыми *S. aureus* phage-type 80/81, прервать которую удалось только при помощи метициллина [24]. Вскоре после этого сообщалось о появлении устойчивых ко многим препаратам штаммов *Shigella* spp, вследствие явного горизонтального переноса генов от фекальных штаммов *E. coli*. Примечательно, что такие случаи происходили в стационаре у пациентов в ходе их лечения антибиотиками [4].

Известно, что резистентность в популяции восприимчивых бактерий может возникнуть путем накопления мутаций (например, точечные мутации в ДНК-гиразе, придающие устойчивость к хинолонам) или путем получения генов устойчивости, которые защищают клетку от антибиотиков. При этом гены антибиотикорезистентности могут вызывать фенотипическую резистентность с помощью различных механизмов, включая ферментативную инактивацию антибиотика, модификацию антибиотической мишени и предотвращение накопления летальных внутриклеточных концентраций антибиотика через эффлюкс насосы [5]. Временная шкала открытия антибиотиков представлена на рис. 1.

Хотя феномену резистентности мы стали уделять повышенное внимание именно в эпоху антибиотикотерапии, само явление устойчивости такое же древнее, как и сами бактерии. Секвенирование древней ДНК из окружающей среды, сохранившейся в отложениях 30 000-летней мерзлоты, позволило обнаружить гены, устойчивые к нескольким классам антибиотиков [30], а непосредственное изучение бактерий, культивированных из пещеры, которая не имела антропогенного контакта за последние четыре миллиона лет, выявило значительную резистентность к 14 антибиотикам [17]. Аналогично было обнаружено, что микробиота коренных народов Южной Америки, ранее не контактировавших с антибиотиками, содержит несколько детерминант резистентности [26]. Таким образом, устойчивость к антибиотикам существовала задолго до того, как эти молекулы стали использоваться человеком в лечении заболеваний. Этот факт объясняется тем, что «антибиотики» на самом деле являются

прежде всего сигнальными молекулами для бактериального общения, и становятся антимикробными только в концентрациях, намного превышающих концентрации, в которых они использовались бактериями первоначально [12, 80, 91, 100]. Кроме того, антибиотики могут функционировать как сигнальные молекулы, которые могут вызывать процессы бактериального развития, такие, как образование биопленки, способствующую выживанию микроорганизмов [7, 60].

В течение продолжительного времени проблемы терапии новых резистентных штаммов, возникающих в различных бактериальных таксонах, решались путем разработки и выпуска нового антибиотика. Появление резистентных бактерий даже приветствовалось как возможность увеличить долю рынка антибиотиков [20]. В этот период резистентные бактерии в основном идентифицировали культуральными методами с последующей расшифровкой молекулярных механизмов наблюдаемого фенотипа. Итогом этого периода стало накопление фундаментальных знаний о генетических основах формирования лекарственной устойчивости, послужившее основой для реализации современных метагеномных проектов.

#### Резистом и подходы к его исследованию

С 2006 г. был предложен термин «резистом» [29] для определения совокупности набора генетических детерминант в каком-либо объекте — организме, сообществе, экосистеме, и т.д., вплоть до биосферы в целом, подчеркивая, в частности, резистом почвы, как «резервуар», внутри которого развивается потенциал антибиотикорезистентности до передачи их клинически-значимым микроорганизмам. Понятие резистом охватывает как собственные, так и приобретенные гены устойчивости, а

также гены прото-резистентности и молчащие гены антибиотикорезистентности [90, 92, 119]

На данный момент доказано, что гены резистентности, идентифицируемые в клинически-значимых бактериальных патогенах, берут свое начало от микроорганизмов окружающей среды. Эта гипотеза была впервые высказана Бенвенистом и Дэйвисом [16], которые в 1973 году обнаружили биохимически сходные ацетилтрансферазы, обеспечивающие резистентность к канамицину, в почвенных бактериях *Streptomyces* spp. и клинических штаммах патогенной *E. coli*. В последние несколько десятилетий благодаря техническим достижениям в молекулярной биологии и секвенировании нуклеиновых кислот сформировалась философия резистома, которая признает окружающую среду как исходный источник генов резистентности и как вместилище их разнообразия. Недавний функциональный скрининг метагеномов почвы продемонстрировал наличие природных генов устойчивости к антибиотикам, которые имеют более 99% сходство с нуклеотидной последовательностью детерминант резистентности, обнаруживаемых в патогенных изолятах [41]. Наблюдаемое объединение этих генов с мобильными элементами указывает на то, что они являются вероятными кандидатами для распространения в микробных популяциях путем горизонтального переноса.

Подходы, реализуемые для исследования резистома, неразрывно связаны с общим научно-техническим прогрессом. Выделение бактериальной культуры с последующей характеристикой полученных лабораторных штаммов долгое время оставалось основным методом исследования фенотипического и генетического разнообразия микробных популяций. Однако изоляция всего многообразия кишечных бактерий долгое время считалась невозможной [96], и, как следствие, информация о генах резистентности к антибиотикам в кишечных комменсалах и

#### Хронология открытия различных классов антибиотиков

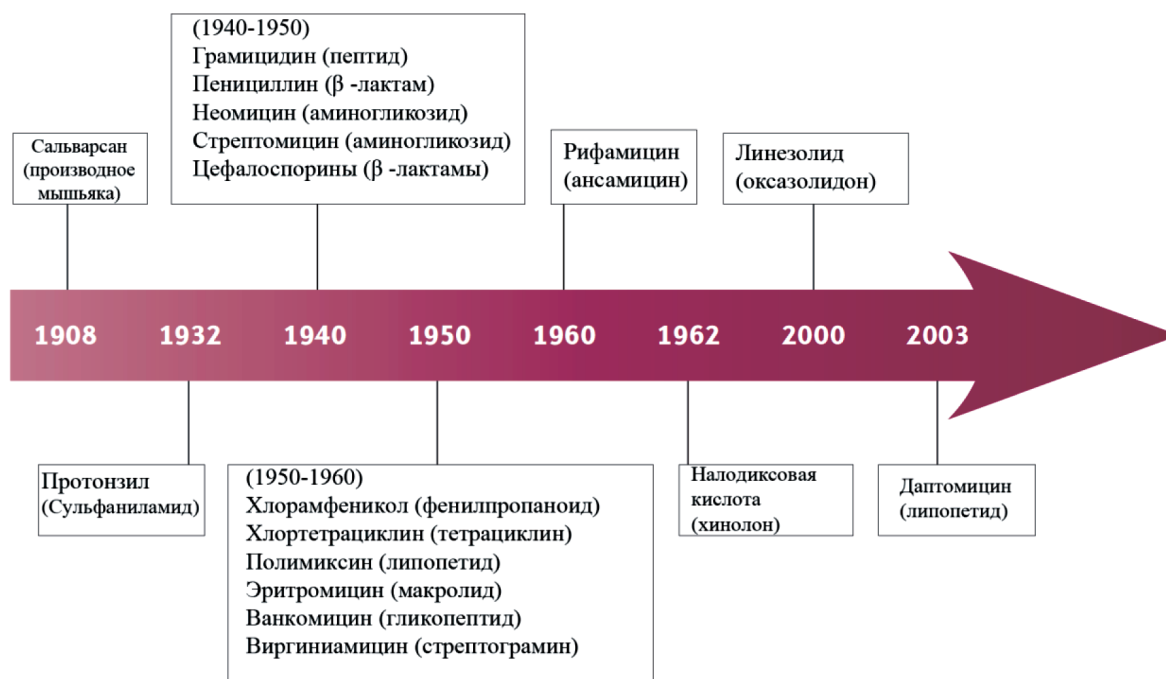


Рис. 1. Временная шкала разработки антибиотиков [119].

о том, как эти гены связаны с мобильными элементами накапливалась крайне медленно. Тем не менее, исследования на основе культур 1970-х и 1980-х годов показали, что анаэробные кишечные комменсалы видов *Bacteroidales* и *Clostridiales* могут нести детерминанты резистентности к антибиотикам. Эти бактерии могут переносить гены антибиотикорезистентности *in vitro* не только близкородственным бактериям, но и патогенам [48, 84, 101, 121]. Не так давно сравнительные геномные исследования были выполнены для *Bacteroidales* [27] и *Enterococcaceae* [65, 78], которые служат резервуарами генов антибиотикорезистентности. Временная шкала развития антибиотикорезистентности представлена на рис. 2.

Разработка геномных методов, которые позволяют проводить независимое от «культуральных методов» исследование разнообразных экологических микробных сообществ, является решающим фактором сдвига парадигмы в изучении резистомов [3, 8, 87, 116]. Это иллюстрируется ростом каталога известных генов резистентности, который произошел наряду с быстрым снижением затрат на секвенирование. Начиная с 1986 года в базе данных UniProt [109] наблюдается экспоненциальное увеличение количества гипотетических детерминант резистентности, классифицированных как β-лактамазы, хлорамфеникол-ацетилтрансферазы или тетрациклин-эффлюксные помпы. Сегодня совокупность известных генов резистентности объединяют открытые базы данных, самые известные из которых ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database, <https://ardb.cbcb.umd.edu>) [68] (поглощена Comprehensive Antibiotic Resistance Database, <https://card.mcmaster.ca>) [53, 55], ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) [124], ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene Annotation, <http://en.mediterranee-infection.com/article.php?leref=283%26titre=arg-annot->), MEGARes (<http://megares.meglab.org/>) [64], Resfams [44] (<http://www.dantaslab.org/resfams/>) и база данных детер-

минант резистентности к биоцидам и тяжелым металлам BacMet (<http://bacmet.biomedicine.gu.se/>) [77].

К сожалению, отсутствие во многих случаях функциональной валидации генов антибиотикорезистентности в этих базах данных ставит под сомнение, являются ли все они действительными детерминантами резистентности. В частности, ARDB [68] содержит много генов, которые имеют неясную роль в формировании антибиотикорезистентности. Например, в составе Van-оперонов гены *vanRA* и *vanRG* участвуют в регуляции транскрипции генов резистентности к ванкомицину у энтерококков [62]. Однако, будучи регуляторными генами, они широко представлены в микробных популяциях вне оперонной структуры, и в этом случае не играют никакой роли в развитии резистентности к ванкомицину [6].

Одним из методов, который оказался полезным для обнаружения новых детерминант резистентности, является функциональная метагеномика. Функциональная метагеномика была впервые описана в 2000 году, как способ доступа к разнообразным биохимическим процессам, закодированным в некультивируемом почвенном метагеноме [94], и доказала свою важность для характеристики резистомов.

Эта методика состоит из клонирования фрагментов метагеномной ДНК в векторы экспрессии для скрининга интересующего фенотипа (например, резистентности к антибиотикам) в более удобном организме-хозяине, например, *E. coli*. Что позволяет обходить узкое место, связанное с невозможностью культивирования ряда бактерий, и точно выбирать гены, которые могут распространяться посредством горизонтального переноса, поскольку обнаруживаются только фенотипы, которые переносятся хозяину [45, 110]. Однако устойчивость к антибиотикам, возникающая в результате мутаций антибиотической мишени, например, резистентность к хинолонам, обусловленная мутациями в ДНК-гиразе [59], не всегда может быть обнаружена при функциональном метагеномном скрининге. Единичный ген, выделенный от устойчивого микроорганизма и клонированный в экспрессирующий

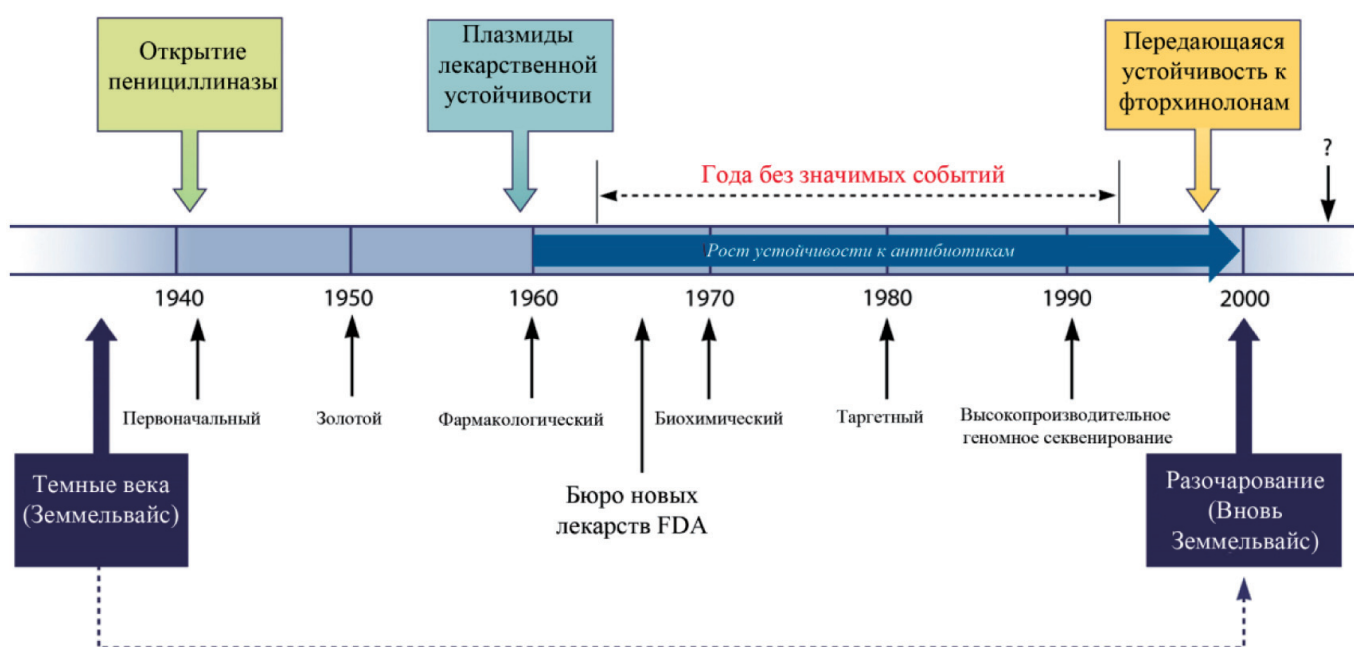


Рис. 2. Временная шкала формирования резистентности к антибиотикам в процессе их применения и открытия новых [28].

вектор, как правило не оказывает влияния на чувствительный фенотип хозяина, реализуемый за счет собственных не мутантных ферментов.

Первым микробным сообществом человека, которое было подвергнуто функциональному метагеномному анализу, был микробиом полости рта. Скрининг небольшой функциональной библиотеки, построенной из образцов ДНК, выделенной из зубного налета и слюны на тетрациклин, привел к открытию *tet37* гена, который кодирует фермент, дезактивирующий тетрациклин, и который имеет низкую степень гомологии с любой ранее описанной детерминантой резистентности к данной субстанции [35]. В другом функциональном метагеномном исследовании фрагменты метагеномной ДНК из образцов слюны и фекалий двух здоровых доноров отбирали на панели из 13 антибиотиков [102]. Последовательности 95 уникальных фрагментов, изолированных от фенотипически-устойчивых клонов, в значительной степени отличались от ближайших известных генов резистентности. Например, 10 новых  $\beta$ -лактамов были идентифицированы только в двух кишечных микробиомах. Примечательно, что эти микробиомы охватывали большее филогенетическое разнообразие лактамаз, чем все ранее описанные  $\beta$ -лактамазы.

#### Резистом микробиоты кишечника человека

Человеческий желудочно-кишечный тракт содержит большой и разнообразный пул бактерий различных видов, который играет важную роль в функционировании организма человека. Количество бактерий изменяется по длине желудочно-кишечного тракта, варьируя от менее чем 103 бактерий на мл содержимого в желудке и двенадцатиперстной кишке, увеличиваясь до 10<sup>4</sup>–10<sup>7</sup>/мл бактерий в тонкой и подвздошной кишке. Наибольшая бактериальная нагрузка приходится на толстую кишку, где концентрация бактерий достигает 10<sup>11</sup>–10<sup>12</sup>/мл [99]. Микробиота кишечника относительно стабильна у здорового взрослого населения, но ее состав может меняться из-за изменений диеты, болезней и использования антибиотиков [34, 37].

Учитывая высокую плотность сообщества, микробиота кишечника обладает широкими возможностями для горизонтального обмена генетической информацией, в частности генами антибиотикорезистентности. Многочисленные исследования микробиоты кишечника различных групп населения, в том числе здоровые взрослые [25], здоровые близнецы и их матери [43, 72, 73], недоношенные новорожденные [45], бесконтактные непривычные к антибиотикам индейцы [26], показали, что, хотя резистом человека, постоянно проживающего в каком-то месте, обогащается после антибактериальной терапии [45], кишечник содержит экстенсивный резистом даже в отсутствие антропогенного использования антибиотиков [17, 79].

Горизонтальная передача генетического материала, включая гены антибиотикорезистентности, путем конъюгации и трансдукции является частым явлением в кишечной микробиоте, но в основном затрагивает непатогенные кишечные комменсалы, так как они доминируют в микробиоте здоровых людей. Передача генов антибиотикорезистентности от комменсалов обитающим в кишечнике патогенам, по-видимому, является относительно

но редким событием, но может способствовать возникновению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, что иллюстрирует распространение детерминант резистентности к ванкомицину среди анаэробных кишечных комменсалов и нозокомиальных патогенов *Enterococcus faecium*.

Подавляющее большинство бактерий, населяющих кишечник человека, являются строго анаэробными. Два типа, Bacteroidetes и Firmicutes, обычно доминируют в кишечной микробиоте здорового взрослого населения. Бактерии этих типов выполняют важные для физиологии человека функции, такие, как производство витаминов и процессинг поступающих с пищей веществ. Вдобавок, несколько факультативно анаэробных бактерий семейств Enterobacteriaceae и Enterococcaceae являются постоянными членами микробного сообщества кишечника человека, но в целом их представленность значительно (примерно в 100 раз) ниже, чем строго анаэробных комменсалов [86, 126].

Стоит отметить, что Enterobacteriaceae и Enterococcaceae представляют особый интерес, поскольку среди видов, входящих в эти группы — *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, сформировались мультирезистентные штаммы, вызывающие нозокомиальные инфекции [91, 112]. Очевидно, кишечник может служить резервуаром для оппортунистических патогенов, вызывающих инфекции у лиц с ослабленным иммунитетом. Роль кишечника как источника оппортунистических инфекций особенно актуальна для пациентов, пребывающих в отделениях интенсивной терапии. Большие количества антибиотиков, которые используются при ведении таких больных, способствуют формированию устойчивых ко многим лекарствам оппортунистических патогенов в кишечной микробиоте. Путем транслокации через кишечный барьер или после фекального заражения кожи и других участков тела оппортунистические патогены из кишечника могут вызывать генерализованные инфекции, вплоть до септических осложнений [12, 112].

#### Источники обогащения резистома микробиоты кишечника

Древнее происхождение антибиотиков и резистентности к ним делает неудивительным то, что крупномасштабное клиническое и сельскохозяйственное использование этих соединений привело к увеличению потенциала резистентности микробных популяций. Надежные доказательства повышения устойчивости окружающей среды найдены в образцах почвы десятилетней давности, в которой увеличивающееся количество генов устойчивости к антибиотикам коррелирует с промышленным производством и использованием этих лекарственных средств [56].

Наибольшая экологическая нагрузка антибиотиками происходит сейчас от их промышленного производства [28], которое по очень приближенным оценкам составляет миллионы тонн в год [98]. Антибиотики попадают в окружающую среду через потоки отходов жизнедеятельности человека, поскольку значительная доля антибиотиков выводится из организма практически неизменной [95].

Устойчивость к антибиотикам среди комменсалов и патогенов человека [46, 63, 89], а также в биотопах окру-

жающей среды [27] значительно возросла за последнее столетие, отражая широкое распространение адаптации бактерий к их воздействию, что указывает на две проблемы. Первая заключается в том, что человечество проиграло бактериям «гонку вооружений». Факты свидетельствуют, что если резистентность к первым широко используемым антибиотикам, сульфаниламидам, была отмечена только через 6 лет после их массового использования [66], то совсем недавно устойчивость к тигециклину была идентифицирована еще до его введения в клиническую практику [72]. Вторая проблема — это наш относительно близорукий, хотя и понятный, акцент на проблеме резистентности исключительно клинически-значимых микроорганизмов. Очевидно, что антибиотики наиболее эффективны при лечении патогенов человека, иначе они не были бы антибиотиками. Но наш акцент на нескольких патогенных «деревьях» вначале привел к тому, что мы не замечали влияния антибиотиков на «лес» бактерий окружающей среды. Стоит помнить, что мишени воздействия большинства антибиотиков являются высоко консервативными и важными для жизнедеятельности бактериальной клетки элементами, и поэтому, когда мы смотрим на огромное разнообразие непатогенных бактерий, неудивительно видеть, что все роды бактериального царства развили механизмы резистентности, которые защищают эти жизненно важные процессы.

Одним из источников формирования резистомы микробиоты кишечника несомненно является медикаментозное применение антибиотиков, что подтверждается тестами на чувствительность микробных изолятов кишечника до и после лечения [52]. Хотя некоторое обогащение детерминант резистентности, по-видимому, является временным [88], в других исследованиях [50, 51] показано со-

хранение приобретенных генов резистентности на срок до 2–4 лет. На демографическом уровне прослеживается очевидная связь между близостью населения к современной медицине и устойчивостью к антибиотикам микробиома кишечника [13, 19, 47–67]. Например, *Walson et al.* [114], продемонстрировали относительно низкую представленность резистентности среди бактерий из фекальных образцов жителей, изолированных от цивилизации непальских деревень. Это наблюдение согласуется с результатами, полученными при обследовании отдаленной перуанской общины [14].

Особый интерес представляют сельскохозяйственные резистомы, поскольку селективное давление на широкое использование антибиотиков и значительное антропогенное взаимодействие делают это место обитания зоной высокого риска для выбора и распространения резистентности к антибиотикам. Действительно, *mcg1* индуцированная плазмидой детерминанта резистентности к колистину была впервые обнаружена на китайской свиноферме [69], хотя с тех пор она была детектирована в клинических и природных образцах по всему миру [18, 22, 33, 40, 55, 74, 105, 113, 118].

Неправильное и чрезмерное использование в медицине может быть только частью проблемы. Существенный вклад в формирование базового уровня резистентности микробиоты кишечника человека вносит потребление продукции сельского хозяйства, так называемый «farm-to-fork» («от-фермы-до-вилки») путь передачи. В 1940-х годах было обнаружено, что индюки, питающиеся стрептомицетами, набирают живую массу быстрее и больше, что впоследствии было продемонстрировано для многих сельскохозяйственных животных [15, 36, 70]. Учитывая также, что профилактическое лечение промышлен-

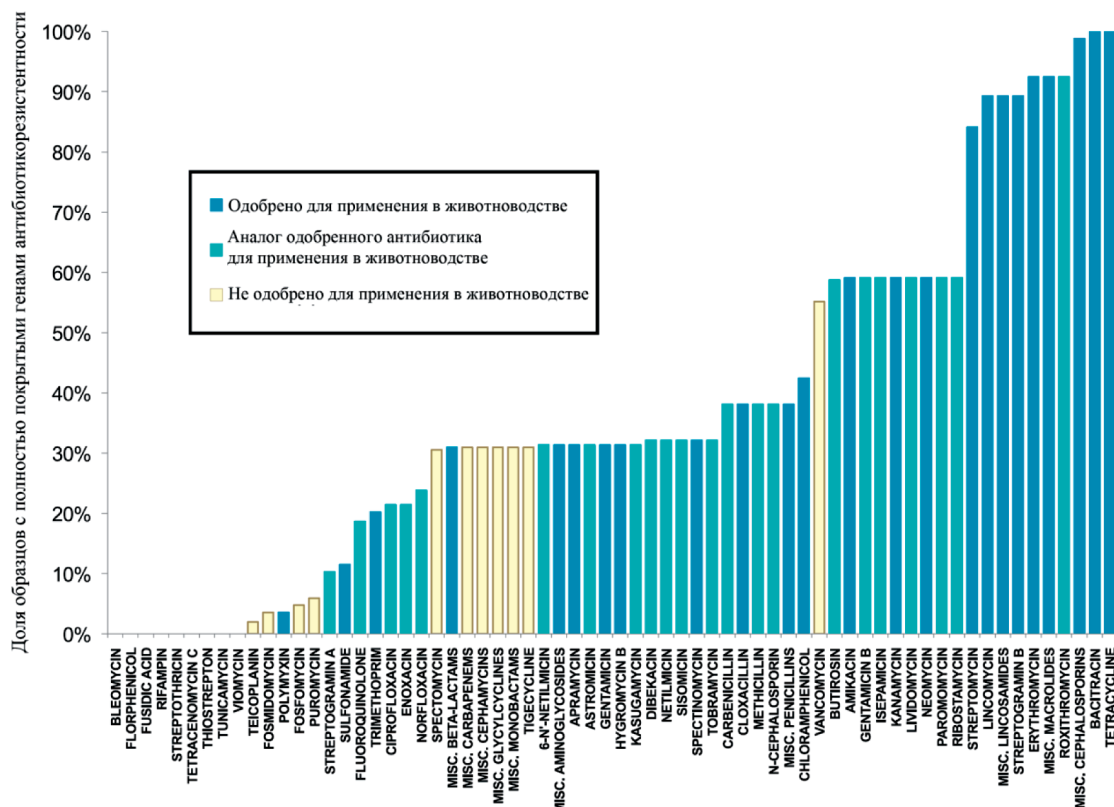


Рис. 3. Встречаемость детерминант резистентности в 252 метагеномах [42].

ных животных, производящих пищевые продукты, предотвращает трансмиссивные заболевания, «лечебный корм» и вода, содержащие антимикробные препараты, быстро стали стандартной практикой во всем мире [9, 70]. Риск увеличения отбора на устойчивость к антибиотикам в производстве продуктов питания был признан ранее [104], но только сейчас европейское законодательство стало накладывать ограничения на эту практику [9, 23, 70, 83, 85]. Это законодательное действие было предпринято в ответ на исследования, свидетельствующие о том, что «farm-to-fork» передача резистентности произошла и может продолжаться [9, 15, 106, 107, 111, 115, 117].

В целом, из того, что мы знаем, использование антибиотиков в производстве продуктов питания способствует росту резистентности комменсальной и патогенной микрофлоры, но масштабы этого вклада еще не определены количественно. Использование антибиотиков в производстве пищевых продуктов в настоящее время сильно ограничено, а различные движения поддерживают полный запрет этой практики в странах Европы и США [85].

Стоит отметить, что результаты одного из первых метагеномных исследований резистенции кишечника здорового населения [42] продемонстрировали преимущественное распространение генов резистентности к антибиотикам, применяемым в сельском хозяйстве, или их производным (рис. 3).

#### **Географическая и индивидуальная вариабельность резистомов**

Проведенные недавно исследования резистенции кишечника здоровых людей [32, 42, 49, 102] и лиц с различными патологиями [21, 81] метагеномным секвенированием и функциональной метагеномикой продемонстрировали, что микробиота кишечника человека обладает высоким потенциалом резистентности и формирует обширный резервуар генов антибиотикорезистентности. Среди 252 фекальных метагеномных образцов, полученных от отдельных лиц в Испании, Италии, Дании, Франции, Малави, США и Японии Forslund et al. [42] обнаружили гены резистентности для 50 из 68 классов антибиотиков, в среднем 21 ген антибиотикорезистентности на образец. Nu et al. [49] среди 162 данных по метагеномным образцам из Китая, Дании и Испании, частично перекрывающимся с анализом Forslund et al., выявили в общей сложности 1093 гена устойчивости к антибиотикам. Гены, обеспечивающие устойчивость к тетрациклину (tet32, tet40, tetO, tetQ и tetW), присутствуют в микробиоте всех индивидуумов и являются наиболее распространенным семейством генов устойчивости [42, 49].

Интересно, что люди из стран с относительно низким уровнем применения антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве (в частности, в Дании в этих исследованиях) имеют более низкий уровень генов антибиотикорезистентности в микробиоте кишечника, чем люди из стран, где использование антибиотиков значительно выше, например, в Испании и Китае. Этот вывод показывает, что политика, касающаяся использования антибиотиков в медицине и ветеринарии, может оказать значительное влияние на относительное обилие генов устойчивости к антибиотикам в кишечной микробиоте жителей разных стран [42, 49].

Недавно метагеномное секвенирование было использовано для изучения резистентности кишечника у паци-

ентов во время госпитализации [21, 81]. Как и в исследованиях, обсуждавшихся выше, было обнаружено, что в микробиоте исследованных пациентов обнаружено много генов устойчивости к антибиотикам. Например, Vuelow et al. [21] обнаружили, что относительное количество генов, которые придают устойчивость к аминогликозидам, увеличивается во время пребывания в больнице, особенно во время госпитализации в отделение интенсивной терапии. Расширение резистенции может быть связано с использованием тобрамицина (аминогликозидного препарата), который используется как часть профилактической антибактериальной терапии, называемой селективной дезактивацией пищеварительного тракта, которая применяется в некоторых европейских странах для снижения риска инфекции с участием оппортунистических патогенов во время госпитализации [31]. Аналогичные эффекты на резистенции наблюдались в метагеномном исследовании, в котором четыре пациента получали разные курсы антибиотиков [81]. Однако использование антибиотиков не всегда приводит к расширению резистентности кишечника у пациентов, и гены устойчивости из микробиоты человека могут даже быть искоренены во время антибактериальной терапии [21, 81]. Это может произойти во время комбинированной терапии, когда одновременно используются два (или более) антибиотика: когда бактерия несет ген устойчивости к одному из антибиотиков, но все еще чувствительна к другому антибиотику, который используется во время терапии, ген устойчивости будет потерян для микробного сообщества.

При реализации инициативного проекта по анализу особенностей кишечной микрофлоры населения России научным коллективом нашего Центра полученные метагеномные данные для 96 здоровых добровольцев [108]. Последующий анализ этих данных позволил установить особенности потенциала резистентности жителей России в сравнении с данными из других частей света (рис. 4). Согласно полученному распределению, распространенность генов резистентности в России ближе по данному показателю к Китаю, и значимо выше, чем в образцах, выделенных в США и странах Европы. Можно предположить, что существующая политика применения антибиотиков в нашей стране, как и в Китае, привела к расширению массовой доли генов антибиотикорезистентности в кишечной микробиоте человека.

Сравнительный анализ представленности генов резистентности в группе здоровых добровольцев и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) также позволил зафиксировать характерные отличия [1]. Поскольку синдром хронической бронхиальной обструкции создает благоприятные условия для бактериальной контаминации дыхательных путей у больных ХОБЛ, при лечении обострения ХОБЛ обычно назначаются системные антибиотики, прием которых может привести к развитию антибиотикорезистентности микроорганизмов в различных экологических нишах организма, в том числе желудочно-кишечного тракта.

Хотя гены антибиотикорезистентности были обнаружены как в метагеномах здоровых людей, так и пациентов с ХОБЛ, относительная представленность генов антибиотикорезистентности в группе больных ХОБЛ была достоверно выше. Наиболее представленными оказались гены резистентности к тетрацикламам, макролидам, цефалоспорином, ванкомицину и линкозамидам. Стоит отметить,

что данные препараты наиболее часто используются в клинической практике, в том числе и в пульмонологии. Во всех исследованных образцах кишечной микробиоты пациентов с ХОБЛ был идентифицированы гены *ermB* и *mef*. Данные гены обеспечивают устойчивость микроорганизмов к макролидам, куда входят наиболее востребованные при обострении ХОБЛ антибиотики — азитромицин и кларитромицин.

### Возможности системного анализа резистома

Опубликованные обширные объемы метагеномных данных дают возможность оценить изменение резистентности к антибиотикам между здоровыми популяциями мира, а также некоторыми клиническими когортами. Одним из примеров такого инструмента является интерактивный ресурс **ResistoMap** (<http://resistomap.rcpcm.org/>), предназначенный для всесторонней визуализации потенциала резистентности на основании метагеномных данных [123]. Возможности инструмента включают визуализацию присутствия генов, точечных мутации, обуславливающих резистентность к антибиотикам, а также генов, обеспечивающих устойчивость к биоцидам и тяжелым металлам. ResistoMap — это перспективный инструмент для изучения глобального ландшафта резистентности кишечника с целью выявле-

ния национальных особенностей приема антибиотиков, корреляции композиции резидома с различными внешними факторами и создания биомедицинских гипотез, которые могут помочь контролировать лекарственную устойчивость в глобальном масштабе (рис. 5).

В настоящий момент ресурс содержит данные 1638 метагеномных образцов, полученных от индивидов из 15 стран. Для каждого образца указана страна происхождения, представлена информация о поле, возрасте и клиническому статусу пациента. Поскольку ресурс является общедоступным, ожидается последовательное пополнение имеющейся базы данных, что позволит в дальнейшем сформировать исчерпывающую картину распространения устойчивости через микробиоту кишечника (в перспективе всей микробиоты человека) в мировом масштабе и подсказать новые идеи по оптимизации схем применения антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве.

С другой стороны, лавинообразное накопление метагеномных данных способствует разработке новых алгоритмов, позволяющих выявить пути передачи генов резистентности в микробных популяциях.

Как известно, горизонтальный перенос генов антибиотикорезистентности между бактериями может осуществляться тремя механизмами: путем трансформации, конъюгации и трансдукции. Вопрос о преобладании ка-

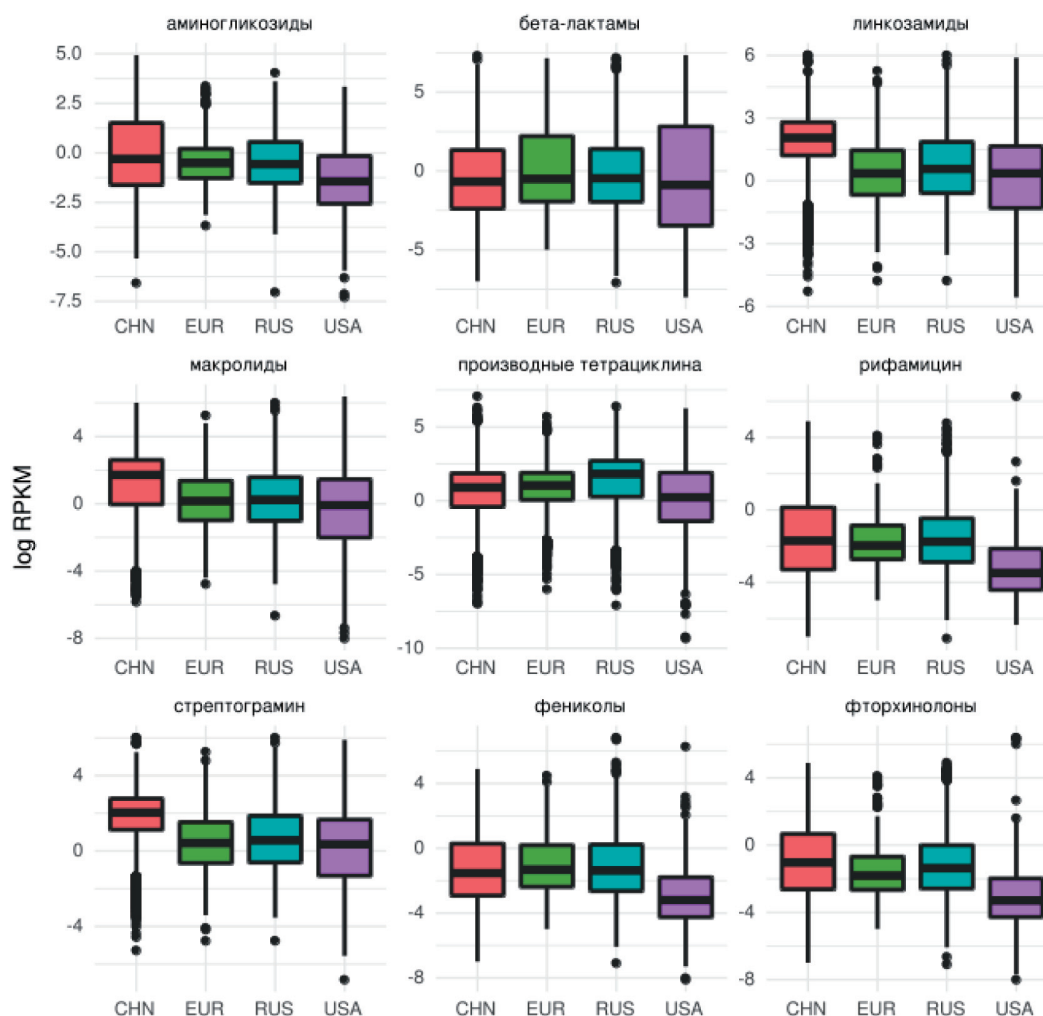


Рис. 4. Географические отличия в представленности генов антибиотикорезистентности в метагеномных образцах России (RUS), Китая (CHN), западной Европы (EUR), и США (USA).



кого-либо из этих путей переноса генов остается открытым. В исследовании, проведенном на 1642 фаговых геномах и 1571 бактериальном геноме, было показано, что 0,21% фагов и 0,97% профагов переносят гены антибиотикорезистентности, с преобладанием генов устойчивости к макролидам и аминогликозидам [54]. Однако гены резистентности, предсказанные в составе фаговых геномов на основе гомологии к известным генам антибиотикорезистентности, не подтвердили своих антибиотических свойств в экспериментах *in vitro* [38].

В то же время, в некоторых исследованиях отмечается преобладание фаговых путей в распространении генов антибиотикорезистентности. Так, высокая частота переноса этих генов посредством бактериофагов была отмечена в кишечнике мышей, принимавших антибиотики, причем повышалась частота переноса генов устойчивости и к другим антибиотикам, не связанным с принимаемыми [71]. Большое количество генов антибиотикорезистентности было обнаружено в виромах, полученных из образцов мокроты больных, страдающих муковисцидозом [39], вследствие чего возникло предположение о ведущей роли фагов в распространении лекарственной устойчивости [93]. Метагеномный анализ образцов сточных вод больниц показал, что относительная распространенность генов резистентности в вирусной фракции (0,26%) была выше, чем в бактериальной (0,18%) [103].

Кроме того, в исследованиях *in vitro* было показано, что умеренный фаг *Bacillus anthracis* Wβ переносит ген устойчивости к фосфомицину [97]. Перенос генов антибиотикорезистентности был показан также для сателлит-

ных фагов *Staphylococcus aureus* и индуцированных профагов из изолятов *Salmonella enterica* [125]. Стоит отметить, что некоторые гены антибиотикорезистентности были обнаружены в виrome, выделенном из образца копролита XIV века [11].

Недавно коллективом ФНКЦ ФХМ совместно с лабораторией «Компьютерные технологии» университета ИТМО (Санкт-Петербург) разработан алгоритм анализа метагеномных данных MetaCherchant [75]. Этот алгоритм, основанный на построении графов де Брейна [82], позволяет восстанавливать геномный контекст генов антибиотикорезистентности и выдвигать гипотезы относительно горизонтального переноса в пределах микробиоты у одного и того же пациента в ходе антибиотикотерапии. Пример результатов работы алгоритма представлен на рис. 6.

### Терапия следующего поколения

Ключевой аспект, который требует внимания в изучении резистентности к антибиотикам следующего поколения — это активное развитие терапевтических стратегий противодействия возникающей антибиотикорезистентности. Одной из сторон этого подхода является усиление внимания к потенциалу резистентности при разработке новых и улучшенных антибиотиков. Существующие в настоящее время системы обнаружения и разработки антибиотиков учитывают только механизмы уже получившие распространение в клинической практике. В ретроспективе, мы знаем, что эта стратегия обречена на провал, по-

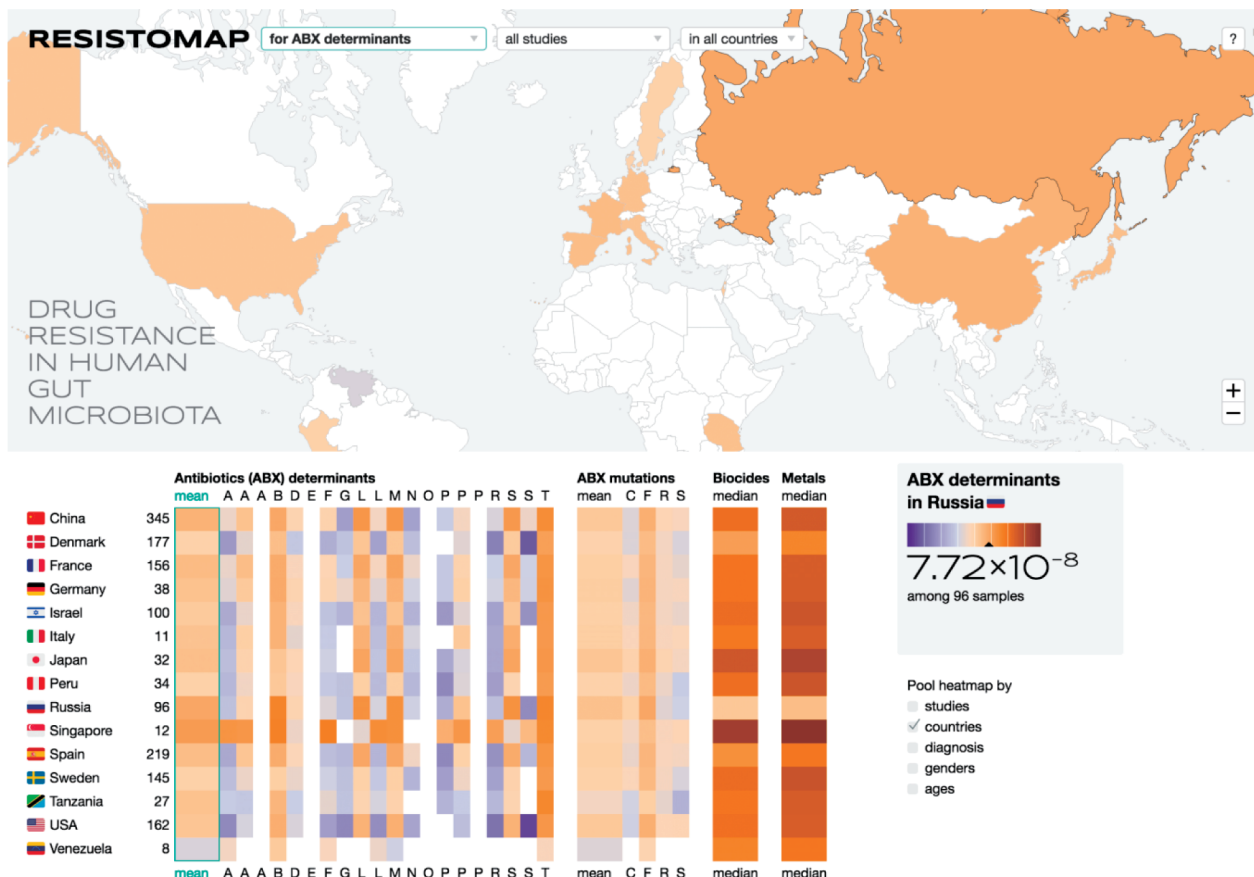


Рис. 5. Ресурс ResistoMap (<http://resistomap.rcpcm.org/>), отражающий распространение AP-генов в кишечной микробиоте на основе мировых данных [123].

сколькo резистентность наблюдалась для каждого антибиотика, который применяется для лечения людей [66]. Двигаясь вперед, мы должны улучшать текущие противодействующие стратегии путем скрининга перспективных соединений на резистентность к различным функциональным метагеномным библиотекам. Это выявит существующие механизмы резистентности, которые могут распространяться в клинических условиях после введения нового антибиотика для клинического применения.

Экстенсивное изучение резистомы в течение последних нескольких десятилетий позволило нам начать понимать скрытые механизмы формирования и распространения резистентности и предпринять некоторые шаги к устранению существующих угроз. Тем не менее, очевидно, что устойчивость будет продолжать развиваться и распространяться, несмотря на наши усилия по разработке новых антибактериальных средств. Если нынешняя практика не будет изменена, будет все труднее установить и поддерживать даже переходный контроль над бактериями в этой «гонке вооружений». Современный подход исследований в области антибиотикорезистентности предполагает использование комбинации функциональной метагеномики, технологий NGS и передовых вычислительных методов для мониторинга эволюции и распространения резистентности до того, как определенная детерминанта проявится в геноме патогена или в клиническом окружении, а также в активно развивающейся терапии следующего поколения, которая нацелена на эти детерминанты резистентности.

### Список литературы

1. Федосенко С.В., Огородова Л.М., Деев И.А., Тяхт А.В., Попенко А.С., Карнаушкина М.А., Кострюкова Е.С., Куликов Е.С., Кириллова Н.А., Салтыкова И.В., Говорун В.М., Алексеев Д.Г. Анализ генетических детерминант антибиотикостойчивости кишечной микробиоты больных хронической обструктивной болезнью легких. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(2): 157-66.
2. Fedosenko SV, Ogorodova LM, Deev IA, Takht AB, Popenko AC, Karnaushkina MA, Kostryukova ES, Kulikov ES, Kirillova NA, Saltykova IV, Govorun VM, Alekseev DG Analysis of genetic determinants of antibiotic resistance of intestinal microbiota in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimiokrobnaya khimioterapiya*. 2015; 17(2): 157-66.
3. Abraham E.P., Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of infectious diseases*. 1988; 10(4): 677-8.
4. Adu-Oppong B., Gasparrini A. J., Dantas G. Genomic and functional techniques to mine the microbiome for novel antimicrobials and antimicrobial resistance genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017; 1388(1) 42-58.
5. Akiba T., Koyama K., Ishiki Y., Kimura S., Fukushima. On the mechanism of the development of multiple drug-resistant clones of *Shigella*. *Japanese journal of microbiology*. 1960; 4(2): 219-27.
6. Allen H.K., Donato J, Wang H.H., Cloud-Hansen K.A., Davies J., Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews. Microbiology*. 2010; 8(4): 251.
7. Ammam F., Mengin-Lecreux D., Meziane-Cherif D. The functional vanGcd cluster of *Clostridium difficile* does not confer vancomycin resistance. *Molecular microbiology*. 2013; 89(4): 612-25.
8. Aminov R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental microbiology*. 2009; 11(12): 2970-88.
9. Anantharaman K., Brown C.T., Hug L.A., Sharon I., Castelle C.J., Probst A.J., Thomas B.C., Singh A., Wilkins M.J., Karaoz U., Brodie E.L., Williams K.H., Hubbard S.S., Banfield J.F. Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nature communications*. 2016; 7: 13219.

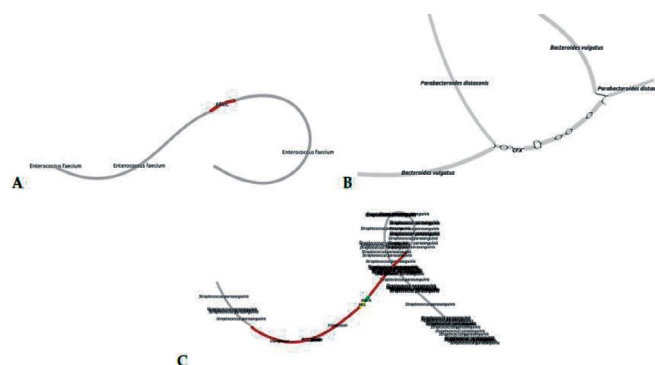


Рис. 6. Метагеномный контекст генов антибиотикорезистентности, реконструированный при анализе метагеномных данных. А — ген *adeC* в геноме *Enterococcus faecium*; В — ген *sfxA3* в геномах кишечных бактерий: *Bacteroides vulgatus* и *Parabacteroides distasonis*; С — Гены *mel* и *msrD* внутри транспозонной структуры в геноме *Streptococcus parasanguinis* [75]. Работы проведены в рамках проекта «Оценка вариабельности резистомы микробиоты кишечника у жителей РФ для обнаружения путей передачи и распространения антибиотикорезистентности» при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00066).

9. Angulo F.J., Collignon P., Wegener H.C., Braam P, Butler C.D. The routine use of antibiotics to promote animal growth does little to benefit protein undernutrition in the developing world. *Clinical infectious diseases*. 2005; 41(7): 1007-13.
10. Angulo F.J., Collignon P., Powers J.H., Chiller T.M., Aidara-Kane A., Aarestrup F.M. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clinical infectious diseases*. 2009; 49(1): 132-41.
11. Appelt S. L., Fanello M., Le Bailly D., Raoult M., Drancourt C. Viruses in a 14th-century coprolite. *Applied and environmental microbiology*. 2014; 80(9): 2648-55.
12. Arias C.A., Murray B.E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2012; 10(4): 266-78.
13. Austin D.J., Kristinsson K.G., Anderson R.M. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999; 96(3): 1152-6.
14. Bartoloni A., Pallecchi L., Rodriguez H., Fernandez C., Mantella A., Bartalesi F., Strohmeyer M., Kristiansson C., Gotuzzo E., Paradisi F., Rossolini G.M., Pallecchi L., Rodriguez H., Fernandez C., Mantella A., Bartalesi F., Strohmeyer M., Kristiansson C., Gotuzzo E., Paradisi F., Rossolini G.M. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *International journal of antimicrobial agents*. 2009; 33(2): 125-9.
15. Barton M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition research reviews*. 2000; 13(2): 279-99.
16. Benveniste R., Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973; 70(8): 2276-80.
17. Bhullar K., Waglechner N., Pawlowski A., Koteva K., Banks E.D., Johnston M.D., Barton H.A., Wright G.D. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PloS one*. 2012; 7(4): e34953.
18. Brauer A., Telling K., Laht M., Kalmus P., Lutsar I., Remm M., Kisand V., Tenson T. Plasmid with colistin resistance gene *mcr-1* in ESBL-producing *Escherichia coli* strains isolated from pig slurry in Estonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016; AAC. 00443-16.
19. Bronzwaer S. L., Cars O., Buchholz U., Molstad S., Goettsch W., Veldhuijzen I.K., Kool J.L., Sprenger M.J.W. The relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Europe. *Emerging infectious diseases*. 2002; 8(3): 278.
20. Brown E.D., Wright G.D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. 2016; 529(7586): 336-43.
21. Buelow E., Gonzalez T.B., Versluis D., Oostdijk E.A.N., Ogilvie L.A., van Mourik M.S.M., Oosterink E., van Passel M.W.J.

Effects of selective digestive decontamination (SDD) on the gut resistome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014; 69(8): 2215-23.

22. Carnevali C., Morganti M., Scaltriti E., Bolzoni L., Pongolini S., Casadei G. Occurrence of mcr-1 in colistin-resistant *Salmonella enterica* isolates recovered from humans and animals in Italy, 2012 to 2015. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016; 60(12): 7532-4.

23. Casewell M., Friis C., Marco E., McMullin P., Phillips I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003; 52(2): 159-61.

24. Chambers H.F., DeLeo F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews. Microbiology*. 2009; 7(9): 629.

25. Cheng G., Hu Y., Yin Y., Yang X., Xiang C., Wang B., Chen Y., Yang F., Lei F. Functional screening of antibiotic resistance genes from human gut microbiota reveals a novel gene fusion. *FEMS microbiology letters*. 2012; 336(1): 11-16.

26. Clemente J.C., Pehrsson E.C., Blaser M.J., Sandhu K., Gao Z., Wang B., Magris M., Hidalgo G., Contreras M., Noya-Alarcon O. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science advances*. 2015; 1(3): e1500183.

27. Coyne M.J., Zitomersky N.L., McGuire A.M., Earl A.M., Comstock L.E. Evidence of extensive DNA transfer between bacteroidales species within the human gut. *MBio*. 2014; 5(3): e01305-14.

28. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2010; 74(3): 417-33.

29. D'costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W., Wright G.D. Sampling the antibiotic resistome. *Science*. 2006; 311(5759): 374-7.

30. D'costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Cabelms F., Debruyne R., Golding G.B., Poinar H.N., Wright G.D. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011; 477(7365): 457.

31. De Smet A., Kluytmans J.A., Cooper B.S., Mascini E.M., Benus R.F., van der Werf T.S., van der Hoeven J.G., Pickkers P., Bogaers-Hofman D., van der Meer N.J., Bernards A.T., Kuijper E.J., Joore J.C., Leverstein-van Hall M.A., Bindels A.J., Jansz A.R., Wesselink R.M., de Jongh B.M., Dennesen P.J., van Asselt G.J., te Velde L.F., Frenay I.H., Kaasjager K., Bosch F.H., van Iterson M., Thijssen S.F., Kluge G.H., Pauw W., de Vries J.W., Kaan J.A., Arends J.P., Aarts L.P., Sturm P.D., Harinck H.I., Voss A., Uijtendaal E.V., Blok H.E., Thieme Groen E.S., Pouw M.E., Kalkman C.J., Bonten M.J. Decontamination of the digestive tract and oropharynx in ICU patients. *New England Journal of Medicine*. 2009; 360(1): 20.

32. De Vries L.E., Valles Y., Agero Y., Vaishampayan P.A., Garcia-Montaner A., Kuehl J.V., Christensen H., Barlow M., Francino M.P. The gut as reservoir of antibiotic resistance: microbial diversity of tetracycline resistance in mother and infant. *PloS one*. 2011; 6(6): e21644.

33. Delgado-Blas J.F., Ovejero C.M., Abadia Patino L., Gonzalez-Zorn B. Coexistence of mcr-1 and bla<sub>NDM-1</sub> in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016; 60(10): 6356-8.

34. Dethlefsen L., Relman D.A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(1): 4554-61.

35. Diaz-Torres M.L., McNab R., Spratt D.A., Villedieu A., Hunt N., Wilson M., Mullany P. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003; 47(4): 1430-2.

36. Dibner J.J., Richards J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry science*. 2005; 84(4): 634-43.

37. Faith J. J., Guruge J.L., Charbonneau M., Subramanian S., Seedorf H., Goodman A.L., Clemente J.C., Knight R., Heath A.C., Leibel R.L., Rosenbaum M., Gordon J.I. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*. 2013; 341(6141): 1237439.

38. Enault F., Briet A., Bouteille L., Roux S., Sullivan M.B., Petit M.A. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *The ISME Journal*. 2017; 11(1): 237-47.

39. Fancello L., Desnues C., Raoult D., Rolain J.M. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011; 66(11): 2448-54.

40. Fernandes M. R., McCulloch J.A., Vianello M.A., Moura Q., Perez-Chaparro P.J., Esposito F., Sartori L., Dropa M., Matte M.H., Lira D.P.A., Mamizuka E.M., Lincopan N. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the mcr-1 gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016; 60(10): 6415-7.

41. Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O., Dantas G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*. 2012; 337(6098): 1107-11.

42. Forslund K., Sunagawa S., Kultima J.R., Mende D.R., Arumugam M., Typas A., Bork P. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome research*. 2013; 23(7): 1163-9.

43. Fouhy F., Ogilvie L.A., Jones B.V., Ross R.P., Ryan A.C., Dempsey E.M., Fitzgerald G.F., Stanton C., Cotter P.D. Identification of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam resistance genes from within an infant gut functional metagenomic library. *PLoS One*. 2014; 9(9): e108016.

44. Gibson M.K., Forsberg K.J., Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *The ISME journal*. 2015; 9(1) 207.

45. Gibson M.K., Wang B., Ahmadi S., Burnham C-A.D., Tarr P.I., Warner B.B., Dantas G. Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome. *Nature microbiology*. 2016; 1: 16024.

46. Goodman A.L., Kallstrom G., Faith J.J., Reyes A., Moore A., Dantas G. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(15): 6252-7.

47. Goossens H., Ferech M., Vander Stichele R., Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet*. 2005; 365(9459): 579-87.

48. Guiney D.G., Davis C.E. Identification of a conjugative R plasmid in *Bacteroides ohraceus* capable of transfer to *Escherichia coli*. *Nature*. 1978; 274(5667): 181-2.

49. Hu Y., Yang X., Qin J., Lu N., Cheng G., Wu N., Pan Y., Li J., Zhu L., Wang X., Meng Z., Zhao F., Liu D., Ma J., Qin N., Xiang C., Xiao Y., Li L., Yang H., Wang J., Yang R., Gao G.F., Wang J., Zhu B. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature communications*. 2013; 4: 2151.

50. Jakobsson H.E., Jernberg C., Andersson A.F., Sjolund-Karlsson M., Jansson J.K., Engstrand L. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PloS one*. 2010; 5(3): e9836.

51. Jernberg C., Lofmark S., Edlund C., Jansson J.K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME journal*. 2007; 1(1): 56.

52. Jernberg C., Lofmark S., Edlund C., Jansson J.K. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*. 2010; 156(1): 3216-23.

53. Jia B., Raphenya A.R., Alcock B., Wagelchner N., Guo P., Tsang K.K., Lago B.A., Dave B.M., Pereira S., Sharma A.N., Doshi S., Courtot M., Lo R., Williams L.E., Frye J.G., Elsayegh T., Sardar D., Westman E.L., Pawlowski A.C., Johnson T.A., Brinkman F.S., Wright G.D., McArthur A.G.. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*. 2017; 45(1): 566-73.

54. Kleinheinz K.A., Joensen K.G., Larsen M.V. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage*. 2014; 4(2): e27943.

55. Kline K.E. Investigation of first identified mcr-1 gene in an isolate from a US patient-Pennsylvania, 2016. *Morbidity and mortality weekly report*. 2016; 65(36): 977-8

56. Knapp C.W., Dolfig J., Ehler P.A., Graham D.W. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental science & technology*. 2009; 44(2): 580-7.

57. Koch R.I. Weitere Mittheilungen uber ein Heilmittel gegen Tuberculose. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1890; 16946): 1029-32.

58. Koch R. Über den augenblicklichen Stand der bakteriologischen Cholera-diagnose. *Medical Microbiology and Immunology*. 1893; 14(1): 319-38.
59. Martinez J.L., Baquero F., Andersson D.I. Predicting antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*. 2007; 5(12): 958.
60. Martinez J.L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*. 2008; 321(5887) 365-7.
61. Martinez J.L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2014; 11: 33-9.
62. McKessar S.J., Berry A.M., Bell J.M., Turnidge J.D., Paton J.C. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000; 44(11): 3224-8.
63. Lagier J.C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., Bittar F., Fournous G., Gimenez G., Maraninchi M., Trape J.F., Koonin E.V., La Scola B., Raoult D. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012; 18(12): 1185-93.
64. Lakin S.M., Dean C., Noyes N.R., Dettenwanger A., Ross A.S., Doster E., Rovira P., Abdo Z., Jones K.L., Ruiz J., Belk K.E., Morley P.S., Boucher C. MEGARes: an antimicrobial resistance database for high throughput sequencing. *Nucleic acids research*. 2017; 45(1): 574-80.
65. Lebreton F., van Schaik W., McGuire A.M., Godfrey P., Griggs A., Mazumdar V., Corander J., Cheng L., Saif S., Young S., Zeng Q., Wortman J., Birren B., Willems R.J.L., Earl A.M., Gilmore M.S. Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *MBio*. 2013; 4(4): e00534-13.
66. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2013; 12(5): 371-87.
67. Lindbaek M., Berild D., Straand J., Hjortdahl P. Influence of prescription patterns in general practice on anti-microbial resistance in Norway. *Br J Gen Pract*. 1999; 49(443): 436-40.
68. Liu B., Pop M. ARDB-antibiotic resistance genes database. *Nucleic acids research*. 2008; 37(1): 443-7.
69. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.H., Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016; 16(2): 161-8.
70. Marshall B.M., Levy S.B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*. 2011; 24(4): 718-33.
71. Modi S.R., Lee H.H., Spina C.S., Collins J.J. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 2013; 499(7457): 219.
72. Moore A.M., Patel S., Forsberg K.J., Wang B., Bentley G., Razia Y., Qin X., Tarr P.I., Dantas G. Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. *PLoS one*. 2013; 8(11): e78822.
73. Moore A.M., Ahmadi S., Patel S., Gibson M.K., Wang B., Ndao M.I., Deych E., Shannon W., Tarr P.I., Warner B.B., Dantas G. Gut resistome development in healthy twin pairs in the first year of life. *Microbiome*. 2015; 3(1): 27.
74. Ortega-Paredes D., Barba P., Zurita J. Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the mcr-1 gene in Ecuador. *Epidemiology & Infection*. 2016; 144(14): 2967-70.
75. Olekhnovich E.I., Vasilyev A.T., Ulyantsev V.I., Tyakht A.V. MetaCherchant — an algorithm for analyzing genomic environment of antibiotic resistance gene in gut microbiota. *bioRxiv*. 2017; doi: <https://doi.org/10.1101/106161>
76. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2013; 12(5): 371-87.
77. Pal C., Bengtsson-Palme J., Rensing C., Kristiansson E., Larsson D.G.J. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic acids research*. 2013; 42(1): 737-43.
78. Palmer K.L., Godfrey P., Griggs A., Kos V. N., Zucker J., Desjardins C. Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. *MBio*. 2012; 3(1): e00318-11.
79. Pehrsson E.C., Tsukayama P., Patel S., Mejia-Bautista M., Sosa-Soto G., Navarrete K.M., Calderon M., Cabrera L., Hoyos-Arango W., Bertoli M.T., Berg D.E., Gilman R.H., Dantas G. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature*. 2016; 533(7602): 212-6.
80. Penders J., Stobberingh E.E., Savelkoul P.H.M., Wolfs P.F.G. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*. 2013; 4: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00087>
81. Perez-Cobas A.E., Artacho A., Knecht H., Ferrus M.L., Friedrichs A., Ott S.J., Moya A., Latorre A., Gosalbes M.J. Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PLoS one*. 2013; 8(11): e80201.
82. Pevzner P.A., Tang H., Waterman M.S. An Eulerian path approach to DNA fragment assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001; 98(17): 9748-53.
83. Phillips I. The use of bacitracin as a growth promoter in animals produces no risk to human health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999; 44(6): 725-8.
84. Privitera G., Dublanchet A., Sebald M. Transfer of multiple antibiotic resistance between subspecies of *Bacteroides fragilis*. *Journal of Infectious Diseases*. 1979; 139(1): 97-101.
85. Pugh D.M. The EU precautionary bans of animal feed additive antibiotics. *Toxicology letters*. 2002; 128(1): 35-44.
86. Rajilic-Stojanovic M., de Vos W.M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*. 2014; 38(5): 996-1047.
87. Rappe M.S., Giovannoni S.J. The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*. 2003; 57(1): 369-94.
88. Raum E., Lietzau S., von Baum H., Marre R., Brenner H. Changes in *Escherichia coli* resistance patterns during and after antibiotic therapy: a longitudinal study among outpatients in Germany. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14(1): 41-8.
89. Rettedal E.A., Gumpert H., Sommer M.O.A. Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria. *Nature communications*. 2014; 5: 4714.
90. Rice L.B. Unmet medical needs in antibacterial therapy. *Biochemical pharmacology*. 2006; 71(7): 991-5.
91. Rice L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008; 197(8): 1079-81.
92. Robinson D.A., Kearns A.M., Holmes A., Morrison D., Grundmann H., Edwards G., O'Brien F.G., Tenover F.C., McDougal L.K., Monk A.B., Enright M.C. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *The Lancet*. 2005; 365(9466): 1256-8.
93. Rolain J.M., Fancello L., Desnues C., Raoult D. Bacteriophages as vehicles of the resistome in cystic fibrosis. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011; 66(11): 2444-7.
94. Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Lioacono K.A., Lynch B.A., MacNeil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and environmental microbiology*. 2000; 66(6): 2541-7.
95. Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. 2006; 65(5): 725-59
96. Savage D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology*. 1977; 31(1): 107-33.
97. Schuch R., Fischetti V.A. Detailed genomic analysis of the W $\beta$  and  $\gamma$  phages infecting *Bacillus anthracis*: implications for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*. 2006; 188(8): 3037-51.
98. Segura Egea J., Velasco-Ortega J.E., Torres-Lagares D., Velasco-Ponferrada M.C., Monsalve-Guil L., Llamas-Carreras J.M. Pattern of antibiotic prescription in the management of endodontic infections amongst Spanish oral surgeons. *International endodontic journal*. 2010; 43(4): 342-50.
99. Sekirov I.S., Russell L., Antunes L.C.M., Finlay B.B. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*. 2010; 90(3): 859-904.
100. Smillie C.S., Smith M.B., Friedman J., Cordero O.X., David L.A., Alm E.J. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*. 2011; 480(7376): 241.

101. Smith C.J., Markowitz S.M., Macrina F.L. Transferable tetracycline resistance in *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1981; 19(6): 997-1003.
102. Sommer M.O.A., Dantas G., Church G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*. 2009; 325(5944): 1128-31.
103. Subirats J., Sanchez-Melsio A., Borrego C.M., Balcazar J., Simonet P. Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *International journal of antimicrobial agents*. 2016; 48(2): 163-7.
104. Swann M.M. Report of the joint committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. HMSO, London; 1969.
105. Teo J.Q.-M., Ong R.T.-H., Xia E., Koh T.-H., Khor Ch.-Ch., Lee S.J.-Y., Lim T.-P., Kwa A.L.-H. Mcr-1 in multidrug-resistant blaKPC-2-producing clinical Enterobacteriaceae isolates in Singapore. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016; 60(10): 6435-7.
106. Teuber M., Meile L., Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999; 76(1-4): 115-37.
107. Teuber M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 1999; 56(9-10): 755-63.
108. Tyakht A.V., Kostyukova E.S., Popenko A.S., Belenikin M.S., Pavlenko A.V., Larin A.K., Karpova I.Y., Selezneva O.V., Semashko T.A., Ospanova E.A., Babenko V.V., Maev I.V., Cheremushkin S.V., Kucheryavyy Y.A., Shcherbakov P.L., Grinevich V.B., Efimov O.I., Sas E.I., Abdulkhakov R.A., Abdulkhakov S.R., Lyalyukova E.A., Livzan M.A., Vlassov V.V., Sagdeev R.Z., Tsukanov V.V., Osipenko M.F., Kozlova I.V., Tkachev A.V., Sergienko V.I., Alexeev D.G., Govorun V.M. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature communications*. 2013; 4: 2469. doi: 10.1038/ncomms3469.
109. UniProt Consortium et al. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*. 2014; gku989.
110. Van Boeckel T.P., Gandra S., Ashok A., Caudron Q., Grenfell B.T., Levin S.A., Laxminarayan R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014; 14(8): 742-50.
111. van den Bogaard A.E., Stobberingh E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *International journal of antimicrobial agents*. 2000; 14(4): 327-35.
112. Vincent J.L. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *The lancet*. 2003; 361(9374): 2068-77.
113. von Wintersdorff C.J.H., Wolffs P.F., van Niekerk J.M., Beuken E., van Alphen L.B., Stobberingh E.E. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene mcr-1 in faecal metagenomes of Dutch travelers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016; 71(12): 3416-19.
114. Walson J.L., Marshall B., Pokhrel B.M., Kafle K.K., Levy S.B. Carriage of antibiotic-resistant fecal bacteria in Nepal reflects proximity to Kathmandu. *The Journal of infectious diseases*. 2001; 184(9): 1163-9.
115. Wegener H.C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current opinion in microbiology*. 2003; 6(5): 439-45.
116. Wetterstrand K.A. DNA sequencing costs: data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). 2013.
117. Witte W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000; 16: 19-24.
118. Wong S.C.Y., Tse H., Chen H.K.J., Cheng V.C.C., Ho P.L., Yuen K.Y. Colistin-resistant Enterobacteriaceae carrying the mcr-1 gene among patients in Hong Kong. *Emerging infectious diseases*. 2016; 22(9):1667.
119. Wright G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*. 2007; 5(3): 175-86.
120. Wright P.M., Seiple I.B., Myers A.G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014; 53(34): 8840-69.
121. Wust J., Hardegger U. Transferable resistance to clindamycin, erythromycin, and tetracycline in *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1983; 23(5): 784-6.
122. Xavier B.B., Das A.J., Cochrane G., De Ganck S., Kumar-Singh S., Aarestrup F.M., Goossens H., Malhotra-Kumar S. Consolidating and Exploring Antibiotic Resistance Gene Data Resources. *J Clin Microbiol*. 2016; 54: 851-9.
123. Yarygin K.S., Kovarsky B.A., Bibikova T.S., Melnikov D.S., Tyakht A.V., Alexeev D.G. ResistoMap-online visualization of human gut microbiota antibiotic resistome. *Bioinformatics*. 2017; 33(14): 2205-6.
124. Zankari E. Comparison of the web tools ARG-ANNOT and ResFinder for detection of resistance genes in bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58(8): 4986.
125. Zhang Y., LeJeune J.T. Transduction of bla CMY-2, tet (A), and tet (B) from *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Heidelberg to *S. Typhimurium*. *Veterinary microbiology*. 2008; 129(3): 418-25.
126. Zoetendal E.G., Rajilic-Stojanovic M., De Vos W.M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*. 2008; 57(11): 1605-15.

#### **Сведения об авторах:**

*Ильина Елена Николаевна, доктор биол. наук, профессор РАН, заместитель генерального директора по научной работе.*

*Олехнович Евгений Иванович, кандидат биол. наук, научн. сотр.*

*Павленко Александр Владимирович, научн. сотр.*