

## **Mikrobiální perzistence: nevyhnutelná cesta ke chronicitě a rezistenci?**

*Microbial persistence: one-way ticket to chronic infection and resistance?*

---

***Tereza Kopecká, Oto Melter***

### *Souhrn • Summary*

Mikrobiální perzistence patří jako jeden ze způsobů odolávání antibiotické léčbě mezi nejaktuálnější témata lékařské mikrobiologie. A to především proto, že ji pozorujeme v jakékoliv mikrobiální populaci, včetně těch, které nebyly žádné antimikrobiální látky vystaveny. Její podstatou je přirozená schopnost bakteriální subpopulace utlumit metabolismus, a tím se vyhnout účinkům léčiv. Ani antibiotická politika v pojetí, které si klade za cíl prevenci rezistence, tedy nemůže jejímu vzniku zabránit. V této práci citujeme účinné metody překonávání perzistence, jejich výběr ale záleží na individuálním zvážení s ohledem na pacienta.

Persistence, as one of the mechanisms of antimicrobial treatment survival, ranks among the hot topics of medical microbiology. We observe it in every microbial population: exposed to antimicrobials or native. It is based on a natural ability to down-regulate metabolic processes and thus avoid the effect of the medications. This is why antibiotic stewardship, in terms of resistance-lowering guidelines, cannot fight persistence. In this paper, we cite other methods of persistence overcoming, but the choice is individual, with regards to the needs of the patient.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2020; 29(4): 173–177

**Klíčová slova:** perzistence, TD test, antibiotika, rezistence

**Key words:** persistence, TD test, antibiotics, resistance

## ÚVOD

Perzistence je jev u mikrobů zcela přirozený: za přítomnosti významné noxy se určitá subpopulace záměrně vyhne jejímu působení zpomalením metabolismu. Vzniká jakási „konzerva“, perzister, ze kterého se může po obnovení příhodných podmínek reaktivovat mikrob se všemi původními vlastnostmi.

Ke vzniku perzisterů dochází stále, můžeme je detekovat v laboratoři a také se projevují klinicky. O perzistenci se může jednat tehdy, když v organismu pacienta navzdory léčbě přetrvávají mikroby, které jsou ve smyslu laboratorních testů k dané antimikrobiální látce citlivé, případně když navzdory účinné léčbě dochází k relapsům infekce způsobeným totožným mikrobem. Uvádí se i jako příčina chronických infekcí. [1]

Perzistence je jedním z faktorů, které nahrávají vzniku rezistence, například zvyšováním spotřeby antimikrobiálních látek, která je s rezistencí spojena. [1][2] Tyto jevy jsou ale provázány mnohem komplexněji. [2]

V odborné literatuře se termín „persistence“ používá pro dva různé fenomény: jednak pro mikrobiální perzistenci v užším smyslu, tedy soubor vnitřních molekulárních procesů vedoucích k odolnosti jednotlivých mikroorganismů, jednak jako přetrvávání infekce z důvodu přežívání mikroorganismu v příhodném prostředí – v biofilmu, intracelulárně anebo v jiném úkrytu před imunitními mechanizmy hostitele a před antimikrobiální léčbou. Tyto pojmy však je dobré nezaměňovat.

Nejdůležitější ovšem je vymezit perzistenci vůči rezistenci. Na rozdíl od rezistence, perzistence není geneticky kódována, a to ani krátkodobě – genotyp perzisterů je stále stejný jako u ostatní fenotypicky citlivé populace. Pokud bakterie získají rezistenci, budou rezistentní i jejich dceřiné buňky a možnost ztráty rezistence je otázkou do budoucna: někdy nastane, a jindy ne. Záleží to na řadě faktorů, mimo jiné na povaze genetické struktury, která rezistenci kóduje.

Tolerance je dalším pojmem, který je třeba vysvětlit: popisuje se jako proces nejpodobnější perzistenci a spočívá nikoli ve zpomalení nebo zastavení růstu, ale v různé bazální rychlosti metabolismu uvnitř mikrobiální populace. V situaci působení antimikrobiálních látek jsou pak zvýhodněny ty buňky, které se množí nejpomaleji. Zdůvodnění je jednoduché: pokud mají delší období růstového klidu, kdy neprobíhají žádné pochody, ve kterých by jim antibiotika mohla bránit, zůstává jejich životní styl navzdory léčbě prakticky nezměněn. Délka období růstového klidu se tak ukazuje jako zásadní aspekt. [4] Právě kvůli tomu potřebujeme

u pomalu rostoucích mikrobů podávat antibiotickou léčbu po delší dobu.

## PRINCIPY PERZISTENCE

Antimikrobiální látky jsou s perzistencí pevně svázané už v mechanismu účinku. Pokud se rozhodneme mikroby eliminovat inhibicí určitého pochodu, který je v jejich metabolismu zásadní, právě zde vzniká prostor pro vznik perzistence. V mikrobiální populaci se vyskytne několik buněk, které jsou schopné účinku antimikrobiální látky uniknout tak, že samy své metabolické pochody utlumí nebo odloží, a to způsobem, který je neohroží. Když je pak znovu nastartují, dají vznik populaci se stejnými vlastnostmi, jako byla ta původní. [5] Nejde tedy o přímý vznik rezistentních kmenů. Jedná se pouze o přechodnou fenotypovou změnu. Někdy se také perzistence přirovnává k dormanci nebo hibernaci. Dlouhodobá přítomnost perzisterů v hostiteli může být nepřímým důvodem pro vznik rezistence na antimikrobiální látky.

Perzistence vůči antimikrobiálním látkám není ničím výjimečným ani definujícím určité druhy nebo vyšší taxonomické úrovně. Je obvykle epigenetickým znakem, [6] přirozeným vyjádřením fenotypické heterogenity uvnitř genotypicky homogenní populace. [7] Byla popsána u všech důležitých bakteriálních patogenů, [8] i u mikromycet. Její široký výskyt a praktické důsledky ukazují na to, že vznikla jako evoluční mechanismus, který umožňoval mikroorganismům přežít nepříznivé podmínky. [2]

Perzistence je nespecifický pochod a nastává nejen při působení antimikrobiálních látek, ale i při jiných druzích chemických nebo fyzikálních nepříznivých podmínek, jako je nevhodná teplota, vlhkost nebo chemické vlastnosti prostředí, ve kterém se mikrob nachází. Pokud by ji mikroby neuměly navodit, podlely by první nepříznivé podmínky nebo by se musely vyzbrojit tolika specifickými obrannými mechanizmy, že by se jejich genetická informace stala neudržitelnou. [6]

Jednou z metod, jak v laboratoři perzistery detekovat, je tzv. TD (tolerance-detection) test. Jedná se v zásadě o modifikaci Kirby-Bauerovy diskové difuzní metody, která se využívá jako standardní metoda stanovení citlivosti na antibiotika. Pro TD test se po odstranění vyčerpaného antibiotického disku na jeho místo umístí disk obsahující glukózu. [9] Ta je velmi vhodným a snadno dostupným oživovacím substrátem, který využívají i mikroby s výrazně utlumeným metabolismem. V inhibiční zóně se po standardní kultivační době mohou objevit kolonie perzisterů, které nebyly v době odečítání inhibičních zón patrné. Když kolonie vyočkujeme a stanovíme citlivost této subpopulace na antimikrobiální látky, nedetekujeme rezistenci k danému antibiotiku: profil odpovídá původní kultuře a stejně tak se neliší ani genotyp prvotní kultury a resuscitované subpopulace.

Zvláště svízelnou problematikou je perzistence u takových nemocí, jako je cystická fibróza. U těchto pacientů

nacházíme v biofilmu dýchacích cest relativně vysoký podíl perzisterů. Detailně byl tento jev popsán u *Pseudomonas aeruginosa*, [10] ale vidáme ho i u jiných gramnegativních nefermentujících tyčinek a dalších bakterií. Obdobně byla u chronických nebo recidivujících infekcí močových cest zaznamenána mutanta (v genu pro HipB) primárního uropatogena *Escherichia coli*, která taktéž vykazuje vysokou frekvenci perzistence uvnitř své populace. [11]

Příčinou chronických infekcí ovšem nemusí být jen perzistence: příčinou nálezu přetrvávající „citlivé“ kultury může být i selhání laboratorních metod, kterými odhalujeme rezistenci. [12]

## MECHANIZMY VZNIKU PERZISTENCE

Za vznikem perzistence stojí především strategie *hedging*, kdy uvnitř geneticky homogenní populace bakterií vznikají jedinci s různou mírou exprese genů, a tedy i s různou úrovní metabolismu (čímž vzniká tolerance) a s různou schopností metabolismus ztlumit nebo pozastavit (čímž vzniká perzistence). Jde o strategii obdobnou *bet hedging*, kterou praktikují investoři: aby se nezhroutil jejich balík investic, musejí investovat do různých typů komodit, na jedněch se dá více vydělat, jiné jsou jistější. [13] Pro každou potenciální situaci má tudíž bakteriální populace připravenou subpopulaci, která v ní bude úspěšná.

Další zajímavou problematikou, ačkoli dosud málo probádanou, je perzistence bakterií v leukocytech nebo erytrocytech a krevní mikrobiom obecně. Tato myšlenka je v rozporu s klasickou představou o krvi jako sterilním prostředí, proto se o jejím výzkumu stále diskutuje a interpretace dat získaných z výzkumu je nejistá. Nicméně přítomnost krevního mikrobiomu, který je obdobou přirozeného osídlení mnoha jiných lokalit, byla opakovaně prokázána. Nejedná

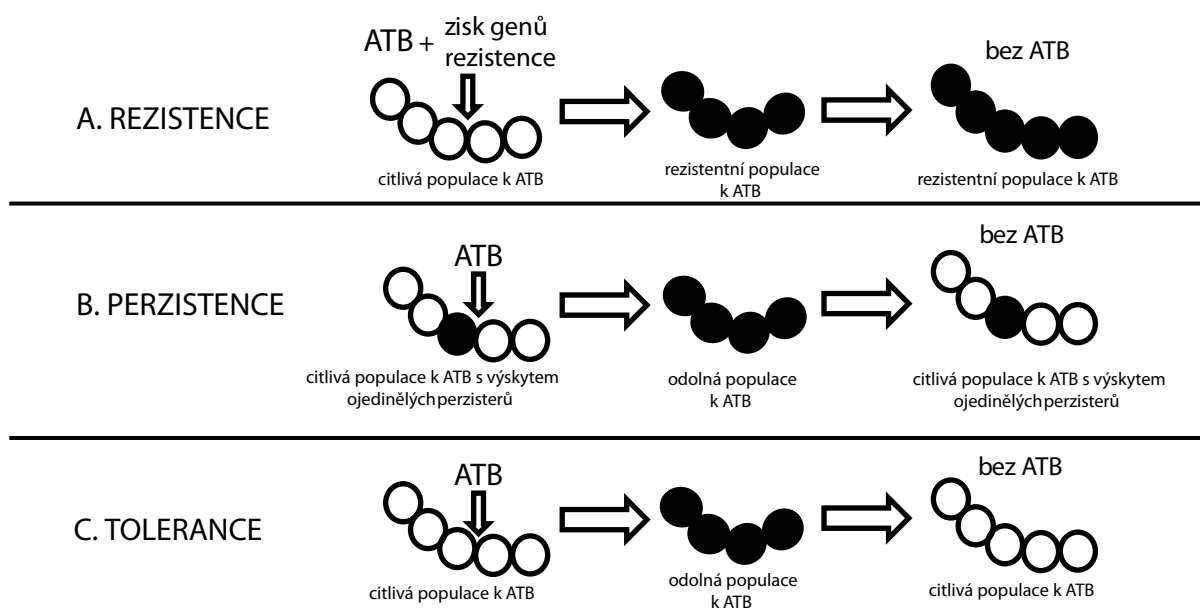
se ovšem o aktivní plnohodnotné mikroby, naopak jsou dormantní a hovoří se i o jejich strukturálních abnormalitách, například o L-formě. [14] I zde se hovoří o perzistenci, ačkoli princip její indukce i resuscitace bakterií je dosud neznámý. [15]

Další možností je přežívání buněk ve stavu VBNC (*viable but not culturable*). Tento stav je popsán například při hladovění bakteriální kultury, kdy část buněk zahyne a část přežívá za cenu praktického vyprázdnění cytoplazmy a viditelného poškození buněčné membrány. Tyto buňky mohou být po obnovení vhodných kultivačních podmínek oživeny a vracejí se do svého normálního fenotypu. Ačkoli je tento proces o něco drastičtější, v důsledku je to jen odlišný fenotyp dormance. [16]

Molekulárních cest rozvoje perzistence je ale více. Nejlépe popsáný je systém toxin-antitoxin, který je založený na různých autodestruktivních mechanismech buněk a jejich inhibici. Pro perzistenci jsou zásadní komplexy toxinů, které jsou za příhodných podmínek inhibovány antitoxiny, ale vždy jsou připraveny k akci. Pokud dojde ke vzniku stresové situace, antitoxin je selektivně rozložen a dochází k uvolnění aktivního toxinu, který selektivně zastaví kritické procesy v buňce, jako je dělení nebo tvorba DNA. Tím si buňka zajistí přežití, její odlišný stav ale není ireverzibilní: po obnovení příznivých podmínek se toxiny navážou zpět a metabolické procesy v buňce se obnoví.

V perzistencích pozorujeme na molekulární úrovni také změny antioxidační ochrany, ochrany nebo oprav DNA, fosfátového metabolismu, využívání alternativních zdrojů energie nebo degradaci vlastních makromolekul. [17]

Mikroby nenavozují perzistenci jen spontánně – stochasticky, ale jejich switch může být aktivovaný i prostřednictvím *quorum sensing*. Ten představuje komunikační systém, v němž



**Diagram:** Rezistence mikroorganismů k antibiotikům (ATB) je většinou determinovaná získem genů rezistence a populace má po vysazení ATB nadále rezistentní fenotyp (A). Perzistence, která je většinou způsobena přítomností několika perzistentních buněk v mikrobiální populaci. Po vystavení účinku ATB se stává celá populace odolná k antibiotikům a po jejich vysazení se stává opět citlivá k ATB s několika perzistentními buňkami (B). Tolerance je nejčastěji způsobena dlouhodobému vystavení mikrobiální populace ATB a po jejich vysazení dochází ke konverzi populace na populaci citlivou k ATB (C). Diagram není schopen schématicky postihnout všechny známé vztahy v mikrobiálních populacích např. výskyt perzisterů k několika ATB.

si mikroby předávají chemické signály, vedoucí ke změně exprese genů, včetně genů perzistence, kterých je celá řada. Může tak pravděpodobně vznikat i tzv. *multidrug persistence*, neboli perzistence vůči více antimikrobiálním látkám. [12][18]

## PERZISTENCE A LÉČBA

Antimikrobiální léčba zdaleka vždy není tak účinná, jak bychom si přáli. Příčinou může být například nesprávná volba vzhledem k původci infekce (přirozená rezistence), nízká dávka, nedostatečná penetrace do infikovaného prostoru, rezistence, perzistence nebo tolerance.

Rezistenci dokážeme monitorovat fenotypově i genotypově, známe charakteristiky nejčastějších typů a dokážeme přijímat konkrétní opatření: cíleně vyšetřovat, používat bariérová opatření k prevenci šíření rezistentních kmenů, a především přizpůsobit přístup k antimikrobiálním látkám, abychom efektivně léčili/dekolonizovali, nevytvářeli zbytečný tlak a neselektovali rezistentní kmeny. Vzniku tolerance bráníme především prodloužením antibiotické léčby. Co si ale počít s perzistencí?

Při hledání reálných řešení je třeba opustit izolovaný model perzistence jako takové a nezapomínat na biofilm, přetrvávání mikrobů za biologickými bariérami, otázku nízkého prokrvení některých lokalit (zvláště v podmínkách zánětu) apod., protože tyto faktory přispívají ke vzniku faktické perzistence ve smyslu přetrvávání mikroba v organismu.

Odstranění infekčního fokusu není vždy možné, zvláště pokud infekce postihuje větší část životně důležitého orgánu. Při eliminaci biofilmu je prospěšné odstraňování útvarů, které jsou jím potaženy, zejména cizorodých materiálů, jako jsou katétry, implantáty apod. To lze někdy provést velmi snadno, ale jindy (jako u nenahraditelných implantátů) to není možné vůbec. Proto v praxi používáme také antibiotika, která dokážou do biofilmu pronikat a v něm účinkovat proti jednotlivým mikrobům nebo dokonce zabraňovat jeho celkové funkci, což platí především o rifampicinu, daptomycinu a tigecyclinu. [19]

Dalším řešením je kombinace antibiotik. Při působení různých stresorů se vytvářejí perzisteri z různých buněk uvnitř populace, a proto můžeme jejich vzniku zabránit tím, že použijeme dvě a více antimikrobiálních látek s odlišným mechanismem účinku najednou. [8] Je ovšem známo, že antibiotické kombinace mají svá úskalí. A těmi je především požadavek, aby kombinace byla indikovaná (jako například při sepsi), protože jinak může usnadňovat vznik rezistence. [3] Tomuto riziku je nanejvýš vhodné se vyhnout, protože vznik rezistentních kmenů situaci nevyřeší.

Další možností je využití některé z „budících“ strategií. Některé látky totiž ukázaly v experimentu schopnost dormantní bakterie aktivovat a výrazně zvýšit jejich citlivost na antibiotika, například cis-decenová kyselina, [20] v experimentech pak i cukry jako manitol. Jejich praktický potenciál je zatím neznámý, ale nabízí se jako jedna z možností přídatků k antibiotické léčbě.

Další možností navození aktivace je přerušované podávání antibiotik, které vede k tomu, že se aktivovaným dormantním buňkám nedaří perzistenci navodit opakovaně. Tato metoda je ovšem problematická z hlediska stanovení efektivního protokolu. [12] Toto řešení spatřilo světlo světa jako první už ve čtyřicátých letech 20. století, kdy byla perzistence objevena [8], a ukazuje se jako jedno z nejnásilně proveditelných.

U tuberkulózy je specificky k hubení perzisterů určený pyrazinamid. Na rozdíl od ostatních antibiotik, která inhibují tvorbu buněčné stěny, proteinů nebo nukleových kyselin, pyrazinamid inhibuje produkci energie a proces trans-translace, který recykluje ribosomy a degraduje toxické proteiny, které vznikají během stresu. Pravděpodobně inhibuje i syntézu koenzymu A, které je zásadní pro přežití perzisterů *M. tuberculosis*. [17] Tato strategie by měla být vzorem pro vývoj nových antibiotik, aby byla možná cílená inhibice perzisterů i u jiných bakteriálních druhů.

Další možností je povzbudit účinek některého z dostupných antibiotik přidáním složky, která by napomáhala hubit perzistery. Například aspirin, ibuprofen nebo železo tímto způsobem zvyšují aktivitu pyrazinamidu vůči *M. tuberculosis*. [17]

A zasáhnout je možné i na straně pacienta, tedy povzbudit imunitní systém, aby se s perzistery vyrovnal sám. To je možné jednak pomocí imunomodulačních cytokinů, jednak pomocí vakcín, které by obsahovaly specifické antigeny nejen metabolicky aktivních, ale i perzisterových kmenů bakterií. [17]

Nepodkročitelnou podmínkou pro přežití mikrobů je určitá míra celistvosti cytoplazmatické membrány, proto byla jako metoda eliminace perzistorů navržena léčba pomocí polymyxinových antibiotik, antimikrobiálních peptidů nebo jiných látek, které narušují integritu důležitých membránových proteinů. Kandidátských látek je mnoho, ovšem jejich praktická využitelnost není vždy ideální vzhledem k nežádoucím účinkům pro pacienta. [8].

Mikrobiální perzistence je v mnoha ohledech obdobná perzistenci rakovinných buněk, proto se mikrobiologie a onkologie mohou navzájem inspirovat a posunout perspektivu svých pacientů ke skutečné kurativě. [21]

### Poděkování

MUDr. Václav Vaniš, Ústav lékařské mikrobiologie, FN v Motole za podnětnou diskusi o problematice.

### ZDROJE

1. Jung, Sung-Hee, Choong-Min Ryu, and Jun-Seob Kim. 2019. Bacterial Persistence: Fundamentals and Clinical Importance. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 2019; 57 (10): 829–35.
2. Windels EM, Michiels JE, Fauvart M, et al. Bacterial Persistence Promotes the Evolution of Antibiotic Resistance by Increasing Survival and Mutation Rates'. *The ISME Journal* 2019; 13 (5): 1239–51.

3. Tängdén T. Combination Antibiotic Therapy for Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Uppsala Journal of Medical Sciences* 2014; 119 (2): 149–153.
4. Bertrand RL. Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. *Journal of Bacteriology* 2019; 201(7): e00697-18
5. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, et al. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science (New York, N.Y.)* 2004; 305(5690): 1622–1625.
6. Kussell E, Kishony R, Balaban NQ, Leibler S. 2005. Bacterial Persistence. *Genetics* 2005; 169(4): 1807–1814.
7. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. 2017. Persistent Bacterial Infections and Persister Cells. *Nature Reviews Microbiology* 2017; 15(8): 453–464.
8. Defraigne V, Fauvart M, Michiels J. 2018. Fighting Bacterial Persistence: Current and Emerging Anti-Persister Strategies and Therapeutics. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 2018; 38: 12–26.
9. Gefen O, Chekol B, Strahilevitz J, Balaban NQ. 2017. TDtest: Easy Detection of Bacterial Tolerance and Persistence in Clinical Isolates by a Modified Disk-Diffusion Assay. *Scientific Reports* 2017; 7 (February).
10. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Producing High Levels of Persister Cells in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Bacteriology* 2010; 192(23): 6191–6199.
11. Schumacher, Maria A., Pooja Balani, Jungki Min, Naga Babu Chinnam, Sonja Hansen, Marin Vulić, Kim Lewis, and Richard G. Brennan. 2015. ‘HipBA-Promoter Structures Reveal the Basis of Heritable Multidrug Tolerance’. *Nature* 524 (7563): 59–64.
12. Fauvart M, De Grootte VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol.* 2011; 60(Pt 6)Jun: 699–709.
13. Browning AP, Sharp JA, Mapder T, et al. Persistence Is an Optimal Hedging Strategy for Bacteria in Volatile Environments. *BioRxiv* 2019; December 12. 19. 883645.
14. Markova N. L-Form Bacteria Cohabitants in Human Blood: Significance for Health and Diseases. *Discovery Medicine* 2017; 23(128): 305–313.
15. Castillo DJ, Rifkin RF, Cowan DA, Potgieter M. 2019. ‘The Healthy Human Blood Microbiome: Fact or Fiction?’ *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2019; 9: 148
16. Kim J-S, Chowdhury N, Yamasaki R, Wood TK. 2018. Viable but Non-Culturable and Persistence Describe the Same Bacterial Stress State. *Environmental Microbiology* 2018; 20 (6): 2038–2048.
17. Zhang Y. Persisters, Persistent Infections and the Yin–Yang Model. *Emerging Microbes & Infections* 2014; 3(1): e3.
18. Leung V, Lévesque CM. A Stress-Inducible Quorum-Sensing Peptide Mediates the Formation of Persister Cells with Noninherited Multidrug Tolerance. *Journal of Bacteriology* 2012; 194 (9): 2265–2274.
19. Aslam S. Effect of Antibacterials on Biofilms. *American Journal of Infection Control* 2008; 36(10): S175.e9-11.
20. Renbarger TL, Baker JM, Sattley WM. Slow and Steady Wins the Race: An Examination of Bacterial Persistence. *AIMS Microbiology* 2017; 3 (2): 171–185.
21. Glickman MS, Sawyers CL. Converting Cancer Therapies into Cures: Lessons from Infectious Diseases. *Cell* 2012; 148(6): 1089–1098.

Tereza Kopecká<sup>1,2</sup>, Oto Melter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lékařské mikrobiologie 2. LFUK a FN v Motole

<sup>2</sup>Ústav dějin lékařství a cizích jazyků 1. LFUK