

Формирование персистеров у клинических изолятов *K.pneumoniae*, индуцированных меропенемом, амикацином и их комбинацией

*Н. Н. МАРКЕЛОВА^{1,2}, А. В. ТУТЕЛЬЯН^{1,3}, Н. Г. СЕДЫХ¹

¹ ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

² ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» МЗ РФ, Москва

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова МЗ РФ, Москва

Formation of Persisters in Clinical Isolates of *K.pneumoniae* Induced with Meropenem, Amikacin, and Their Combination

*N. N. MARKELOVA^{1,2}, A. V. TUTELYAN^{1,3}, N. G. SEDYKH¹

¹ Science Central Institute of Epidemiology of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, Moscow

² Central Research Institute of Roentgenology and Radiology of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Health of Russian Federation

Исследование индуцированной антибиотикотолерантности чувствительных к меропенему и амикацину клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* выявило формирование у них фенотипически гетерогенных персистеров, представленных SCV (small colony variant) и NCV (normal colony variant) формами. Корреляции образования персистеров между данными антимикробными препаратами не обнаружено ($R=-0,37$), что указывает на различные механизмы толерантности к антибиотикам. Способность амикацина индуцировать образование SCV-персистеров была выше, чем у меропенема ($p<0,05$), и снижению их количества способствовал синергетический эффект обоих препаратов, максимально — до 80,0%. При этом SCV-персистеры *K.pneumoniae* характеризовались кратковременным повышением адаптивной устойчивости к антибиотикам, которые были использованы в качестве индукторов образования персистирующих фракций бактерий ($p<0,05$), что может способствовать их более эффективному выживанию в средах с антибиотиками.

Ключевые слова: антибиотикотолерантность, персистеры, фенотипическая гетерогенность, SCV (вариант малой колонии).

A study of induced antibiotic tolerance of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* sensitive to meropenem and amikacin revealed the formation of phenotypically heterogeneous persisters in them, represented by the SCV (small colony variant) and NCV (normal colony variant) forms. There was no correlation of persister formation between these antimicrobial drugs ($R=-0.37$), which indicates different mechanisms of tolerance to antibiotics. The ability of amikacin to induce the formation of SCV persisters was higher than that of meropenem ($p\text{-level} > 0.05$), and the synergistic effect of both drugs contributed to a decrease in their number, to a maximum of 80.0%. At the same time, SCV-persisters of *K.pneumoniae* were characterized by a short-term increase in adaptive resistance to antibiotics, which were used as inducers of the formation of persistent bacterium fractions ($p\text{-level} > 0.05$), which may contribute to their more effective survival in media with antibiotics.

Keywords: antibiotic tolerance, persisters, phenotypic heterogeneity, SCV (small colony variant).

Введение

Толерантность к антибиотикам на сегодняшний день описана у *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* и других видов микроорганизмов, и её роль в персистенции инфекций в последние годы получила признание [1–5]. В отличие от генетической устойчивости бактерий к антибиотикам, когда бактерии способны расти в присутствии бактерицидных концентраций антибиотиков, то-

лерантность — это способность генетически восприимчивых к антибиотикам популяций бактерий выживать в этих же условиях в результате образования персистеров [6].

Субпопуляции персистеров при прекращении действия антибиотиков возобновляют рост, восстанавливая популяцию, сохраняя первоначальную чувствительность к антибиотикам [1, 7]. Персистеры являются важным компонентом биоплёнок, образуемых патогенами, что в значительной степени способствует их толерантности к противомикробным препаратам [8, 9]. Часть субпопуляции персистеров может быть представлена вариантами небольших колоний, так называемыми SCV (small colony variants) — формами, которые наиболее час-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: E-mail: sedykhnatali@yandex.ru

то ассоциируются с хроническими и рецидивирующими инфекциями [10]. Частота встречаемости SCV в бактериальной популяции увеличивается после воздействия различных стрессовых условий, например, изменения кислотности среды или присутствия антибиотиков [11–13]. SCV-формы найдены у различных видов *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Burkholderia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* и др., но существуют трудности их выявления в клинических образцах и изучения их свойств из-за нестабильности большинства SCV, подверженных фенотипическому переключению с возвратом к обычному фенотипу нормальных колоний [10, 14, 15].

Несмотря на активные исследования закономерностей образования персистеров в бактериальной популяции, слабо изученным остаётся влияние различных антибиотиков и их комбинаций, как на формирование, так и на искоренение персистирующих форм бактериальных клеток, включая SCV. Оценка индуцированной антибиотиками толерантности к антимикробным препаратам в отношении гетерогенных бактериальных популяций клинических изолятов может способствовать выявлению наиболее эффективных препаратов и/или их комбинаций в терапии инфекций.

Цель работы — исследовать особенности формирования персистеров *Klebsiella pneumoniae*, индуцированных высокими бактерицидными концентрациями антибиотиков, и оценить эффективность синергетической комбинации меропенема с амикацином в элиминации персистеров из бактериальных популяций.

Материал и методы

В качестве объектов изучения из коллекции культур лаборатории ИСМП ЦНИИ эпидемиологии были отобраны 18 изолятов *K. pneumoniae*, чувствительных к меропенему и амикацину. Культуры бактерий выращивали на агаре Лурия–Бертани (ЛБ) в течение 24 ч. Из приготовленных суспензий культур ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) готовили ряд разведений и высевали на агар Мюллера–Хинтона (МХ) для подсчёта колоний в 1 мл суспензии. В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора антибиотика и бактериальной суспензии. Рабочие растворы антибиотиков соответствовали концентрациям, превышающим минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотика в 100 раз (меропенем 3,0–200,0 мкг/мл; амикацин 25,0–800,0 мкг/мл). Инокулированные в 3 повторностях образцы инкубировали 6 ч при 37 °C и непрерывном встряхивании. По окончании инкубации из каждой экспериментальной лунки высевали по 1 мкл инокулята на плотную питательную среду МХ. Посевы культивировали 24 ч при 37 °C и подсчитывали КОЕ (колониеобразующие единицы) выживших бактериальных популяций. МИК антибиотиков определяли микрометодом в жидкой питательной среде МХ [16]. Интерпретация результатов чувствительности к антибиотикам проводилась в соответствии с рекомендациями EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [17].

Определение кинетических параметров роста осуществляли с помощью программы «Микроб-автомат» на базе планшетного фотометра «Multiscan Ascent». В лунки стандартного 96-луночного планшета вносили суспензию бактериальных культур и бульон МХ в равных объёмах, измерение проводи-

лось в трёх повторностях. Температура инкубации составила 37,0 °C. Динамическое измерение оптической плотности в ячейках планшета происходило через каждые 3 мин при длине волны фотометрирования 620 нм, и непрерывном встряхивании; количество измерений составляло 220. Результатом обработки кривых роста бактерий являлось соотношение площади под кривой приращений оптических плотностей в опытных лунках к соответствующей площади в контрольных лунках, выданное в процентах [18].

Обработку данных и статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программ Statistica 13. Процент диссоциации культур по размеру колоний подсчитывали как отношение количества изменённых колоний к общему количеству колоний. Корреляции определяли с помощью коэффициента Спирмена для признаков, характеризующихся отличным от нормального распределением. Сравнение изменений признаков проводили с помощью непараметрического *W*-критерия [19].

Результаты исследования

Исследуемые клинические изоляты *K. pneumoniae*, чувствительные к меропенему (МИК в диапазоне от 0,03 до 2 мкг/мл) и амикацину (МИК в диапазоне от 0,25 до 8 мкг / мл), после воздействия этих препаратов на культуры *in vitro* в дозах, превышающих значения МИК в 100 раз, полностью не погибали, оставляя жизнеспособную популяцию клеток, состоящую из двух фенотипов колоний: SCV (1/10 от обычного размера) и NCV (normal colony variant). Применив в эксперименте комбинацию антимикробных препаратов меропенема и амикацина, обладающих синергетическим эффектом, возникло предположение, что их сочетание может эффективно искоренять гетерогенные популяции АТ клеток, полученных после воздействия антибиотиков.

В зависимости от применяемого антибиотика и их сочетания формирование АТ фракций популяций *K. pneumoniae* происходило с различной интенсивностью. Изоляты были сгруппированы в 4 группы в соответствии с долей персистеров в популяции после воздействия меропенема, амикацина и их комбинации. Фракции персистеров большинства изолятов составляли менее чем 0,26% от общей популяции для меропенема, 0,36% — для амикацина, 0,35% — для комбинации меропенема с амикацином (рис. 1).

Между численностью популяций выживших клеток при воздействии антибиотиков меропенема и амикацина с отличающимися механизмами действия корреляции не обнаружено ($R = -0,37$), следовательно, в основе внутреннего контроля их фенотипа лежат различные механизмы, что контрастирует с явлением множественной лекарственной толерантности (МЛТ). Состояние МЛТ неоднократно описано исследователями, при этом предполагалось, что связано оно с состоянием покая бактериальных клеток и может достигаться с помощью перекрестных эффектов, вызванных разными антимикробными препаратами [20, 21]. Отсутствие корреляции образования АТ популяций бактерий, между противомикробными препара-



Рис. 1. Распределение частот персистирующих фракций *K.pneumoniae*, полученных в результате воздействия высоких доз антибиотиков.

ратами, даже с похожими механизмами действия, такими как ципрофлоксацин и налидиксовая кислота, подтверждаются другими авторами [22]. Что касается величины образования персистеров в результате воздействия комбинации антибиотиков, то наблюдались корреляция ($R=0,77$; $p<0,05$) между персистерами, индуцированными амикацином, с одной стороны, и персистерами, индуцированными сочетанием меропенема и амикацина, — с другой, и отсутствие корреляции между персистерами, индуцированными меропенемом и обоими антибиотиками ($R=0,22$), что указывает на преобладающую способность амикацина в данной комбинации антибактериальных препаратов стимулировать персистенцию в клинических изолятах.

В условиях экспериментального антибиотического стресса, когда большинство изолятов отвечает образованием АТ популяций, у 4 изолятов

K.pneumoniae получить АТ популяции к амикацину не удалось. Их отсутствие может характеризовать дикие популяции бактерий, для которых появление толерантности к антибиотикам не является критически важным в обеспечении жизнеспособности бактерий, в отличие от изолятов внутрибольничного происхождения из среды с постоянным селективным давлением, налагаемым антибактериальной терапией [22, 23].

В составе общих фракций персистеров *K.pneumoniae* были выявлены SCV-персистеры, которые составляли меньшую часть от общего числа выживших субпопуляций бактерий. Разнообразие в интенсивности проявления фенотипа SCV-персистеров, индуцированных меропенемом, амикацином и их комбинацией между изолятами, может указывать на дифференциальную способность антибиотиков стимулировать образование

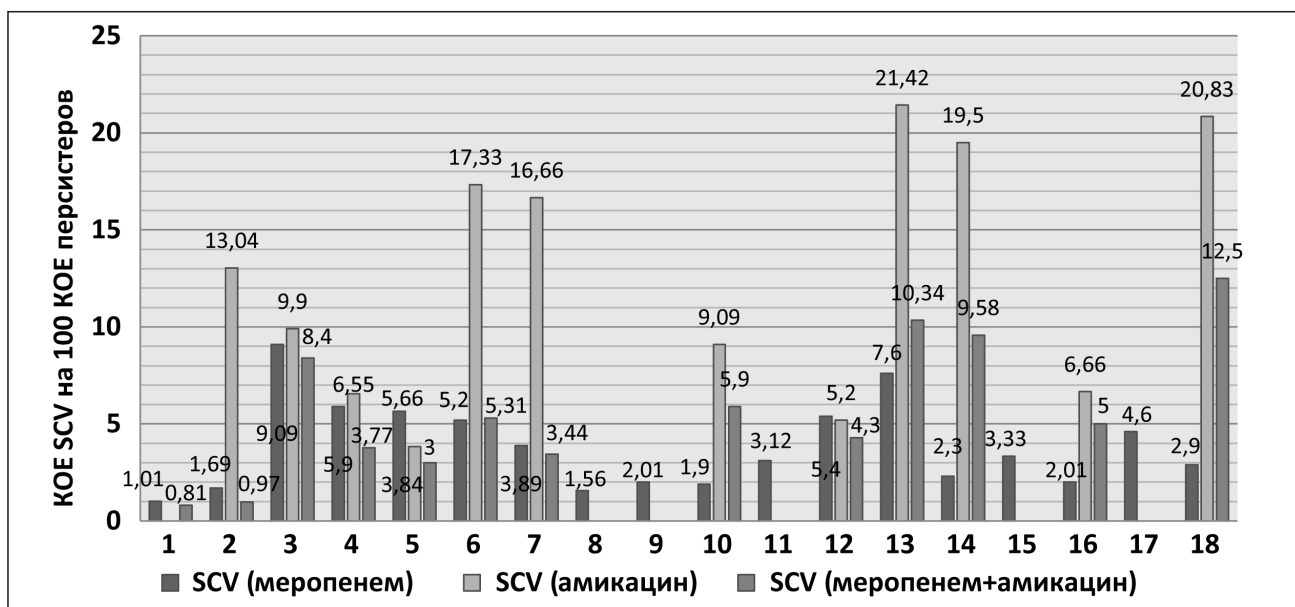


Рис. 2. Образование SCV-персистеров в составе персистирующих фракций 18 изолятов *K.pneumoniae* под влиянием меропенема — SCV (меропенем), амикацина — SCV (амикацин), их комбинации — SCV (меропенем+амикацин).

SCV-форм. При обработке бактерий амикацином субпопуляции SCV относительно популяций персистеров значительно превышали SCV, выявленных при обработке меропенемом ($p=0,04$), при этом совместное действие этих антибиотиков достоверно снижало SCV (минимум — 17,5%, максимум — 80,0%) только по отношению к SCV, индуцированных амикацином ($p=0,001$), но не меропенемом ($p=0,61$) (рис. 2).

Фенотип SCV в 100,0% случаев оказался нестабилен, и при пересеве через 24 ч происходило фенотипическое переключение на колонии нормального размера. Основным признаком переключения стало восстановление морфологии колоний. Анализ кинетических моделей роста SCV и NCV показал, что рост ревертантов SCV составлял 94,0–144,0% от роста NCV, принятого за 100,0%, что отличает их от стабильных SCV, рост которых характеризуется медленными темпами за счёт мутаций. Небольшой размер колоний нестабильных SCV может быть следствием более позднего начала роста и отсроченной инициации клеточного деления бактерии [24].

Выявленные после воздействия высоких концентраций антибиотиков SCV-персистеры *K.pneumoniae* после однократного пересева показали уменьшение зон ингибирования антибиотиками в сравнении с исходными изолятами: в отношении SCV(м), индуцированных меропенемом, наблюдалось снижение чувствительности к меропенему ($p=0,005$), SCV(а), индуцированных амикацином, — к амикацину ($p=0,002$) и не наблюдалось к амикацину ($p=0,57$) и меропенему ($p=0,06$), соответственно; в отношении SCV(м+а), индуцированных

комбинацией меропенема с амикацином, чувствительность снизилась и к меропенему ($p=0,001$) и к амикацину ($p=0,001$) (рис. 3).

В ряде случаев отмечался переход в категорию умереннорезистентного фенотипа у SCV(м) — 2 из 15, SCV(а) — 6 из 10, SCV(м+а) — 9 из 10 в отношении амикацина, а в отношении меропенема — только у SCV(м+а) — 1 из 10. Следует отметить, что исходные изоляты *K.pneumoniae* через 48 ч культивирования образовывали мелкие колонии в зоне ингибирования меропенемом. Появление подобных колоний может быть связано как с образованием субпопуляций с гетерогенной экспрессией устойчивости, которые в свою очередь способны проявлять гетерорезистентность — повышенную устойчивость к антибиотикам, так и со способностью персистировать в латентном состоянии в присутствии противомикробных препаратов на фоне чувствительной популяции, [25]. Сниженная чувствительность к антибиотикам при последующих пассажах SCV сохранилась только у SCV(м) к меропенему, произошедших от 3 исходных изолятов, которые относились к категории NWT (non-wild-type), то есть к микробиологически устойчивым, и были гетерорезистентными в отношении меропенема. Во всех остальных случаях SCV можно считать персистирующими формами, показавшими временное адаптивное повышение устойчивости к антибиотикам, и при последующих пассажах воосстановившими чувствительность исходных изолятов, которые в соответствии с критериями эпидемиологических точек отсечения EUCAST

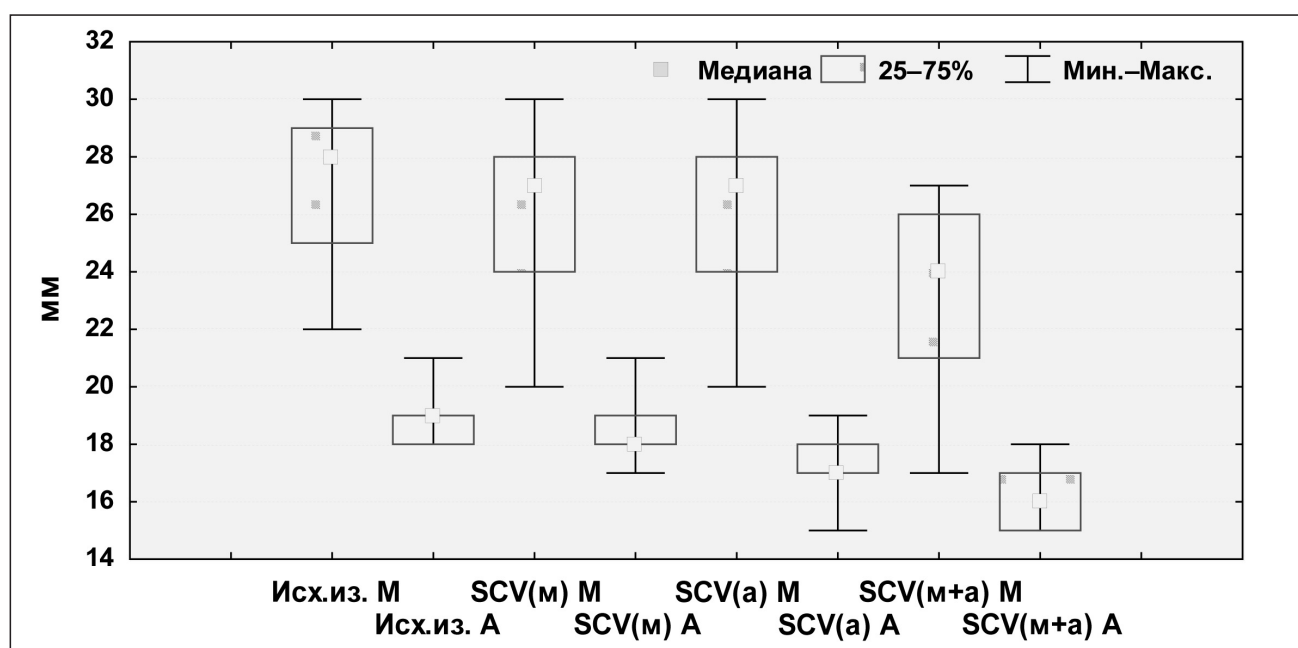


Рис. 3. Зоны ингибирования (мм) антибиотиками меропенемом — М, амикацином — А, исходных изолятов — исх. из. *K.pneumoniae* и SCV-персистеров различного происхождения: индуцированных высокими концентрациями меропенема — SCV(м), амикацина — SCV(а), меропенема и амикацина — SCV(м+а).

(амикацин — 18 мм, меропенем — 25 мм) относились к категории WT (wild-type) — не имеющие механизмов устойчивости [17].

Результаты проведенного нами исследования показали, что антибиотики с отличающимися механизмами действия формировали популяции персистеров с различной интенсивностью, в связи с чем, корреляции между численностью этих популяций не наблюдалось, следовательно, механизмы толерантности к антибиотикам различались. АТ популяции *K.pneumoniae*, характеризовалась фенотипической гетерогенностью и были представлены фенотипами персистеров SCV и NCV.

Меропенем и амикацин в отдельности способствовали увеличению доли SCV в популяциях. Повышенное образование SCV-форм при воздействии одним антибиотиком — амикацином — существенно уменьшалось при его совместном действии с меропенемом, что вносит вклад в синергетический эффект этих двух препаратов, с другой стороны — комбинация меропенема с амикацином индуцировала повышение адаптивной устойчивости SCV-персистеров к этим препаратам, которая в сочетании с более длительным временем задержки роста SCV может иметь преимущество во время инфекции, способствуя вы-

живанию в среде с антибиотиками. Таким образом, присущая бактериальным популяциям гетерогенность способствует их адаптации к колебаниям окружающей среды, а использование синергетических комбинаций антибиотиков может привести к неудаче в терапии инфекций в результате того, что в бактериальной популяции образуются фенотипически устойчивые к ним формы.

Современные лабораторные подходы к определению чувствительности к антибиотикам бактерий не охватывают весь спектр механизмов невосприимчивости к ним. Не всегда с их помощью можно обнаружить гетерорезистентность возбудителей, не говоря уже о том, что адаптационные механизмы, приводящие к формированию фенотипически гетерогенных АТ популяций, полностью исключаются из результата исследования. Важной составляющей их решения является понимание механизмов формирования персистентных форм возбудителей, их популяционных изменений; моделирование и прогнозирование химиотерапевтической эффективности антибиотиков в отношении возбудителей с повышенным образованием персистеров, разработка оптимальных схем антибиотикотерапии, предотвращающих развитие персистентности и резистентности патогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology* 2017; 15: 453–464.
2. Shan Y., Lazinski D., Rowe S., Camilli A., Lewis K. Genetic basis of persister tolerance to aminoglycosides in *Escherichia coli*. *mBio* 2015; 6 Is 2: e00078-15.
3. Chua S. L., Yam J. K., Hao P., Adav S. S., Salido M. M., Liu Y. et al. Selective labelling and eradication of antibiotic-tolerant bacterial populations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature communications* 2016; 7: 10750.
4. Torrey H. L., Keren I., Via L. E., Lee J. S., Lewis K. High persister mutants in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2016; 11 (5): e0155127.
5. Haaber J., Friberg C., McCreary M., Lin R., Cohen S. N., Ingmer H. Reversible antibiotic tolerance induced in *Staphylococcus aureus* by concurrent drug exposure. *mBio* 2015; 6 Is 1: e02268-14.
6. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 230 Is 1: 13–21.
7. Wiuff C., Zappala R. M., Regoes R. R., Garner K. N., Baquero F., Levin B. R. Phenotypic tolerance: Antibiotic enrichment of non-inherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1483–1494.
8. Fleur D. L., Kumamoto C. A., Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (Pt11): 3839–3846.
9. Roberts M. E., Stewart P. S. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* 2005; 151: 75–80.
10. Johns B. E., Purdy K. J., Tucker N. P., Maddocks S. E. Phenotypic and genotypic characteristics of small colony variants and their role in chronic infection. *Microbiol Insights* 2015; 8: 15–23.
11. Leimer N., Rachmühl C., Marques M., Bahlmann A. S. et al. Nonstable *Staphylococcus aureus* small-colony variants are induced by low pH and sensitized to antimicrobial therapy by phagolysosomal alkalization. *J Infect Dis* 2015; 213 (2): 305–308.
12. Proctor R. A., Eijff C., Kahl B. C., Becker K., McNamara P., Herrmann M. et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4 (Pt4): 295–305.
13. Tuchscher L., Medina E., Hussain M., Völker W., Heitmann V., Niemann J. et al. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 2011; 3 (3): 129–141.
14. Kahl B. C., Becker K., Löffler B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29 (2): 401–427.
15. Zhang P., Wright J. A., Osman A. A., Nair S. P. An *aroD* ochre mutation results in a *Staphylococcus aureus* small colony variant that can undergo phenotypic switching via two alternative mechanisms. *Frontiers in Microbiology* 2017; 8: 1001.
16. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty First Informational Supplement, CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2014.
17. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters: Version 8.1. valid from 2018-05-15. (<http://www.eucast.org>).
18. Скала Л. З., Лукин И. Н. Автоматизированное рабочее место микробиолога и химиотерапевта «Микроб-Автомат». Программное обеспечение. Версия 1.13, 2002–2009. Руководство пользователя. М.: МедПроект-3, 2012. — 55 с. / Скала Л. З., Лукин И. Н. Автоматизированное рабочее место микробиолога и химиотерапевта «Микроб-Автомат». Программное обеспечение. Версия 1.13, 2002–2009. Руководство пользователя. М.: МедПроект-3, 2012; 55. [in Russian]
19. Трухачёва Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica: М.: Геотар-Медиа; 2012. / Трухачёва Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica: М.: Геотар-Медиа; 2012. [in Russian]
20. Pu Y., Zhao Z., Li Y., Zou J., Ma Q., Zhao Y. et al. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Molecular cell* 2016; 62 (2): 284–294.
21. Helaine S., Kugelberg E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends in microbiology* 2014; 22 (7): 417–424.
22. Hofsteenge N., Van Nimwegen E., Silander O. K. Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. *BMC microbiology* 2013; 13 (1): 25.
23. Goneau L. W., Yeoh N. S., MacDonald K. W., Cadieux P. A., Burton J. P., Razvi H. et al. Selective target inactivation rather than global metabolic dormancy causes antibiotic tolerance in uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; AAC-02552.
24. Vulin C., Leimer N., Huemer M., Ackermann M., Zinkernagel A. S. Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters. *Nature Comm* 2018; 9 (1): 4074.
25. Neou E., Michail G., Tsakris A., Pourmaras S. Virulence of *Acinetobacter baumannii* Exhibiting Phenotypic Heterogeneous Growth against Meropenem in a Murine Thigh Infection Model. *Antibiotics* 2013; 2 (1): 73–82.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Маркелова Наталья Николаевна — к. б. н., с. н. с. лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; бактериолог микробиологического отдела КДЛ ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» МЗ РФ, Москва

Тутельян Алексей Викторович — д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский инсти-

тут эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; профессор кафедры эпидемиологии ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова МЗ РФ; ННКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва МЗ РФ, Москва

Седых Наталья Григорьевна — м. н. с. лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва