

© ГОСТЕВ В.В., СИДОРЕНКО С.В., 2023

Гостев В.В.^{1,2}, Сидоренко С.В.^{1,2}

ГЕТЕРОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», 197022, Санкт-Петербург, Россия; ²ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия

*В настоящее время общепринятого определения гетерорезистентности нет, и чаще всего этот термин используют для описания неоднородности в уровне чувствительности отдельных клеток бактериальной суспензии, полученной из единичной колонии. При этом выделяют поликлональную и моноклональную гетерорезистентность. Под поликлональной гетерорезистентностью стоит понимать смешанную популяцию разных генетических линий одного вида с разной чувствительностью к антибиотикам. Моноклональная популяция всегда представлена одной генетической линией, в которой малая часть клеток проявляет устойчивость к антибиотику. Настоящий обзор посвящен только моноклональной гетерорезистентности. С точки зрения лабораторной диагностики, смешанная популяция в рамках одной колонии одного вида микроорганизма по признаку чувствительности к антибиотикам, является сложно дифференцируемым фенотипом. Гетерорезистентность в отношении разных антибиотиков встречается среди многих клинически значимых патогенов, в том числе и прихотливых. Использование методов диффузии в агар, серийных разведений, градиентных тестов, молекулярной детекции для оценки чувствительности к антибиотикам малоэффективны для выявления гетерорезистентности. Клиническая значимость гетерорезистентности очевидна, определение ложной чувствительности ведет за собой назначение неадекватной антибактериальной терапии. В обзоре представлена сравнительная характеристика различных подходов для лабораторного определения фенотипа гетерорезистентности к разным антибактериальным препаратам. Приведено описание популяционного анализа и его различных модификаций как золотого стандарта выявления гетерорезистентности. Приведен сравнительный анализ подходов для выявления гетерорезистентности к ванкомицину у *Staphylococcus aureus*. Дана оценка роли классических методов определения чувствительности к антибиотикам для выявления гетерорезистентных фенотипов. В обзоре рассмотрены возможности использования методов молекулярного типирования и полногеномного секвенирования для выявления смешанных популяций. Гетерорезистентность является достаточно распространенным явлением, однако ее клиническое значение остается до конца не изученным. В настоящее время необходимы четкие определения и унификация методов выявления гетерорезистентности, особенно среди грамотрицательных патогенов. Очевидна необходимость разработки экспресс-методов для скрининга и выявления таких фенотипов в рутинной лабораторной практике.*

Ключевые слова: обзор; гетерорезистентность; методы; чувствительность к антибиотикам; популяционный анализ.

Для цитирования: Гостев В.В., Сидоренко С.В. Гетерорезистентность: клиническое значение и методы выявления (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2023; 68 (7): 418-427. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-418-427>.

Для корреспонденции: Гостев Владимир Валерьевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. НИО медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России»; e-mail: guestvv11@gmail.com

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда 18-75-10114-П.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.05.2023

Принята к печати 18.05.2023

Опубликовано 03.07.2023

Gostev V.V.^{1,2}, Sidorenko S.V.^{1,2}

HETERORESISTANCE: CLINICAL IMPLICATIONS AND DETECTION METHODS (REVIEW OF LITERATURE)

¹Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russian Federation;

²North-Western State Medical University Named After I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russian Federation

*Since there is currently no agreed upon definition of heteroresistance, this term is most frequently used to refer to the variation in the degree of susceptibility of individual bacteria in a bacterial suspension isolated from a single colony. There is a difference between polyclonal and monoclonal heteroresistance. It is necessary to understand that polyclonal heteroresistance is a mixed population of various lineages of the same species with varying antibiotic susceptibility. A monoclonal population is always represented by a single lineage in which a small part of the cells is resistant to the antibiotic. Monoclonal heteroresistance is the only focus of this review. A mixed population within a colony of a single species of microorganism based on antibiotic susceptibility is a difficult-to-detect phenotype from the perspective of laboratory diagnostics. Many clinically significant pathogens, including fastidious ones, exhibit heteroresistance to different antibiotics. Heteroresistance cannot be identified using methods for determining antibiotic susceptibility such as agar diffusion, serial dilutions, gradient diffusion tests, or molecular detection. Heteroresistance has clear clinical implications and the definition of false sensitivity results in the prescription of ineffective antibiotic therapy. The review provides a comparison of various methods for laboratory determining the heteroresistance phenotype to various antibacterial drugs. The population analysis profile and all of its modifications are referred to as the gold standard for heteroresistance detection. It is presented a comparative analysis of methods for identifying vancomycin heteroresistance in *Staphylococcus aureus*. For the purpose of detecting heteroresistant phenotypes, the value of classical antibiotic susceptibility tests is discussed. The*

review examines the viability of identifying mixed populations using whole genome sequencing and molecular typing techniques. The clinical significance of heteroresistance, through a fairly common phenomenon, is still not fully understood. Currently, especially for gram-negative pathogens, clear definitions and a unified approach to heteroresistance detection are required. Developing express methods for screening and detecting such phenotypes in standard laboratory practice is obviously necessary.

Key words: review; bacterial drug resistance; microbial sensitivity tests; vancomycin resistance.

For citation: Gostev V.V., Sidorenko S.V. Heteroresistance: clinical implications and detection methods (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (7):418-427 (in Russ). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-418-427>.

For correspondence: Gostev V.V., PhD, senior researcher of Department of medical microbiology and molecular epidemiology of Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases; e-mail: guestvv11@gmail.com

Information about authors:

Gostev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3480-8089>;

Sidorenko S.V., <https://orcid.org/0000-0003-3550-7875>.

Acknowledgment. This study was funded by the Russian Science Foundation (grant no. 18-75-10114-P).

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 05.05.2023

Accepted 19.05.2023

Published 03.07.2023

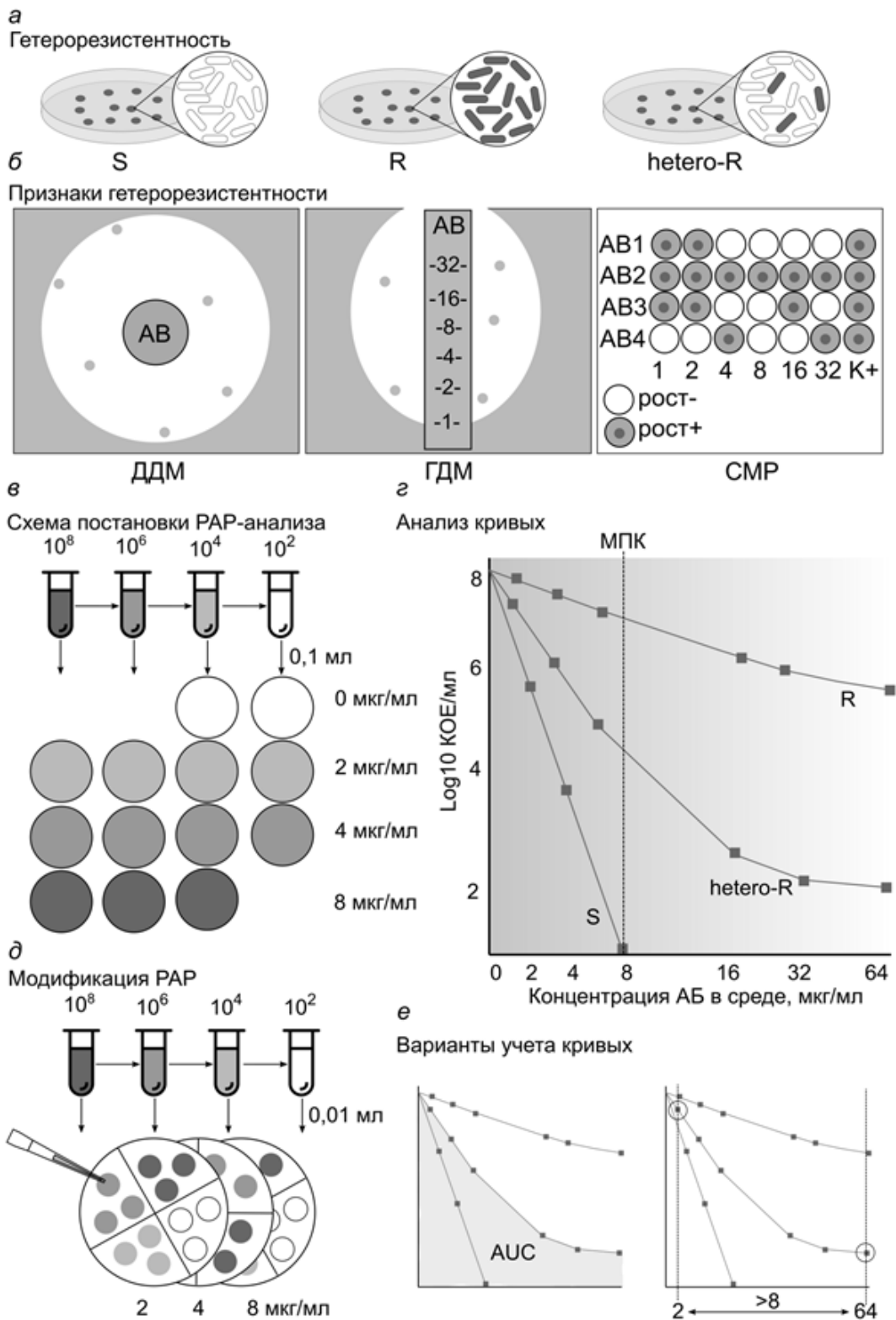
Понятие гетерорезистентности. Традиционно под антимикробной резистентностью понимают вызванную различными биохимическими и генетическими механизмами неспособность антибиотика подавлять функцию своей мишени действия. Золотым стандартом определения чувствительности к антибиотикам является определение методом серийных разведений минимальной подавляющей концентрации (МПК), по величине которой можно судить о микробиологической и клинической чувствительности/устойчивости. Для оценки этих параметров EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) предлагает использовать соответственно эпидемиологическую точку отсечения (epidemiologic cut-off) и клинические пограничные точки (clinical breakpoints) [1]. Диск-диффузионный метод (ДДМ) оценки антимикробной чувствительности является вторичным по отношению к методу серийных разведений.

При использовании стандартных методов по умолчанию предполагается, что все клетки исследуемой бактериальной суспензии, полученной из изолированной колонии, характеризуются одним и тем же уровнем устойчивости. Однако в реальности это не совсем так. Еще в 1947 году Н.Е. Alexander и соавт. [2], работая с *Haemophilus influenzae*, обнаружили, что при исследовании отдельных колоний, сформировавшихся после посева на плотную питательную среду бактериальной суспензии, приготовленной из единичной колонии, результаты оценки чувствительности оказывались неоднородными. Микроорганизмы из подавляющего большинства производных колоний были чувствительны к стрептомицину, но единичные колонии демонстрировали устойчивость. В 1964 году R. Sutherland и соавт. [3] описали неоднородность чувствительности к метициллину отдельных колоний *Staphylococcus aureus*, полученных из гомогенной суспензии. В 1970 году F.N. Kayser и соавт. [4], продолжая изучать феномен неоднородной чувствительности к бета-лактамам производных отдельной колонии *S. aureus*, предложили термин «гетерорезистентность».

В настоящее время общепринятого определения

гетерорезистентности нет. Чаще всего этот термин используют для описания неоднородности в уровне чувствительности отдельных клеток бактериальной суспензии, полученной из единичной колонии [5]. Иными словами, под гетерорезистентностью стоит понимать наличие смешанной культуры по признаку чувствительности к антибиотикам в пределах одной колонии одного микроорганизма (см. рисунок, а). При этом соотношение устойчивых и чувствительных клеток в такой популяции может составлять 10-100 клеток на $10^6 - 10^8$ КОЕ/мл, соответственно. Ввиду такого малого количества резистентных клеток при использовании стандартных подходов определения чувствительности выявить гетерорезистентность весьма затруднительно [6]. Некоторые исследователи относят гетерорезистентность к промежуточному этапу в эволюции фенотипа от чувствительности к полной устойчивости [7]. Одним из подтверждением данной гипотезы является недавнее исследование, где изучался уровень гетерорезистентности к бета-лактамам у карбапенем-устойчивых энтеробактерий в зависимости от длительности применения антибиотиков на примере одного стационара. Авторы установили, что чем дольше использовался антибиотик (десять лет), тем выше гетерорезистентность, которая переходила в стабильную устойчивость [8].

Гетерорезистентность подразделяется на моноклональную и поликлональную. Под поликлональной гетерорезистентностью стоит понимать смесь генетически разных клонов, но относящихся к одному виду, выделенных в культуре из одного биологического материала. Каждый такой клон может характеризоваться своей индивидуальной чувствительностью к антибиотикам [9, 10]. В таком случае количественное соотношение клонов будет приблизительно одинаковым. Поликлональная гетерорезистентность часто описывается у *Helicobacter pylori* и *Mycobacterium tuberculosis* [9-11]. В недавнем исследовании было выявлено, что у 80% пациентов с муковисцидозом выделялись поликлональные гетерорезистентные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* [12].



Гетерорезистентность и методы ее выявления. *а* – отличие фенотипа гетерорезистентности (hetero-R) от чувствительности (S) и устойчивости (R); *б* – признаки возможной гетерорезистентности при постановке разных методов определения чувствительности к антибиотикам: появление одиночных мелких колоний в зонах ингибиции роста при диско-диффузионном методе (ДДМ) или градиентных полосках (ГДМ). Наличие «проскоков» при постановке серийных микроразведений (СМР), АВ1 и АВ2 примеры нормального прохождения СМР, АВ3, АВ4 – примеры проскоков, (K+) – положительный контроль роста; *в* – схема подготовки PAMP-анализа, разведение инокулюма, разведение антибиотика в чашках Петри; *г* – анализ кривых отношения клеточной плотности к концентрации антибиотика, сравнение трех фенотипов: чувствительного, устойчивого и гетерорезистентного; пунктирной линией отмечен уровень МПК, определенный любым стандартным способом; *д* – схема подготовки PAMP-анализа в модификации с использованием микрообъемов; *е* – варианты учета PAMP анализа: измерение параметра AUC и сравнение с контролем; измерение соотношения между максимальной не ингибирующей концентрацией и максимальной ингибирующей.

Настоящий обзор посвящен проблемам выявления исключительно моноклональных гетерорезистентных популяций, состоящих из одной генетической линии. Как правило, в большинстве случаев, микроорганизмы с гетерорезистентностью, при использовании стандартных подходов определения антибиотикочувствительности, относятся к категории чувствительных. Феномен гетерорезистентности описан у многих микроорганизмов, однако частота обнаружения достаточно сильно колеблется от 1% – 50% и зависит от комбинации бактерия-антибиотик, механизмов устойчивости и используемых методов выявления. Так, гетерорезистентность описана у *S. aureus* [13], *Klebsiella pneumoniae* [14], *P. aeruginosa* [15], *Acinetobacter* spp. [16], встречается также среди прихотливых микроорганизмов: *Streptococcus pneumoniae* [17], *H. influenzae* [18], *M. tuberculosis* [19], *H. pylori* [20]. Недавнее исследование показало, что природные цианобактерии, обитающие в пресноводных озерах, также характеризуются множественной перекрестной гетерорезистентностью [21]. Гетерорезистентность к противогрибковым препаратам описана и у грибов *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus* [22]. Среди паразитов также описан феномен гетерорезистентности, например, у трипаномы *Trypanosoma rhodesiense* было описано появление минорной субпопуляции, проявляющей устойчивость к действию сыворотки человека [23]. В наибольшей степени изучена гетерорезистентность *S. aureus* к ванкомицину, а среди грамотрицательных бактерий (*K. pneumoniae* и *Acinetobacter* spp.) к колистину и бета-лактамам [5].

Феномен гетерорезистентности описан не только для классических антибиотиков, но и для новых антимикробных препаратов. В частности, необычно высокий уровень частоты встречаемости гетерорезистентности среди карбапенем-устойчивых грамотрицательных бактерий (9–60%), по результатам международных многоцентровых исследований, был выявлен к новому антибактериальному препарату – цефидероколу, представляющего собой гибридную молекулу сидерофора и цефалоспорины [24, 25]. При этом чаще всего устойчивость выявлялась у изолятов *Acinetobacter* spp. Гетерорезистентность может быть нестабильной и в отсутствие воздействия антибиотиками, при частых пассажах или длительном хранении, фенотипы реверсируют в полностью чувствительный фенотип [26]. Перечисленные особенности еще более усложняют лабораторную детекцию рассматриваемого фенотипа. Клиническая значимость гетерорезистентности очевидна, определение ложной чувствительности ведет за собой назначение неадекватной антибактериальной терапии, в ходе которой происходит элиминация чувствительных клеток, а оставшиеся устойчивые клетки дают начало новой популяции. В литературе представлено множество примеров о влиянии гетерорезистентности на неблагоприятные исходы при терапии инфекционных заболеваний. Хронические и рецидивирующие инфекции также могут быть ассоциированы с гетеро-

резистентностью [27]. Существуют также и другие исследования, демонстрирующие отсутствие влияния гетерорезистентности на исход терапии [28, 29]. Такие противоположные результаты свидетельствуют об отсутствии консенсуса о лабораторном выявлении гетерорезистентности, а также о не совсем полном понимании инфекционного процесса, вызванного такими фенотипами.

Классические методы. Выявление гетерорезистентности с помощью традиционных методов определения чувствительности являются единственными доступными инструментами в рутинной лабораторной практике любой лаборатории. Появление одиночных колоний в зоне подавления роста вокруг диска с антибиотиком в ДДМ может служить косвенным признаком гетерорезистентности (см. рисунок, б). Появление отдельных колоний в зоне подавления роста при использовании градиентно-диффузионного метода (ГДМ) с полосками, на которые нанесены градиенты концентраций антибактериального препарата, также может свидетельствовать о наличии возможной гетерорезистентности (см. рисунок, б). Так, например, одно из первых сообщений о гетерорезистентности к колистину у *K. pneumoniae*, во Франции было выявлено с использованием ГДМ, где обнаруживалось множество колоний в зоне ингибции роста вблизи полоски Etest [30]. Гетерорезистентность проблематично выявить напрямую с помощью метода серийных микроразведений с определением МПК. При наличии резистентной субпопуляции показатель МПК сильно зависит от плотности инокулята и скорости роста резистентных клеток бактерий. В свою очередь, увеличение плотности инокулята может приводить к инокулюм-эффекту, когда уровень МПК повышается при увеличении плотности клеточной биомассы. Выявляемый в таких случаях инокулюм-эффект можно неправильно трактовать как присутствие гетерорезистентной субпопуляции [31, 32]. Однако описан другой косвенный признак гетерорезистентности при постановке серийных разведений. В работе D. Landman соавт. [33] было показано, что при оценке чувствительности к полимиксину В методом серийных микроразведений у 33% из 114 изолятов *Enterobacter cloacae* и *E. aerogenes* наблюдался эффект «проскоков», когда рост появлялся на более высоких концентрациях антибиотика при отсутствии роста в соседних лунках с низкой концентрацией антибиотика (см. рисунок, б). Появление «проскоков» имело случайный характер у разных изолятов. Впоследствии, гетерорезистентность у таких изолятов была подтверждена в популяционном анализе. Метод серийных разведений в агаре для выявления гетерорезистентности имеет больше преимуществ, по сравнению с серийными разведениями в бульоне. Использование агара позволяет выявить возможные микроколонии на более высоких концентрациях антибиотика [34]. Однако к минусам этого подхода можно отнести тот факт, что при стандартной постановке используется низкая клеточная плотность (10^4 – 10^5 КОЕ/мл), в таком случае существует риск пропустить резистентную субпопуляцию. Еще раз стоит подчеркнуть, что выяв-

ление гетерорезистентности с помощью традиционных методов имеет очень низкую эффективность. В 1950-х годах был предложен градиентный метод для определения чувствительности к разным противомикробным препаратам, основанный на использовании двухслойного агара [35]. Сущность метода заключалась в приготовлении в чашке Петри нижнего слоя питательного агара под наклоном, и горизонтальное нанесение второго слоя агара, содержащего антибактериальный препарат. Таким образом, обеспечивался линейный градиент антибактериального препарата от одной точки до противоположной точки чашки Петри. Исследуемая культура микроорганизмов наносилась на поверхность либо на всю площадь агара, либо штрихом. Далее, после инкубирования, по длине роста колоний микроорганизма с учетом линейности диффузии антибактериального препарата в агар, переводили длину роста в уровень МПК. Позже была предложена оригинальная модификация данного подхода с использованием уже тройного агара (Trilevel gradient-agar), разработанного для определения чувствительности грибов к антимикотикам [36]. В основе модификации было добавление третьего тонкого горизонтального слоя питательного агара поверх двух приготовленных нижних. Добавление третьего слоя позволило получить более четкие зоны роста микроорганизмов. На сегодняшний день, метод градиентного агара используется и для выявления гетерорезистентности [6]. Как правило, используют посев в виде штриха и оценивают длину роста колоний по ходу штриха. Появление колоний на высоких концентрациях (в конце штриха) может свидетельствовать о гетерорезистентности. Либо проводят сравнение длин роста штриха с известным гетерорезистентным контрольным штаммом. К основным минусам градиентного подхода можно отнести следующие. Особенности диффузии разных антибиотиков в агар влияют на линейность градиента концентраций; отсутствуют критерии, какую концентрацию антибиотика необходимо использовать; отсутствуют критерии дифференцировки устойчивости и гетерорезистентности. Широко используемые автоматизированные системы, такие как VITEK®2 (bioMérieux), Phoenix™ (Becton Dickinson), Microscan Walkaway (Siemens), также не эффективны для выявления гетерорезистентности, по всей видимости, это связано также с низкой загруженной плотностью инокулюма [34, 37]. Системы для длительного инкубирования и определения чувствительности у *M. tuberculosis*, например, VASTEC™ 960 (Becton Dickinson), также являются не эффективными. Возможно это связано с тем, что устойчивая популяция может вытесняться более быстро растущими клетками, что в итоге приводит к ложноотрицательным результатам [38].

Подходы к выявлению гетерорезистентности к ванкомицину у *S. aureus*. Снижение чувствительности *S. aureus* к ванкомицину при МПК ≥ 2 мкг/мл является неблагоприятным прогностическим клиническим признаком, связанным с возможным появлением гетерорезистентности (heteroresistant vancomycin intermediate *S. aureus*, hVISA). Фенотип hVISA

это единственный на сегодняшний день вариант гетерорезистентности, включенный в рекомендации EUCAST по выявлению специфических механизмов резистентности, имеющих клиническое и эпидемиологическое значение [39]. Так, по рекомендациям EUCAST отмечается, что ДДМ не приемлем, как для определения чувствительности, так и определения гетерорезистентности у стафилококков. Вместо этого предлагаются следующие подходы, которые целесообразно использовать при подозрении на hVISA фенотип (при МПК ванкомицина 2 мкг/мл). Макроградиентный подход заключается в использовании градиентных полосок с ванкомицином и/или тейкопланином, но с высокой плотностью инокулюма, по стандарту мутности 2 МакФарланда с инокуляцией на сердечно-мозговой агар. После инкубации в течение 48 часов, полученные результаты интерпретируются следующим образом, при МПК ванкомицина ≥ 8 мкг/мл или МПК тейкопланина ≥ 12 мкг/мл, исследуемая культура может быть отнесена к гетерорезистентной. Минусом данного подхода может быть инокулюм-эффект, вследствие высокой клеточной плотности [6]. Еще один аналогичный подход заключается в использовании градиентной двойной полоски, содержащей ванкомицин и тейкопланин (Glycopeptide resistance detection gradient test, GRD). GRD-тест выпускается несколькими производителями, например, bioMérieux или Liofilchem®, постановка и интерпретация данного теста аналогична макроградиентному подходу: при достижении МПК ≥ 8 мкг/мл к обоим антибиотикам, исследуемый изолят следует относить к hVISA. В работе S.W. Satola и соавт. [32] был предложен скрининговый тест для детекции hVISA изолятов, основанный на детекции роста на сердечно-мозговом агаре с добавлением ванкомицина (4 мкг/мл) и казеина с использованием инокулюма 0,5 по МакФарланду. Однако, подобный подход не нашел широкого применения, что затрудняет достоверно оценить его эффективность. EUCAST рекомендует использовать альтернативный аналогичный подход: это инокуляция инокулюма в объеме 0,01 мл по шкале мутности 2 МакФарланда, на агар Мюллера-Хинтона, содержащего 5 мкг/мл тейкопланина [39, 40]. После 48 часов инкубации появление колоний будет свидетельствовать о наличии гетерорезистентности к гликопептидам. Несмотря на наличие нескольких подходов, подтверждающим методом выявления гетерорезистентности, является популяционный анализ (Population analysis profile, PAP).

Популяционный анализ – золотой стандарт выявления гетерорезистентности. PAP - анализ был впервые предложен для выявления hVISA, но на сегодняшний день используется практически для всех микроорганизмов и антибиотиков. Данный метод позволяет выявлять минорные субпопуляции, которые способны расти на высоких концентрациях антибиотиков. Схема постановки PAP-анализа (см. рисунок, в) практически одинакова для всех микроорганизмов, а вот подходы интерпретации результатов различаются. В основе PAP-анализа лежит оценка отношения количества живых клеток (КОЕ/мл) в зависимости от

воздействующей концентрации антибиотика. Для постановки РАР-анализа требуется наличие субстанции антибиотика с известной активностью (мкг/мг сухого вещества). Протоколы РАР-анализа достаточно подробно описаны, ниже представлены только основные этапы. Изначально готовятся серии чашек с агаром, содержащим антибиотик, от минимальной (два разведения ниже известного значения МПК) до максимальной концентрации (два и более разведений выше от известного значения МПК). Например, для оценки hVISA фенотипа, который имеет МПК 2 мкг/мл, необходимо приготовить шесть чашек, содержащих ряд концентраций при двукратных разведениях ванкомицина от 0,5 мкг/мл до 16 мкг/мл, и одна чашка без антибиотика. В качестве среды чаще всего используются агар Мюллера-Хинтона или сердечно-мозговой агар. Исходный инокулом исследуемой культуры ($6 \times 10^8 - 10^9$ КОЕ/мл) с последующими 10-кратными разведениями разводятся до 10^1 КОЕ/мл. Каждое разведение инокулома наносится на агар, содержащий каждое разведение антибиотика. Чашки инкубируются 24 – 72 часа до появления колоний. Количество выросших колоний подсчитывается, и с учетом разведений, строится график отношения КОЕ/мл к концентрации антибиотика. В зависимости от категории чувствительности, определенной стандартными способами, характер кривых в РАР-анализе будет различаться (см. рисунок, з). Чувствительный фенотип будет характеризоваться отсутствием роста на более высоких концентрациях, следующих после МПК; устойчивый фенотип, напротив, будет характеризоваться отсутствием спада или незначительным снижением клеточной плотности на возрастающих концентрациях антибиотика. Кривая гетерорезистентного фенотипа будет характеризоваться постепенным снижением КОЕ/мл при повышении концентрации антибиотика. Одной из особенностей гетерорезистентности является существенный разрыв между значением МПК, определенной стандартными подходами и значением МПК в РАР-анализе. В работе R.F. Peltz и соавт. [41] была предложена модификация РАР-анализа, заключающаяся в сокращении объемов инокулома (до 0,01 мл), который добавляется на поверхность агара (см. рисунок, д). С использованием такого подхода существенно сокращается объем используемых сред, так, на одной стандартной чашке Петри (90 мм) с антибиотиком, разделенной на секторы, можно инокулировать несколько тестируемых изолятов и/или их разведений. Подсчет колоний осуществляется в зоне капли инокулома. Для выявления hVISA фенотипов с помощью РАР-анализа был предложен способ определения площади под кривой (Area under curve, AUC), с последующим сравнением AUC известного контрольного штамма, который характеризуется hVISA фенотипом (см. рисунок, е) [42]. Для расчетов используется следующая формула:

$$\frac{AUC_{\text{тестового штамма}}}{AUC_{\text{контрольного штамма}}} = \text{RAR-AUC}.$$

При значениях RAR-AUC $\geq 0,9$, тестируемый изолят будет характеризоваться гетерорезистентностью. В

качестве контрольных штаммов используются штаммы *S. aureus* Mu3 (ATCC 700698) и *S. aureus* Mu50 (ATCC 700699). Другой подход определения гетерорезистентности заключается в измерении разницы между максимальной не ингибирующей концентрацией и максимальной ингибирующей концентрацией в РАР-анализе (см. рисунок, е) [43]. Если такая разница достигает ≥ 8 раз, это свидетельствует о гетерорезистентности. Подобный подход изначально был апробирован для выявления устойчивости *Burkholderia cenocepacia* к полимиксину В и на сегодняшний день используется во многих работах по выявлению гетерорезистентности у грамотрицательных бактерий. К минусам РАР-анализа можно отнести сложность постановки, значительные трудозатраты и времязатраты. Необходимость наличия контрольных штаммов, а также субстанций антибиотиков. Данный метод больше подходит для исследовательских лабораторий и референс-центров. Также, к ограничениям данного метода можно отнести отсутствие стандартизованных протоколов интерпретации получаемых результатов, за исключением определения гетерорезистентности к ванкомицину [44]. Отсутствие стандартных протоколов отражается и на выборе диапазона используемых концентраций антибиотиков. В одних работах используются двукратные разведения, в других работах используют меньшую кратность (шаг 0,1 – 1 мкг/мл), таким образом, нет возможности унифицировать получаемые результаты. РАР-анализ не может быть использован как быстрый скрининговый тест, поскольку на время получения результатов может уходить до 72-х часов. В некоторых исследованиях был предложен «быстрый» РАР-анализ для выявления устойчивости к гликопептидам, где использовалась только одна высокая концентрация (в 2 – 4 раза выше МПК) антибиотика; при появлении роста на этой концентрации это интерпретировалось как гетерорезистентность [45, 46]. Однако, такой подход характеризуется низкой чувствительностью и специфичностью [6, 47]. На основании анализа ранее опубликованных обзоров [5, 6, 44], в таблице представлены примеры выявления гетерорезистентности у разных микроорганизмов с использованием разных подходов, в большинстве представленных случаев гетерорезистентность была выявлена у клинических изолятов. Методология определения гетерорезистентности *A. baumannii* к колистину подробно представлена в работе E.X. Sherman и соавт. [48].

Молекулярные методы для детекции гетерорезистентности. Использование молекулярных методов с использованием ПЦР или ПЦР в режиме реального времени для детекции различных детерминант устойчивости, в том числе и мутаций, не могут быть использованы для обнаружения гетерорезистентности. Это связано с тем, что большинство коммерческих тест-систем разрабатывается для выявления хорошо изученных и верифицированных детерминант резистентности, а формирование гетерорезистентности происходит преимущественно с формированием множества вариантов мутаций или амплификации генов. Например, у *S. aureus* выявлено более 30 ло

Гетерорезистентность и методы ее выявления среди клинически значимых патогенов

Микроорганизмы	Антибактериальные препараты	Используемые методы обнаружения
<i>S. aureus</i> , стафилококки	Бета-лактамы, цефтаролин	РАР
<i>S. pneumoniae</i>	Пенициллин, фосфомицин	РАР
<i>Enterococcus faecium</i>	Ванкомицин	ГДМ
<i>Clostridioides difficile</i>	Метронидазол	ГДМ, ДДМ
<i>H. influenzae</i>	Имипенем	ГДМ
ГОНФБ, <i>Enterobacterales</i>	Карбапенемы	РАР, ГДМ, ДДМ
ГОНФБ, <i>Enterobacterales</i>	Колистин, полимиксин В	РАР, агар с 4 мкг/мл колистина, ГДМ
<i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacterales</i>	Ципрофлоксацин	РАР
<i>Bartonella</i> spp.	Ципрофлоксацин	ГДМ
<i>H. pylori</i>	Левифлоксацин, кларитромицин, метронидазол	ГДМ, разведения в агаре
<i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i>	Аминогликозиды	РАР, ГДМ
<i>A. baumannii</i> , <i>Enterobacterales</i>	Тигециклин	РАР
<i>A. baumannii</i> , <i>Enterobacterales</i>	Цефидерокол	РАР, ГДМ, ДДМ
<i>S. aureus</i>	Омадациклин	РАР [49]

Примечание. РАР – популяционный анализ; ДДМ – рост колоний в зоне ингибирования роста в диско-диффузионном методе; ГДМ – рост колоний в зоне ингибирования роста у градиентной полоски; ГОНФБ – грамотрицательные неферментирующие бактерии.

кусков, различные мутации в которых ассоциированы с гетерорезистентностью к гликопептидам [50]. Амплификация гена или группы генов, которая обнаруживается среди представителей *Enterobacterales*, *Salmonella* spp., *Acinetobacter* spp., обуславливает формирование гетерорезистентности к бета-лактамам, аминогликозидам, тетрациклинам, колистину [26, 51, 52]. Предел чувствительности обнаружения специфической детерминанты у многих тест-систем составляет от 5% клеток в клеточной популяции, а потенциальная устойчивая субпопуляция при гетерорезистентности составляет 1% и менее клеток [5]. Для повышения чувствительности выявления гетерорезистентности возможно использование цифровой ПЦР (droplet digital PCR, ddPCR). Так, в работе Y. Zheng и соавт. [53] на примере устойчивости *M. tuberculosis* к изониазиду было показано, что метод ddPCR позволяет выявлять до 0,01% ДНК, содержащей специфические мутации, ассоциированные с гетерорезистентностью в смешанной пробе, где 99% от всего количества ДНК представлено ДНК без мутаций. Среди прочих доступных молекулярных подходов стоит выделить полногеномное секвенирование, которое позволяет получить сиквенс всего генома. Любые потенциальные и известные мутации, ассоциированные с гетерорезистентностью можно выявить с помощью данного подхода. Однако, необходимо обратить внимание на то, что необходимо анализировать не только сборки геномов (контиги), но и само выравнивание ДНК-прочтений (ридов). Поскольку гетерорезистентная популяция представляет собой смешанную моноклональную культуру, то необходимо учитывать количественное соотношение ридов с нуклеотидной заменой и ридов без замены при анализе конкретной позиции, соответствующей определенной мутации. Так, в случае обнаружения в выравнивании смешанных ридов, где $\geq 10\%$ ридов несут замену, которая соответствует известной мутации, это может свидетельствовать о наличии субпопуляции [54, 55]. Такой

анализ возможен только при оптимальном покрытии секвенируемого генома (более $\times 100$) и высоком качестве самих ридов. Более сложный случай – это выявление тандемной амплификации генов, которое возможно только с использованием технологий секвенирования с получением длинных прочтений (Oxford Nanopore Technologies или PacBio) [5]. Методы полногеномного секвенирования, несмотря на все большую распространённость и удешевление сиквенса, остаются недоступными для массового использования в клинических бактериологических лабораториях.

Когда необходимо выявлять гетерорезистентность? Поскольку гетерорезистентность имеет важное клиническое значение с одной стороны, и сложность постановки РАР-анализа с другой стороны, возникает вопрос, в каких случаях имеет смысл проводить исследование? Подтверждение гетерорезистентности должно осуществляться при выявлении одиночных колоний при рутинном выполнении ДДМ или ГДМ у исследуемых патогенов. Либо при постановке серийных разведений с получением повторных результатов с «проскоками» лунок. Существуют и клинические аспекты, например, бактериальные изоляты, выделенные от пациентов с предшествующей терапией антибиотиками, имеют риск формирования такого фенотипа [56]. При этом не важно, какую предшествующую антибактериальную терапию получал пациент. Результаты, полученные в *in vitro* экспериментах, показывают, что воздействие одних групп антибиотиков может влиять на формирование гетерорезистентности к другим антибиотикам. Например, воздействие субингибирующими концентрациями бета-лактамов приводит к формированию фенотипа hVISA [57]. Недостаточные дозировки ванкомицина или колистина приводят к появлению гетерорезистентности [58, 59]. Костно-суставные инфекции, хронические остеомиелиты, персистирующие бактериемии, осложненные инфекции центральной нервной системы связаны с риском появления гетерорезистентности [44, 60, 61]. При выяв-

лении гетерорезистентности целесообразно заменить антибиотик на альтернативный, при отсутствии такой возможности наиболее эффективной стратегией будет использование комбинации бактерицидных антибиотиков [44, 62].

Гетерорезистентность, по-видимому, является распространенным явлением, в частности среди изолятов с множественной лекарственной устойчивостью, однако ее клиническое значение остается до конца неизученным. До сих пор гетерорезистентность остается сложно дифференцируемым фенотипом, для выявления которого необходимы существенные затраты и ресурсы. Остро необходимы четкие определения и унификация методов выявления гетерорезистентности, особенно у грамотрицательных патогенов. Очевидна необходимость разработки экспресс-методов для скрининга и выявления таких фенотипов в рутинной лабораторной практике.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-53, 55-62 с.м.
REFERENCES)

54. Гостев В. В., Сопова Ю. В., Калиногорская О. С., Цветкова И. А., Сидоренко С. В. Селекция устойчивости к даптомицину метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*: роль го- и гетеро-мутаций. *Генетика*. 2020; 56(3): 282-91.

REFERENCES

1. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>. 2023.
2. Alexander H.E., Leidy G. Mode of action of streptomycin on type b *H. influenzae*: i. origin of resistant organisms. *The Journal of experimental medicine*. 1947; 85(4):329-38. DOI: 10.1084/jem.85.4.329.
3. Sutherland R., Rolinson G.N. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococci*. *Journal of bacteriology*. 1964; 87(4):887-99. DOI: 10.1128/jb.87.4.887-899.1964.
4. Kayser F.H., Benner E.J., Hoepflich P.D. Acquired and native resistance of *Staphylococcus aureus* to cephalosporins and other beta-lactam antibiotics. *Applied microbiology*. 1970; 20(1):1-5. DOI: 10.1128/am.20.1.1-5.1970.
5. Andersson D.I., Nicoloff H., Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nature reviews Microbiology*. 2019; 17(8):479-96. DOI: 10.1038/s41579-019-0218-1.
6. El-Halfawy O.M., Valvano M.A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clinical microbiology reviews*. 2015; 28(1):191-207. DOI: 10.1128/CMR.00058-14.
7. Dewachter L., Fauvart M., Michiels J. Bacterial heterogeneity and antibiotic survival: understanding and combatting persistence and heteroresistance. *Molecular cell*. 2019; 76(2):255-67. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.09.028.
8. Band V.I., Weiss D.S. Heteroresistance to beta-lactam antibiotics may often be a stage in the progression to antibiotic resistance. *PLoS biology*. 2021; 19(7):e3001346. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001346.
9. Zheng C., Li S., Luo Z., Pi R., Sun H., He Q. et al. Mixed infections and rifampin heteroresistance among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2015; 53(7):2138-47. DOI: 10.1128/JCM.03507-14.
10. Mascellino M.T., Porowska B., De Angelis M., Oliva A. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in *Helicobacter pylori* infection. *Drug. design, development and therapy*. 2017; 11:2209-20. DOI: 10.2147/DDDT.S136240.

11. Marais A., Monteiro L., Occhialini A., Pina M., Lamouliatte H., Megraud F. Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gut*. 1999; 44(4):463-7. DOI: 10.1136/gut.44.4.463.
12. Maxwell D.N., Kim J., Pybus C.A., White L., Medford R.J., Filkins L.M. et al. Clinically undetected polyclonal heteroresistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis respiratory specimens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2022; 77(12):3321-30. DOI: 10.1093/jac/dkac320.
13. Falagas M.E., Makris G.C., Dimopoulos G., Matthaiou D.K. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clinical microbiology and infection*. 2008; 14(2):101-4. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01912.x.
14. Stojowska-Swedzinska K., Lupkowska A., Kuczynska-Wisnik D., Laskowska E. Antibiotic Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of molecular sciences*. 2021; 23(1). DOI: 10.3390/ijms23010449.
15. Chen Z. Mechanisms and clinical relevance of *Pseudomonas aeruginosa* heteroresistance. *Surgical infections*. 2023; 24(1):27-38. DOI: 10.1089/sur.2022.349.
16. Jo J., Ko K.S. Tigecycline Heteroresistance and Resistance Mechanism in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology spectrum*. 2021; 9(2):e0101021. DOI: 10.1128/Spectrum.01010-21.
17. Engel H., Gutierrez-Fernandez J., Fluckiger C., Martinez-Ripoll M., Muhlemann K., Hermoso J.A. et al. Heteroresistance to fosfomycin is predominant in *Streptococcus pneumoniae* and depends on the murA1 gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013; 57(6):2801-8. DOI: 10.1128/AAC.00223-13.
18. Cherkaoui A., Diene S.M., Renzoni A., Emonet S., Renzi G., Francois P. et al. Imipenem heteroresistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* is linked to a combination of altered PBP3, slow drug influx and direct efflux regulation. *Clinical microbiology and infection*. 2017; 23(2):118 e119-118 e119. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.10.009.
19. Ye M., Yuan W., Molaeipour L., Azizian K., Ahmadi A., Kouhsari E. Antibiotic heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review and meta-analysis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2021; 20(1):73. DOI: 10.1186/s12941-021-00478-z.
20. Keikha M., Karbalaee M. Prevalence of antibiotic heteroresistance associated with *Helicobacter pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *Microbial pathogenesis*. 2022; 170:105720. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105720.
21. Wang Z., Chen Q., Zhang J., Yan H., Chen Y., Chen C. et al. High prevalence of unstable antibiotic heteroresistance in cyanobacteria causes resistance underestimation. *Water research*. 2021; 202:117430. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117430.
22. Ferreira G.F., Santos D.A. Heteroresistance and fungi. *Mycoses*. 2017; 60(9):562-8. DOI: 10.1111/myc.12639.
23. Xong H.V., Vanhamme L., Chamekh M., Chimfwembe C.E., Van Den Abbeele J., Pays A. et al. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell*. 1998; 95(6):839-46. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81706-7.
24. Choby J.E., Ozturk T., Satola S.W., Jacob J.T., Weiss D.S. Widespread cefiderocol heteroresistance in carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *The Lancet Infectious diseases*. 2021; 21(5):597-8. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00194-8.
25. Karakonstantis S., Rousaki M., Kritsotakis E.I. Cefiderocol: systematic review of mechanisms of resistance, heteroresistance and *in vivo* emergence of resistance. *Antibiotics*. 2022; 11(6). DOI: 10.3390/antibiotics11060723.
26. Nicoloff H., Hjort K., Levin B.R., Andersson D.I. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nature microbiology*. 2019; 4(3):504-14. DOI: 10.1038/s41564-018-0342-0.
27. Band V.I., Weiss D.S. Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? *PLoS pathogens*. 2019; 15(6):e1007726. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007726.
28. van Hal S.J., Jones M., Gosbell I.B., Paterson D.L. Vancomycin

- heteroresistance is associated with reduced mortality in ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood stream infections. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21217. DOI: 10.1371/journal.pone.0021217.
29. Srinivas P., Hunt L.N., Pouch S.M., Thomas K., Goff D.A., Pancholi P. et al. Detection of colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* from blood and respiratory isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2018; 91(2):194-8. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.028.
 30. Bardet L., Baron S., Leangapichart T., Okdah L., Diene S.M., Rolain J.M. Deciphering heteroresistance to colistin in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Marseille, France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017; 61(6). DOI: 10.1128/AAC.00356-17.
 31. van Hal S.J., Wehrhahn M.C., Barbagiannakos T., Mercer J., Chen D., Paterson D.L. et al. Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2011; 49(4):1489-94. DOI: 10.1128/JCM.02302-10.
 32. Satola S.W., Farley M.M., Anderson K.F., Patel J.B. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *Journal of clinical microbiology*. 2011; 49(1):177-83. DOI: 10.1128/JCM.01128-10.
 33. Landman D., Salamera J., Quale J. Irreproducible and uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of clinical microbiology*. 2013; 51(12):4106-11. DOI: 10.1128/JCM.02129-13.
 34. Lo-Ten-Foe J.R., de Smet A.M., Diederer B.M., Kluytmans J.A., van Keulen P.H. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51(10):3726-30. DOI: 10.1128/AAC.01406-06.
 35. Bryson V., Szybalski W. Microbial selection. *Science*. 1952; 116(3003):45-51. DOI: 10.1126/science.116.3003.45.
 36. Hunt D.E., Sandham H.J. Improved agar gradient-plate technique. *Applied microbiology*. 1969; 17(2):329-30. DOI: 10.1128/am.17.2.329-330.1969.
 37. Gordon N.C., Wareham D.W. Failure of the MicroScan WalkAway system to detect heteroresistance to carbapenems in a patient with *Enterobacter aerogenes* bacteremia. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 47(9):3024-5. DOI: 10.1128/JCM.01033-09.
 38. Zhang Z., Wang Y., Pang Y., Liu C. Comparison of different drug susceptibility test methods to detect rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58(9):5632-5. DOI: 10.1128/AAC.02778-14.
 39. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST; 2017.
 40. Wootton M., MacGowan A.P., Walsh T.R., Howe R.A. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45(2):329-32. DOI: 10.1128/JCM.01508-06.
 41. Pfeltz R.F., Schmidt J.L., Wilkinson B.J. A microdilution plating method for population analysis of antibiotic-resistant staphylococci. *Microbial drug resistance*. 2001; 7(3):289-95. DOI: 10.1089/10766290152652846.
 42. Wootton M., Howe R.A., Hillman R., Walsh T.R., Bennett P.M., MacGowan A.P. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2001; 47(4):399-403. DOI: 10.1093/jac/47.4.399.
 43. El-Halfawy O.M., Valvano M.A. Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells. *PLoS One*. 2013; 8(7):e68874. DOI: 10.1371/journal.pone.0068874.
 44. Roch M., Sierra R., Andrey D.O. Antibiotic heteroresistance in ESKAPE pathogens, from bench to bedside. *Clinical microbiology and infection*. 2023; 29(3):320-5. DOI: 10.1016/j.cmi.2022.10.018.
 45. D'Mello D., Daley A.J., Rahman M.S., Qu Y., Garland S., Pearce C. et al. Vancomycin heteroresistance in bloodstream isolates of *Staphylococcus capitis*. *Journal of clinical microbiology*. 2008; 46(9):3124-6. DOI: 10.1128/JCM.00592-08.
 46. Sun W., Chen H., Liu Y., Zhao C., Nichols W.W., Chen M. et al. Prevalence and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates from 14 cities in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; 53(9):3642-9. DOI: 10.1128/AAC.00206-09.
 47. Voss A., Mouton J.W., van Elzakker E.P., Hendrix R.G., Goessens W., Kluytmans J.A. et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA). *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2007; 6:9. DOI: 10.1186/1476-0711-6-9.
 48. Sherman E.X., Wozniak J.E., Weiss D.S. Methods to evaluate colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*. *Methods in molecular biology*. 2019; 1946:39-50. DOI: 10.1007/978-1-4939-9118-1_4.
 49. Bai B., Lin Z., Pu Z., Xu G., Zhang F., Chen Z. et al. *In vitro* activity and heteroresistance of omadacycline against clinical *Staphylococcus aureus* isolates from China reveal the impact of omadacycline susceptibility by branched-chain amino acid transport system II carrier protein, Na/Pi cotransporter family protein, and fibronectin-binding protein. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10:2546. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02546.
 50. Fait A., Seif Y., Mikkelsen K., Poudel S., Wells J.M., Palsson B.O. et al. Adaptive laboratory evolution and independent component analysis disentangle complex vancomycin adaptation trajectories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2022; 119(30):e2118262119. DOI: 10.1073/pnas.2118262119.
 51. Hjort K., Nicoloff H., Andersson D.I. Unstable tandem gene amplification generates heteroresistance (variation in resistance within a population) to colistin in *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*. 2016; 102(2):274-89. DOI: 10.1111/mmi.13459.
 52. Anderson S.E., Sherman E.X., Weiss D.S., Rather P.N. Aminoglycoside heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* AB5075. *mSphere*. 2018; 3(4). DOI: 10.1128/mSphere.00271-18.
 53. Zheng Y., Xia H., Bao X., Zhao B., He P., Zhao Y. Highly sensitive detection of isoniazid heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* by droplet digital PCR. *Infection and drug resistance*. 2022; 15:6245-54. DOI: 10.2147/IDR.S381097.
 54. Gostev V., Sopova J., Kalinogorskaya O., Tsvetkova I., Sidorenko S. Selection of resistance to daptomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of homo- and hetero-mutations. *Genetika*. 2020; 56(3):282-91. DOI: 10.31857/S0016675820030066. (in Russian)
 55. Gostev V., Kalinogorskaya O., Ivanova K., Kalisnikova E., Lazareva I., Starkova P. et al. *In vitro* selection of high-level beta-lactam resistance in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2021; 10(6). DOI: 10.3390/antibiotics10060637.
 56. He J., Jia X., Yang S., Xu X., Sun K., Li C. et al. Heteroresistance to carbapenems in invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections. *International journal of antimicrobial agents*. 2018; 51(3):413-21. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.10.014.
 57. Roch M., Clair P., Renzoni A., Reverdy M.E., Dauwalder O., Bes M. et al. Exposure of *Staphylococcus aureus* to subinhibitory concentrations of beta-lactam antibiotics induces heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58(9):5306-14. DOI: 10.1128/AAC.02574-14.
 58. Gomes D.M., Ward K.E., LaPlante K.L. Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*. *Pharmacotherapy*. 2015; 35(4):424-32. DOI: 10.1002/phar.1577.
 59. David M.D., Gill M.J. Potential for underdosing and emergence of resistance in *Acinetobacter baumannii* during treatment with colistin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008; 61(4):962-4. DOI: 10.1093/jac/dkn009.
 60. Rodriguez C.H., Bombicino K., Granados G., Nastro M., Vay C., Famiglietti A. Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive

- care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009; 65(2):188-91. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.05.019.
61. Li J., Rayner C.R., Nation R.L., Owen R.J., Spelman D., Tan K.E. et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50(9):2946-50. DOI: 10.1128/AAC.00103-06.
62. Band V.I., Hufnagel D.A., Jaggavarapu S., Sherman E.X., Wozniak J.E., Satola S.W. et al. Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple drugs effectively control infection. *Nature microbiology*. 2019; 4(10):1627-35. DOI: 10.1038/s41564-019-0480-z.