

DOI: 10.15690/vramn687

А.В. Тутельян<sup>1, 2, 4</sup>, В.М. Писарев<sup>1, 2, 3</sup>, Н.З. Минаева<sup>1</sup>, А.М. Гапонов<sup>1, 2, 3</sup>,  
А.Н. Грачёва<sup>2</sup>, Г.Г. Солопова<sup>2</sup><sup>1</sup> Центральный НИИ эпидемиологии, Москва, Российская Федерация<sup>2</sup> Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва,  
Москва, Российская Федерация<sup>3</sup> НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского, Москва, Российская Федерация<sup>4</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,  
Москва, Российская Федерация

# Генерация антибиотикотолерантных бактерий при гематологических и онкологических заболеваниях, сопровождающихся иммунокомпрометацией: новая проблема инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

183

**Обоснование.** Антибиотикотолерантность (АТ) — одна из причин феномена антибиотикоустойчивости — обеспечивает ускользание нереплицирующихся и метаболически инертных микроорганизмов (персистеров) от воздействия любых антибиотиков вследствие отсутствия биологических мишеней воздействия последних, тем самым создавая потенциал для хронизации инфекций. **Цель:** установление факта гетерогенности клинических изолятов условно-патогенных микроорганизмов *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных от детей с онкогематологическими заболеваниями, по содержанию персистеров, несущих феномен АТ. **Методы.** Детей с онкогематологическими заболеваниями разделили на 2 группы в зависимости от интенсивности антибиотикотерапии инфекционных осложнений (менее или более 5 антибиотиков за госпитализацию). В биоматериале, полученном от больных детей, *in vitro* определяли количество цiproфлоксацин-индуцированных бактерий-персистеров. **Результаты.** Среди изученных штаммов, около 1/3 характеризуется высоким содержанием персистеров, обеспечивающих быстрое восстановление численности популяции после антибиотической атаки *in vitro*. Содержание персистеров не коррелировало с определенной ранее минимальной подавляющей концентрацией цiproфлоксацина ( $r=0,148$ ;  $n=25$ ;  $p>0,05$ ). Высокий уровень формирования персистеров у штаммов условно-патогенных микроорганизмов *E. coli* и *P. aeruginosa* ассоциирован с более высоким уровнем инфекционных осложнений и неблагоприятным течением основного заболевания у детей, страдающих онкогематологическими заболеваниями. Штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa*, выделенные из крови, бронхоальвеолярного лаважа, мочи и мазков со слизистых оболочек пациентов, получивших массивную антибиотикотерапию (5 и более антибиотиков в течение 2–3-недельного курса лечения), достоверно чаще характеризовались высоким уровнем содержания персистеров (более 1000 КОЕ/мл), по сравнению со штаммами, выделенными от детей, в лечении которых использовано меньшее число антибактериальных препаратов. **Выводы.** Количественная оценка персистирующих форм патогенных и условно-патогенных микроорганизмов у больных, страдающих онкогематологическими заболеваниями, может быть рекомендована к включению в алгоритм исследований при клинико-микробиологическом мониторинге больных и внутрибольничной среды.

**Ключевые слова:** персистеры, онкогематология, дети.

**(Для цитирования:** 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;71(3):183–189. doi: 10.15690/vramn687)

## Обоснование

Первые случаи устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, описанные вскоре после открытия последних [1, 2], легли в основу изучения основных причин последующей эры «эпидемии антибиотикоустойчивости». В настоящее время признаются две основные биологические причины феномена устойчивости к антибиотикам — антибиотикорезистентность (АР) и антибиотикотолерантность (АТ) [3–5]. Если АР основана на распространении генов устойчивости среди «своих» бактерий, то АТ обусловлена иными механизмами фенотипических изменений штаммов на уровне генной экспрессии, проявляющихся

прекращением пролиферации и замедлением уровня метаболизма бактерий [6–8]. В отличие от более изученного феномена — АР, антибиотикотолерантность обеспечивает ускользание нереплицирующихся и метаболически инертных микроорганизмов (персистеров) от воздействия любых антибиотиков вследствие отсутствия биологических мишеней воздействия последних [9–11].

АТ несет потенциал сохранения персистирующих инфекций, которые могут длительное время быть бессимптомными. Так, в биопленках персистеры могут составлять более 10% всех микробных клеток в виде dormantных (молчащих, не проявляющих признаки жизни) бактерий, являясь, даже после успешной антибиотикотерапии, ре-

зервуаром для новой инфекции [12, 13]. Опасность фенотипической реверсии персистеров в пролиферирующие штаммы делает любой организм практически безоружным перед инфекцией. Более подвержены такому риску больные или выздоровевшие, организм которых испытывал воздействие окислительного стресса (цитотоксическая терапия, воспалительные реакции). Показано, что именно окислительный стресс в микроокружении бактерий вызывает адаптивные реакции микроорганизмов, приводящие к фенотипической изменчивости, заключающейся в изменении уровня пролиферации и метаболизма, продвижению по пути к анабиозоподобному состоянию микроорганизма, обеспечивающих выживание всей микробной популяции в условиях действия летальных для нее факторов [11–14]. Такой стресс могут вызывать и антибиотики [15–17].

Вопросы, связанные с генерацией антибиотикотолерантных персистеров среди патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), до сих пор являются дискуссионными [18–20]. Отсутствуют сведения о распространенности штаммов УПМ *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* с высокой способностью формировать клетки-персистеры в ответ на воздействие антибактериальных препаратов среди клинических изолятов, выделенных от больных злокачественными новообразованиями. Поскольку клиническое значение персистирующих форм условно-патогенных бактерий-возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи еще далеко не ясно, основной целью настоящей работы стал количественный анализ формирования персистеров *E. coli* и *P. aeruginosa* в группе иммунокомпрометированных больных с повышенным риском повторных инфекций — детей с онкогематологическими и другими заболеваниями в зависимости от интенсивности антибиотикотерапии.

## Методы

### Дизайн исследования

Проведено клинико-бактериологическое, рандомизированное методом случайной выборки, исследование количественного содержания АР и АТ бактерий в биологических образцах, полученных от детей с онкогематологическими заболеваниями. Дети были разделены на две подгруппы в зависимости от интенсивности антибиотикотерапии, которую проводили по медицинским показаниям с учетом течения инфекционного процесса. Были сформулированы две гипотезы для исследования. Первая гипотеза — штаммы, содержащие большое количество персистеров, встречаются довольно часто среди случайно отобранных клинических изолятов УПМ, выделенных от детей с онкогематологическими заболеваниями — проверялась на основе анализа случайно отобранных, бактериологически охарактеризованных штаммов, полученных от детей, госпитализированных в 2012–2014 гг. Вторая гипотеза — массивная антибиотикотерапия детей с иммунокомпрометацией сопровождается преимущественной колонизацией пациентов штаммами УПМ, характеризующимися более высоким уровнем генерации персистеров — проверялась на основании разделения детей, обследованных в течение 2015 г., на две группы в соответствии с критериями соответствия.

### Критерии соответствия

Критерием для включения в группу 1 являлось назначение пяти или более антибиотиков в течение 2–3-недельного курса лечения (в соответствии с медицинскими показаниями), в группу 2 — менее интенсивная антибиотикотерапия.

A.V. Tutelyan<sup>1, 2, 4</sup>, V.M. Pisarev<sup>1, 2, 3</sup>, N.Z. Minaeva<sup>1</sup>, A.M. Gaponov<sup>1, 2, 3</sup>,  
A.N. Gracheva<sup>2</sup>, G.G. Solopova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Central Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Dmitry Rogachev's Federal Scientific and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology  
Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimation, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup> I.M. Setchenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

## Generation of Antibiotic Tolerant Bacterial Persisters in Immunocompromized Patients with Hematologic and Malignant Diseases: A New Problem of Health-Care Associated Infections

**Background:** Antibiotic tolerance (AT) represents one of the causes of the phenomenon of antibiotic resistance that allows escape of non-replicating metabolically inert microorganisms (persisters) from any antibiotics attack because molecular targets of antibiotics are lacking thereby creating the potential for chronic infections. **Aims:** Determine the heterogeneity of the strains of opportunistic pathogens *E. coli* and *P. aeruginosa* isolates from children with hematologic malignancies containing bacterial persisters that cause the AT phenomenon. **Methods:** Children with hematological malignancies were divided into 2 groups according to the intensity of antibiotic treatment of infectious complications. Ciprofloxacin-induced persisters were quantitatively determined in the biological materials obtained from sick children. **Results:** Within the clinical isolates of *E. coli* and *P. aeruginosa*, about a third of the strains belong to high-persisting. The numbers of persistent forms of bacteria did not correlate with a minimal inhibitory concentration values ciprofloxacin ( $r=0.148$ ,  $n=25$ ,  $p>0.05$ ). Interestingly, higher level of formation of persistent *E. coli* and *P. aeruginosa*, is associated with higher frequencies of infection attacks, massive antibiotic use and unfavorable course of the disease in children. **Conclusions:** Therefore, detecting the persistent forms of bacterial pathogens including those associated with the health-care associated infection, specifically, in immunocompromised patients, should be included into the contemporary algorithms of microbiological observation and monitoring of patients and intrahospital environment.

**Key words:** persisters, oncology, children.

(For citation: Tutelyan A.V., Pisarev V.M., Minaeva N.Z., Gaponov A.M., Gracheva A.N., Solopova G.G. Generation of Antibiotic Tolerant Bacterial Persisters in Immunocompromized Patients with Hematologic and Malignant Diseases: A New Problem of Health-Care Associated Infections. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(3):183–189. doi: 10.15690/vramn687)

Критерии исключения — отсутствие информации о выделенных штаммах или число штаммов, полученных от каждого пациента менее 2.

### Условия проведения

Исследование проходило в ФГБУ «ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва» Минздрава России (на первом этапе — 25 детей, на втором этапе — 21 ребенок; возраст до 17 лет, а также четверо родителей).

### Продолжительность исследования

Исследование проводилось в течение 2012–2015 гг.

### Исходы исследования

#### Основные исходы исследования:

- на первом этапе — пропорция персистеров среди общего числа выделенных и охарактеризованных штаммов УПМ, полученных от детей с онкогематологическими заболеваниями;
- на втором этапе — число штаммов УПМ, образующих большое количество персистеров, среди иммунокомпromетированных детей, получивших антибиотикотерапию разной интенсивности.

**Дополнительным исходом исследования** стала оценка корреляции между интенсивностью генерации персистеров и резистентностью к антибиотикам среди штаммов УПМ (т.е. между АТ и АР), выделенных на протяжении второго этапа исследования.

### Анализ в подгруппах

Выделенные подгруппы анализировали дополнительно по полу, возрасту, диагнозу, однако по данным критериям различий между подгруппами выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

### Методы регистрации исходов

В качестве референсных штаммов (контроль) использовали штамм K12 (ATCC 25922) для *E. coli* и штамм PAO1 (ATCC 27853) для *P. aeruginosa*, которые до начала экспериментов хранились при  $-70^{\circ}\text{C}$  в криопротективной среде, содержащей 25% глицерина.

Определение чувствительности клинических штаммов бактерий к ципрофлоксацину, учет и интерпретацию результатов проводили в соответствии с требованиями Европейского комитета по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST). Для приготовления инокулята использовали метод прямого суспендирования в стерильном изотоническом растворе колоний чистой 18–24-часовой культуры бактерии, выросшей на плотной неселективной питательной среде. Бактериальную суспензию доводили до плотности 0,5 по стандарту мутности Мак Фарленда (при автоматизированном учете на фотометре — 0,05–0,08 и длине волны 620 нм), что приблизительно соответствует концентрации  $1-3 \times 10^8$  КОЕ/мл. Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) ципрофлоксацина проводили на питательных средах МХА (Мюллера–Хинтона агар) и МХБ (Мюллера–Хинтона бульон) методом последовательных разведений в питательной среде. Для определения МПК заданные концентрации ципрофлоксацина (с двукратным шагом) вносили в питательную среду, которую затем засеивали культурой исследуемого штамма бактерий и после инкубации в течение 16–20 ч при  $35^{\circ}\text{C}$  оценивали наличие/отсутствие видимого роста. Результаты отмечали по наличию роста бактериальной

культуры. В каждой серии экспериментов с целью соблюдения условий их проведения параллельно производили контрольное определение чувствительности референс-штаммов к ципрофлоксацину методом последовательных разведений.

Определение уровня персистеров в клинических изолятах *E. coli* проводили в соответствии с методикой N. Kaldalu и соавт. [21] в собственной модификации. Культуру исследуемого штамма выращивали 16–18 ч в пробирках с бульоном Луриа (ЛБ) на шейкере (220 об/мин) при  $37^{\circ}\text{C}$ , после чего культуру разводили ЛБ в 1000 раз, переносили мерно в пробирки по 3 мл, помещали на шейкер (220 об/мин) и культивировали при  $37^{\circ}\text{C}$  с мониторингом оптической плотности культуры на фотометре каждые 30 мин. Длительность культивирования устанавливали для каждого штамма (от 1,5 до 2,5 ч) по достижению оптической плотности бактериальной суспензии равной 0,05–0,08 при 620 нм, что соответствует  $1-3 \times 10^8$  КОЕ/мл (стандартизованная культура), затем проводили контроль плотности суспензии бактериальной культуры (число клеток в 1 мл). На следующем этапе к стандартизованной культуре добавляли ципрофлоксацин в конечной концентрации, равной 12,5-кратной величине МПК в 1 мл бактериальной суспензии. Смесь хорошо перемешивали, инкубировали на шейкере (220 об/мин) при  $37^{\circ}\text{C}$ . Через 1,5 и 3,5 ч от начала инкубации проводили контроль антибактериального действия ципрофлоксацина — путем определения степени гибели культуры. Параллельно через 3,5 ч от начала инкубации отбирали пробы, содержащие клетки-персистеры испытуемого штамма (3,5 ч — точка отбора клеток-персистеров). Все колонии бактерий, выросшие на 2–3-и сут на ЛА (после обработки исходной культуры ципрофлоксацином в течение 3,5 ч), подвергали изучению на видовую принадлежность и чувствительность к ципрофлоксацину. В случае если выросшая культура бактерий соответствовала исходной культуре по фенотипическим признакам и уровню чувствительности к ципрофлоксацину, то предполагалось, что выделены клетки-персистеры изучаемого штамма *E. coli*.

Определение ципрофлоксацин-индуцированных клеток-персистеров у клинических штаммов *P. aeruginosa* проводили в соответствии с методикой N. Møker и соавт. [22] в модификации авторов настоящего исследования. Культуру исследуемого штамма выращивали 16–18 ч в пробирках с МХБ на шейкере (220 об/мин) при  $37^{\circ}\text{C}$ , после чего культуру отмывали путем двукратного центрифугирования в PBS (8000 об/мин в течение 10 мин). Отмытую культуру ресуспендировали в МХБ до оптической плотности равной 0,05–0,08 при 620 нм, что соответствует  $1-3 \times 10^8$  КОЕ/мл (стандартизованная культура), затем проводили контроль плотности суспензии бактериальной культуры (число клеток в 1 мл). На следующем этапе к стандартизованной культуре добавляли ципрофлоксацин, в количестве равном 20-кратной величине МПК в 1 мл бактериальной суспензии. Через 1,5; 3,5 и 6 ч от начала инкубации проводили контроль антибактериального действия ципрофлоксацина путем определения степени гибели культуры. Параллельно через 3,5 ч от начала инкубации отбирали пробы, содержащие клетки-персистеры испытуемого штамма (3,5 ч — точка отбора клеток-персистеров). Все колонии бактерий, выросшие на 2–3-и сутки (после обработки исходной культуры ципрофлоксацином в течение 3,5 и 6 ч) подвергали изучению на видовую принадлежность и чувствительность к ципрофлоксацину. В случае если выросшая культура бактерий соответствовала исходной

культуре по фенотипическим признакам и уровню чувствительности к ципрофлоксацину, то предполагалось, что выделены клетки-персистеры изучаемого штамма *P. aeruginosa*.

### Этическая экспертиза

Исследование выполнено в соответствии с принятыми международными и российскими этическими принципами и нормами. Биологический материал был доступен исследователям уже после выписки всех больных из клиники и не содержал основных персональных индикаторов (фамилии и имени). Исследователям были неизвестны персональные данные детей и их родителей, за исключением возраста, веса и роста детей. Родители детей были информированы о том, что результаты любого обследования могут быть использованы в научных целях без указания персональных данных, и дали добровольное информированное согласие на возможность использования биологических материалов своих детей в научных целях. Использование биологического материала и анализ данных были проведены исследователями после завершения лечения детей без их персональной идентификации, поэтому само исследование никак не могло отразиться на лечении или каких-либо других интересах детей или их родителей. Таким образом, дополнительное одобрения данного исследования на заседании Локального этического комитета ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва не потребовалось.

### Статистический анализ

Данные были статистически обработаны при помощи программы GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, США). Степень ассоциации параметров характеризовали с помощью показателя соотношения шансов (odds ratio, OR) с учетом положительного прогностического значения (positive prognostic value, PPV), чувствительности и специфичности метода. Для бинарных показателей применяли точный критерий Фишера, для количественных показателей — критерий Манна–Уитни. Достоверными считались различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Объект исследования

В группу исследования вошел 21 ребенок в возрасте до 17 лет, госпитализированный в ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва в течение 2015 г., в основном со злокачественными опухолевыми или другими заболеваниями, сопровождающимися иммунокомпрометацией, из них 5 с острым лимфобластным лейкозом, 2 с острым миелобластным лейкозом, 4 с саркомой Юинга, 3 с первичным иммунодефицитным состоянием; по одному пациенту было с опухолью почки, В-клеточной лимфомой, фиброматозом дна полости рта, апластической анемией, лимфомой Беркитта, новообразованием гортани и трахеи и стенозом гортани. Дополнительно исследовали биообразцы, полученные от некоторых родителей пациентов ( $n=4$ ).

Бактерии выделяли из крови, бронхоальвеолярного лаважа, мочи, смывов со слизистой оболочки ротовой полости и зева, а также из отделяемого ран при хирургических вмешательствах у лиц данной категории. У всех выделенных штаммов исследовали спектр чувствительности к антибиотикам (феномен AP) методом серийных разведений с использованием автоматического микробиологического анализатора AutoScan-4 (Siemens, Германия) и размер фракции персистирующих клеток (феномен AT),

который определяли по характеристике кривой роста после воздействия антибактериального агента с установленной чувствительностью, взятого в концентрации в 100 раз превышающей МПК для данного препарата в отношении исследуемого штамма.

### Основные результаты исследования

На первом этапе исследования определяли, насколько часто встречаются штаммы, содержащие большое количество персистеров, среди случайно отобранных штаммов УПМ, выделенных от детей с онкогематологическими заболеваниями (с острым лимфобластным лейкозом и хроническим лимфолейкозом). В разных биологических образцах (кровь, моча, бронхоальвеолярный лаваж, отделяемое ран) определяли наличие бактериального роста, характеризовали чувствительность к антибиотикам (в т.ч. к ципрофлоксацину), определяли наличие персистеров (молчащих, непролиферирующих бактерий, выявляемых после обработки бактериальных культур ципрофлоксацином в очень высокой дозе — в 12,5–20 раз превышающей МПК — и способных при пересеве в новую среду без антибиотиков активно пролиферировать, образуя легко поддающиеся автоматическому учету колонии (подробно метод описан в разделе «Методы регистрации исходов»). Обнаружено, что штаммы УПМ от разных больных характеризовались различным содержанием персистеров (от менее 10 КОЕ/мл исходной суспензии до более 50000 КОЕ/мл). Культуры бактерий, содержащие более 1000 колоний, было принято считать штаммами, образующими большое количество персистеров. За время госпитализации от каждого больного получали по 2–4 культуры. Если хотя бы один раз за время госпитализации у пациента выявляли штамм, образующий большое количество персистеров, такой больной учитывался как выделяющий бактерии с высоким содержанием персистеров. При исследовании 74 штаммов (*E. coli* — 41 штамм, *P. aeruginosa* — 33 штамма) было обнаружено, что в 12 штаммах *E. coli* (29%) и 8 штаммах *P. aeruginosa* (24%) фракция персистеров превышала аналогичный показатель соответствующего референсного штамма в 100–1000 раз. У остальных выделенных штаммов фракция бактерий-персистеров также была больше, чем у референсных штаммов, но различия не превышали 2–10-кратного диапазона. Таким образом, более чем в 1/4 случайно отобранных штаммов наиболее распространенных УПМ *E. coli* и *P. aeruginosa*, полученных от детей с онкогематологическими заболеваниями, в условиях клинического стационара встречались бактерии-персистеры. Это соответствует выдвинутой гипотезе о значительной частоте генерации бактерий-персистеров в биообразцах, полученных от детей онкогематологического стационара.

На втором этапе исследования определяли, в какой степени массивная антибиотикотерапия детей с иммунокомпрометацией приводит к повышенной генерации УПМ со свойствами персистеров по сравнению с менее интенсивной антибиотикотерапией. Проверка гипотезы о значении интенсивности антибиотикотерапии в генерации персистеров проверялась на основании разделения детей, исследованных на протяжении 2015 г., на две группы: больные группы 1 получали многократные курсы антибиотикотерапии (пять и более курсов за период госпитализации — массивная антибиотикотерапия; средняя и наиболее частая продолжительность госпитализации — 2–3 нед); группу 2 составили больные с менее агрессивной антибиотикотерапией.

Проведенный независимым аналитиком анализ данных, поступивших от клиницистов и микробиологов,

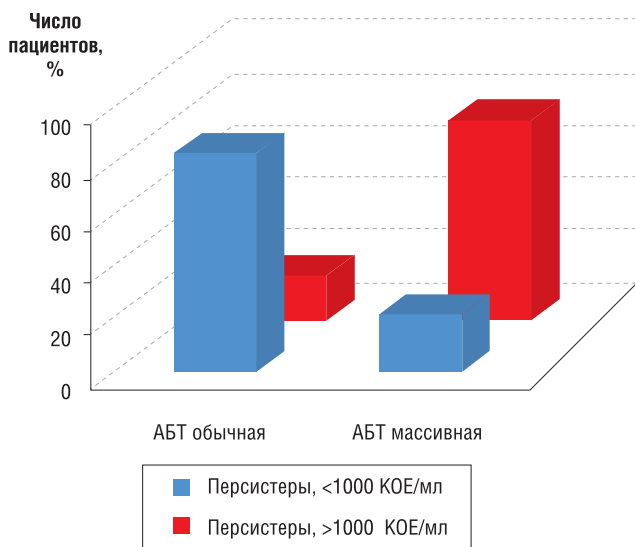


выявил, что в биообразцах детей группы 1 (массивная антибиотикотерапия по медицинским показаниям в дополнение к протоколу антибиотикотерапии) наблюдалось значительно больше персистеров, чем в образцах, полученных от детей с менее агрессивным курсом лечения (7 из 9 против 2 из 12, соответственно;  $p=0,0092$  по точному методу Фишера, двусторонний тест, адекватный данному объему выборки) (рис.).

Соотношение шансов для большого содержания персистеров в биообразцах по отношению к меньшему на основании фактора массивности антибиотикотерапии составило 17,5 ( $p<0,01$ ); чувствительность — 0,778 (95% CI 0,4–0,972), специфичность — 0,833 (95% CI 0,516–0,979); значения положительного и отрицательного предиктора были высокими (PPV=0,75 и NPV=0,846, соответственно;  $p<0,01$ ). Таким образом, более интенсивная антибиотикотерапия ассоциируется со значительным накоплением персистерных форм УПМ, а это соответствует представлению, что антибиотики способствуют генерации персистирующих форм бактерий.

**Дополнительные результаты**

Анализ данных об АР выделенных штаммов от детей и их родителей показал, что размер субпопуляции бактерий-персистеров (определяемый по числу колониеобразующих единиц после пересева в свежую среду бактерий, подвергнутых антибиотической атаке в высокой дозе) не коррелировал с величиной МПК антибиотиков ( $r=0,148$ ,  $p>0,05$ ,  $n=25$ ). Таким образом, стандартная оценка чувствительности патогенных и условно-патогенных бактерий к антибиотикам методом определения МПК полностью не отражает истинную эффективность антибиотика в отношении исследуемого штамма, поскольку не учитывает генерации персистеров. Результаты свидетельствуют о целесообразности учета не только АР, но и АТ клинических штаммов при решении вопросов устойчивости к антибиотикам, а также о необходимости проведения широкомасштабных исследований для учета антибиотикотолерантных персистеров с целью определения их возможного вклада в хроническое течение инфекций, вызываемых УПМ,



**Рис.** Генерация персистеров у детей с онкогематологическими заболеваниями

*Примечание.* АБТ — группы пациентов, получающих обычную (менее 5 антибиотиков в течение курса лечения) или массивную (5 и более назначений антибиотиков) терапию. Результаты статистической обработки указаны в тексте.

и эпидемиологию инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

**Обсуждение**

Полученные данные впервые позволили выявить связь между интенсивностью антибиотикотерапии и генерацией персистеров УПМ у иммунокомпрометированных детей-пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Более интенсивная антибиотикотерапия у иммунокомпрометированных детей ассоциировалась со значительным накоплением персистеров, что соответствует представлениям о том, что антибиотики способствуют генерации персистирующих форм бактерий [5, 15, 16].

Давно известное со времен Ливенгука (1702 г., цит. по [23]) существование dormantных примитивных форм живых существ сегодня начинают рассматривать с позиций их возможного значения в инфекционной патологии человека — при воспалительных заболеваниях и хронических инфекциях, в т.ч. туберкулезе [24–26]. В настоящее время недостаточно рассматривать только АР как единственную основную проблему, связанную с устойчивостью бактерий, в том числе УПМ, к антибиотикам [27, 28]. Бактериальная инфекция, в особенности вызванная грамотрицательными УПМ, нередко непосредственно угрожает жизни иммунокомпрометированных пациентов с онкологическими заболеваниями [29, 30], однако возможное значение персистерных форм в развитии УПМ-инфекции остается пока неизвестным, хотя и вполне обоснованно предполагается [31, 32]. В настоящее время для этой категории больных, особенно среди детей с онкогематологическими заболеваниями, ставится вопрос не только о правильном и своевременном назначении антибиотиков [29, 30], но и о целесообразности их применения у отдельных пациентов [28]. Предполагается, что, несмотря на небольшое количество персистеров в популяции бактерий, их последующее накопление потенциально может служить резервуаром инфекции после антибиотикотерапии [33–35].

В литературе отсутствуют данные о распространенности штаммов УПМ *E. coli* и *P. aeruginosa* с высокой способностью формировать клетки-персистеры в ответ на воздействие антибактериальных препаратов среди больных злокачественными новообразованиями. Полученные в ходе настоящего исследования результаты впервые продемонстрировали важность определения персистирующей субпопуляции в штаммах УПМ *E. coli* и *P. aeruginosa*, выделенных от больных данной группы. Результаты апробации и оптимизации в Центре детской онкогематологии метода идентификации бактерий-персистеров, сопоставленные с лабораторными и клиническими данными, представляют целесообразность масштабирования клинических исследований, направленных на внедрение методов идентификации и количественной оценки субпопуляции антибиотикотолерантных бактерий-персистеров. Наши предварительные исследования выявили существование генетических вариантов УПМ, что в комплексе с представленными в данной статье результатами свидетельствует в пользу проведения мониторинга гетерогенных персистерных популяций после антибиотикотерапии с целью расширения критериев персонализации такого лечения и предотвращения накопления персистерных популяций в организме. Подобные исследования позволили бы создать доказательную базу с целью расширения критериев рационализации антибиотикотерапии и обеспечения персонализации не только на уровне АР, но и АТ.

### Заключение

С помощью разработанных подходов определены методы идентификации клеток-персистеров в клинических изолятах УПМ. Эти результаты имеют непосредственное отношение к созданию тест-систем для диагностики персистирующих штаммов УПМ у больных (в особенности при инфекциях, связанных с оказанием медицинской помощи) и создают основу для выяснения механизмов генерации персистеров после антибиотикотерапии. Разработанные методы позволили стратифицировать больных детей с иммунокомпрометацией и неблагоприятным течением заболевания на группы с высоким уровнем персистирующих форм бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* (более 1000 колоний персистеров, см. рис.) и детей с более благоприятным течением заболевания и относительно низким содержанием бактерий-персистеров (менее 1000 колоний персистеров, см. рис.). Эти группы существенно отличались по уровню назначения антибиотиков: дети с массивным применением антибиотиков (т.е. нуждавшиеся в дополнительных курсах антибиотиков в период госпита-

лизации) преимущественно находились в первой группе,  $p < 0,001$ . Полученные результаты свидетельствуют, что широкое использование антибиотиков у детей с онкогематологическими заболеваниями является фактором риска повышенной генерации персистеров у таких больных и, следовательно, может служить фактором, определяющим большую вероятность развития оппортунистических инфекций.

### Источник финансирования

Исследование было поддержано РФФИ, № 13-04-40229 и № 13-04-40230-Н (КОМФИ).

### Конфликт интересов

Авторы статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов, о которых необходимо сообщить в связи с данной публикацией.

### ЛИТЕРАТУРА

- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146(3713):837. doi: 10.1038/146837a0.
- Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet*. 1944;244(6320):497–500. doi: 10.1016/S0140-6736(00)74210-3.
- Levin BR. Microbiology: Noninherited resistance to antibiotics. *Science*. 2004;305(5690):1578–1579. doi: 10.1126/science.1103077.
- Gillings MR, Stokes HW. Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends Ecol Evol*. 2012;27(6):346–352. doi: 10.1016/j.tree.2012.02.006.
- Kahrstrom CT. Antimicrobials: persisters come under fire. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(1):3. doi: 10.1038/nrmicro3181
- Mc Dermott W. Microbial persistence. *Yale J Biol Med*. 1958;30(4):257–229.
- Balaban NQ, Merrin J, Chait R, et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004;305(5690):1622–1625. doi: 10.1126/science.1099390.
- Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:357–372. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134306.
- Balaban NQ. Persistence: mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(6):768–775. doi: 10.1016/j.gde.2011.10.001.
- Kint CI, Verstraeten N, Fauvart M, Michiels J. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol*. 2012;20(12):577–585. doi: 10.1016/j.tim.2012.08.009.
- Verstraeten N, Knapen W, Fauvart M, Michiels J. A historical perspective on bacterial persistence. *Methods Mol Biol*. 2016;1333:3–13. doi: 10.1007/978-1-4939-2854-5\_1.
- Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:107–131. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3\_6.
- Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*. 2012;272(6):541–561. doi: 10.1111/joim.12004.
- Эль-Регистан Г.И., Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., и др. Явление персистенции — формы и механизмы выживаемости популяций // *Медицинский алфавит*. — 2014. — Т. 2. — №10. — С. 49–54. [El'-Registan GI, Nikolaev YuA, Mulyukin AL, et al. Yavlenie persistentsii — formy i mekhanizmy vyzhivaemosti populyatsii. *Meditinskii alfavit*. 2014;2(10):49–54. (In Russ).]
- Kim JS, Heo P, Yang TJ, et al. Bacterial persisters tolerate antibiotics by not producing hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(1):105–110. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.063.
- Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handb Exp Pharmacol*. 2012(211):121–133. doi: 10.1007/978-3-642-28951-4\_8.
- Li Y, Zhang Y. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):2092–2099. doi: 10.1128/aac.00052-07.
- Balaban NQ, Gerdes K, Lewis K, McKinney JD. A problem of persistence: still more questions than answers? *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(8):587–591. doi: 10.1038/nrmicro3076.
- Conlon BP, Rowe SE, Lewis K. Persister cells in biofilm associated infections. *Adv Exp Med Biol*. 2015;831:1–9. doi: 10.1007/978-3-319-09782-4\_1.
- Delarze E, Sanglard D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resist Updat*. 2015;23:12–19. doi: 10.1016/j.drug.2015.10.001.
- Kaldalu N, Joers A, Ingelman H, Tenson T. A general method for measuring persister levels in *Escherichia coli* cultures. *Methods Mol Biol*. 2016;1333:29–42. doi: 10.1007/978-1-4939-2854-5\_3.
- Moker N, Dean CR, Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol*. 2010;192(7):1946–1955. doi: 10.1128/JB.01231-09.
- Keilin D. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1959;150(939):149–191. doi: 10.1098/rspb.1959.0013.
- Potgieter M, Bester J, Kell DB, Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(4):567–591. doi: 10.1093/femsre/fuv013.
- Fauvart M, De Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol*. 2011;60(6):699–709. doi: 10.1099/jmm.0.030932-0.
- Wayne LG, Sohaskey CD. Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:139–163. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.139.
- Trecarichi EM, Tumbarello M. Antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria in febrile neutropenic patients with cancer: current epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis*. 2014;27(2):200–210. doi: 10.1097/QCO.000000000000038.25.

28. Khurana M, Lee B, Feusner JH. Fever at diagnosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia: are antibiotics really necessary? *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37(7):498–501. doi: 10.1097/MPH.0000000000000417.
29. Nolt D, Lindemulder S, Meyrowitz J, et al. Preventive antibiotics in pediatric patients with acute myeloid leukemia (AML). *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(7):1149–1154. doi: 10.1002/pbc.25463.
30. Blennow O, Ljungman P. The challenge of antibiotic resistance in haematology patients. *Br J Haematol*. 2016;172(4):497–511. doi: 10.1111/bjh.13816.
31. Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe*. 2013;13(6):632–642. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.009.
32. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(1):48–56. doi: 10.1038/nrmicro1557.
33. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013;4(4):273–283. doi: 10.4161/viru.23987.
34. Fothergill JL, Winstanley C, James CE. Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(2):219–235. doi: 10.1586/eri.11.168.
35. Тутельян А.В., Гапонов А.М., Писарев В.М., Эльрегистан Г.И. Дормантное состояние микроорганизмов и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи // *Терапевтический архив*. — 2015. — Т. 87. — №11. — С. 103–108. [Tutelyan AV, Gaponov AM, Pisarev VM, Elregistan GI. Microbial dormancy and prevention of healthcare-associated infections. *Ter Arkh*. 2015;87(11):103–108. (In Russ).]

### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Тутельян Алексей Викторович**, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; профессор кафедры эпидемиологии ИПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, тел.: +7 (495) 305-57-55, e-mail: bio-tav@yandex.ru

**Писарев Владимир Митрофанович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов критических состояний НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского

Адрес: 107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2, тел.: +7 (495) 694-27-08, e-mail: vpisarev@gmail.com

**Минаева Наталья Захаровна**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, тел.: +7 (495) 672-11-90, e-mail: natm9797@ya.ru

**Гапонов Андрей Михайлович**, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией инфекционной иммунологии ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва

Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1, тел.: +7 (495) 287-65-70, e-mail: zorba@yandex.ru

**Грачёва Александра Николаевна**, бактериолог отдела инфекционного контроля ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва

Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1, тел.: +7 (495) 287-65-70, e-mail: alnickgrach@mail.ru

**Солопова Галина Геннадьевна**, кандидат медицинских наук, заведующая отделом инфекционного контроля ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва

Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1, тел.: +7 (495) 287-65-70, e-mail: galigen@yahoo.co.uk