

## Анализ генетических детерминант антибиотикоустойчивости кишечной микробиоты больных хронической обструктивной болезнью легких

С.В. Федосенко<sup>1</sup>, Л.М. Огородова<sup>1</sup>, И.А. Деев<sup>1</sup>, А.В. Тяхт<sup>2</sup>, А.С. Попенко<sup>2</sup>, М.А. Карнаушкина<sup>3</sup>, Е.С. Кострюкова<sup>2,4</sup>, Е.С. Куликов<sup>1</sup>, Н.А. Кириллова<sup>1</sup>, И.В. Салтыкова<sup>1</sup>, В.М. Говорун<sup>2,4</sup>, Д.Г. Алексеев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической медицины, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Проведено исследование уровня относительной представленности и состава генов лекарственной устойчивости кишечной микробиоты у пациентов с *хронической обструктивной болезнью легких* (ХОБЛ) с последующей оценкой влияния частоты курсов антибиотикотерапии на риск накопления детерминант резистентности к антибактериальным препаратам, применяемым в лечении респираторных инфекций. В ходе исследования секвенированы и проанализированы метагеномы кала 52 пациентов с ХОБЛ и 96 здоровых добровольцев. Все пациенты на момент включения в исследование характеризовались стабильным течением заболевания с анамнезом не менее 12 месяцев, отсутствием эпизодов обострений на протяжении предшествующих 4 недель, у которых антибиотикотерапия не проводилась в течение 12 недель

до момента включения в исследование. Для идентификации генов лекарственной устойчивости использованы аминокислотные последовательности генов антибиотикорезистентности из базы данных Antibiotic Resistance Database. Выявлено значительное разнообразие и преобладание набора генов антибиотикорезистентности в кишечной микробиоте больных ХОБЛ по сравнению с образцами группы сравнения. Наиболее высокий уровень представленности генов антибиотикорезистентности у кишечной микробиоты больных ХОБЛ выявлен для макролидов, бета-лактамов (включая цефалоспорины) и фторхинолонов, в меньшей степени — для гликопептидов, линкозамидов, аминогликозидов и тетрациклинов.

**Ключевые слова:** ХОБЛ, кишечная микробиота, гены антибиотикоустойчивости.

## Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Intestinal Microbiota in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

S.V. Fedosenko<sup>1</sup>, L.M. Ogorodova<sup>1</sup>, I.A. Deev<sup>1</sup>, A.V. Tyakht<sup>2</sup>, A.S. Popenko<sup>2</sup>,  
M.A. Karnaukhina<sup>3</sup>, E.S. Kostryukova<sup>2,4</sup>, E.S. Kulikov<sup>1</sup>, N.A. Kirillova<sup>1</sup>, I.V. Saltykova<sup>1</sup>,  
V.M. Govorun<sup>2,4</sup>, D.G. Alekseev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Moscow State Medical and Dentistry University named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

This paper presents the study results of the representation relative level and drug resistance genes composition of intestinal microbiota in COPD patients with subsequent evaluation of the antibiotic therapy courses frequency effect on the risk of development of resistance to antibiotics used in the respiratory infections treatment. In the study 52 COPD patients and 96 healthy volunteers fecal metagenome were sequenced and analyzed. All of the patients at the time of inclusion in the study were characterized by a stable COPD with a diagnosis history for 12 months and more, the lack of exacerbation episodes during the previous 4 weeks, and antibiotic therapy was not carried out for 12 weeks prior to inclusion. For identification of drug resistance genes amino acid sequence of the antibiotic resistance gene database Antibiotic

Resistance Database were used. In result of metagenomic analysis of COPD patients and healthy volunteers stool samples with revealed considerable diversity set of genes resistant to antibiotics. Intestinal microbiota in patients with COPD is characterized by a high total relative representation of antibiotic resistance gene in comparison with samples of the comparison group. The highest level of representation of the antibiotic resistance genes in the intestinal microbiota in COPD patients was identified for families of macrolide, beta-lactam (including cephalosporins) and fluoroquinolone antibiotics, to a lesser extent for vancomycin, lincosamides, aminoglycosides and tetracycline.

**Key words:** COPD, intestinal microbiota, antibiotic resistance genes.

Синдром хронической бронхиальной обструкции с выраженными вентиляционными нарушениями создает благоприятные условия для поддержания бактериальной контаминации дыхательных путей у больных *хронической обструктивной болезнью легких* (ХОБЛ) [1]. Трансформация бактериальной контаминации в инфекционный процесс, а также появление новых штаммов микроорганизмов в бронхиальном дереве зачастую становятся пусковыми факторами развития так называемых инфекционно-зависимых обострений, частота которых имеет склонность к прогрессирующему увеличению по мере нарастания тяжести заболевания [2].

Обычно в течение года больной ХОБЛ переносит от одного до четырех обострений и более. Их частота значительно варьирует в зависимости от степени тяжести заболевания и адекватности выбранной схемы лечения [1]. В свою очередь, каждый эпизод обострения ХОБЛ сопряжен с высокой вероятностью рационального или нерационального назначения системных антибактериальных препаратов и потенциальным риском развития молекулярно-генетических механизмов лекарственной устойчивости у бактерий, колонизирующих различные локусы организма человека, включая микробные популяции желудочно-кишечного тракта.

Обоснованное, но частое применение антибиотиков широкого спектра действия на фоне инфекционных обострений у больных ХОБЛ, а также их нерациональное использование может не только нарушать рост нормальной кишечной микробиоты, но и способствовать приобретению ее представителями генетических детерминант лекарственной устойчивости с последующим обменом генами, кодирующими антибиотикорезистентность [3].

В связи с этим представляет интерес молекулярно-генетическое исследование микробных сообществ кишечника больных ХОБЛ как потенциальной модели накопления генов антибиотикоустойчивости микроорганизмами, населяющими тело человека, в условиях повышенной частоты применения антибактериальных препаратов.

**Цель исследования** — изучить уровень относительной представленности и состав генов лекарственной устойчивости кишечной микробиоты у пациентов с ХОБЛ и в последующем оценить влияние частоты курсов антибиотикотерапии на риск формирования резистентности к антибактериальным препаратам, применяемым в лечении респираторных инфекций.

## Материал и методы

В ходе исследования секвенированы и проанализированы метагеномы кала 52 пациентов с ХОБЛ (25 больных ХОБЛ средней степени тяжести и 27 больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения). В качестве группы сравнения (контроля) использованы результаты исследованных по аналогичной методике образцов кала 96 здоровых добровольцев [4].

Все пациенты на момент включения в исследование характеризовались стабильным течением с анамнезом заболевания не менее 12 месяцев. При этом критерием включения для пациентов с ХОБЛ был индекс курения 10 и более пачка/лет. У всех пациентов отсутствовали эпизоды обострений на протяжении предшествующих 4 недель, а антибиотикотерапия не проводилась в течение 12 недель до момента включения. Сбор кала осуществляли в индивидуальный стерильный пластиковый контейнер, избегая попадания в образцы мочи и туалетной бумаги. Образец весом 10–20 г подвергали немедленной заморозке и хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Для выделения ДНК и пробоподготовки всех образцов кала использовался одинаковый метод. К замороженной навеске образца кала (150 мг) добавляли кремниево-циркониевые бусины (BioSpec Products, США) диаметром 0,1 мм (300 мг) и 0,5 мм (100 мг), а затем 1200 мкл теплого лизирующего буфера (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 4% SDS) перемешивали на вортексе до однородного состояния и гомогенизировали с помощью MiniBeadBeater (BioSpec Products, США) в течение 3 мин. Полученный лизат инкубировали при  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин, после чего образцы центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали в новые пробирки и ставили на лёд. К осадку повторно добавляли лизирующий буфер и повторяли процесс гомогенизации. Надосадочные жидкости объединяли, добавляли 2 объема 96% этанола и  $\frac{1}{10}$  объема 3M ацетата натрия. Инкубировали при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  не менее часа. После этого образцы центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 мин. Сформировавшийся осадок дважды промывали 80% этанолом, сушили на воздухе и растворяли в деионизованной воде.

Подготовка фрагментной библиотеки ДНК и полногеномное секвенирование на платформе SOLiD 4 (Life Technologies, США) были проведены в соответствии с инструкциями от производителя с применением следующих наборов: SOLiD Fragment Library Construction Kit, SOLiD Fragment Library Barcoding Module 1–16, SOLiD

EZ Bead TM E80 System Consumables и SOLiD ToP Sequencing Kit, MM50/5. Выходная длина ридов составила 50 п. н. Была проведена предобработка ридов с целью отбрасывания низкодостоверных данных.

Для идентификации генов лекарственной устойчивости использованы аминокислотные последовательности генов антибиотикорезистентности из базы данных Antibiotic Resistance Database – (ARDB) [5]. Выбрана 7461 последовательность генов, определяющих устойчивость к 83 представителям различных групп антибиотиков. Классификация исследованных генов включала в себя 378 классов, объединенных в 86 надклассов. Цветовые риды SOLiD переводились в нуклеотидный формат и выравнивались на референсную базу с помощью быстрого параллельного алгоритма RAPSearch [6]. Для дальнейшего анализа сохранялись как абсолютные числа ридов, отобразившихся на ген, так и нормализованная величина – относительная представленность гена, равная отношению числа ридов, отобразившихся на ген, к общему числу ридов в метагеноме. При сравнении относительных значений для каждого метагенома производилась нормировка данных путем деления на общее число его ридов, картировавшихся на каталог генов.

Дополнительно качественная детекция присутствия генов антибиотикорезистентности в образцах была произведена для выборочных генов с помощью ПЦР реального времени по специфичным праймерам в НПФ «Литех» (табл. 1).

С целью сравнения результатов профилирования резистома между метагеномным и ПЦР подходами, с помощью алгоритма BLASTX был произведен поиск последовательностей генов, использованных для подбора ПЦР праймеров в базе ARDB (критерий совпадения – более 80% сходства и  $e\text{-value} < 0,001$ ). Для каждого метагенома число отобразившихся ридов суммировалось по всем последовательностям каждого гена, приводилось к бинарному виду (ненулевое число ридов – ген присутствует, нулевое – отсутствует) и сравнивалось с результатами детекции по ПЦР.

Статистический анализ выполнен с использованием среды R 3.1.1. Для выявления достоверного различия относительной представленности гена между двумя группами индивидуумов использовался ранговый тест Манна–Уитни. Различие считалось статистически значимым, если скорректированное значение  $p$  составляло  $< 0,05$ . Анализ корреляционных связей проводился по методу Спирмена.

Таблица 1. Подбор праймеров для качественной детекции присутствия генов антибиотикорезистентности в образцах

Микроорганизмы	Антибактериальные препараты	Выявляемые гены	Количество бактериальных нуклеотидов, использованных для подбора праймеров
<i>Enterobacteriaceae</i>	Пенициллины и ранние цефалоспорины	<i>TEM</i>	6
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.	Цефалоспорины	<i>CTX-M</i>	7
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.	Бета-лактамы антибиотики	<i>VIM</i>	6
		<i>NDM</i>	7
		<i>OXA-48</i>	3
		<i>KPC</i>	7
<i>Staphylococcus</i> spp.	Бета-лактамы антибиотики	<i>mecA</i>	3
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Ванкомицин и тейкопланин	<i>vanA</i>	4
		<i>vanB</i>	4
<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.	Макролиды, линкозамиды, стрептограммины	<i>ermB</i>	6
<i>Streptococcus</i> spp.	Макролиды	<i>mef</i>	4

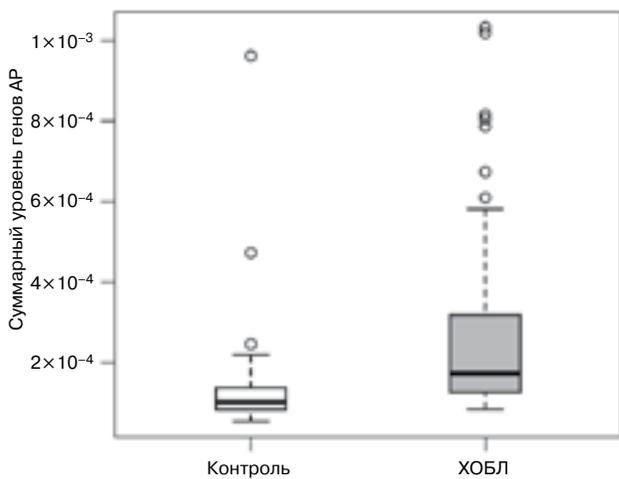


Рис. 1. Суммарная относительная представленность генов антибиотикорезистентности для образцов кала здоровых добровольцев и больных ХОБЛ.

**Результаты исследования**

В результате анализа в метагеномах как здоровых людей, так и пациентов с ХОБЛ было обнаружено значительное присутствие генов устойчивости к антимикробным препаратам. В суммарной выборке ненулевое покрытие получили 2074 нуклеотидных последовательности генов АР.

Суммарная относительная представленность генов *антибиотикорезистентности* (АР) оказалась достоверно выше в группе пациентов по сравнению с группой контроля (односторонний тест Манна–Уитни,  $p = 8,329 \times 10^{-12}$ , отношение медиан двух

групп 1,7) (рис. 1). Отличия сохранялись и при альтернативном способе нормировки данных – не на число ридов, картировавшихся на каталог генов, а на общее число ридов, прошедших фильтрацию по качеству ( $p = 1,391 \times 10^{-9}$ ).

В среднем, наиболее представленными по содержанию генов резистентности оказались группы тетрациклина, макролидов, цефалоспоринов, ванкомицина, линкозамидов и др. (рис. 2).

Для 26 антибактериальных препаратов относительный уровень соответствующих им генов антибиотикорезистентности достоверно выше в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой контроля (односторонний тест Манна–Уитни, скорректированное  $p < 0,05$ ). Помимо отдельных АБП идентифицированы 7 групп антибиотиков (бета-лактамы антибиотики, аминогликозиды, макролиды, сульфаниламиды, фторхинолоны, глицилциклины, линкозамиды), гены резистентности к которым в большей степени представлены у больных ХОБЛ, чем у здоровых лиц (данные приведены в табл. 2 в порядке уменьшения статистической значимости). Важно, что по результатам всех выполненных методов нормировки для каждой группы антибиотиков уровень генов в образцах больных ХОБЛ выше по сравнению с образцами здоровых добровольцев.

Различия в представленности генов антибиотикорезистентности между группами сравнения наблюдаются и в уровнях представленности классов генов, кодирующих тот или иной механизм устойчивости. Из 78 классов, представленных во всех метагеномах, содержание генов 29 классов зна-

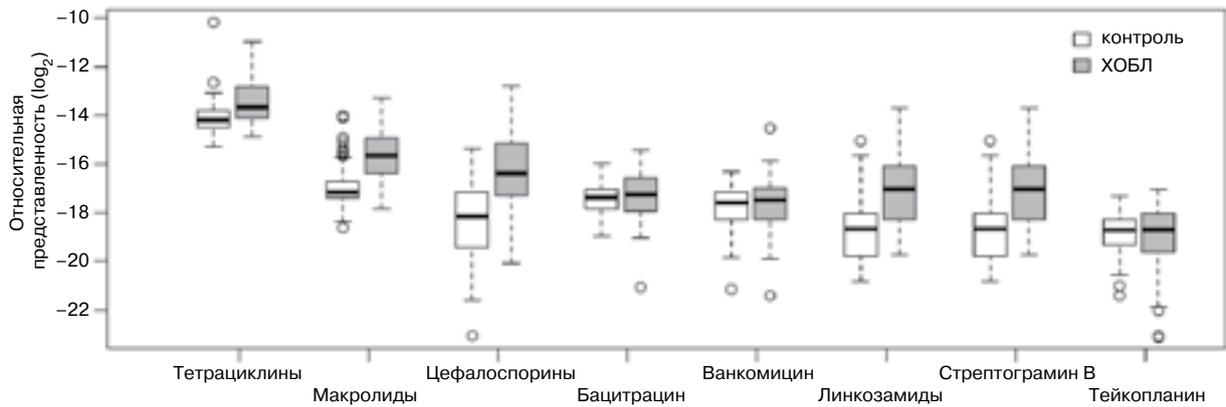


Рис. 2. Группы антибиотиков с наиболее высокой средней представленностью относящихся к ним генов антибиотикорезистентности (в двоичном логарифмическом масштабе).

чимо выше в метагеномах кала пациентов с ХОБЛ (табл. 3). При этом не выявлены классы генов антибиотикорезистентности, представленность которых была бы более высокой в группе контроля.

Отметим, что из различающихся классов наиболее представленная группа — RND транспортеры (Resistance-nodulation-division), являющиеся эффлюксными насосами, обеспечивающими множественную лекарственную устойчивость ( $n=15$ ).

Также для 47 образцов ДНК, выделенных из кала группы пациентов с ХОБЛ, выполнен поиск маркеров устойчивости к антибиотикам в формате ПЦР реального времени. Результатом стала положительная детекция во всех образцах генов *ermB* и *mef*, ответственных за реализацию механизмов устойчивости стрептококков к воздействию макролидных антибиотиков. Гены *ermB* также отвечают за реализацию механизмов устойчивости стрептококков к линкозамидам и стрептограмину В.

Соотнесение последовательностей генов, по которым подбирались ПЦР праймеры, с базой ARDB показало, что в данной базе представлены все гены, кроме *OXA-48* и *NDM*. По остальным генам (за исключением *OXA-48* и *NDM*) проведено сравнение результатов детекции, полученных метагеномным и ПЦР методами. Для некоторых генов выявлена особая согласованность результатов двух методов. Так, из 47 образцов для гена *ermB* совпали положительные результаты идентификации по 44 образцам, а для гена *mecA* — по 46 образцам. Гены *KPC*, *VIM* и *CTX-M* не были детектированы ни в одном образце ни одним из двух методов (за исключением положительной метагеномной детекции гена *CTX-M* в 1 образце).

Для гена *mecA* метагеномный подход оказался более чувствительным и обнаружил его присут-

ствие в 8 образцах. В то же время результаты ПЦР по данному гену были отрицательными во всей группе.

Различия между методами обнаружены для генов *vanA* и *vanB*. Так, по гену *vanA* положительный результат согласно метагеномному подходу зарегистрирован в 6 образцах и отрицательный результат согласно ПЦР во всей группе. Для гена *vanB* несоответствие результатов, полученных двумя способами, зарегистрировано в 10 случаях. При этом ген *vanB* согласно ПЦР зарегистрирован в 1 образце (по результатам метагеномного метода в данном образце ген *vanB* не определялся), в то время как согласно метагеномному методу — в 9 других образцах (где метод ПЦР его не идентифицировал).

Относительная представленность резистома по образцам кала больных ХОБЛ сопоставлена с клинико-anamnestическими характеристиками пациентов. В частности, не выявлена корреляционная связь между типом ХОБЛ (классификация GOLD 2011 по степени риска обострений), степенью тяжести заболевания (спирометрическая классификация GOLD 2010) и уровнем представленности генов резистентности к антибактериальным препаратам ( $p>0,05$ ).

При оценке корреляционных связей между общим уровнем антибиотикорезистентности и частотой курсов антибиотикотерапии за предшествующие 12 месяцев статистически значимые результаты также не получены. Однако выявлена положительная корреляция между уровнем резистома по отдельным классам антибактериальных препаратов и частотой антибиотикотерапии (табл. 4).

Также обнаружена положительная корреляция между уровнем резистома по отдельным надклас-

Таблица 2. Антибиотики, гены резистентности к которым избыточно представлены в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с контролем (классифицированы в соответствии с [7])

Антибактериальные препараты	<i>p</i>	Отношение медиан двух групп*
<b>I. Бета-лактамы антибиотики</b>	0	0,3103
<b>Пенициллины</b>		
Пенициллин	0,0344	0,438
<b>Цефалоспорины</b>	0	0,2373
Первого поколения	0,0281	1,0
Второго поколения	0,0281	1,0
<b>II. Аминогликозиды</b>	0	0,3155
Канамицин	0	0,2088
Неомицин	0,00001	0,2126
Паромомицин (мономицин)	0,00001	0,2126
Рибостамицин	0,00001	0,2126
Ливидомицин	0,00002	0,2126
Бутирозин	0,00002	0,2425
Стрептомицин	0,0016	0,5182
Сизомицин	0,0028	0,0212
Дибекацин	0,0028	0,0212
Гентамицин В	0,00002	0,2126
Нетилмицин	0,0054	0,0222
Тобрамицин	0,0036	0,0212
Амикацин	0	0,1842
Изепамицин	0	0,1842
<b>III. Макролиды</b>	0	0,3474
Эритромицин	0	0,3059
Рокситромицин	0,0054	0,4046
<b>IV. Сульфаниламиды и ко-тримоксазол</b>		
Сульфаниламиды	0	1,0
<b>V. Хинолоны</b>		
Фторхинолоны	0	0,3399
<b>VI. Препараты других классов</b>		
<b>Тетрациклины</b>		
Доксициклин	0	0,2479
Тетрациклин	0	0,7069
<b>Глицилциклины</b>	0	0,3366
Тигециклин	0,0015	0,4443
<b>Линкозамиды</b>	0	0,3194
Линкомицин	0	0,0176
<b>Прочие</b>		
Хлорамфеникол	0	0,4116
Фосмидомицин	0	0,3882
Стрептограмин А	0,0102	0,6439
Стрептограмин В	0	0,3194
Спектиномицин	0,04	1,0

Примечание. \* Элементы с обеими нулевыми медианами не учитывались.

Таблица 3. **29 классов генов AP, относительная представленность которых достоверно выше в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с контролем (перечислены в порядке уменьшения статистической значимости)**

Класс генов AP	Описание из базы ARDB	<i>p</i>	Отношение медиан двух групп
<i>acr</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0,29
<i>amr</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0
<i>bla a</i>	Бета-лактамаза класса А. Этот фермент разрывает бета-лактамное кольцо антибиотика и инактивирует антибактериальное действие молекулы	0	0,22
<i>erm</i>	N-6-метилтрансфераза аденина рРНК, которая метилирует аденин 23S рРНК в положении 2058, обеспечивая резистентность к эритромицину	0	0,28
<i>lnu</i>	Линкозамид-нуклеотидилтрансфераза	0	0
<i>mdtef</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0,25
<i>mexef</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0,28
<i>mexvw</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0,26
<i>mls mfs</i>	Транспортер макролидов, линкозамидов и стрептограмина В	0	0,11
<i>rosab</i>	Калиевый антипортер, RosA, RosB	0	0,39
<i>tet mod</i>	НАДФ-зависимая оксидоредуктаза, модифицирующая тетрациклин	0	0
<i>aph</i>	Аминогликозид-О-фосфотрансфераза	0,00001	0,26
<i>catb</i>	Ацетилтрансфераза хлорамфеникола	0,00001	0
<i>macab</i>	RND транспортер. Транспортер множественной лекарственной устойчивости	0,00001	0,71
<i>tet rpp</i>	Рибосомальный защитный белок, защищающий рибосомы от подавления трансляции тетрациклином	0,00001	0,76
<i>smeabc</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,00001	0,44
<i>adeabc</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,00001	0
<i>mls abc</i>	ABC транспортер. Транспортер макролидов, линкозамидов и стрептограмина В	0,00003	0,76
<i>mexab</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0032	0,37
<i>ant</i>	Аминогликозид-О-нуклеотидилтрансфераза	0,0043	0,54
<i>aac</i>	Аминогликозид-N-ацетилтрансфераза	0,0056	0
<i>ceo</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0073	0,52
<i>mexcd</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0083	0,4
<i>mexhi</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0104	0,34
<i>tet flavo</i>	Флавобелок	0,0109	0,47
<i>tet efflux</i>	Транспорт тетрациклина	0,0173	0,64
<i>vanb</i>	Ванкомицин VanB	0,0189	0,73
<i>vat</i>	Ацетилтрансфераза виргиниамицина А	0,0242	0,57
<i>cata</i>	Ацетилтрансфераза хлорамфеникола А	0,0298	0,79

Таблица 4. Корреляции уровня антибиотикорезистентности по отдельным группам препаратов и частоты применения антибактериальных препаратов за предшествующие 12 месяцев (по Спирмену)

Антибиотики	<i>r</i>	<i>p</i>
Линкозамиды	0,40368	0,004
Цефалоспорины	0,3731	0,0083
Макролиды	0,3422	0,0161
Сульфаниламиды	0,33837	0,0174

Таблица 5. Корреляции уровня антибиотикорезистентности по отдельным классам генов и частоты применения антибактериальных препаратов за предшествующие 12 месяцев (по Спирмену)

Надклассы генов антибиотикорезистентности	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>tet_mod</i>	0,38264	0,0067
<i>mdtl</i>	0,34556	0,015
<i>erm</i>	0,33054	0,0204
<i>sul</i>	0,33018	0,0205
<i>mls_mfs</i>	0,31166	0,0293
<i>emrd</i>	0,2934	0,0408
<i>bla_a</i>	0,2919	0,0418

сам генов антибактериальных препаратов (по классификации ARDB) и частотой курсов антибиотикотерапии (табл. 5).

### Обсуждение результатов

В результате выполненного метагеномного анализа относительной представленности генов антибактериальной резистентности кишечной микробиоты пациентов с ХОБЛ в сравнении с образцами здоровых добровольцев выявлено значительное разнообразие набора генов резистентности к антибактериальным препаратам. Всего для сопоставленных групп были идентифицированы более 2000 нуклеотидных последовательностей генов устойчивости к различным антибиотикам и их семействам.

Кишечная микробиота больных ХОБЛ характеризуется более высокой суммарной относительной представленностью генов AP по сравнению с образцами в контрольной группе. При этом для 7 групп антибиотиков (включая бета-лактамы, аминогликозиды, макролиды, сульфаниламиды, фторхинолоны, глицилциклины, линкозамиды) и 26 других антибактериальных препаратов относительный уровень соответствующих им генов устойчивости был повышен в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с контрольными образцами

здоровых добровольцев. Полученные результаты могут быть обусловлены более высокой частотой эпизодов антибиотикотерапии в анамнезе у пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми добровольцами.

Наиболее высокий уровень представленности генов устойчивости у кишечной микробиоты больных ХОБЛ выявлен для макролидов, бета-лактамов (включая цефалоспорины) и фторхинолонов, а также ванкомицина, линкозамидов, аминогликозидов и тетрациклина, т. е. фактически для всех групп препаратов, наиболее широко применяемых в различных областях клинической практики (в том числе и в пульмонологии).

В то же время многие гены антибиотикорезистентности наиболее представленных групп являются видоспецифическими (в норме присутствуют в геномах различных непатогенных видов, входящих в состав нормофлоры кишечника). При этом соответствующие гены могут экспрессироваться или же являются молчашими. Поэтому относительная представленность групп не означает большую или меньшую представленность резистентных микроорганизмов, а скорее отражает естественное разнообразие и представленность генов резистентности к антибиотикам разных групп в природных популяциях бактерий.

Примечательно, что во всех образцах кишечной микробиоты больных ХОБЛ как метагеномным методом, так и методом ПЦР реального времени идентифицированы гены *ermB* и *mef*. Данные гены детерминируют устойчивость микроорганизмов к макролидам, среди которых азитромицин и кларитромицин — наиболее востребованные в пульмонологической практике противомикробные препараты, назначаемые, в том числе, и при обострениях ХОБЛ.

Различия в уровне резистента между группами, наблюдаемые при суммировании данных по антибиотикам, отражаются и в представленности надклассов генов, определяющих конкретный механизм устойчивости. Так, выявлены 29 классов генов устойчивости, представленность которых значимо повышена в группе пациентов с ХОБЛ, в то время как в группе контроля — ни одного. При этом наиболее широко в образцах метагеномов кала больных ХОБЛ представлены гены, кодирующие RND транспортеры (Resistance-nodulation-division), являющиеся эффлюксными насосами, обеспечивающими множественную лекарственную устойчивость.

Для макролидов и цефалоспоринов, а также линкозамидов и сульфаниламидов выявлена положительная корреляция между относительной представленностью резистента и количеством курсов антибиотикотерапии за предшествующий год. Также более частому применению антибактериальных препаратов соответствовал более высокий уровень резистента по некоторым надклассам генов устойчивости (*tet mod*, *medtl*, *erm*, *sul*, *mls mfs*, *emrd*, *bla a*).

## Заключение

Таким образом, частота и качество антибактериальной терапии непосредственно влияют на уровень представленности и состав генетических детерминант антибиотикоустойчивости кишечной микробиоты больных ХОБЛ.

Рассматривая относительно стабильные микробные сообщества кишечника как потенциальную модель накопления (резервуар) генов лекарственной устойчивости микроорганизмами, населяющими тело человека, в целом, следует отметить тот факт, что, в отличие от здоровых лиц, у пациентов с ХОБЛ гены антибиотикорезистентности в различных вариациях представлены в подавляющем большинстве образцов.

Обнаруженные в кишечной микробиоте больных ХОБЛ генетические детерминанты лекарственной устойчивости ответственны за реализацию механизмов резистентности к наиболее значимым группам антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины, макролиды, фторхинолоны и др.). Данный факт, вероятно, является следствием наиболее частого применения указанных групп препаратов в лечении эпизодов обострений ХОБЛ, ассоциированных с респираторной инфекцией.

Следует отметить, что наличие тех или иных генов антибиотикорезистентности у конкретного микроорганизма может напрямую не соотноситься с результатами определения чувствительности к антибиотикам *in vitro* культуральными методами, и терапевтической эффективностью соответствующих противомикробных препаратов в условиях реальной клинической практики, однако отражает процесс приобретения новых детерминант устойчивости или замещения чувствительной микрофлоры на резистентную в попытке приспособления и выживания в условиях агрессивного лекарственного воздействия.

В связи с этим проведение антибактериальной терапии при обострении ХОБЛ должно быть обоснованным с позиции наличия у пациента критериев (маркеров) бактериальной инфекции, а выбор препарата следует осуществлять в соответствии с национальными рекомендациями, учитывающими ключевых возбудителей, особенности распространенности устойчивых к тем или иным антибиотикам микроорганизмов, а также наличие факторов риска антибиотикорезистентности у конкретного пациента.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № НК 13–04–01854 и федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (ГК № 14.604.21.0075, уникальный идентификатор RFMEFI60414X0075), с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского (Приволжского) федерального университета (ГК № 14.594.21.0003, уникальный идентификатор RFMEFI59414X0003).*

**Литература**

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Electronic resource]. - Update 2011. - Mode of access: <http://www.goldcopd.com/GuidelineItem.asp?intId=989>.
2. Seemungal T.A., Donaldson G.C., Paul E.A., et al. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 151:1418-22.
3. Bennett P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008; 153:347-57.
4. Tyakht A.V., Kostyukova E.S., Popenko A.S., et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat. Commun* 2013; 4:eP. 2469.
5. Liu B., Pop M. ARDB - Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(Database issue): D443-7.
6. Zhao Y., Tang H., Ye Y. RAPSearch2: a fast and memory-efficient protein similarity search tool for next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 2012; 28(1):125-6.
7. Справочник по антимикробной терапии. Выпуск 3. Под ред. Р.С. Козлова, А.В. Дехнича. - Смоленск: МАКМАХ, 2013. - 480 с.