

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2022.

Содержание

Болезни и возбудители

Синяев А.А., Гриненко А.О., Попова М.О., Рогачева Ю.А., Спиридонова А.А., Власова Ю.Ю., Смирнова А.Г., Морозова Е.В., Лепик К.В., Михайлова Н.Б., Владовская М.Д., Бондаренко С.Н., Моисеев И.С., Кулагин А.Д.

196 Новая коронавирусная инфекция у реципиентов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

202 Федотов В.Д., Жестков А.В., Лямин А.В., Заславская М.И., Добротина И.С., Туличев А.А. Микробиом, обострение и прогрессирование ХОБЛ: есть ли выход?

213 Ткачев П.В., Гончаров А.Е., Дмитриев А.В. Умеренные бактериофаги энтерококков: генетические особенности и практическое применение

Антимикробные препараты

220 Захаренков И.А., Рачина С.А., Козлов Р.С., Белькова Ю.А. Потребление системных антибиотиков в России в 2017–2021 гг.: основные тенденции

226 Кароли Н.А., Ребров А.П. Некоторые проблемы, связанные с безопасностью антибактериальной терапии у больных COVID-19

Антибиотикорезистентность

236 Павлова А.С., Егорова А.Е., Крутова Н.Е., Саенко С.С., Михайлова Ю.В., Гусева А.Н., Чеботарь И.В., Подколзин А.Т., Кулешов К.В., Акимкин В.Г. Распространенность и характеристика БЛРС-продуцирующих штаммов *Salmonella enterica*, циркулирующих на территории России (2016–2020 гг.)

248 Позднякова-Филатова И.Ю., Загоскин А.А., Захарова М.В., Нагорных М.О. Анализ генов, кодирующих белки семейства МБЛ-подобных металлопротеиназ, штамма-деструктора компонентов нефти *Pseudomonas putida* BS3701

Микробиологическая диагностика

254 Азизов И.С., Мартинович А.А. Выявление *mcg-1*-опосредованной резистентности к полимиксинам у бактерий порядка *Enterobacteriales* методом нанесения хелаторов на диск с колистином

Опыт работы

261 Андреев С.С., Рязанцева Е.В., Мальцева Н.П., Мутовина З.Ю., Фомина Д.С., Лысенко М.А. Инфекционный эндокардит, вызванный *Corynebacterium amycolatum*, у пациента с COVID-19 тяжелого течения: описание клинического случая

268 Гординская Н.А., Борискина Е.В., Кряжев Д.В. Фенотипические и молекулярно-генетические особенности антибиотикорезистентности клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* в стационарах Нижнего Новгорода

274 Стрелкова Д.А., Рачина С.А., Кулешов В.Г., Бурмистрова Е.Н., Сычев И.Н., Ананичева Н.А., Васильева Ю.Ю., Чуркина Е.А. Микробиологический мониторинг пациентов с COVID-19 в ОРИТ: проспективное наблюдательное исследование

283 Гордина Е.М., Божкова С.А., Смирнова Л.Н. Влияние бактериофагов на биопленки *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с ортопедической инфекцией

Выявление *mcr-1*-опосредованной резистентности к полимиксинам у бактерий порядка Enterobacterales методом нанесения хелаторов на диск с колистином

Азизов И.С., Мартинович А.А.

НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск, Россия

Контактный адрес:
Илья Сулейманович Азизов
Эл. почта: Ilya.Azizov@antibiotic.ru

Ключевые слова: полимиксины, хелатор, резистентность, *mcr*, Enterobacterales.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Изучить возможность использования метода нанесения хелаторов на диск с колистином (НХДК) в качестве простого и доступного скрининга на резистентность к полимиксинам, обусловленную геном *mcr-1*.

Материалы и методы. В работу включено 47 устойчивых к колистину изолятов энтеробактерий, полученных в рамках многоцентрового исследования «Марафон» с 2014 по 2020 г. Определение чувствительности к колистину проводили с использованием метода микроразведений в бульоне Мюллера – Хинтона в соответствии с ISO 20776-1:2006. Результаты тестирования интерпретировали на основании пограничных значений МПК в соответствии с рекомендациями EUCAST v. 12.0. Присутствие генов *mcr* определяли методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Фенотипический скрининг на экспрессию генов *mcr* проводили на агаре Мюллера – Хинтона методом НХДК раствора дипиколиновой кислоты в концентрации 1000 мкг/диск в объеме 10 мкл и 0,5 М раствора ЭДТА в объеме 5 мкл на диск. Хелатирующий эффект регистрировали по разнице диаметров зон задержки роста вокруг дисков с колистином без и с хелатором. Измерение зон задержки роста в миллиметрах проводили с помощью штангенциркуля.

Результаты. У 25 из 47 включенных в исследование изолятов энтеробактерий молекулярным методом было подтверждено наличие генов *mcr*. При использовании метода НХДК среднее значение разницы зон задержки роста для колистина и его комбинации с ЭДТА и ДПК составило 4,1 мм и 3,7 мм соответственно для *mcr*-положительных изолятов, 1,7 мм и 1,2 мм соответственно – для *mcr*-отрицательных изолятов. Статистический анализ показал, что разница в диаметре зон задержки роста ≥ 3 мм для комбинации колистина с одним из хелатирующих агентов по сравнению только с колистином позволяет сделать вывод о наличии у исследуемого изолята *mcr-1*-опосредованной резистентности к полимиксинам. При этом при использовании ДПК чувствительность теста составляет 96%, специфичность – 91% против 88% и 77% при использовании ЭДТА соответственно.

Выводы. Предложенная методика является доступным способом фенотипического скрининга представителей порядка Enterobacterales на резистентность к полимиксинам, обусловленную генами *mcr-1*, для практических лабораторий в современных условиях. При этом использование ДПК является предпочтительным ввиду более высоких показателей специфичности и чувствительности.

Original Article

Detection of *mcr-1*-mediated resistance to polymyxins in Enterobacterales using colistin disk chelator application

Azizov I.S., Martinovich A.A.

Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

Contacts:
Ilya S. Azizov
E-mail: Ilya.Azizov@antibiotic.ru

Key words: polymyxin, resistance, chelator, *mcr*, Enterobacterales.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To evaluate the possibility of using the colistin disk chelator application (CDCA) method as simple and available screening tool for detection of *mcr-1*-mediated resistance to polymyxins in Enterobacterales. **Materials and methods.** A total of 47 colistin-resistant Enterobacterales isolates obtained in 2014–2020 within multicenter MARATHON study were included in the experiment. Colistin susceptibility testing was performed using Mueller–Hinton broth microdilution method according to ISO 20776-1:2006. Interpretation of the results was performed according to EUCAST v.12.0 clinical breakpoints. MCR-genes were detected by multiplex real-time PCR. Phenotypic screening for *mcr*-expression was performed on Mueller–Hinton agar by application of dipicolinic acid in concentration of 1,000 mcg/disk in 10 μ l volume per disk and 0.5 M solution of EDTA in 5 μ l volume per disk. Chelating effect was registered by differences in zone of growth inhibition around colistin disks with and without chelator. Measurements were performed with the help of caliper in millimeters. Statistical data processing was carried out in accordance with guidelines for statistical analysis in medical researches using MS-Excel tool.

Азизов И.С., Мартинович А.А.

Results. In 25 of 47 included in the experiment enterobacteria isolates *mcr*-genes were detected by molecular method. MCR-detection by CDCA method identified the average difference value of the zones of growth inhibition for colistin and its combination with EDTA and DPA as 4.1 mm and 3.7 mm respectively for *mcr*-positive isolates and 1.7 mm and 1.2 mm respectively for *mcr*-negative isolates. Statistical analysis estimated that a difference of ≥ 3 mm in zone of growth inhibition for combination of colistin with one of the chelating agents when compared to colistin only allows us to conclude that a studied isolated carries *mcr-1*-mediated resistance to polymyxins. In addition, sensitivity of the test was 96% and specificity was 91% if DPA is used, while EDTA showed only 88% sensitivity and 77% specificity.

Conclusions. Proposed method appears as available technique for phenotypic screening of the Enterobacteriales order for *mcr-1*-mediated resistance to polymyxins for practical laboratories in present conditions. The use of DPA is preferred because of better specificity and sensitivity rates.

Введение

В последние годы в мире наблюдается стремительный рост доли карбапенемоустойчивых штаммов грамотрицательных микроорганизмов в этиологической структуре госпитальных инфекций [1–3]. Это привело к катастрофическому снижению эффективности карбапенемов при лечении госпитальных инфекций, вызванных прежде всего грамотрицательными микроорганизмами «критического уровня приоритета» по классификации ВОЗ [4].

Отсутствие доступных препаратов с высокой активностью актуализирует вопросы использования полимиксинов в клинической практике. Как известно, с середины 90-х гг. эта группа препаратов начала утрачивать свою клиническую актуальность из-за высокой нефро- и гепатотоксичности. На фоне постепенной утраты роли карбапенемов в лечении тяжелых инфекций, вызванных грамотрицательными возбудителями, на современном этапе полимиксины стали опять рассматриваться как важные жизнеспасающие препараты [5, 6]. Вслед за возросшим клиническим использованием полимиксина Б и полимиксина Е (колистина) стало наблюдаться снижение их активности, однако вплоть до конца 2015 г. эпидемически значимых механизмов резистентности к полимиксинам описано не было [7–9]. В настоящее время известно, что устойчивость к полимиксинам у грамотрицательных бактерий (ГОб) в большинстве случаев обусловлена мутациями генов, участвующих в регуляции синтеза липополисахарида (ЛПС) [10]. Несмотря на то что число подобных мутаций, имеющих клиническое значение, достаточно велико (уже описано более 250 вариантов, и их число продолжает уверенно увеличиваться), проблема устойчивости к колистину долгое время не имела глобальных масштабов и проявлялась лишь в виде локальных случаев на уровне отдельных стационаров [10, 11]. Однако появление первой публикации об устойчивости к колистину, связанной с плазмидными генами фосфоэтанолламинотрансфераз (*mcr* – mobile colistine resistance), радикально изменило эпидемиологическую ситуацию [12]. Вскоре после этого стали появляться сообщения об эпидемиологическом трансконтинентальном распространении *mcr*-опосредованной устойчивости к колистину в составе успешных человеческих и животных эпидемических клонов актуальных групп микроорганизмов (*E. coli*,

K. pneumoniae, *S. enteritidis* и т.д.) на плаزمидах из различных классов несовместимости [11, 13]. В течении последующих нескольких лет практически на всех континентах были описаны новые варианты генов семейства *mcr*, и к окончанию 2021 г. известно 10 вариантов генов фосфоэтанолламинотрансфераз с различными уровнями гомологии [13]. Гены семейства *mcr* кодируют фермент фосфоэтанолламинотрансферазу, осуществляющую перенос молекулы фосфоэтанолламина на молекулу липида А. Модификация липида А приводит к изменению его заряда и снижению афинности к колистину, и как следствие, клинически значимой устойчивости к полимиксинам [14]. Кристаллографический анализ структуры белка MCR-1 показал, что фермент представляет собой металлопротеин, содержащий по крайней мере один ион цинка, связанный с консервативным остатком треонина (Thr285) и сетью внутримолекулярных дисульфидных связей. Была показана корреляция значений МПК колистина между числом дисульфидных связей и ионов Zn^{2+} или других двухвалентных ионов [15].

В России список публикаций, посвященных устойчивости к полимиксинам, весьма ограничен: есть сообщение о проведенном секвенировании и депонировании плазмиды IncX4, имеющей в своем составе ген *mcr-1*, описан случай копродукции *mcr-1* и карбапенемаз NDM-1 у полирезистентного штамма *E. coli*; в рамках глобального исследования SENTRY в 2020 г. был зарегистрирован единственный случай выявления штамма *E. coli*, несущего ген *mcr-9* [16]; сообщения о выявлении штаммов, несущих другие гены семейства *mcr*, отсутствуют. Между тем актуальность полимиксинов для российских стационаров в ближайшей перспективе будет сохраняться, т.к. достаточную *in vitro* активность в отношении нозокомиальных штаммов Enterobacteriales, помимо карбапенемов, сохраняют немногие из доступных антимикробных препаратов [17]. Это делает необходимым проведение непрерывного мониторинга устойчивости к полимиксинам с расшифровкой механизмов устойчивости и оценкой вероятных механизмов их эпидемиологического распространения.

В настоящее время для выявления устойчивости к колистину доступно множество методов, как фенотипических, так и молекулярных. Из фенотипических предложены следующие:

1) специальные питательные среды, такие как SuperPolymyxin™, CHROMagar COL-APSE и среда LBJMR, которая также позволяет выявлять устойчивые к ванкомицину грамположительные бактерии [18–20];

2) оригинальный RPNP-тест (Rapid Polymixin Nordmann-Poirel) и его модификация RCDE-тест (Rapid Colistin Ddisk Elution): изменение цвета питательной среды на желто-оранжевый (индикатор феноловый красный) при сдвиге pH в результате метаболизма глюкозы в присутствии установленных концентраций колистина или полимиксина Б [21, 22];

3) Colispot тест: измерение зоны задержки роста вокруг капли стандартизованного раствора антибиотика на поверхности агара [23];

4) изменение зета-потенциала клетки [24];

5) определение МПК и пограничных МПК с использованием автоматизированных станций: MICRONAUT-S, Vitek 2, BD Phoenix, Sensititre и MicroScan [25–27].

Некоторые из указанных методов позволяют выявить наличие устойчивости к полимиксинам в течение 2 ч., но не способны установить механизм резистентности. Более того, многие из них требуют наличия специального оборудования, трудоемки в выполнении и характеризуются недостаточной чувствительностью и/или специфичностью.

Молекулярная диагностика является более точной и включает амплификационные методы, масс-спектрометрическую детекцию модификации молекулы липида А, иммунохроматографическую детекцию продукта гена *mcr-1* [28–33].

Данные методы демонстрируют более высокую точность результатов (чувствительность и специфичность приближаются к 100%), способны выявлять несколько вариантов генов *mcr*, в том числе низкоэкспрессируемые, но характеризуются высокой стоимостью расходных материалов и/или оборудования и трудоемкостью анализа.

В то же время уже давно был продемонстрирован хелатирующий эффект ЭДТА и дипиколиновой кислоты (ДПК) при ингибировании активности карбапенемаз класса В, являющихся металло-ферментами [34, 35], а в ряде работ был показан ингибирующий эффект обоих веществ на активный центр фосфоэтаноламинотрансферазы, кодируемой генами *mcr*, сопровождающийся снижением МПК колистина у модельных штаммов микроорганизмов [36–38]. Однако во всех опубликованных случаях применение хелаторов проводилось в формате микроразведений, что, на наш взгляд, является весьма трудоемким и неприемлемым в рамках массового скрининга. При этом в ряде работ была показана возможность детекции у ГОВ карбапенемаз класса В (металло-ферменты) методом двойных дисков с ЭДТА или ДПК [39, 40]. В связи с этим **целью** данной работы было изучить возможность выявления *mcr*-опосредованной резистентности к полимиксинам путем ингибирования фосфоэтаноламинотрансферазы методом элюции из дисков с ЭДТА и ДПК как простого и доступного способа фенотипической детекции продуктов генов группы *mcr*.

Материалы и методы

В исследовании использованы неповторяющиеся клинические изоляты Enterobacterales из коллекции НИИАХ, собранные в рамках многоцентрового исследования «Марафон» с 2014 по 2020 г.

Определение чувствительности к колистину проводилось методом двукратных серийных разведений с использованием катион-сбалансированного бульона Мюллера – Хинтона (Oxoid, Великобритания) в соответствии с требованиями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST, www.eucast.org) и стандартов ISO 20776-1:2006/ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 [41, 42]. Клинические категории чувствительности изолятов к антимикробным препаратам определяли на основании пограничных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК), в соответствии с рекомендациями EUCAST [43]. Контроль качества определения чувствительности проводили с использованием штаммов: *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Escherichia coli* NCTC 13846 (*mcr-1*-положительный).

В исследовании включались изоляты с МПК колистина > 2 мкг/мл, из суточной культуры готовили бактериальную взвесь со значением мутности 0,5 единиц МакФарланда, которую высевали на чашки Петри с катион-сбалансированным агаром Мюллера – Хинтона (Oxoid, Великобритания). На равном друг от друга удалении размещали три диска с полимиксином: на один наносили раствор ДПК, на другой – раствор ЭДТА, третий содержал только полимиксин.

Гены *mcr* (1–3) выявляли с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Определение типа *mcr* проводили путем анализа температурных кривых плавления. В качестве положительных контролей использовались синтетические матрицы амплифицируемых участков генов (Синтол, Россия).

Для выявления активности колистина использовали диски с колистином (нагрузка 10 мкг на диск, MAST Diagnostics) и стандартные стерильные диски (MAST Diagnostics).

Раствор ДПК (2,6-pyridenedicarboxic acid, Aldrich, Lot: S42228-308) готовили из расчета создания нагрузки 1000 мкг/диск и наносили в объеме 10 мкл на диск. Раствор 0,5 М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль, Реахим, Россия) наносили в объеме 5 мкл на диск [40]. Измерение зон задержки роста в миллиметрах проводили с помощью штангенциркуля.

Хелатирующий эффект ЭДТА и ДПК регистрировали по разнице диаметров зон задержки роста вокруг дисков с колистином. Для исключения ингибирующего эффекта самого хелатора использовали химически чистые стерильные диски, на которые наносили раствор хелатора. Статистическая обработка проводилась с использованием пакета MS-Excel.

Расчет достаточности выборки проводили в соответствии с рекомендациями по статистическому анализу в медицинских исследованиях с использованием формулы

расчета размера выборки при сравнении двух средних, с уровнем значимости 0,05% и мощностью исследования 95% [44]. Расчетный размер выборки составил 47 наблюдений.

Диагностическая значимость регрессионной модели оценивалась методом анализа ROC-кривых. Качество прогностической модели, полученной данным методом, оценивалось исходя из значений площади под ROC-кривой со стандартной ошибкой и 95% доверительным интервалом (ДИ) и уровня статистической значимости.

Результаты

В исследование было включено 45 изолятов *E. coli* и 2 изолята *K. pneumoniae*, устойчивых к колистину. Из них у 23 изолятов *E. coli* и обоих изолятов *K. pneumoniae* были выявлены гены *mcr-1*, оставшиеся 22 изолята *E. coli* имели другие механизмы резистентности к полимиксинам.

Принимая во внимание недостатки использования метода «двойных дисков», связанные с необходимостью подбора расстояния между дисками с антибиотиком и хелатором для получения легко регистрируемого расширения зоны задержки роста, использовалась детекция *mcr* нанесением хелатора на диск с колистином (НХДК), т.е. раствор хелатора наносился непосредственно на диск с колистином (Рисунок 1).

Однако в силу собственной ингибирующей активности ЭДТА, вокруг диска с нанесенным раствором 0,5 М ЭДТА наблюдалась диффузная зона подавления роста. Ранее токсический эффект ЭДТА в отношении бактериальных клеток был неоднократно описан, что является существенным ограничением его применения, в том числе и при использовании для детекции карбапенемаз [45]. У ДПК подобная активность отсутствует.

Среднее значение разницы зон задержки роста для колистина и его комбинации с ЭДТА и ДПК составило 4,1 мм и 3,7 мм соответственно для *mcr*-положительных

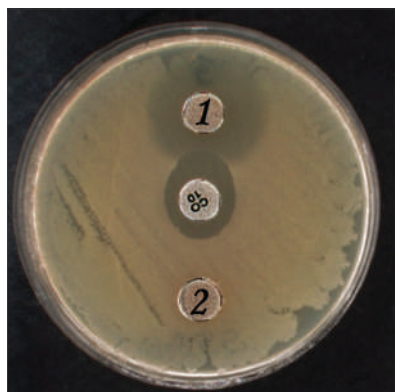


Рисунок 1. Использование метода «двойных дисков» для выявления эффекта расширения зоны задержки роста в сторону диска с ЭДТА (диск 1) вокруг диска с колистином (диск в центре)

Снизу расположен чистый стерильный диск (диск 2).

изолятов, 1,7 мм и 1,2 мм соответственно – для *mcr*-отрицательных изолятов.

Методом анализа ROC-кривых было установлено, что разница в диаметре зон задержки роста ≥ 3 мм для комбинации колистина с хелатирующим агентом по сравнению только с колистином позволяет сделать вывод о наличии у исследуемого изолята генов *mcr-1*. При этом чувствительность теста составляет 96%, специфичность – 91% при использовании ДПК против 88% и 77% – при использовании ЭДТА соответственно (Рисунок 2).

Смещение отсекающей точки (cutoff – дельта диаметров задержки роста) будет сопровождаться либо повышением чувствительности с утратой специфичности, либо, напротив, повышением специфичности на фоне снижения чувствительности (Рисунок 3). Эти особенности

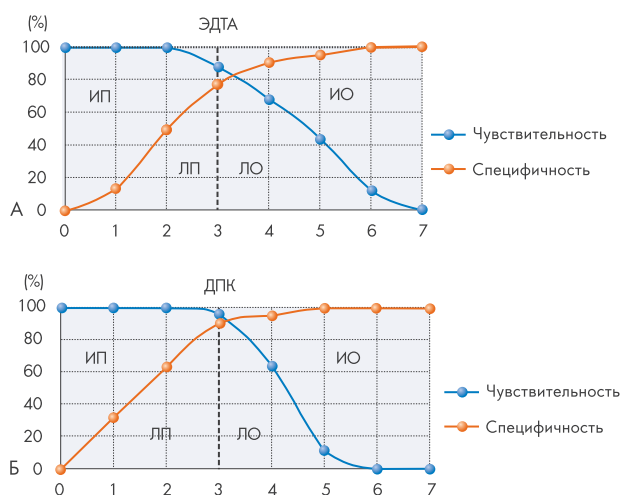


Рисунок 2. Показатели чувствительности и специфичности метода НХДК при использовании ЭДТА/ДПК и в зависимости от диаметра зоны задержки роста

А. При использовании комбинации колистина с ЭДТА.

Б. При использовании комбинации колистина с ДПК.

ИП – истинно положительный; ИО – истинно отрицательный; ЛП – ложноположительный; ЛО – ложноотрицательный.

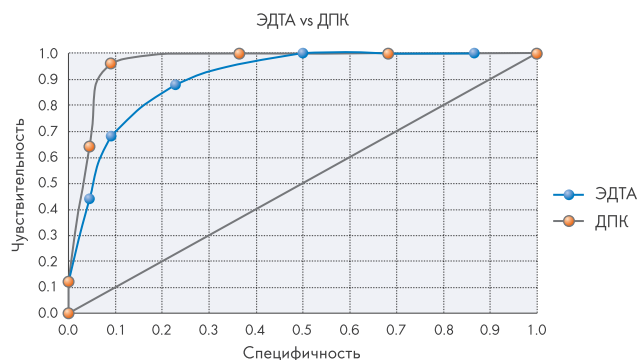


Рисунок 3. Сравнение показателей специфичности и чувствительности метода НХДК при использовании ЭДТА и ДПК (cutoff = 3 мм)

можно использовать в диагностической практике в зависимости от поставленных перед исследователем задач.

Обсуждение

Предложенная методика выявления *mcr*-опосредованной устойчивости к колистину является простым и доступным методом, основанным на способности ЭДТА и ДПК ингибировать металлопептидазы (кодируемые плазмидным геном *mcr* фосфоэтаноламинотрансферазы), и может применяться для проведения фенотипического скрининга резистентности к колистину. При этом использование ДПК демонстрирует лучшие показатели специфичности и чувствительности, что обусловлено меньшей собственной токсичностью по сравнению с ЭДТА и является предпочтительным.

Предложенный нами вариант использования стандартных дисков с колистином, с одной стороны, сохраняет все недостатки диско-диффузионного метода, который с 2016 г. не рекомендован для определения чувствительности к колистину [27], а с другой – позволяет использовать потенциал дисков, имеющихся на рынке диагностических препаратов, для выявления эпи-

демически значимого механизма устойчивости к важной группе антимикробных препаратов.

Обязательным условием при постановке теста является наличие системы внутренних контролей. Для отрицательного контроля мы рекомендуем штамм *E. coli* ATCC 25922, используемый в лабораториях при определении чувствительности к антибиотикам, для контроля положительного результата необходимо использовать штамм *E. coli* NCTC 13846 с высоким уровнем экспрессии гена *mcr*.

Принимая во внимание наличие изолятов, демонстрирующих в исследованиях *in vitro* низкий уровень экспрессии гена *mcr-1*, не проявляющих фенотип резистентности [46], очевидным недостатком метода является его низкая чувствительность, поскольку именно на низких значениях МПК «задержки роста» будут зависеть от ограничений диффузии крупной заряженной молекулы антибиотика в агаровой среде. Тем не менее низкая стоимость, простота выполнения, отсутствие необходимости в каком-либо дополнительном оборудовании и специальных навыках со стороны персонала делают метод НХДК доступной альтернативой для практических лабораторий.

Литература

- Lutgring J.D. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an emerging bacterial threat. *Semin Diagn Pathol.* 2019;36(3):182-186. DOI: 10.1053/j.semdp.2019.04.011
- Pachori P., Gothwal R., Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* 2019;6(2):109-119. DOI: 10.1016/j.gendis.2019.04.001
- Lin M.-F. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. *World J Clin Cases.* 2014;2(12):787. DOI: 10.12998/wjcc.v2.i12.787
- Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318-327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Falagas M.E., Kasiakou S.K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care.* 2006;10(1):R27. DOI: 10.1186/cc3995
- Velkov T., Roberts K.D., Nation R.L., Thompson P.E., Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013;8(6):711-724. DOI: 10.2217/fmb.13.39
- Pellegrino F.L., Teixeira L.M., Carvalho M. da G.S., Aranha Nouér S., Pinto de Oliveira M., Mello Sampaio J.L., et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2420-2424. DOI: 10.1128/JCM.40.7.2420-2424.2002
- Sampaio J.L.M., Gales A.C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian J Microbiol.* 2016;47:31-37. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.002
- Bakour S., Olaitan A.O., Amari H., Touati A., Saoudi S., Saoudi K., et al. Emergence of colistin- and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clinical isolate in Algeria: first case report. *Microb Drug Resist.* 2015;21(3):279-285. DOI: 10.1089/mdr.2014.0214
- Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5:643. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00643
- Moffatt J.H., Harper M., Boyce J.D. Mechanisms of polymyxin resistance. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:55-71. DOI: 10.1007/978-3-030-16373-0_5
- Liu Y.-Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.-X., Zhang R., Spencer J., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-168. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- Hasman H., Hammerum A.M., Hansen F., Hendriksen R.S., Olesen B., Agersø Y., et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates

- from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(49). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085
14. Gao R., Hu Y., Li Z., Sun J., Wang Q., Lin J., et al. Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance. *PLoS Pathog.* 2016;12(11):e1005957. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005957
 15. Hinchliffe P., Yang Q.E., Portal E., Young T., Li H., Tooke C.L., et al. Insights into the mechanistic basis of plasmid-mediated colistin resistance from crystal structures of the catalytic domain of MCR-1. *Sci Rep.* 2017;7:39392. DOI: 10.1038/srep39392
 16. Ling Z., Yin W., Shen Z., Wang Y., Shen J., Walsh T.R. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(11):3087-3095. DOI: 10.1093/jac/dkaa205
 17. Shaidullina E.R., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Sukhurokova M.V., Kozlov R.S. Antimicrobial resistance of nosocomial carbapenemase-producing Enterobacterales in Russia: results of surveillance, 2014-2016. *Klinicheskaa mikrobiologia i antimikrobnaya himioterapiya.* 2018;20(4):362-369. Russian. (Шайдуллина Э.Р., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Сухорукова М.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомальных карбапенемазопродуцирующих штаммов Enterobacterales в России: результаты эпидемиологического исследования 2014-2016 гг. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018; 20(4):362-369.) DOI: 10.36488/смас.2018.4.362-369
 18. Bardet L., Le Page S., Leangapichart T., Rolain J.-M. LBJMR medium: a new polyvalent culture medium for isolating and selecting vancomycin and colistin-resistant bacteria. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):220. DOI: 10.1186/s12866-017-1128-x
 19. Abdul Momin M.H.F., Bean D.C., Hendriksen R.S., Haenni M., Phee L.M., Wareham D.W. CHROMagar COL-APSE: a selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. *J Med Microbiol.* 2017;66(11):1554-1561. DOI: 10.1099/jmm.0.000602
 20. Przybysz S.M., Correa-Martinez C., Köck R., Becker K., Schaumburg F. SuperPolymyxin™ medium for the screening of colistin-resistant Gram-negative bacteria in stool samples. *Front Microbiol.* 2018;9:2809. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02809
 21. Nordmann P., Jayol A., Poirel L. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(6):1038-1043. DOI: 10.3201/eid2206.151840
 22. Ngudsuntia A., Lunha K., Lulitanond A., Tippayawat P., Sukkasem C., Charoensri N., et al. Colistin susceptibility testing by rapid colistin disk elution test among *Enterobacteriaceae* in low-resource setting. *Microb Drug Resist.* 2021;27(12):1685-1691. DOI: 10.1089/mdr.2020.0613
 23. Jouy E., Haenni M., Le Devendec L., Le Roux A., Châtre P., Madec J.-Y., et al. Improvement in routine detection of colistin resistance in *E. coli* isolated in veterinary diagnostic laboratories. *J Microbiol Methods.* 2017;132:125-127. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.017
 24. Halder S., Yadav K.K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Haldar S., et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus.* 2015;4(1):672. DOI: 10.1186/s40064-015-1476-7
 25. Matuschek E., Åhman J., Webster C., Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(8):865-870. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.11.020
 26. Fadana V., Thomas T., Von Knorring N. Retrospective analysis of Vitek®2 performance compared to manual broth micro-dilution for colistin susceptibility testing of *Acinetobacter baumannii* complex isolates in South Africa. *Afr J Lab Med.* 2022;11(1):1597. DOI: 10.4102/ajlm.v11i1.1597
 27. Chew K.L., La M.-V., Lin R.T.P., Teo J.W.P. Colistin and Polymyxin B Susceptibility testing for carbapenem-resistant and *mcr*-positive *Enterobacteriaceae*: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2017;55(9):2609-2616. DOI: 10.1128/JCM.00268-17
 28. Cunningham S.A., Vasoo S., Patel R. Evaluation of the check-points check MDR CT103 and CT103 XL microarray kits by use of preparatory rapid cell lysis. *J Clin Microbiol.* 2016;54(5):1368-1371. DOI: 10.1128/JCM.03302-15
 29. Sękowska A., Bogiel T., Gospodarek-Komkowska E. Evaluation of Eazyplex® SuperBug CRE Test for beta-lactamase genes detection in *Klebsiella* spp. and *P. aeruginosa* strains. *Curr Microbiol.* 2020;77(1):99-103. DOI: 10.1007/s00284-019-01806-5
 30. Chabou S., Leangapichart T., Okdah L., Le Page S., Hadjadj L., Rolain J.-M. Real-time quantitative PCR assay with Taqman® probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. *New Microbes New Infect.* 2016;13:71-74. DOI: 10.1016/j.nmni.2016.06.017
 31. Donà V., Bernasconi O.J., Kasraian S., Tinguely R., Endimiani A. A SYBR® Green-based real-time PCR method for improved detection of *mcr-1*-mediated colistin resistance in human stool samples. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;9:57-60. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.01.007
 32. Azizov I.S., Lavrinenko A.V., Belyaev I.A., Babenko D.B., Shambilova N.A., Bissenova N.M. Sensitivity to antimicrobial drugs of *Pseudomonas aeruginosa* extreme-resistant strains isolated in the major hospitals of Central Kazakhstan. *Maced J Med Sci.* 2017;5(1). DOI: 10.3889/oamjms.2017.023
 33. Dortet L., Potron A., Bonnin R.A., Plesiat P., Naas T., Filloux A., et al. Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Sci Rep.* 2018;8(1):16910. DOI: 10.1038/s41598-018-35041-y

34. Giske C.G., Gezelius L., Samuelsen, Warner M., Sundsfjord A., Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(4):552-556. DOI: 10.1111/J.1469-0691.2010.03294.X
35. Kimura S., Ishii Y., Yamaguchi K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM- type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;53(3):241-244. DOI: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2005.05.017
36. Wink P.L., Caierão J., Nunes A.G.A., Collar G. da S., Martins J.B., Dalmolin T.V., et al. Evaluation of EDTA and dipicolinic acid in broth microdilution with polymyxin B as a phenotypic test to detect the *mcr-1* gene. *Microb Drug Resist.* 2020;26(4):329-333. DOI: 10.1089/mdr.2019.0172
37. Coppi M., Cannatelli A., Antonelli A., Vaccani I., Di Pilato V., Sennati S., et al. A simple phenotypic method for screening of MCR-1-mediated colistin resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(2):201.e1-201.e3. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.08.011
38. Büdel T., Clément M., Bernasconi O.J., Principe L., Perreten V., Luzzaro F., et al. Evaluation of EDTA- and DPA-based microdilution phenotypic tests for the detection of MCR-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist.* 2019;25(4):494-500. DOI: 10.1089/mdr.2018.0275
39. Shevchenko O.V., Edelstein M.V., Stepanova M.N. Metallo-beta-lactamases: importance and detection methods in Gram-negative non-fermenting bacteria. *Klinicheskaa mikrobiologia i antimikrobnahimioterapia.* 2007;9(3):211-218. Russian. (Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Степанова М.Н. Металло- β -лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2007;9(3):211-218.)
40. Shin K.S., Son B.R., Hong S.B., Kim J. Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(1):102-105. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.015
41. International Organisation for Standardization (ISO). ISO 20776-1:2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems. susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: reference method for testing the in vitro; 2006. Available at: www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=41630. Accessed 30.08.2022
42. GOST R ISO 20776-1-2010. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1. Reference method for laboratory testing of the activity of antimicrobial agents against fast-growing aerobic bacteria causing infectious diseases. Russian. (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни.)
43. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. 2022:1-108. Available at: www.eucast.org. Accessed 30.08.2022.
44. Altman D.G. *Practical Statistics for Medical Research.* Chapman and Hall/CRC; 1990. DOI: 10.1201/9780429258589
45. Haque H., Russell A.D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and related chelating agents on whole cells of Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974;5(5):447-452. DOI: 10.1128/aac.5.5.447
46. Terveer E.M., Nijhuis R.H.T., Crobach M.J.T., Knetsch C.W., Veldkamp K.E., Gooskens J., et al. Prevalence of colistin resistance gene (*mcr-1*) containing *Enterobacteriaceae* in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a *mcr-1* containing, colistin susceptible *E. coli*. Cloeckaert A., ed. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178598. DOI: 10.1371/journal.pone.0178598