

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ АМИНОГЛИКОЗИДФОСФОТРАНСФЕРАЗ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ В МИКРОБИОТЕ ЖИТЕЛЕЙ РОССИИ

А. С. Ковтун<sup>1,2</sup>, М. Г. Алексеева<sup>1</sup>, О. В. Аверина<sup>1</sup>, В. Н. Даниленко<sup>1,2,3</sup> ✉

<sup>1</sup> Лаборатория генетики микроорганизмов, отдел генетических основ биотехнологии, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

<sup>2</sup> Факультет биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

<sup>3</sup> Научно-исследовательский центр биотехнологии антибиотиков «БИОАН», Москва

Устойчивость бактерий к антибиотикам является одной из самых серьезных проблем в современной медицине. Эффективность антимикробной терапии снижается вследствие работы бактериальных ферментов — аминогликозидфосфотрансфераз (Aph). Гены *aph* аннотированы в геномах многих бактерий, в том числе комменсалов микробиоты кишечника, из геномов которых они могут попадать в геномы клинически значимых штаммов. Анализ *in silico* 11 метагеномов кишечника здоровых людей из России показал наличие в 7 образцах микробиоты 3 генов *aph* из 21, включенного в каталог, составленный для исследования: *aph(3')-Ib*, *aph(3')-IIIa* и *aph(2')-Ia*. Наиболее распространенным оказался ген *aph(3')-IIIa*, найденный в 6 исследованных метагеномах. Важно, что этот ген впервые был обнаружен у *Enterococcus faecalis*, но в данной работе он был идентифицирован в генетическом окружении, характерном для комменсальной бактерии *Ruminococcus obeum* и условно-патогенных бактерий *Enterococcus faecium*, *Roseburia hominis*, *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus epidermidis*. То же наблюдали для гена *aph(2')-Ia*: он был обнаружен для *Clostridium difficile*, а не для *E. faecalis*. Полученные результаты согласуются с литературными данными, указывающими на значимое влияние географического происхождения людей на распространенность *aph*-генов. Также, учитывая данные исследования, представляется обоснованным при клиническом обследовании пациентов с инфекционными заболеваниями и назначении антибиотиков для их лечения анализировать антибиотикорезистентность не только бактерии-возбудителя, но и микробиоты пациента.

**Ключевые слова:** устойчивость к антибиотикам, антибиотикорезистентность, аминогликозидфосфотрансферазы, Aph, клинические штаммы бактерий, микробиом, микробиота, кишечник человека

**Благодарности:** авторы благодарят профессора Сергея Сидоренко из Северо-Западного государственного медицинского университета имени И. И. Мечникова за обсуждение

✉ **Для корреспонденции:** Даниленко Валерий Николаевич  
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; valerid@vigg.ru

**Статья получена:** 29.03.2017 **Статья принята к печати:** 07.04.2017

## IDENTIFICATION OF AMINOGLYCOSIDE PHOSPHOTRANSFERASES OF CLINICAL BACTERIAL ISOLATES IN THE MICROBIOTA OF RUSSIANS

Kovtun AS<sup>1,2</sup>, Alekseeva MG<sup>1</sup>, Averina OV<sup>1</sup>, Danilenko VN<sup>1,2,3</sup> ✉

<sup>1</sup> Laboratory of bacterial genetics, Department of genetics and biotechnology, Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Department of biological and medical physics, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia

<sup>3</sup> Scientific Research Center for Biotechnology of Antibiotics "BIOAN", Moscow, Russia

Antibiotic resistance is one of the biggest threats to modern medicine. Response to antimicrobial treatment is seriously disrupted by aminoglycoside phosphotransferases (Aph) — enzymes produced by bacteria. The *aph* genes were annotated in many bacterial species, including commensals of the gut microbiota that can transfer these genes to clinically important strains. For this study we prepared a catalog of 21 *aph* genes. The *in silico* analysis of 11 intestinal microbiomes of healthy Russians revealed the presence of 3 cataloged *aph* genes in 7 microbiota samples, namely *aph(3')-Ib*, *aph(3')-IIIa* and *aph(2')-Ia*. The most frequent was the *aph(3')-IIIa* gene detected in 6 metagenomes. Of note, this gene was first discovered in *Enterococcus faecalis*, but in this study we observed it in sequences typical for commensal *Ruminococcus obeum* and opportunistic *Enterococcus faecium*, *Roseburia hominis*, *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus epidermidis*. Similarly, *aph(2')-Ia* originally present in *E. faecalis* was detected in a sequence typical for *Clostridium difficile*. Our findings are consistent with the reports on the strong association between the geographical origin of the individual and frequency of *aph* genes. We suggest that clinical examination should include antibiotic sensitivity tests run not only on the causative agent, but also on the gut microbiota, for a better treatment outcome.

**Keywords:** antibiotic resistance, aminoglycoside phosphotransferase (Aph), clinical isolates of bacteria, human gut microbiota

**Acknowledgements:** authors thank Professor Sergey Sidorenko of North-West State Medial University for his comments on the article.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valery Danilenko  
ul. Gubkina, d. 3, Moscow, Russia, 119991; valerid@vigg.ru

**Received:** 29.03.2017 **Accepted:** 07.04.2017

Ежегодно только в США по крайней мере 2 миллиона человек оказываются инфицированы бактериями, устойчивыми к антибиотикам, и по меньшей мере 23 000 человек умирают от устойчивых бактериальных инфекций [1]. Растущая антибиотикорезистентность патогенов человека является серьезной клинической проблемой с важными экологическими последствиями. По данным Antibiotic Resistance Genes Database (ARDB) [2], в настоящее время насчитывается 13 293 гена устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Возможность обмена генетической информацией между бактериями в смешанных популяциях обуславливает существование множества потенциальных сложных путей распространения генов резистентности [3].

Кишечник человека, содержащий наибольшее количество клеток (около  $10^{14}$ ) и видов (около 1000) микроорганизмов [4], образует динамический резервуар генов устойчивости к антибиотикам (резистому) [5]. Лечение с использованием антибактериальных агентов оказывает значительное влияние на резистому кишечника и приводит к росту интенсивности горизонтального переноса генов и селекции устойчивых форм [6]. Анализ генов устойчивости представителей кишечной микробиоты показывает, что комменсальные бактерии желудочно-кишечного тракта могут быть резервуарами генов устойчивости для других видов бактерий, в том числе патогенных [7].

Для изучения проблемы устойчивости к антибиотикам используют высокотехнологичные методы секвенирования ДНК нового поколения, методы биоинформатики и аналитической химии, что позволяет проводить идентификацию более 20–30 кластеров генов, связанных с устойчивостью к антибиотикам [8]. В Центре по изучению генома и системной биологии Вашингтонского университета был проведен биоинформатический анализ распространения генов устойчивости к 18 клинически значимым антибиотикам. Были выявлены гены устойчивости к двум из наиболее широко используемых классов антибиотиков в клинике и в сельском хозяйстве —  $\beta$ -лактамам и тетрациклинам [9].

Серьезную угрозу для антимикробной терапии представляют аминогликозидфосфотрансферазы (Aph) [10]. Гены этих ферментов впервые были обнаружены в плазмидах и мобильных элементах клинических штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий [11]. Проведенный филогенетический анализ Aph клинических штаммов и штаммов-продуцентов аминогликозидных антибиотиков [12] показал, что в зависимости от положения гидроксильной группы антибиотика, модифицируемой ферментом, различают 7 подсемейств аминогликозидфосфотрансфераз: Aph(2''), Aph(3'), Aph(3''), Aph(4), Aph(6), Aph(7'') и Aph(9).

Гены *aph* аннотированы в геномах многих бактерий, в том числе непатогенных штаммов бактерий микрофлоры кишечника, от которых они могут передаваться клиническим штаммам [13]. Анализ метагеномной ДНК кишечника новорожденных показал, что уже в это время кишечник является резервуаром многочисленных генов резистентности к аминогликозидам и  $\beta$ -лактамам [14].

При сравнении метагеномов кишечника 832 человек из десяти разных стран (Англии, Финляндии, Франции, Италии, Норвегии, Шотландии, США, Японии, Китая и Малави) было установлено, что существенное влияние на состав генов устойчивости оказывало географическое происхождение человека [15].

В различных лабораториях мира были проведены исследования распространения генов *aph*. Ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* являлся наиболее распространенным геном

устойчивости к аминогликозидам у энтерококков и был выявлен в 26 из 27 изолятов, выделенных из организмов пациентов иранской больницы [16]. При эпидемиологическом исследовании 534 клинических штаммов, выделенных в японской больнице, по распределению 12 генов аминогликозид-модифицирующих ферментов в трех штаммах *Enterococcus faecium* был идентифицирован ген *aph(2'')-Ie*, в трех штаммах *E. faecalis*, *E. faecium* и *E. avium* — ген *ant(9)-Ia*. Нуклеотидные последовательности генов *ant(9)-Ia* из этих трех энтерококков были идентичны генам *Staphylococcus aureus* и были расположены в транспозоне Tn554 [17]. Поскольку аминогликозиды часто используются для лечения стафилококковых инфекций, исследовалась распространенность устойчивости к аминогликозидам среди метициллин-резистентных штаммов *S. aureus*, выделенных из организмов пациентов иранской клиники. Были обнаружены гены *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa* и *ant(4')-Ia* среди 134 (77,0 %), 119 (68,4 %) и 122 (70,1 %) изолятов соответственно [18].

В связи с этим актуальна задача идентификации генов аминогликозидфосфотрансфераз в метагеномах желудочно-кишечного тракта жителей России.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Пробоподготовка и секвенирование ДНК микробиома

Объектом исследования была кишечная микробиота 11 здоровых людей разного возраста и пола — жителей Москвы и Твери. Отбирали пробы фекалий, используя стандартные методики [19]. До использования в экспериментах образцы хранили замороженными ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Тотальную бактериальную геномную ДНК выделяли из навесок замороженного кала при помощи набора реагентов QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Германия) по протоколу, рекомендованному производителем. Использовали версию протокола с условиями лизиса для преимущественного выделения ДНК микроорганизмов Protocol: Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection (Qiagen). Концентрацию выделенной ДНК определяли с помощью прибора Qubit (Invitrogen, США). Полученная геномная ДНК была фрагментирована на ультразвуковом фрагментаторе Covaris M220 (Covaris, США) до размера фрагментов 100–700 пар оснований (средний размер —  $\sim 350$  п. о.).

Библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора реагентов NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, Великобритания). Для секвенирования были отобраны фрагменты длиной от 250 до 500 п. о., включая адаптерные последовательности. Библиотеки были проверены при помощи анализатора Agilent TapeStation (Agilent Technologies, Германия) и смешаны эквимолярно. Последовательности адаптеров, использованных при подготовке библиотек: Read1 (AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACNNNNNNATCT CGTATGCCGTCTTCTGCTTG) и Read2 (AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGATAGATCTCG GTGGTCGCCGTATCAT), где NNNNNN — шестинуклеотидный индекс, уникальный для каждого образца. После контроля качества и определения количества библиотек при помощи количественной полимеразной цепной реакции пул библиотек был секвенирован на одной дорожке прибора Illumina HiSeq 4000 (101 цикл с каждого конца фрагментов) с использованием реактивов HiSeq 4000 SBS sequencing kit version 1 (Illumina, США). Файлы FASTQ были получены с помощью программы

bcl2fastq v2.17.1.14 Conversion Software (Illumina). Формат записи строки данных о качестве — Phred 33. Полученные метагеномы были депонированы в базе данных Sequence Read Archive (SRA) NCBI. Описание полученных библиотек представлено в табл. 1.

#### Контроль качества метагеномных библиотек и сборка

Контроль качества полученных метагеномных библиотек проводили при помощи программы FastQC [20]. Тримминг проводили при помощи программы trimmomatic [21]. Фильтрация контаминации ридов, полученными из человеческого генома, проводили методом картирования метагеномных ридов на сборку генома человека. Для картирования использовали программа Bowtie2 [22]. Сборку метагеномных ридов до уровня контигов проводили при помощи программы SPAdes [23]. Описание полученных сборок представлено в табл. 2.

#### Составление каталога генов аминокликозидфосфотрансфераз

На основе литературных данных [12] был сформирован каталог генов аминокликозидфосфотрансфераз, найденных в клинических штаммах бактерий *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus circulans*, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Legionella pneumophila* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Всего в каталог вошел 21 ген. Также был создан каталог аминокислотных последовательностей, кодируемых отобранными генами аминокликозидфосфотрансфераз.

#### Анализ метагеномов

Для поиска генов аминокликозидфосфотрансфераз в полученных сборках метагеномов была написана программа на языке Perl. Основной задачей программы являлся запуск анализа метагеномов с помощью BLASTX и последующий отбор результатов по двум параметрам: гомологии и относительной длине выравнивания. В качестве базы данных для поиска использовали составленный в рамках исследования каталог из 31 аминокислотной последовательности. Отбор результатов выравниваний, полученных с помощью BLASTX, проводили с применением фильтров по гомологии и относительной длине выравнивания. Относительная длина выравнивания вычислялась программой по формуле:

$$L_{\text{относит}} = \frac{L_{\text{выравнив}}}{L_{\text{послед}}},$$

где  $L_{\text{выравнив}}$  — это длина полученного выравнивания, а  $L_{\text{послед}}$  — это длина референсной аминокислотной последовательности из каталога. Поскольку в данной работе не ставилась задача поиска новых генов аминокликозидфосфотрансфераз, в качестве минимального значения гомологии выбрали 90 %, а минимального значения относительной длины выравнивания — 80 %. Для определения видового состава исследуемых метагеномов была использована программа MetaPhlan2 [24].

Таблица 1. Описание исследуемых метагеномов

№	Образец	Пол	Возраст, лет	Регион	Номер в Genbank
1	4B_S2	Ж	34	Россия, г. Тверь	SRX1870055
2	12_S1	Ж	28	Россия, г. Тверь	SRX1878777
3	D3F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672491
4	D4F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672492
5	D5F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672493
6	D6F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672494
7	D11F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672495
8	D12F	Ж	15	Россия, г. Москва	SRX2672496
9	D13F	Ж	15	Россия, г. Москва	SRX2672497
10	DG_S1	Ж	28	Россия, г. Тверь	SRX1869842
11	HG550	Ж	6	Россия, г. Тверь	SRX1869839

Таблица 2. Описание сборок метагеномов

№	Образец	Размер сборки, Мбаз	Максимальная длина контига, п. н.	N50, п. н.
1	4B_S2	73	50917	2790
2	12_S1	160	111721	3800
3	D3F	106	855598	9284
4	D4F	237	433763	5677
5	D5F	140	517131	21016
6	D6F	238	544506	5742
7	D11F	46	1671967	7207
8	D12F	147	545374	7999
9	D13F	317	643760	12617
10	DG_S1	208	125246	2621
11	HG550	82	69816	3121

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Формирование каталога генов  
аминогликозидфосфотрансфераз из клинических  
штаммов

В зависимости от положения гидроксильной группы антибиотика, модифицируемой ферментом, различают 7 подсемейств аминогликозидфосфотрансфераз: Aph(2''), Aph(3'), Aph(3''), Aph(4), Aph(6), Aph(7'') и Aph(9). Каталог генов клинических штаммов был составлен путем обобщения данных, представленных в обзоре [12]. Каталог генов аминогликозидфосфотрансфераз из клинических штаммов приведен в табл. 3.

Поиск генов аминогликозидфосфотрансфераз  
в российских метагеномах

С помощью созданной программы были проанализированы метагеномы кишечника 11 здоровых людей из России. Результаты анализа представлены в табл. 4. Всего были идентифицированы 3 гена в 7 метагеномах. Все гены были идентифицированы с гомологией 100 %. Самым распространенным оказался ген *aph(3')-IIIa*, не найденный только в одном метагеноме из семи — D5F. В метагеноме D12F были найдены два гена: *aph(2'')-IIa* и *aph(3')-IIIa*. Ген *aph(3'')-Ib* был идентифицирован только в метагеноме D5F.

Исследуемые метагеномы были проанализированы по видовому составу с помощью программы MetaPhlan2. Риды, для которых был определен видовой состав, были картированы на метагеномные контиги с помощью Bowtie2. Таким образом, была определена видовой принадлежность контигов, в которых были найдены гены аминогликозидфосфотрансфераз [неопубликованные данные, А. С. Ковтун]. Результаты биоинформатического анализа метагеномов представлены в табл. 5.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный *in silico* анализ 11 кишечных метагеномов от здоровых россиян показал наличие генов аминогликозидфосфотрансфераз только в 7 из них и только 3 генов из 21, найденных в клинических штаммах бактерий *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus circulans*, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Legionella pneumophila* и *Pseudomonas aeruginosa* и включенных в составленный для исследования каталог *aph*-генов (табл. 3). Речь идет о следующих генах: *aph(3'')-Ib*, *aph(3')-IIIa* и *aph(2'')-IIa*. Наиболее распространенным оказался ген *aph(3')-IIIa* (CAA24789), найденный в 6 исследуемых метагеномах. Этот ген ранее был выявлен в геноме *E. faecalis* как определяющий устойчивость

Таблица 3. Каталог генов аминогликозидфосфотрансфераз из клинических штаммов

Название гена	Ссылка на GenBank	Бактерия*	Локализация генов	Устойчивость к аминогликозидам
<i>aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia</i>	AAA26865	<i>Enterococcus faecalis</i>	Хромосома	Тобрамицин
<i>aph(2'')-IIa</i>	AAK63040	<i>Escherichia coli</i>	Хромосома	Канамицин, гентамицин
<i>aph(2'')-IIIa</i>	AAB49832	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Хромосома	Гентамицин
<i>aph(2'')-IVa</i>	AAC14693	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Хромосома	Гентамицин
<i>aph(2'')-Ie</i>	AAW59417	<i>Enterococcus faecium</i>	Хромосома	Гентамицин
<i>aph(3')-Ia</i>	CAA23656	<i>Escherichia coli</i>	Транспозон Tn903	Канамицин
<i>aph(3')-Ib</i>	AIL00451	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Хромосома	
<i>aph(3')-IIa</i>	CAA23892	<i>Escherichia coli</i>	Транспозон Tn5	Неомицин
<i>aph(3')-IIb</i>	AAG07506	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Хромосома	Канамицин, неомицин, бутирозин, селдомицин
<i>aph(3')-IIIa</i>	CAA24789	<i>Enterococcus faecalis</i>	Хромосома	Канамицин
<i>aph(3')-IVa</i>	P00553	<i>Bacillus circulans</i>	Транспозоны Tn5 и Tn903	Канамицин, неомицин
<i>aph(3')-VIa</i>	CAA30578	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Канамицин, амикацин
<i>aph(3')-VIb</i>	CAF29483	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Транспозон Tn5393	Канамицин, стрептомицин, амикацин
<i>aph(3')-VIIa</i>	P14508	<i>Campylobacter jejuni</i>	Хромосома	Канамицин, неомицин
<i>aph(3')-VIIIa</i>	P14509	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида RP4	Канамицин, неомицин
<i>aph(3'')-Ib</i>	AAA26442	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида RSF1010	Стрептомицин
<i>aph(4)-Ia</i>	P00557	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида pJR225	Гигромицин
<i>aph(4)-Ib</i>	CAA52372	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Хромосома	Гигромицин
<i>aph(6)-Ic</i>	CAA25854	<i>Escherichia coli</i>	Транспозон Tn5	Стрептомицин
<i>aph(6)-Id</i>	AAA26443	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида RSF1010	Стрептомицин
<i>aph(9)-Ia</i>	AAB58447	<i>Legionella pneumophila</i>	Хромосома	Спектиномицин

Примечание. \* — организм, из которого был впервые выделен данный ген.

Таблица 4. Гены аминогликозидфосфотрансфераз, идентифицированные в исследуемых метагеномах

Название гена	Номера метагеномов										
	4B_S2	12_S1	D3F	D4F	D5F	D6F	D11F	D12F	D13F	DG_S1	HG550
<i>aph(2'')-Ia</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>aph(3'')-Ib</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>aph(3')-IIIa</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+

Таблица 5. Видовой состав исследуемых метагеномов, в которых были идентифицированы гены аминогликозидфосфотрансфераз

Метагеном	Длины контигов, п. н.	<i>aph(2'')-Ia</i>	<i>aph(3')-Ib</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>
D3F	3389	–	–	<i>Enterococcus faecium</i>
D4F	6439	–	–	<i>Ruminococcus obeum</i>
D5F	1422	–	<i>Escherichia coli</i>	–
D6F	979	–	–	<i>Enterococcus faecium</i>
D12F	5607 (для гена <i>aph(3')-IIIa</i> ); 4407 (для гена <i>aph(2'')-Ia</i> )	<i>Clostridium difficile</i>	–	<i>Roseburia hominis</i>
D13F	4356	–	–	<i>Streptococcus pyogenes</i>
HG550	2242	–	–	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

к канамицину. Только в одном метагеноме встречался ген *aph(3')-Ib* (AAA26442), выявленный ранее в геноме *E. coli* как определяющий устойчивость к стрептомицину, и ген *aph(2'')-Ia* (AAA26865), выявленный ранее в геноме *E. faecalis* как определяющий устойчивость к тобрамицину (табл. 3).

Интересно, что анализ контигов, в которых были выявлены гены аминогликозидфосфотрансфераз, показал их присутствие в геномах бактерий иных видов. Ген *aph(3')-IIIa* был обнаружен в генетическом окружении, характерном для комменсальной бактерии *Ruminococcus obeum*, а также условно-патогенных бактерий *E. faecium*, *Roseburia hominis*, *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus epidermidis*, но не для *E. faecalis*. Ген *aph(2'')-Ia* был обнаружен для *Clostridium difficile*, а не *E. faecalis* (табл. 3, табл. 5). Таким образом, этот ген, оказавшийся наиболее распространенным у энтерококков в исследовании [16], встретился только в одном российском метагеноме и не в энтерококке. Гены *aph(2'')-Ia* и *aph(3')-IIIa* ранее были обнаружены у метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* [17], но в российском метагеноме ген *aph(3')-IIIa* присутствовал в генетическом окружении, характерном для *Staphylococcus epidermidis*. Ген *aph(3')-Ib* был обнаружен в *E. coli*.

Представленные результаты согласуются с данными, полученными при сравнительном анализе метагеномов кишечника жителей разных стран мира: возраст, пол и состояние здоровья человека мало влияют на антибиотикорезистентный потенциал микробиоты кишечника, тогда как географическое происхождение человека оказывает существенное влияние на состав резистом [15]. Редкая встречаемость *aph*-генов в российских метагеномах и их принадлежность к определенным классификационным группам могут указывать на региональную специфичность состава микробиоты и более редкое использование ами-

ногликозидов в лечебных целях у людей, чей микробиом был использован для данного исследования. С другой стороны, у анаэробных бактерий, являющихся большинством в популяции кишечника, отсутствие *aph*-генов может объясняться тем, что у них нет цитохром-опосредованного транспорта [25]. Важным результатом является наличие в микробиоме здорового человека условно-патогенных бактерий, содержащих *aph*-гены.

## Выводы

В 7 образцах микробиоты 11 здоровых жителей России было установлено наличие генов аминогликозидфосфотрансфераз, ранее выявленных в клинических штаммах бактерий: *aph(3')-Ib*, *aph(3')-IIIa* и *aph(2'')-Ia*. Наиболее распространенным оказался ген *aph(3')-IIIa*. Обнаруженные гены встречались у условно-патогенных бактерий *Enterococcus faecium*, *Roseburia hominis*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*. Два из них, *E. coli* и *E. faecium*, относятся к 12 самым опасным бактериям (по данным Всемирной организации здравоохранения). В связи с этим при клиническом обследовании пациентов с инфекционными заболеваниями и назначении антибиотиков для их лечения целесообразно проводить диагностический анализ на устойчивость к антибиотикам не только в отношении бактерии-возбудителя, но и в отношении микробиоты пациента.

Исследования распространенности генов устойчивости к антибиотикам в микробиоте желудочно-кишечного тракта российских людей представлены впервые в данной работе. Подобным образом, в том числе с использованием ПЦР-анализа, необходимо проводить поиск и других клинически важных генов устойчивости.

## Литература

- Hossion AM, Sasaki K. Novel quercetin glycosides as potent anti-MRSA and anti-VRE agents. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013 Dec; 8 (3): 198–205.
- McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jul; 57 (7): 3348–57.
- Wooldridge M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Rev Sci Tech*. 2012 Apr; 31 (1): 231–47.
- Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*. 2013 Jan 3; 493 (7430): 45–50.
- Elbeheri AH, Aziz RK, Siam R. Antibiotic Resistome: Improving Detection and Quantification Accuracy for Comparative Metagenomics. *OMICS*. 2016 Apr; 20 (4): 229–38.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Jan; 13 (1): 42–51.
- Willmann M, El-Hadidi M, Huson DH, Schütz M, Weidenmaier C, Autenrieth IB, et al. Antibiotic Selection Pressure Determination through Sequence-Based Metagenomics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec; 59 (12): 7335–45.
- Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol*. 2014 Oct; 21: 45–50.
- Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J*. 2015 Jan; 9 (1): 207–16.
- Shakya T, Wright GD. Nucleotide selectivity of antibiotic kinases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 May; 54 (5): 1909–13.
- Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun (Camb)*. 2011 Apr 14; 47 (14): 4055–61.

12. Shakya T, Stogios PJ, Waglechner N, Evdokimova E, Ejim L, Blanchard JE, et al. A small molecule discrimination map of the antibiotic resistance kinome. *Chem Biol*. 2011 Dec 23; 18 (12): 1591–601.
13. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7; 21 (29): 8787–803.
14. Fouhy F, Ogilvie LA, Jones BV, Ross RP, Ryan AC, Dempsey EM, et al. Identification of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam resistance genes from within an infant gut functional metagenomic library. *PLoS One*. 2014 Sep 23; 9 (9): e108016.
15. Forslund K, Sunagawa S, Coelho LP, Bork P. Metagenomic insights into the human gut resistome and the forces that shape it. *Bioessays*. 2014 Mar; 36 (3): 316–29.
16. Emaneini M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, et al. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *J Prev Med Hyg*. 2016 Dec; 57 (4): E197–E200.
17. Mahbub Alam M, Kobayashi N, Ishino M, Sumi A, Kobayashi K, Uehara N, et al. Detection of a novel *aph(2'')* allele (*aph(2'')-Ie*) conferring high-level gentamicin resistance and a spectinomycin resistance gene *ant(9)-Ia* (*aad 9*) in clinical isolates of enterococci. *Microb Drug Resist*. 2005 Fall; 11 (3): 239–47.
18. Mahdiyoun SM, Kazemian H, Ahanjan M, Hourii H, Goudarzi M. Frequency of Aminoglycoside-Resistance Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Hospitalized Patients. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Jul 26; 9 (8): e35052.
19. Standard operating procedure for fecal samples DNA extraction. The International Human Microbiome Standards (IHMS) project [интернет]. [дата обращения: 3 апреля 2017 г.]. Доступно по: <http://www.microbiome-standards.org/index.php#SOPS>
20. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Version 0.11.5 [программное обеспечение]. Babraham Bioinformatics group. 8 марта 2016 г. [дата обращения: 3 апреля 2017 г.]. Доступно по: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
21. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1; 30 (15): 2114–20.
22. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Mar 4; 9 (4): 357–9.
23. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May; 19 (5): 455–77.
24. Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, Scholz M, Weingart G, Pasolli E, et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat Methods*. 2015 Oct; 12 (10): 902–3.
25. Mättö J, Suihko ML, Saarela M. Comparison of three test media for antimicrobial susceptibility testing of bifidobacteria using the Etest method. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Jul; 28 (1): 42–8.

## References

1. Hossion AM, Sasaki K. Novel quercetin glycosides as potent anti-MRSA and anti-VRE agents. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013 Dec; 8 (3): 198–205.
2. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jul; 57 (7): 3348–57.
3. Wooldridge M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Rev Sci Tech*. 2012 Apr; 31 (1): 231–47.
4. Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*. 2013 Jan 3; 493 (7430): 45–50.
5. Elbeheri AH, Aziz RK, Siam R. Antibiotic Resistome: Improving Detection and Quantification Accuracy for Comparative Metagenomics. *OMICS*. 2016 Apr; 20 (4): 229–38.
6. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Jan; 13 (1): 42–51.
7. Willmann M, El-Hadidi M, Huson DH, Schütz M, Weidenmaier C, Autenrieth IB, et al. Antibiotic Selection Pressure Determination through Sequence-Based Metagenomics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec; 59 (12): 7335–45.
8. Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol*. 2014 Oct; 21: 45–50.
9. Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J*. 2015 Jan; 9 (1): 207–16.
10. Shakya T, Wright GD. Nucleotide selectivity of antibiotic kinases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 May; 54 (5): 1909–13.
11. Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun (Camb)*. 2011 Apr 14; 47 (14): 4055–61.
12. Shakya T, Stogios PJ, Waglechner N, Evdokimova E, Ejim L, Blanchard JE, et al. A small molecule discrimination map of the antibiotic resistance kinome. *Chem Biol*. 2011 Dec 23; 18 (12): 1591–601.
13. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7; 21 (29): 8787–803.
14. Fouhy F, Ogilvie LA, Jones BV, Ross RP, Ryan AC, Dempsey EM, et al. Identification of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam resistance genes from within an infant gut functional metagenomic library. *PLoS One*. 2014 Sep 23; 9 (9): e108016.
15. Forslund K, Sunagawa S, Coelho LP, Bork P. Metagenomic insights into the human gut resistome and the forces that shape it. *Bioessays*. 2014 Mar; 36 (3): 316–29.
16. Emaneini M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, et al. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *J Prev Med Hyg*. 2016 Dec; 57 (4): E197–E200.
17. Mahbub Alam M, Kobayashi N, Ishino M, Sumi A, Kobayashi K, Uehara N, et al. Detection of a novel *aph(2'')* allele (*aph(2'')-Ie*) conferring high-level gentamicin resistance and a spectinomycin resistance gene *ant(9)-Ia* (*aad 9*) in clinical isolates of enterococci. *Microb Drug Resist*. 2005 Fall; 11 (3): 239–47.
18. Mahdiyoun SM, Kazemian H, Ahanjan M, Hourii H, Goudarzi M. Frequency of Aminoglycoside-Resistance Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Hospitalized Patients. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Jul 26; 9 (8): e35052.
19. Standard operating procedure for fecal samples DNA extraction. The International Human Microbiome Standards (IHMS) project [Internet]. [cited 2017 Apr 3]. Available from: <http://www.microbiome-standards.org/index.php#SOPS>
20. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Version 0.11.5 [software]. Babraham Bioinformatics group. 2016 Mar 8 [cited 2017 Apr 3]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
21. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1; 30 (15): 2114–20.
22. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Mar 4; 9 (4): 357–9.
23. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May; 19 (5): 455–77.
24. Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, Scholz M, Weingart G, Pasolli E, et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat Methods*. 2015 Oct; 12 (10): 902–3.
25. Mättö J, Suihko ML, Saarela M. Comparison of three test media for antimicrobial susceptibility testing of bifidobacteria using the Etest method. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Jul; 28 (1): 42–8.