

# Некоторые закономерности формирования персистирующих форм клинических изолятов грамотрицательных бактерий

Н. Н. МАРКЕЛОВА<sup>1,2</sup>, А. В. ТУТЕЛЬЯН<sup>1,3,4</sup>, В. М. ПИСАРЕВ<sup>1,5</sup>, А. М. ГАПОНОВ<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

<sup>2</sup> Российский научный центр рентгенодиагностики МЗ РФ, Москва

<sup>3</sup> Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

<sup>4</sup> Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва МЗ РФ, Москва

<sup>5</sup> Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва

## Some Regularities of Persistent Forms of Clinical Isolates of Gram-Negative Bacteria Formation

N. N. MARKELOVA<sup>1,2</sup>, A. V. TUTELYAN<sup>1,3,4</sup>, V. M. PISAREV<sup>1,5</sup>, A. M. GAPONOV<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Central Research Institute for Epidemiology, Moscow

<sup>2</sup> Central Research Institute of Roentgenology and Radiology of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

<sup>3</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

<sup>4</sup> Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

<sup>5</sup> Federal Research and Clinical Center of Critical Care Medicine, V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow

Исследована способность клинических изолятов *Escherichia coli* (16), *Klebsiella pneumoniae* (20), *Pseudomonas aeruginosa* (12) к выживанию при воздействии высоких бактерицидных концентраций меропенема: после 2 и 4 ч экспозиции с антибиотиком выявлены антибиотикотолерантные персистирующие формы бактерий (персистеры), представленные колониями обычных размеров и типа SCV (small variant colony). Количество выросших после антибиотической атаки колоний каждого изолята изученных видов бактерий положительно коррелировало ( $p < 0,05$ ) со временем роста соответствующих бактериальных культур от начала лаг-фазы до момента удвоения оптической плотности в среде без антибиотика, при этом количество SCV не зависело от указанного интервала времени ( $p > 0,05$ ). Таким образом, показано, что кинетические параметры роста бактерий в питательной среде могут характеризовать уровень образования ими персистеров в той же среде после добавления антибиотика.

**Ключевые слова:** антибиотикотолерантность, бактерицидные концентрации антибиотиков, кинетика роста бактерий, фенотипическая гетерогенность, варианты малых колоний.

The ability of clinical isolates *Escherichia coli* (16), *Klebsiella pneumoniae* (20), *Pseudomonas aeruginosa* (12) to survive under the influence of high bactericidal concentrations of meropenem was studied. After 2 and 4 hours of exposure to the antibiotic, the authors have identified antibiotic-tolerant populations of bacteria (persisters) represented by ordinary sized colonies and SCV type (small variant colony). The number of colonies that have grown after the antibiotic attack of each isolate of above-mentioned species of bacteria positively correlated ( $P < 0.05$ ) with the growth time of the same bacterial cultures from the beginning of the lag-phase to the moment of doubling of the optical density in the medium without the antibiotic, while SCV number and the aforementioned time interval were not interdependent ( $P > 0.05$ ). Thus, it has been shown that kinetic parameters of bacterial growth in a medium can designate their level of persisters formation in the same medium after the addition of an antibiotic.

**Keywords:** antibiotic tolerance, persistent cells, bactericidal concentrations of antibiotics, kinetics of bacterial growth, phenotypic heterogeneity, variants of small colonies.

## Введение

Широкое применение антибиотиков является известным стимулом для развития антибиотикорезистентности, что делает многие инфекционные заболевания трудно поддающимися лечению. Особенно резко увеличилась в последние годы скорость формирования устойчивости к антибиоти-

кам представителями семейства *Enterobacteriaceae* и группы неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) [1, 2]. Кроме того, причиной неэффективности антибиотикотерапии является образование в бактериальной популяции покоящихся клеток — персистеров, которые находятся в не-деляющемся состоянии и толерантны к антибиотикам — не погибают в их присутствии. При прекращении действия антибактериального препарата они возобновляют рост, восстанавливая популяцию, и ключевой особенностью этих клеток явля-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 111123, Москва, ул. Новогириевская, д. 3А. Центральный НИИ эпидемиологии

ется сохранение первоначальной чувствительности к антибиотикам [3—5].

В настоящее время образование персистеров описано у *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* и других видов микроорганизмов, часто восприимчивых к антибиотикам, при этом между рецидивом хронических инфекций, таких как муковисцидоз, туберкулёз и кандидоз, не поддающихся противомикробной терапии, и наличием персистеров показана прямая связь [6—10]. Они также являются важным компонентом биоплёнок, образуемых большинством бактериальных патогенов, что в значительной степени способствует их толерантности к противомикробным препаратам [7, 11].

Несмотря на активные исследования явления персистенции у различных видов бактерий, до сегодняшнего дня плохо изученными остаются не только молекулярные механизмы антибиотикотолерантности персистеров, но и закономерности их формирования в бактериальной популяции при воздействии летальных доз антибиотиков. В частности, остаются не выясненными вопросы образования персистеров в зависимости от кинетических и динамических параметров роста самих бактериальных изолятов в условиях их культивирования на питательных средах, а также существования субпопуляций в составе неоднородных популяций выживших при стрессовых воздействиях бактериальных клеток.

Цель работы — исследовать способность к образованию антибиотикотолерантных клеток у клинических изолятов грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* при воздействии высоких бактерицидных концентраций меропенема и определить связь между кинетикой роста бактерий и уровнем образования персистеров.

## Материал и методы

Объектами исследования служили 48 изолятов бактерий, выделенных из различного клинического материала пациентов: *Escherichia coli* ( $n=16$ ), *Klebsiella pneumoniae* ( $n=20$ ), *Pseudomonas aeruginosa* ( $n=12$ ). Минимальные бактерицидные концентрации (МБК) антибиотиков определяли микрометодом в жидкой питательной среде Мюллера—Хинтон [12]. Об отсутствии роста бактерий в ячейках планшета судили по результатам посева инокулята на плотные питательные среды.

Культуры бактерий выращивали в бульоне Лурия—Бертани (ЛБ) в термошейкере (200 об/мин) до достижения стационарной фазы, начало которой определяли как время, когда оптическая плотность культуры не увеличивалась более, чем на 5,0% в течение 30 мин. Далее из выращенных культур в свежем бульоне ЛБ готовили суспензию плотностью 0,5 МФ ( $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл), которую сразу же в равных объёмах добавляли в среду ЛБ, содержащую меропенем в концентрациях, превышающих МБК каждого изолята в 100 раз (0,2—3200 мкг/мл). Инокулированные в 3 повторностях образцы инкубировали 2 и 4 ч. В указанные моменты времени, антибиотик был удалён из образцов путём 3-кратного отмывания клеток 0,9% раствором хлорида натрия и центрифугирования (8000 оборотов; 10 минут). Клеточный осадок был суспендирован в

стерильном бульоне ЛБ, из которого готовили ряд последовательных разведений с 10-кратным шагом. Высев каждого разведения производили на чашки с агаром ЛБ и дополнительно на чашки с агаром Мюллера—Хинтон с антибиотиком меропенемом в той концентрации, в какой проводился эксперимент для каждого изолята (0,2—3200 мкг/мл). Это позволило исключить отбор антибиотикорезистентных мутантов. Колонии бактерий на агаре ЛБ были подсчитаны в течение 24—72 ч инкубации при 37°C. Количество КОЕ (колониеобразующих единиц) принимали соответствующим количеству выживших бактериальных клеток. В отношении выросших колоний определяли МБК меропенема, чтобы удостовериться, что их значения соответствуют исходным.

Обработку данных и статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программ Excel (США) и пакета Statistica 6 (США). Об изменениях ростовых характеристик судили по среднему квадратичному отклонению значений результатов трёх независимых экспериментов от средней арифметической. Корреляции определяли с помощью непараметрического коэффициента Спирмена для признаков, характеризующихся отличным от нормального распределением, и интервальными переменными. Результаты анализа представляли в виде критерия « $p$ » (критического уровня значимости), различие считалось достоверным при  $p < 0,05$  [13, 14].

## Результаты и обсуждение

Исследуемые клинические изоляты *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, обработанные высокими концентрациями меропенема, образовывали антибиотикотолерантные популяции. Количество выживших бактериальных клеток зависело от времени действия антибиотика: через 4 ч инкубации культур с меропенемом их число уменьшилось по сравнению с двухчасовой инкубацией с меропенемом, и эти величины были связаны сильной положительной прямой связью: *E.coli* —  $R = 0,97$  ( $p=0,000$ ), *P.aeruginosa* —  $R = 0,97$  ( $p=0,000$ ), *K.pneumoniae* —  $R = 0,97$  ( $p=0,000$ ) (табл. 1—3). Полученные нами результаты не противоречат выводам многих авторов, которые указывали на зависимость гибели культур от времени воздействия сверхвысоких доз бактерицидных антибиотиков [3, 15, 16].

С другой стороны, в эксперименте мы сразу же подвергли бактериальные культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, антибиотической атаке при переносе в свежую питательную среду, не дожидаясь возобновления их роста. Учитывая, что меропенем, как и все  $\beta$ -лактамы, эффективно убивает растущие клетки бактерий, нарушая синтез клеточной стенки, возникает предположение, что клетки стационарной фазы возобновляют рост в свежей среде независимо от нахождения в ней меропенема. Это согласуется с результатами экспериментов некоторых исследователей, которые показали, что изначальное присутствие в средах ампициллина в концентрации 100 мкг/мл не влияло на процесс пробуждения клеток *E.coli*, как и время нахождения в них антибиотика, при этом время, проведённое бактериальными клетками в свежих питательных средах, определяло количество персистеров [17]. В связи

Таблица 1. Образование персистеров *E.coli* под воздействием меропенема

МБК, мкг/мл	Время действия антибиотика						t, мин
	2 ч			4 ч			
	КОЕ всех типов ( $x \pm \sigma$ )*	V (%)	КОЕ SCV ( $x \pm \sigma$ )*	КОЕ всех типов ( $x \pm \sigma$ )*	V (%)	КОЕ SCV ( $x \pm \sigma$ )*	
0,015	1,66±0,47	28,28	<0,01	1,0±0,0	0,0	<0,01	45
0,015	2,33±0,47	20,2	<0,01	1,0±0,0	0,0	<0,01	45
0,015	0,2±0,0	0,0	<0,01	0,1±0,0	0,1	<0,01	30
0,015	2,33±0,47	20,2	<0,01	1±0,0	0,0	<0,01	45
0,015	0,28±0,028	10,1	<0,01	0,1±0,0	0,0	<0,01	45
0,015	0,33±0,047	14,14	<0,01	<0,1	0,0	<0,01	45
0,015	<0,1	0,0	<0,01	<0,1	0,0	<0,01	45
0,015	0,1±0,1	0,0	<0,01	<0,1	0,0	<0,01	15
0,007	0,25±0,01	6,53	<0,01	0,1±0,0	0,0	<0,01	30
0,007	1,23±0,12	10,11	<0,01	0,43±0,047	10,87	1,66±0,047	30
0,007	0,33±0,047	14,14	<0,01	0,02±0,0	0,0	<0,01	30
0,004	0,73±0,2	28,02	<0,01	0,43±0,094	21,75	<0,01	30
0,004	1,06±0,3	28,98	0,1±0,0	0,36±0,047	12,85	0,03±0,0	30
0,002	1,83±0,12	6,8	0,073±0,01	0,63±0,047	7,44	<0,01	60
0,03	<0,1	0,0	0,023±0,0047	<0,1	0,0	1,0±0,0	45
0,06	0,1±0,1	0,0	0,016±0,0047	0,1±0,1	0,0	1,0±0,0	15

**Примечание.** Здесь и в табл. 2, 3: 2 ч; 4 ч – время инкубации культур с меропенемом; t – промежуток времени от начала культивирования до удвоения оптической плотности культуры в среде, не содержащей антибиотик; \* – количество КОЕ соответствует значению  $(x \pm \sigma) \times 10^4$ .

Таблица 2. Образование персистеров *P.aeruginosa* под воздействием меропенема

МБК, мкг/мл	Время действия антибиотика						t, мин
	2 ч			4 ч			
	КОЕ всех типов ( $x \pm \sigma$ )*	V (%)	КОЕ SCV ( $x \pm \sigma$ )*	КОЕ всех типов ( $x \pm \sigma$ )*	V (%)	КОЕ SCV ( $x \pm \sigma$ )*	
0,125	16,66±1,24	7,48	<0,01	3,33±0,47	14,14	<0,01	105
32,0	20,66±2,49	12,06	<0,01	4,66±1,24	26,72	<0,01	135
16,0	19,33±5,43	28,11	<0,01	6,66±1,24	18,7	<0,01	120
0,25	10,66±2,05	19,26	1,0±0,0	2,33±0,47	20,2	2,33±0,47	90
32,0	18,0±5,35	29,75	1,0±0,0	7,0±1,63	23,32	2,66±0,47	120
32,0	16,33±4,29	30,13	2,33±0,47	6,66±0,94	14,14	4,0±0,81	135
16,0	14,0±1,41	10,1	1,0±0,0	2,33±0,47	20,2	1,0±0,0	90
8,0	13,66±3,09	22,61	<0,01	5,33±1,24	23,75	<0,01	120
1,0	3,0±0,81	27,21	<0,01	1,66±0,47	28,28	<0,01	90
0,5	4,66±1,24	26,72	<0,01	1,0±0,0	0,0	<0,01	90
1,0	7,33±2,05	28,02	1,0±0,0	4,66±1,24	26,72	1,0±0,0	105
0,5	8,33±2,49	29,93	1,0±0,0	4,66±0,94	20,2	3,0±0,0	105

с вышеизложенным, зависимость образования персистеров от времени воздействия антибиотика, несмотря на полученную нами положительную взаимосвязь, скорее является отражением кинетических характеристик роста бактериальных культур.

Независимо от количества клеток, идентифицированных как персистеры, после удаления меропенема, которое было неодинаково у различных изолятов бактерий каждого вида, выявлена значимая корреляция между числом выживших клеток и временем, затраченным на увеличение популяции от начала лаг-фазы до момента удвоения оптической плотности культуры в среде, не содержащей антибиотик: *E.coli* –  $R = 0,72$  ( $t = 120$  мин;  $p = 0,003$ ),  $R = 0,64$  ( $t = 240$  мин;  $p = 0,025$ ); *K.pneumoniae* –  $R = 0,73$  ( $t = 120$  мин;  $p = 0,000$ ), ( $t = 240$  мин;  $R = 0,74$ ;  $p = 0,000$ ) и *P.aeruginosa* –  $R = 0,72$  ( $t = 120$  мин;  $p = 0,008$ ),  $R = 0,86$ ; ( $t = 240$  мин;  $p = 0,000$ ) (табл. 1–3). Прямая положительная связь между этими признаками указывает на

их взаимозависимость: чем больше времени требуется бактериальным клеткам стационарной фазы, чтобы перейти в фазу экспоненциального роста при переносе их в новую среду, тем большее количество персистеров образуется после антибиотической атаки бактерий в тех же условиях культивирования. Результаты, получаемые разными авторами при изучении образования персистеров, часто несопоставимы ввиду использования различных питательных сред, в которых одна и та же культура имеет различную кинетику роста и может производить неодинаковые количества персистеров [17–20]. В связи с этим зависимость уровня образования персистеров от кинетических параметров роста бактериальных изолятов на питательных средах можно рассматривать как одну из стабильных характеристик для описания персистирующих форм бактерий.

Изоляты каждого вида *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* отличались не только количеством выживших клеток в эксперименте с меропене-

Таблица 3. Образование персистеров *K.pneumoniae* под воздействием меропенема

МБК, мкг/мл	Время действия антибиотика						t, мин
	2 ч		4 ч				
	КОЕ всех типов ( $x \pm \sigma$ )*	V (%)	КОЕ SCV ( $x \pm \sigma$ )*	КОЕ всех типов ( $x \pm \sigma$ )*	V (%)	КОЕ SCV ( $x \pm \sigma$ )*	
8,0	10,66±2,49	23,38	<0,01	5±1,41	28,28	<0,01	30
8,0	8±2,16	27,00	<0,01	3,66±0,47	12,85	<0,01	30
8,0	1,0±0,0	0,0	<0,01	0,5±0,08	16,32	<0,01	30
8,0	2,33±0,47	20,2	<0,01	1,0±0,0	0,0	<0,01	30
2,0	3,33±0,47	14,14	1,0±0,0	0,83±0,12	14,96	0,43±0,094	30
0,06	5,0±1,41	28,28	<0,01	3,0±0,81	25,71	2,33±0,47	45
0,06	17,33±4,1	23,7	2,66±0,47	9,33±2,49	26,7	1,66±0,47	60
0,25	3,33±0,94	28,28	1,66±0,47	1,0±0,0	0,0	1,0±0,0	45
0,03	14,66±3,29	22,49	<0,01	7±1,63	23,32	<0,01	45
0,125	63,66±9,74	15,3	4,0±0,81	27±7,25	26,87	4,0±0,0	60
0,03	7,0±1,41	20,2	1,66±0,47	1,0±0,0	0,0	4,0±0,0	45
0,03	6,66±1,69	25,49	1,0±0,0	4,33±1,24	28,78	1,0±0,0	45
0,06	28,0±0,81	2,91	4,33±1,24	18±2,16	12,0	7,66±1,88	45
0,03	23,0±2,44	10,64	1,66±0,47	14,66±1,69	11,58	1,0±0,0	60
0,03	6,0±1,63	27,21	<0,01	1,66±0,47	28,28	<0,01	45
0,03	7,0±1,63	23,32	2,0±0,0	4,33±1,24	28,78	2,0±0,0	45
0,06	95,0±0,81	0,85	9,66±1,24	40,66±3,68	9,05	5,66±0,94	60
0,125	10,33±2,62	25,4	1,66±0,47	4,66±0,94	20,2	2,0±0,0	60
0,03	33,66±2,49	7,4	3,66±0,94	26,33±4,49	17,07	3,33±0,47	60
0,03	21±3,55	16,94	6,0±0,81	16,33±1,69	10,4	6,33±0,47	60

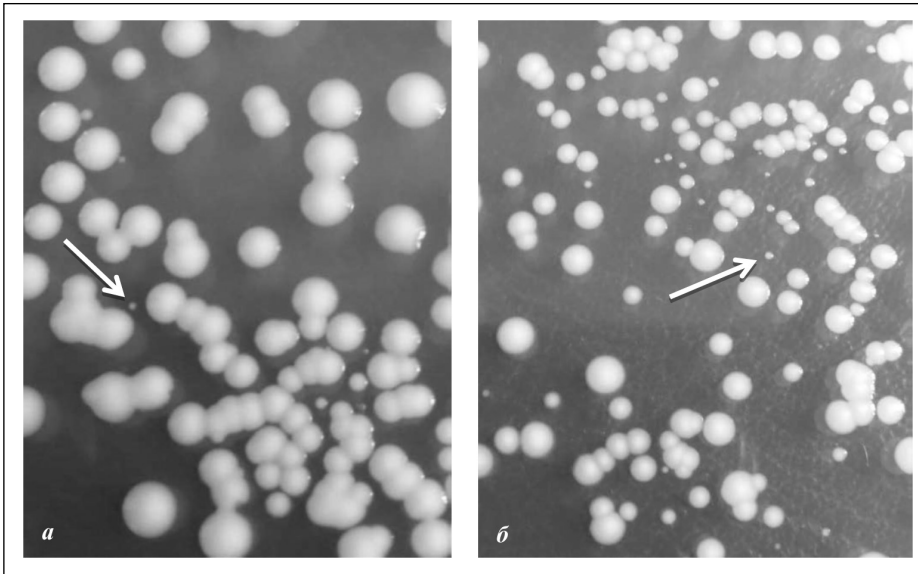
мом, но и различными значениями МБК этого препарата, при этом уровень их образования не коррелировал с МБК антибиотика в отношении: *E.coli* —  $R = -0,33$  ( $t = 120$  мин;  $p = 0,25$ ),  $R = -0,02$  ( $t = 240$  мин;  $p = 0,958$ ); *K.pneumoniae* —  $R = -0,36$  ( $t = 120$  мин;  $p = 0,123$ ),  $R = -0,36$  ( $t = 240$  мин;  $p = 0,123$ ); *P.aeruginosa* —  $R = 0,57$  ( $t = 120$  мин;  $p = 0,054$ ), также как и не коррелировало значение МБК ципрофлоксацина с уровнем образования персистеров некоторыми условно-патогенными бактериями при антибиотической атаке этим препаратом в проводимых нами ранее экспериментах [21, 22]. Таким образом, различия в чувствительности бактерий к антибиотику не оказывали влияния на количество жизнеспособных клеток, восстановивших свои ростовые свойства после воздействия высоких концентраций антибактериального препарата. Исключением стал *P.aeruginosa* после 4 ч инкубации с меропенемом —  $R = 0,64$  ( $n = 7$ ;  $t = 240$  мин;  $p = 0,025$ ). Надо отметить, что МБК меропенема в отношении 50% изолятов *P.aeruginosa* составила 8,0 мкг/мл и выше, в отличие от *E.coli* и *K.pneumoniae*, рост которых в 100 и 80% случаев, соответственно, подавлялся меропенемом в концентрации менее 8,0 мкг/мл. В связи с этим требуются дополнительные исследования образования персистеров у антибиотикорезистентных к меропенему изолятов *P.aeruginosa*.

Способность бактерий выживать при стрессовых воздействиях зависит от их генетических систем, способных генерировать две или более устойчивые субпопуляции с различными фенотипическими свойствами в общей генетически однородной популяции. Фенотипические вариации могут быть эпигенетическими по своей природе,

не сопровождаться изменениями в последовательности ДНК, и зависят они от развитых разнообразных регуляторных путей, которые отвечают за различные адаптивные ответы [23].

В эксперименте кроме определения общего количества возобновивших свой рост клеток бактерий была выявлена гетерогенность их популяций, которая выражалась образованием колоний различной величины на плотной среде, так называемые варианты обычных и малых колоний — SCV (small variant colony) (рисунок). Как правило, каждому изоляту соответствовало меньшее количество SCV, чем общее число выживших клеток (табл. 1–3). Между числом SCV и временем удвоения оптической плотности культуры в среде, не содержащей антибиотик, в отличие от данных, полученных для гетерогенных популяций изолятов, корреляции не наблюдалось: *E.coli* —  $R = 0,71$  ( $t = 120$  мин;  $p = 0,181$ ),  $R = 0,36$  ( $t = 240$  мин;  $p = 0,548$ ); *K.pneumoniae* —  $R = 0,41$  ( $t = 120$  мин;  $p = 0,144$ ),  $R = 0,32$  ( $t = 240$  мин;  $p = 0,262$ ); *P.aeruginosa* —  $R = 0,67$  ( $t = 120$  мин;  $p = 0,141$ ),  $R = 0,71$  ( $t = 240$  мин;  $p = 0,109$ ).

Очевидно, отсутствие этой взаимосвязи связано с особенностями кинетики роста SCV, отличающейся от ростовых характеристик колоний обычных размеров — преобладающего фенотипа в изученных популяциях. В результате этих различий становится объективным то, что количество SCV после 4 ч инкубации с меропенемом сохранялось практически на том же уровне или увеличивалось по сравнению с 2 ч экспозицией с меропенемом. Вероятно, произошло запаздывание вступления SCV в фазу экспоненциального роста. Подобное явление было описано в отношении малых вариантов колоний *S.aureus*, выделенных



**Варианты колоний, выживших после антибиотической атаки меропенемом: обычного размера и SCV (указаны стрелкой).**

*а* – *K. pneumoniae*; *б* – *E. coli*.

от пациентов с муковисцидозом; SCV отличались по их фазовым характеристикам роста от нормальных колоний, в частности, увеличением времени лаг-фазы, а также уровнем экспрессии генов вирулентности, и, как следствие, сниженной вирулентностью [24]. Кроме того, есть данные, что фенотип SCV обусловлен уменьшением транспорта электронов из-за дефектов биосинтеза компонентов электронно-транспортной цепи, по отсутствию которых SCV демонстрируют аукоотрофный фенотип; и по сравнению с родительской популяцией минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков в отношении SCV характеризуются более высокими значениями [25–27]. В нашем исследовании SCV не отличались повышенной устойчивостью к меропенему относительно исходной чувствительности к нему изолятов.

Приведённые результаты исследования свидетельствуют о том, что различные изоляты микроорганизмов одного вида при культивировании в жидкой среде характеризуются закономерностями образования персистеров в зависимости от ки-

нетики роста каждой культуры в этой среде. В частности, увеличение продолжительности времени, в течение которого происходило удвоение оптической плотности бактериальных культур, статистически значимо соотносилось с количеством выживших клеток при воздействии на культуры летальными дозами меропенема различной длительности.

Число персистеров является динамической мерой конкретной культуры, отражающей скорость роста микроорганизмов в определённой питательной среде, и не является фиксированной величиной. Таким образом, различные условия культивирования

микроорганизмов в экспериментах по выявлению персистеров и их индивидуальный подсчёт могут привести к несопоставимым результатам. Необходимы точные экспериментальные детали, например, сравнение изучаемых изолятов с мутантными штаммами с изменёнными частотами образования толерантных к тем или иным антибактериальным препаратам клеток.

Неоднородность бактериальных популяций, выживших под воздействием высоких концентраций меропенема, была обусловлена присутствием колоний типа SCV, характеризующимися не только малыми размерами, но и отличными от клеток обычных размеров ростовыми характеристиками, которые могут вносить свой вклад в кинетику роста гетерогенных популяций персистеров. Кроме того, SCV представляют интерес с точки зрения адаптации бактерий к окружающим их условиям путём снижения вирулентности, замедления роста, формирования компонента биоплёнок при длительной персистенции в организме инфицированного человека

## ЛИТЕРАТУРА

1. Walsh T. R., Toleman M. A. The emergence of pan-resistant gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67 (Pt1): 1–3.
2. Woodford N., Turton J. F., Livermore D. M. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35 (Pt5): 736–755.
3. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 230 1s: 13–18.
4. Wooda T. K., Knabelc S. J., Kwana B. W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79 (Pt23): 7116–7121.
5. Эль-Регистан Г.И., Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Писарев В.М. и соавт. Явление персистенции — формы и механизмы выживаемости популяций. *Медицинский алфавит*. —

2014. — Т. 2. — № 10. — С. 49–54. / *El'-Registan G.I., Nikolaev YU.A., Mulyukin A.L., Lojko N.G., Demkina E.V., Pisarev V.M. i soavt. Yavlenie persistsentsii — formy i mekhanizmy vyzhivaemosti populyatsij. Meditsinskij alfavit* 2014; 2: 10: 49–54. [in Russian]

6. Mulcahy L. R., Burns J. L., Lory S., Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* 2010; 192 (Pt23): 6191–6199.
7. Fleur D. L., Kumamoto C. A., Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (Pt11): 3839–3846.
8. Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; 186 (Pt24): 8172–8180.
9. Fauvarit M., Groote V. N. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol* 2011; 60 (Pt6): 699–709.

10. Wallis R. S., Patil S., Cheon S. H., Edmonds K., Phillips M., Perkins M. D., *et al.* Drug tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2600–06.
11. Roberts M. E., Stewart P. S. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* 2005; 151: 75–80.
12. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04; 2004. / Gosudarstvennoe sanitarno-epidemiologicheskoe normirovanie Rossijskoj Federatsii. Metody kontrolya. Biologicheskie i mikrobiologicheskie faktory. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskie ukazaniya. MUK 4.2.1890-04; 2004. [in Russian]
13. Трухачёва Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica; 2012. / *Trukhacheva N. V. Matematicheskaya statistika v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s primeneniem paketa Statistica*; 2012. [in Russian]
14. Яковлев В. Б. Статистика. Расчёты в Microsoft Excel. 2005. / *Yakovlev V. B. Statistika. Raschet y v Microsoft Excel*. 2005. [in Russian]
15. Gefen O., Gabay C., Mumcuoglu M., Engel G., Balaban N. Q. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 (Pt16): 6145–6149.
16. Balaban N. Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2004; 305 Is 5690: 1622–1625.
17. Joers A., Kaldalu N., Tenson T. The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *J Bacteriol* 2010; 192 (Pt13): 3379–3384.
18. Kussell E., Leibler S. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 2005; 309 Is 5743: 2075–2078.
19. Luidalepp H., Joers A., Kaldalu N., Tenson T. Aage of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence. *J Bacteriol* 2011; 193 (Pt13): 3598–3605.
20. Tuomanen E., Durack D. T., Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30 (Pt4): 521–527.
21. Тутельян А. В., Писарев В. М., Минаева Н. З., Гапонов А. М., Грачёва А. Н., Солопова Г. Г. Генерация антибиотикотолерантных бактерий при гематологических и онкологических заболеваниях, сопровождающихся иммунокомпрометацией: новая проблема инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. — *Вестник РАМН* 2016. — Т. 71. — № 3. — С. 183–189. / *Tutel'yan A. V., Pisarev V. M., Minaeva N. Z., Gaponov A. M., Gracheva A. N., Solopova G. G. Generatsiya antibiotikotolerantnykh bakterij pri gematologicheskikh i onkologicheskikh zabolevaniyakh, soprovozhdayushchikhsya immunokomprometatsiej: novaya problema infektsij, svyazannykh s okazaniem meditsinskoy pomoshchi*. *Vestnik RAMN* 2016; 71 (3): 183–189. [in Russian]
22. Тутельян А. В., Гапонов А. М., Писарев В. М., Эль-Регистан Г. И. Дормантное состояние микроорганизмов и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Терапевтический архив*. — 2015. — Т. 87. — № 11. — С. 103–108. / *Tutel'yan A. V. Gaponov A. M. Pisarev V. M. El'-Registan G. I. Dormantnoe sostoyanie mikroorganizmov i profilaktika infektsij, svyazannykh s okazaniem meditsinskoy pomoshchi*. *Terapevticheskij arkhiv* 2015; 87 (11): 103–108. [in Russian]
23. Smits W. K., Kuipers O. P., Veening J. W. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4 (Pt4): 259–271.
24. Kahl B. C., Belling G., Becker P., Chatterjee I., Wardecki K., Hilgert K., *et al.* Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect Immun* 2005; 73 (Pt7): 4119–4126.
25. 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. *Nature Reviews Microbiology* 2006; 4 (Pt4): 295–305.
26. Singh R., Ray P., Das A., Sharma M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. *Journal of medical microbiology* 2009; 58 (Pt8): 1067–1073.
27. Proctor A., Kahl B., Eijff C., Vaudaux P. E., Lew D. P., Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 27 Suppl 1: S68–S74.

#### 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 КДП ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» МЗ РФ, Москва

Тутельян Алексей Викторович — д. м. н., член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт 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; НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва МЗ РФ, Москва

Писарев Владимир Митрофанович — д. м. н., профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов критических состояний Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского; в. 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

Гапонов Андрей Михайлович — к. м. н., заведующий лабораторией инфекционной иммунологии НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва МЗ РФ; 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, Москва