doi 10.18699/bgrs2026-56

Состав и разнообразие генов антибиотикорезистентности кишечной микробиоты у пациентов с туберкулезом

Зайцева Ю.[1, 5]*, Юнусбаева М.[1], Сабирова Д.[1], Данилов Л.[2], Юнусбаева А.[1, 3] Глотов О.[5], Алтынбаев Р.[4], Юнусбаев Б.[1, 2]

[1] *ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*
[3] *Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения, Санкт-Петербург, Россия*
[4] *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*
[5] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия*
* *iuazaitseva@mail.ru*

Ключевые слова: туберкулез; кишечная микробиота; резистом; гены антибиотикорезистентности; антимикробная резистентность

Мотивация и цель: Кишечная микробиота представляет собой сложную экосистему микроорганизмов, участвующую в обменных процессах, синтезе биологически активных веществ и регуляции иммунного ответа организма [2]. Она также является важным природным резервуаром генов антибиотикорезистентности (ARG), формируя так называемый резистом, при этом гены устойчивости могут передаваться между комменсальными и потенциально патогенными бактериями посредством горизонтального переноса генов [6].

При инфекционных заболеваниях, требующих длительной антибактериальной терапии, таких как туберкулез, баланс между таксономическим составом, функциональными характеристиками и резистомом кишечной микробиоты может изменяться еще до начала лечения [3, 4]. Показано, что у пациентов с туберкулезом наблюдаются выраженные изменения состава микробиоты, включая снижение доли полезных комменсалов и обогащение микроорганизмами, ассоциированными с повышенной представленностью генов антибиотикорезистентности [1, 5].

Несмотря на это, структура и разнообразие резистома кишечной микробиоты у пациентов с туберкулезом, а также вклад отдельных таксонов в распределение генов устойчивости остаются недостаточно изученными.

Целью настоящего исследования является анализ состава и разнообразия генов антибиотикорезистентности кишечной микробиоты у пациентов с туберкулезом.

Методы и алгоритмы: В работе использованы метагеномные данные кишечной микробиоты пациентов с туберкулезом и здоровых доноров, ранее полученные и размещенные в базе данных NCBI (BioProjects PRJNA1366497 и PRJNA1061168).

Сырые прочтения прошли стандартную предварительную обработку, включающую контроль качества и удаление последовательностей низкого качества, а также исключение прочтений, соответствующих ДНК человека.

Для корректного сравнения образцов глубина секвенирования была выровнена путем субсемплирования до одинакового числа прочтений. Дополнительно проверялась корректность парных ридов и полнота сопутствующей метаинформации. Гены антибиотикорезистентности (ARG) определялись путем прямого картирования прочтений на базу данных CARD с использованием инструмента Resistance Gene Identifier (RGI). На основе полученных аннотаций формировались матрицы обилия ARG, которые затем агрегировались по укрупненным классам антибиотиков для последующего сравнительного анализа.

Таксономическая принадлежность прочтений, ассоциированных с генами устойчивости, определялась с помощью Kraken2, что позволило выявить основные таксоны — носители ARG. В результате был проведен комплексный анализ как таксономической структуры микробиоты, так и функционального состава ее резистома.

Результаты: Общее количество генов антибиотикорезистентности (ARG), выявленных во всех образцах, составило 1170 и соответствовало 19 классам антибиотиков. При этом у пациентов с туберкулезом до начала терапии уже обнаруживались гены, обеспечивающие устойчивость к клинически значимым противотуберкулезным препаратам. Сравнительный анализ показал статистически значимые различия в составе резистома между пациентами с ТБ и здоровыми донорами. Анализ главных компонент продемонстрировал четкое разделение этих групп, что указывало на различия в распределении ARG. Эти результаты подтверждались анализом альфа-разнообразия, согласно которому у пациентов с туберкулезом наблюдалось более высокое разнообразие ARG ($p < 0.05$), что свидетельствовало о более сложной и неоднородной структуре резистома. В обеих группах основу резистома составляли гены устойчивости к широко применяемым классам антибиотиков, включая тетрациклины и антибиотики группы MLS. Вместе с тем у пациентов с ТБ наблюдалось увеличение обилия ARG по ряду классов антибиотиков, таких как аминогликозиды, бета-лактамы, фторхинолоны, макролиды, пептидные антибиотики, а также гены множественной лекарственной устойчивости. Кроме того, у них чаще выявлялись гены, связанные с различными механизмами устойчивости, что указывает не только на более высокое разнообразие, но и на расширение функционального потенциала резистома. При этом

резистом пациентов с туберкулезом в значительной степени сохранял набор ARG, характерный для здоровых доноров, однако дополнялся новыми генами устойчивости. Это позволяет предположить, что различия между группами обусловлены преимущественно расширением исходного резистома, а не его качественной перестройкой. Среди пяти наиболее распространенных бактериальных типов у пациентов с туберкулезом во всех случаях наблюдалось более высокое разнообразие ARG по сравнению с контролем. При этом типы *Bacillota* и *Bacteroidota* демонстрировали относительную стабильность между группами, тогда как наиболее выраженные различия были связаны с *Pseudomonadota* и *Actinomycetota*, для которых характерно значительное обогащение генами устойчивости у пациентов с туберкулезом. Анализ механизмов устойчивости показал, что в обеих группах преобладают эффлюксные насосы. Однако у пациентов с туберкулезом наблюдалось большее разнообразие генов, связанных с эффлюксом, включая представителей семейств RND, MFS и SMR, что может свидетельствовать о более выраженном потенциале множественной лекарственной устойчивости.

Таксономический анализ прочтений, ассоциированных с ARG, показал, что увеличение доли генов устойчивости у пациентов с туберкулезом в значительной степени связано с бактериями, относящимися к условно-патогенным родам *Escherichia* и *Klebsiella*. Эти микроорганизмы характеризуются широким спектром устойчивости и являются ключевыми носителями генов антибиотикорезистентности в кишечной микробиоте пациентов с туберкулезом (Рис. 1).

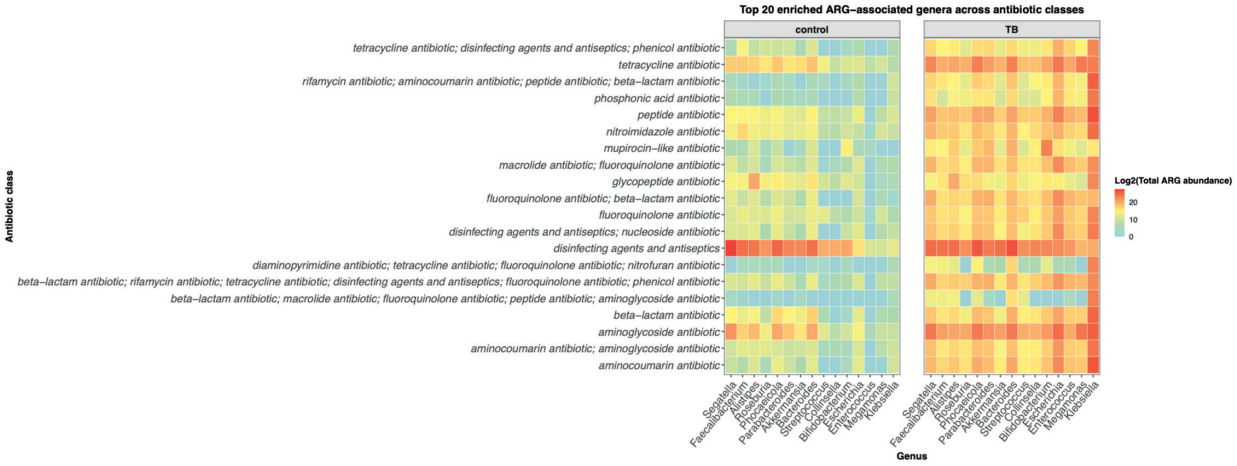

Рисунок 1. Распределение родов бактерий, ассоциированных с генами антибиотикорезистентности, по классам антибиотиков у пациентов с туберкулезом и здоровых доноров.

Выводы: Резистом кишечной микробиоты пациентов с туберкулезом характеризуется более высоким разнообразием и обилием генов антибиотикорезистентности по сравнению со здоровыми донорами. Важно отметить, что гены устойчивости к ключевым противотуберкулезным препаратам обнаруживаются еще до начала терапии, что свидетельствует о возможном существовании механизмов, способных снижать эффективность будущего лечения. Полученные результаты подчеркивают роль кишечной микробиоты как значимого резервуара антимикробной резистентности.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 25-15-00133, https://rscf.ru/en/project/25-15-00133/).

Composition and diversity of antibiotic resistance genes in the gut microbiota of tuberculosis patients

Zaitseva I.[1, 5]*, Yunusbaeva M.[1], Sabirova D.[1], Danilov L.[2], Yunusbayeva A.[1, 3] Glotov O.[5], Altinbaev R.[4], Yunusbayev B.[1, 2]

[1] *Saint Petersburg State Phtisiopulmonology Research Institute, Saint Petersburg, Russia*
[2] *Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*
[3] *State University of Aerospace Instrumentation, Saint Petersburg, Russia*
[4] *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*
[5] *Federal State Budgetary Institution "Federal Scientific and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical and Biological Agency", Saint Petersburg, Russia*
* *iuazaitseva@mail.ru*

Key words: tuberculosis; gut microbiome; resistome; antimicrobial resistance; antimicrobial resistance genes; antibiotic

Motivation and Aim: The gut microbiome represents a complex microbial ecosystem involved in metabolic processes, synthesis of bioactive compounds, and regulation of host immune responses [2]. It also serves as an important reservoir of antibiotic resistance genes (ARGs), collectively referred to as the resistome, which can be exchanged between commensal and potentially pathogenic bacteria via horizontal gene transfer [6].

In infectious diseases requiring prolonged antibiotic therapy, such as tuberculosis (TB), the balance between taxonomic composition, functional potential, and resistome structure of the gut microbiota may be altered even prior to treatment initiation [3, 4]. Previous studies have demonstrated significant shifts in gut microbial composition in TB patients, including depletion of beneficial commensals and enrichment of bacteria associated with increased ARG abundance [1, 5].

Despite these observations, the structure and diversity of the gut resistome in TB patients, as well as the contribution of specific taxa to ARG distribution, remain insufficiently characterized.

The aim of this study is to investigate the composition and diversity of antibiotic resistance genes in the gut microbiota of TB patients.

Methods and Algorithms: Shotgun metagenomic data from patients with tuberculosis and healthy controls were obtained from the NCBI database (BioProjects PRJNA1366497 and PRJNA1061168). Raw sequencing reads were processed using standard quality control and decontamination pipelines to remove low-quality sequences and host-derived contamination. To ensure comparability across samples, sequencing depth was normalized by subsampling to a fixed number of reads per sample. Following preprocessing, datasets were curated to ensure consistency of paired-end reads and associated metadata. Antibiotic resistance genes (ARGs) were identified by direct read mapping using the Resistance Gene Identifier (RGI) against the CARD database. The resulting annotations were used to construct ARG abundance matrices and further aggregated into higher-level antibiotic classes for comparative analysis. Taxonomic classification of ARG-associated reads was performed using Kraken2, allowing identification of microbial taxa carrying resistance genes. This integrative approach enabled joint analysis of the taxonomic composition and functional structure of the gut resistome.

Results: A total of 1170 antibiotic resistance genes (ARGs) belonging to 19 antibiotic classes were identified across all samples. Importantly, treatment-naive tuberculosis (TB) patients already harbored ARGs conferring resistance to clinically relevant anti-TB drug classes.

Comparative analysis revealed statistically significant differences in the overall resistome composition between TB patients and healthy controls. Principal component analysis demonstrated a clear separation between the two groups, suggesting distinct patterns of ARG distribution. This observation was supported by alpha diversity analysis, which showed significantly higher ARG diversity in TB patients ($p < 0.05$), reflecting a more complex and heterogeneous resistome structure.

In both groups, the resistome was primarily represented by genes associated with resistance to commonly used antibiotic classes, including tetracyclines and macrolide–lincosamide–streptogramin (MLS) antibiotics. However, TB patients exhibited a consistent and widespread increase in ARG abundance across multiple antibiotic classes, including aminoglycosides, beta-lactams, fluoroquinolones, macrolides, peptide antibiotics, and multidrug resistance determinants. Moreover, ARGs associated with multiple resistance mechanisms were more frequently detected in TB patients, indicating an expansion not only in diversity but also in the functional breadth of resistance.

Importantly, the resistome of TB patients largely retained the ARG repertoire observed in healthy controls while also containing additional resistance determinants. This suggests that the observed differences are primarily driven by an expansion of the baseline resistome rather than a complete restructuring of its composition.

Across the five most abundant bacterial phyla, TB patients consistently demonstrated higher ARG diversity compared to controls. While *Bacillota* and *Bacteroidota* remained relatively stable between groups, the most pronounced differences were observed in *Pseudomonadota* and *Actinomycetota*, which showed significant enrichment of ARGs in TB patients.

Analysis of resistance mechanisms revealed that efflux pumps constituted the predominant mechanism in both groups. However, TB patients demonstrated a broader diversity of efflux-related genes, including representatives of the RND, MFS, and SMR families, suggesting an increased contribution of multidrug resistance systems and a greater adaptive potential of the microbiome under selective pressures.

Taxonomic profiling of ARG-associated reads further indicated that the enrichment of resistance genes in TB patients was largely driven by bacteria belonging to opportunistic genera such as *Escherichia* and *Klebsiella*. These taxa exhibited extensive resistance profiles spanning multiple antibiotic classes and contributed substantially to the overall resistome structure. The distribution of ARG-associated taxa across antibiotic classes supports their central role as key carriers of antimicrobial resistance within the gut microbiome of TB patients (Fig. 1).

Conclusion: The gut resistome of tuberculosis patients is characterized by increased diversity and abundance of antibiotic resistance genes compared to healthy controls. Notably, resistance determinants against key anti-TB drug classes are already present prior to therapy initiation, suggesting that mechanisms counteracting future treatment may pre-exist in the gut microbiota. These findings highlight the role of the gut microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance.

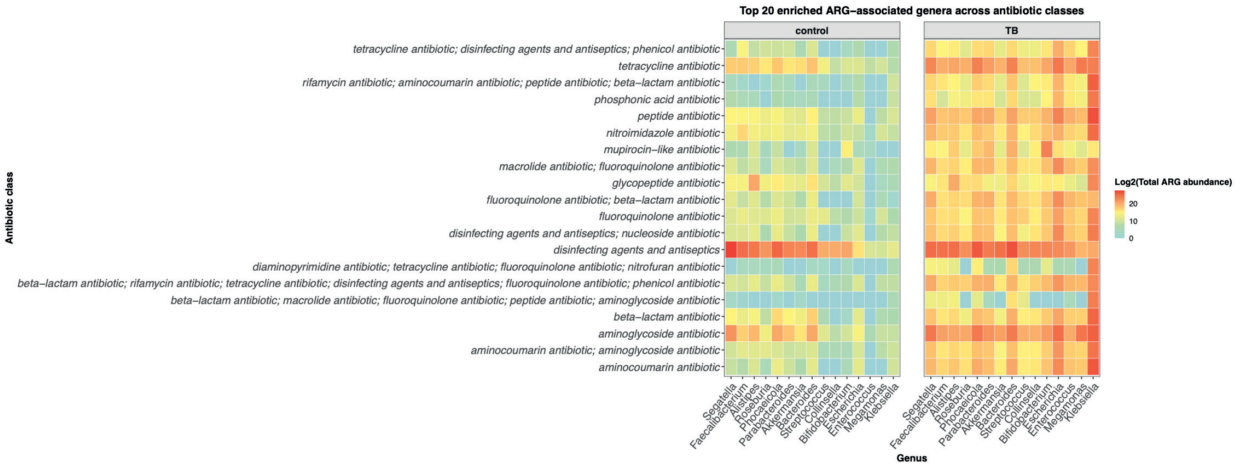

Figure 1. Distribution of ARG-associated bacterial genera across antibiotic classes in TB patients and healthy controls.

Funding: The study is supported by Russian Science Foundation (project No. 25-15-00133, https://rscf.ru/en/project/25-15-00133/).

Список литературы/References

1. Galazzo G., Tedjo D.I., Wintjens D.S.J., Savelkoul P.H.M., Masclee A.A.M., Bodelier A.G.L., Pierik M.J., Jonkers D.M.A.E. Gut microbiota composition and antimicrobial resistome in tuberculosis patients. Microbiome. 2020;8:24. doi 10.1186/s40168-020-0787-4
2. Gurung M., Li Z., You H., Rodrigues R., Jump D.B., Morgun A., Shulzhenko N. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. EBioMedicine. 2020;51:102590. doi 10.1016/j.ebiom.2019.11.051
3. Namasivayam S., Maiga M., Yuan W., Thovarai V., Costa D.L., Mittereder L.R., Wipperman M.F., Glickman M.S., Sher A. Longitudinal profiling reveals a persistent intestinal dysbiosis triggered by conventional anti-tuberculosis therapy. Microbiome. 2020;8:71. doi 10.1186/s40168-020-00860-6
4. Hu Y., Yang X., Qin J., Lu N., Cheng G., Wu N., Pan Y., Li J., Zhu L., Wang X. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. Nat Commun. 2021;12:3655. doi 10.1038/s41467-021-23923-3
5. Wipperman M.F., Fitzgerald D.W., Juste M.A.J., Taur Y., Namasivayam S., Sher A., Bean J., Bucci V., Glickman M.S. Antibiotic treatment for tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome. Sci Rep. 2017;7:10767. doi 10.1038/s41598-017-10346-6
6. Yunusbaeva, M. et al., 2024. Excess fermentation and lactic acidosis as detrimental functions of the gut microbes in treatment-naive TB patients. Frontiers in cellular and infection microbiology, 14, p.1331521. Available at: https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1331521