

## АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ: ЭВОЛЮЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

*Фурсова Н.К. \**, кандидат биологических наук, [fursova@obolensk.org](mailto:fursova@obolensk.org);  
*Карцев Н.Н. \**, тел. 8(4967) 36-00-79, [veselydoktor@yandex.ru](mailto:veselydoktor@yandex.ru);  
*Иваилов С.В. \*\**, тел. 8(4967) 31-07-98, [sv-ivashov@rambler.ru](mailto:sv-ivashov@rambler.ru);  
*Светоч Э.А.*, доктор ветеринарных наук, профессор, [svetoch@obolensk.org](mailto:svetoch@obolensk.org)  
*\*ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии»*  
*\*\*МЛПУ Протвинская городская больница, Московская обл.,*

**Ключевые слова:** *устойчивость к антибактериальным препаратам, горизонтальный перенос генов, эволюция резистентности*

*Работа посвящена обзору данных литературы и представлению результатов собственных исследований по распространенности устойчивости к антимикробным препаратам у бактериальных патогенов человека, по эволюции молекулярных механизмов и клинической значимости данного явления. Рассматривается роль бактериофагов в горизонтальном и вертикальном переносе генетических детерминант резистентности и патогенности.*

Уровень инфекционной заболеваемости населения является одним из компонентов оценки “индекса здоровья” нации. За всю историю человечества именно инфекции внесли подавляющий вклад (почти 90%) в показатель смертности. В настоящее время инфекционные заболевания в мировом масштабе являются главным «убийцей» людей детского и молодежного возраста – 13 млн. смертей в год. В развивающемся мире это – каждая вторая смерть. Каждые 3 секунды в мире умирает ребенок – в большинстве случаев от инфекции. Инфекции стали быстрее распространяться в новые регионы благодаря массовым перемещениям популяций в последние десятилетия (начиная с 1996 г. около 50 млн. людей - 1% мировой популяции – мигрировали). Усугубляющими факторами также являются: рост плотности населения в городах; недостаточно чистая питьевая вода; низкий уровень санитарии; нищета; наличие соматических заболеваний, ослабляющих иммунитет [1].

Основным средством борьбы с серьезными инфекциями являются антибиотики. В свое время, в середине XX в., они сыграли революционную роль, снизив смертность от бактериальных инфекций; и до сих пор многие методы современной медицины немыслимы без применения антибиотиков: трансплантация, химиотерапия рака, ортопедическая хирургия и другие. Однако в последние десятилетия арсенал доступных для лечения инфекций лекарств повсеместно стремительно уменьшается из-за прогрессивного увеличения резистентности возбудителей к применяемым лекарствам и недостаточно быстрого появления новых антибактериальных препаратов [2]. Врачи всего мира сталкиваются с ситуациями, когда инфицированному больному не может быть назначена адекватная терапия из-за устойчивости инфекционного агента ко всем имеющимся антибиотикам. Таким образом, назрел кризис здравоохранения, осложняющийся большим количеством возбудителей инфекционных заболеваний человека, в значительной степени отличающихся по своим свойствам, набору факторов патогенности, механизмам резистентности, а также возможным путям преодоления сформировавшейся лекарственной резистентности.

Всемирная организация здравоохранения (WHO) рекомендует в первую очередь сосредоточить усилия исследователей на направлениях, представляющих наибольшую опасность для здравоохранения многих стран мира - шести смертельных инфекциях, являющихся

причиной 50 % от всех преждевременных смертей в мире (пневмония, туберкулез, кишечные заболевания, малярия, корь и синдром иммунодефицита СПИД/ВИЧ) [3].

Резистентность возбудителей к применяемым антибактериальным препаратам значительно усложнила борьбу с первыми пятью из шести перечисленных смертельных болезней. У многих опасных возбудителей (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Mycobacterium tuberculosis*) отмечается «эскалация» развития резистентности: множественно-резистентные изоляты бактерий (multi drug resistance, MDR) нечувствительны по крайней мере к одному из применяемых для лечения данной инфекции антибиотиков из трех функциональных классов; экстремально-резистентные изоляты бактерий (extreme drug resistance, XDR) - по крайней мере к одному антибиотику из всех функциональных классов, кроме одного или двух; пан-резистентные изоляты бактерий (pan drug resistance, PDR) – ко всем антибиотикам из всех функциональных классов [4, 5]. Яркими примерами инфекций, вызванных резистентными возбудителями в последние годы, явились: вспышка кишечного заболевания в Европе, вызванная MDR-*E. coli* O104:H4 [6] и появление в Индии, с последующим распространением в Европе, PDR-бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, несущих New Delhi металло-бета-лактамазу-1 (NDM-1) [7].

С точки зрения эпидемиологии инфекции подразделяются на две большие группы: внутрибольничные (госпитальные или нозокомиальные) и внебольничные инфекции, часть из которых расценивается как социально-значимые. В настоящее время доля устойчивых к лекарственным препаратам нозокомиальных штаммов в разных странах составляет от 5 % до 60-80 %, зачастую такие инфекции заканчиваются летально (19 тыс. случаев ежегодно в США, столько же – в Европе) [3]. Резистентные формы возбудителей все чаще выделяются от амбулаторных пациентов, от домашних и сельскохозяйственных животных, а также из объектов окружающей среды. Доказано, что бактерии активно обмениваются генетическими детерминантами резистентности, сформирована концепция о наборах факторов резистентности, присутствующих конкретным сообществам бактерий (резистом) [8], в том числе – микробному сообществу организма человека (микробиом) [9].

Основные генетические механизмы, определяющие лекарственную устойчивость у бактерий, относящихся к разным таксономическим группам, значительно отличаются. Так, у метициллин-устойчивых *Staphylococcus aureus* (MRSA) важную роль играет стафилококковая хромосомная кассета SCCmec; у *Pseudomonas aeruginosa* – гены нескольких типов эффлюксных насосов, у *Acinetobacter baumannii* – специфичные мобильные транспозоны *Aba*; у энтеробактерий – гены бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС); у *Mycobacterium tuberculosis* – точечные мутации в генах, кодирующих ферменты, модифицирующие молекулы лекарства. Свой вклад в резистомы отдельных видов бактерий вносят также и универсальные механизмы устойчивости к некоторым классам лекарств: так, устойчивость к хинолонам формируется благодаря наличию точечных мутаций в генах, кодирующих ферменты ДНК-гиразу и топоизомеразу IV. Большую роль в формировании и распространении наиболее «успешных» механизмов резистентности играют мобильные генетические элементы (транспозоны, интегроны, IS-элементы, плазмиды) и универсальные процессы обмена генетической информацией (конъюгация, трансформация, трансдукция, рекомбинация). [10].

Наблюдаемая драматическая картина нарастающей резистентности возбудителей инфекционных болезней человека сложилась в результате совокупного действия нескольких факторов: неадекватного использования антибиотиков - выбора препарата, схемы лечения и/или дозировки (так, в Канаде и США 50 %, а во Вьетнаме - 70% назначений антибиотиков амбулаторным больным признано неоправданным [3]); использования антибиотиков в пищевом производстве (50 % производимых антибиотиков используется в животноводстве, расте-

ниеводстве и садоводстве); активации эволюционных механизмов у госпитальных сообществ микроорганизмов (мутации, горизонтальный перенос генов, мобильные генетические элементы [11]).

В Российской Федерации, как и во всем мире, происходят процессы эволюционной адаптации возбудителей инфекционных заболеваний к применяемым антибактериальным препаратам, проблема резистентности стоит очень остро [12-14]. В нашей лаборатории проводятся работы по изучению молекулярных механизмов множественной устойчивости у бактериальных патогенов, показана важная роль мобильных генетических элементов в распространении генов эпидемических бета-лактамаз СТХ-М типа, а также интегронов - в формировании фенотипов множественной устойчивости у энтеробактерий [15, 16].

Горизонтальному переносу генов (HGT) противостоит специфический механизм защиты генома бактерий от чужеродной информации - система CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), препятствующая поглощению клеткой чужеродной ДНК и являющаяся аналогом иммунной системы у высших организмов [17]. Данная система состоит из коротких нуклеотидных последовательностей (спейсеров), имеющих вирусное, плазмидное или хромосомное происхождение, а иммунитет обеспечивается благодаря синтезируемым на их основе коротким интерферирующим последовательностям РНК (crRNAs), которые узнают соответствующую последовательность инородной ДНК. CRISPR система играет важную роль в эволюции патогенеза бактерий и влияет на фитнес бактериальных клеток [18]. Показано, что глобальное использование антибиотиков приводит к уменьшению количества CRISPR в бактериальных популяциях, что повышает уровень мобилизации ДНК механизмами HGT, поэтому в популяции бактерий отмечается обратная зависимость между содержанием CRISPR и уровнем множественной устойчивости к антибиотикам [19]. Интересно, что бактериофаги находятся в состоянии ступенчатой взаимной эволюции с бактериями-хозяевами: фаги способны преодолевать CRISPR систему хозяина за счет новых мутаций своего генома в области прото-спейсерного мотива (PAM), а хозяин генерирует новые спейсеры в CRISPR [20].

Возможность передачи генетических детерминант резистентности к антибактериальным препаратам посредством бактериофагов показана в ряде исследований. В эксперименте чувствительный штамм *Salmonella* Typhimurium. приобретал устойчивость к бета-лактамам и тетрациклину в результате независимой трансдукции фагами, захватывающими из генома устойчивого штамма *Salmonella enterica* серовара Heidelberg гены резистентности *bla*<sub>CMY-2</sub>, *tetA* и *tetB* [21]. Бактериофаг AP-151, выделенный из нозокомиального MDR штамма *P. aeruginosa*, трансдуцировал генетические детерминанты устойчивости к цефалоспорином и карбапенемам в реципиентный штамм *P. aeruginosa* [22]. Метагеномный анализ виroma мокроты больных кистозным фиброзом на присутствие генов резистентности выявил гены эффлюксных насосов, детерминанты устойчивости к фторхинолонам и бета-лактамам, что позволило авторам выявить резервуар способных к мобилизации генов резистентности, которые могут быстро распространяться среди бактерий в данной специфичной нише [23]. Гены устойчивости к антибактериальным препаратам (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> (clusters 1 and 9) и *mecA*) были обнаружены с помощью количественной ПЦР в ДНК бактериофагов, выделенных от сельскохозяйственных животных (свиней, крупного рогатого скота и птицы), что позволило сделать вывод о том, что бактериофаги являются векторами для горизонтального переноса генов резистентности между бактериальными патогенами животных [24]. Лизогенный перенос *ex vivo* генов устойчивости к эритромицину (*mefA*) и тетрациклину (*tetO*) наблюдали между штаммами стрептококков группы А [25].

Таким образом, явление устойчивости патогенных бактерий к антибактериальным

препаратам – природный эволюционный феномен, который невозможно остановить. Поэтому для решения проблемы терапии инфекционных заболеваний могут быть использованы такие подходы как **возврат к открытым ранее антибиотикам** и отвергнутым по разным причинам (даптомицин, открытый в 1980 г, был выведен на фармацевтический рынок в 2003 г., после подбора используемых в терапии дозировок препарата); **комбинация антибиотиков** друг с другом или с другими классами лекарств для повышения эффективности (ко-тримоксазол, имипенем с природными добавками); **комбинация антибиотиков с ингибиторами механизмов резистентности** (ампициллин с клавулановой кислотой; ингибиторы эффлюксных насосов); **использование альтернативных (ортогональных) стратегий** (вакцинация против возбудителей инфекционных болезней [26]; лечение бактериофагами; использование энхансеров врожденного иммунитета – таких как катионные антимикробные пептиды или бактериоцины [27]); **комбинация антибиотиков с бактериофагами** (эффект предсказать трудно, т.к. он зависит от условий воздействия антибиотиком и от скорости мутирования) [28].

Современное состояние проблемы резистентности возбудителей инфекционных болезней говорит о том, что эта проблема не может быть решена усилиями только клинической микробиологии, как это было на заре эры антибиотиков. Она требует концентрации объединенных усилий микробиологов, экологов, специалистов здравоохранения, образования, политических деятелей, сотрудников сельского хозяйства и фармацевтической промышленности.

### *Библиографический список*

1. WHO Annual Report, 2012. <http://www.who.int/gho/publications/>
2. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. // *Front. Microbiol.* 2010. – Vol. 1. – P. 134.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2011. / Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2011.
4. Paterson DL, Doi Y. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 45. – No. 9. – P. 1179-1181.
5. Magiorakos A.-P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18. – P. 268–281.
6. Menne J., Nitschke M., Stinglele R., et al. Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case-control study. // *BMJ.* – 2012. – Vol. 345. - e4565.
7. Rolain J.M., Parola P., Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? // *Clin. Microbiol. Inf.* – 2010. – Vol.16. - N 12. – P. 1699-1701.
8. Wright G.D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2010. – Vol. 13. – P. 589–594.
9. Sommer M.O.A., Dantas G., Church G.M. Functional Characterization of the Antibiotic Resistance Reservoir in the Human. // *Microflora Sci.* – 2009. – Vol. 325. – P. 1128-1131.
10. Wright G.D. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? // *BMC Biol.* - 2010 – Vol. 8. - P. 123.
11. Stokes H.W., Gillings M.R. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2011. – Vol. 35. – No 5. – P. 790-819.

12. Письмо Роспотребнадзора от 02.10.2007 № 0100/99380732 “О заболеваемости ВБИ в Российской Федерации” // Главная медицинская сестра. - 2007. - № 12. - С. 103–108.
13. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., and Stratchounski L. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. // Antimicrob Agents Chemoter. – 2003. – Vol. 47. – P. 3724–3732.
14. Сидоренко С.В., Березин А.Г., Иванов Д.В. Молекулярные механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* к цефалоспориновым антибиотикам. // Антибиотики и химиотер. – 2004. – Т. 49. – N 3. – С. 3-13.
15. Фурсова Н.К., Прямчук С.Д., Абаев И.В., Ковалев Ю.Н., Шишкова Н.А., Печерских Э.И., Коробова О.В., Асташкин Е.И., Пачкунов Д.М., Светоч Э.А., Сидоренко С.В. Генетическое окружение генов *bla*<sub>CTX-M</sub>, локализованных на конъюгативных плазмидах нозокомиальных изолятов *Enterobacteriaceae*, выделенных в России в 2003-2007 гг. // Антибиотики и химиотер. – 2010. - Т. 55. - № 11-12. – С. 3-10.
16. Fursova N., Pryamchuk S., Kruglov A., Abaev I., Pecherskikh E., Kartsev N., Svetoch E., Dyatlov I. The Novel CTX-M-116 beta-Lactamase Gene Discovered in *Proteus mirabilis* Is Composed of Parts of the CTX-M-22 and CTX-M-23 Genes. // Antimicrob. Agents Chemoter. – 2013. – Vol. 57. – No. 3. – P. 1552-1555.
17. van der Oost J., Jore M.M., Westra E.R., Lundgren M., Brouns S.J. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. // Trends Biochem. Sci. – 2009. – Vol. 34. – No. 8. – P. 401-407.
18. Marraffini L.A. Impact of CRISPR immunity on the emergence of bacterial pathogens. // Future Microbiol. – 2010. – Vol. 5. – No. 5. – P. 693-695.
19. Palmer K.L., Gilmore M.S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. // MBio. – 2010. – Vol. 1. – No. 4. pii: e00227-10.
20. Sun C.L., Barrangou R., Thomas B.C., Horvath P., Fremaux C., Banfield J.F. Phage mutations in response to CRISPR diversification in a bacterial population. // Environ. Microbiol. – 2013. - Vol. 15. – No 2. – P. 463-470.
21. 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*. // Vet. Microbiol. – 2008. – Vol. 129. – No. 3-4. – P. 418-425.
22. Blahová J., Králiková K., Krcméry V., Jezek P. Low-Frequency transduction of imipenem resistance and high-frequency transduction of ceftazidime and aztreonam resistance by the bacteriophage AP-151 isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. // J. Chemoter. – 2000. – Vol. 12. – No. 6. – P. 482-486.
23. Fancello L., Desnues C., Raoult D., Rolain J.M. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. // J. Antimicrob. Chemoter. – 2011. – Vol. 66. – No. 11. – P. 2448-2454.
24. Colomer-Lluch M., Imamovic L., Jofre J., Muniesa M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. // Antimicrob. Agents. Chemoter. – 2011. – Vol. 55. – No. 10. – P. 4908-4911.
25. Di Luca M.C., D’Ercole S., Petrelli D., Prenna M., Ripa S., Vitali L.A. Lysogenic transfer of *mef*(*A*) and *tet*(*O*) genes carried by Phim46.1 among group A streptococci. // Antimicrob. Agents Chemoter. – 2010. – Vol. 54. – No. 10. – P. 4464-4466.
26. Finch, R. and Hunter, P.A. Antibiotic resistance--action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK, 12-13 December 2005. // J Antimicrob Chemoter. - 2006. - Spl 1. - i3-i22.

27. Hassan M., Kjos M., Nes I.F., Diep D.B., Lotfipour F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. // The Authors Journal of Applied Microbiology. - 2012. – Vol. 113. – No. 4. – P. 723-736.

28. Escobar-Páramo P, Gougat-Barbera C, Hochberg ME. Evolutionary dynamics of separate and combined exposure of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 to antibiotics and bacteriophage. // Evol Appl. 2012 Sep;5(6):583-92

## **ANTIBACTERIAL RESISTANCES OF THE BACTERIAL PATHOGENS: EVOLUTION MECHANISMS AND CLINICAL IMPORTANCE**

*Fursova N.K., Kartsev N.N., Ivashov S.V., Svetoch E.A.*

**Key words:** *antibacterial resistance, horizontal gene transfer, evolution of the resistance*

*The study presents the review of the publications and the experimental data concerning prevalence of the antibacterial resistance among human bacterial pathogens, evolution of their molecular mechanisms, and clinical importance of the phenomena. Impact of bacteriophages into the process of horizontal gene transfer between bacteria is discussed.*

УДК 619:616.98:579.842.14

## **ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ПТИЦЫ ЗАРАЖЕННОЙ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ**

*Храмов М. В. \*, кандидат медицинских наук,  
Костенко Ю. Г. \*\*, доктор ветеринарных наук, профессор,  
Воложанцев Н.В., кандидат биологических наук,  
Перельгин В.В., кандидат биологических наук,  
Веревкин В.Н., кандидат биологических наук,  
Светоч Э.А. доктор ветеринарных наук, профессор  
\*ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора  
\*\* ГНУ ВНИИМП им. В. М. Горбатова РАСХН*

**Ключевые слова:** *Сальмонеллез, бактериофаги, мясо птицы, фаговый препарат*  
*Работа посвящена проблеме пищевого сальмонеллеза и деконтаминации мяса птицы от сальмонелл.*

Сальмонеллез является одной из опасных инфекций пищевого происхождения и широко распространен практически во всех регионах земного шара. [1,2] Ежегодно 1,4 млн человек заболевает сальмонеллезом в США, регистрируется и подтверждается порядка 40000 случаев заражения, а умирает 380-400 человек в год. [2]

В России согласно официально опубликованным данным, в 2009 г. заболеваемость сальмонеллезом составила 35,2 человека на 100 тыс. населения. В частности, в Кемеровской области в 2010 г. этот показатель был намного выше - 67,2 человека на 100 тысяч населения.