



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.iacsmc.ru

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

Подписные индексы

По каталогу «Журналы России» на 2020 г. агентства «Роспечать»:

82125 – единый подписной индекс;

T6708 – для юридических лиц.

Подписка на сайте издателя

<https://service.iacsmc.ru>

Адрес для корреспонденции

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

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
www.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, 2020.

Содержание

252 От редакции

Болезни и возбудители

- Козлов Р.С., Андреева И.В., Стецюк О.У., Муравьев А.А.
254 Вакцинация против пневмококковой инфекции взрослых пациентов с сопутствующими заболеваниями: взгляд через призму клинических рекомендаций
 Кожушная О.С., Солопова Г.Г., Воропаев А.Д., Маркова Ж.В., Сацук А.В., Баламожнова А.О., Новичкова Г.А.
266 Эпидемиологическое расследование вспышки кандидемий, вызванной *C. parapsilosis*, в центре детской гематологии/онкологии

Антибиотикорезистентность

- Гординская Н.А., Беляева Е.В., Борискина Е.В., Кряжев Д.В.
272 Проблема антибиотикорезистентности стафилококков в педиатрических стационарах
 Карпов О.Э., Гусаров В.Г., Замятин М.Н., Орлова О.А., Петрова Л.В., Камышова Д.А., Демантиенко М.В., Габоян Я.С., Пивкина А.И., Гриценко Е.А.
277 Управление антибиотикорезистентностью в стационаре: современные реалии и перспективы
 Шедько Е.Д., Тимошина О.Ю., Азизов И.С.
287 Молекулярная эпидемиология генов группы *trc*

Опыт работы

- Гороховский В.С., Слободенюк Е.В., Бобровникова М.Ю., Дьяченко С.В.
302 Влияние сотовых телефонов медицинского персонала на распространение проблемных резистентных микроорганизмов
 Иванова О.В., Эйдельштейн И.А., Ромашов О.И., Козлов Р.С.
306 Оценка влияния мутаций в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*, обуславливающих устойчивость к макролидам, на тяжесть течения внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста, находившихся на лечении в Смоленском военном госпитале
 Егорова С.А., Кафтырева Л.А.
314 Методологические подходы к определению чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам

Молекулярная эпидемиология генов группы *mcr*

Шедько Е.Д.¹, Тимошина О.Ю.¹, Азизов И.С.²

¹ ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск, Россия

Контактный адрес:

Елизавета Дмитриевна Шедько
Эл. почта: shedko@cmd.su

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, генетические детерминанты, гены резистентности, полимиксины, *mcr*, молекулярная диагностика.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Колистин, относящийся к классу полимиксинов, является так называемым антибиотиком последнего резерва и используется в борьбе с заболеваниями, вызванными бактериальными патогенами с множественной лекарственной устойчивостью. Стремительное распространение резистентности к полимиксинам, опосредованной локализованным на плазмидной ДНК геном *mcr*, может представлять высокую эпидемиологическую опасность. Для эффективного контроля за распространением генов группы *mcr* необходимо создание высокоточных, высокочувствительных и простых в применении тест-систем. В данном обзоре рассматриваются наиболее актуальные исследования в области молекулярной эпидемиологии, а также описываются существующие в настоящий момент подходы к микробиологической и молекулярно-биологической диагностике генов группы *mcr*.

Review

Molecular epidemiology of *mcr* gene group

Shedko E.D.¹, Timoshina O.Yu.¹, Azizov I.S.²

¹ Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

² Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

Contacts:

Elizaveta D. Shedko
E-mail: shedko@cmd.su

Key words: antimicrobial resistance, genetic determinants, resistance genes, polymyxins, *mcr*, molecular diagnosis.

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

Colistin and polymyxin B are the "last reserve" antimicrobials for the treatment of extensively drug-resistant Gram-negative bacterial infections. The rapidly increasing prevalence of polymyxin resistance mediated by the *mcr* gene localized on plasmid DNA currently poses a high epidemiological threat. In order to control a distribution of *mcr* genes, it is necessary to develop highly accurate, highly sensitive and easy-to-use diagnostic tools. This paper provides a review of the most relevant studies on the molecular epidemiology as well as current approaches to microbiological and molecular detection of *mcr* group genes.

Введение

Колистин относится к классу полимиксинов – катионных циклических полипептидных антибиотиков, содержащих липофильную жирную ацильную боковую цепь. В основе принципа действия полимиксинов лежит конкурентное связывание двухвалентных катионов кальция и магния, приводящее к дестабилизации бактериальных мембран. Начальные этапы взаимодействия молекулы полимиксина с мембраной обусловлены электростатическими взаимодействиями между положительно заряженными полимиксинами и отрицательно заряженной фосфатной группой липида А на липополисахаридах (ЛПС), локализованных на мембране бактериальных клеток [1]. Из-за неблагоприятного профиля безопасности, а также на фоне появления ряда антибиотиков, активных в отношении некоторых грамотрицательных микроорганизмов, применение полимиксинов с середины 1980-х гг. начало стремительно снижаться, и к началу 2000-х гг.

полимиксины практически не применялись в России. Однако появление и стремительное распространение полирезистентных и панрезистентных штаммов микроорганизмов, устойчивых к абсолютному большинству антимикробных препаратов, применяющихся в клинической практике, послужило причиной ренессанса полимиксинов как антибиотиков. Являясь средствами так называемого последнего резерва, в настоящее время полимиксины используются для лечения инфекций, вызванных полирезистентными бактериями *Acinetobacter baumannii* [2], *Pseudomonas aeruginosa* [3], а также CRE (англ. carbapenem-resistant Enterobacteriaceae – карбапенеморезистентные энтеробактерии) [4], которые, согласно глобальному приоритетному списку антибиотикорезистентных бактерий Всемирной организации здравоохранения, относятся к критически значимым патогенам [5].

В 2015 г. Liu Y. и соавт. впервые сообщили об обна-

ружении гена *mcr-1* [6]. Гены группы *mcr* (англ. mobilized colistin resistance – мобилизованная резистентность к колистину) передаются между бактериями посредством плазмидной ДНК и кодируют белки, детерминирующие формирование устойчивости бактерий к колистину (полимиксинам) [7]. С момента открытия бактерии, несущие гены группы *mcr*, были обнаружены на 5 континентах как в клинических образцах, полученных от человека, так и в культурах, выделенных от животных и из объектов окружающей среды [7]. Высокая эпидемическая опасность широкого распространения генов резистентности к колистину (*mcr*) и, как следствие, существенное сокращение возможности использования жизненно важного препарата ставит задачу по разработке новых, быстрых и точных, методов детекции в клинической диагностике и исследовательской практике.

Молекулярная эпидемиология *mcr*

Классические механизмы резистентности к полимиксинам

Впервые природная устойчивость грамотрицательных бактерий к колистину была показана Muyembe T. и соавт. в 1973 г. [8] у бактерий вида *Edwardsiella tarda*. В дальнейшем природная устойчивость была описана у различных бактерий, включая представителей родов *Proteus*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella*, *Burkholderia* [9]. Вышеупомянутые микроорганизмы имеют ЛПС, модифицированный посредством присоединения к нему различных катионных групп. Таким образом, суммарный заряд ЛПС возрастает, что приводит к ослаблению связывания полимиксинов и, следовательно, к резистентности к данному классу антибиотиков.

В частности, для природно резистентного к полимиксинам *Proteus mirabilis* характерна модификация ЛПС 4-амино-L-арабинозой (L-Ara4N), вызванная конститутивной экспрессией оперона *arnBCADTEF*. Также в геноме *P. mirabilis* был обнаружен ген *eptC*, отвечающий за модификацию ЛПС фосфоэтанололамином (PEtN). Мутации в вышеупомянутых опероне и гене могут приводить к формированию полимиксиночувствительного фенотипа. Также влияние на природную резистентность *P. mirabilis* к полимиксинам могут оказывать мутации в гене *galU*, участвующем в биосинтезе L-Ara4N, и генах двухкомпонентной системы *rppA/rppB*, ответственной за активацию оперона *arnBCADTEF*. Показано, что инактивация генов *arnB* и *arnC*, входящих в состав оперона *arnBCADTEF*, регулируемого двухкомпонентной системой *phoP/phoQ*, также ведет к формированию полимиксиночувствительного фенотипа у *Serratia marcescens*: мутации в этих генах приводят к снижению МПК полимиксина В с 2048 (для штамма дикого типа) до 2 мг/л. Конститутивная экспрессия оперона *arnBCADTEF*, приводящая к модификации ЛПС L-Ara4N, также характерна и для природно резистентных к полимиксинам представителей рода *Burkholderia*.

В отличие от природно резистентных к полимиксинам бактерий, некоторые другие виды грамотрицательных микроорганизмов способны формировать устойчивые к данному классу антибиотиков фенотипы под воздействием неблагоприятных факторов внешней

среды. В частности, приобретенная резистентность к полимиксинам показана для ряда представителей порядка Enterobacterales (*Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*), а также для *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Классическим механизмом формирования устойчивости к полимиксинам является ковалентное присоединение вышеупомянутых катионных групп (L-Ara4N и PEtN) к липиду А ЛПС клетки бактерии. Также могут наблюдаться и другие формы модификации ЛПС (деацилирование, гидроксильное), вплоть до полной его утраты. Альтернативные стратегии формирования резистентности к полимиксинам включают в себя системы эффлюкса (например, AcrAB и KpnEF у *K. pneumoniae*), а также гиперэкспрессию некоторых белков наружной мембраны (в частности, OprH у *P. aeruginosa*).

Модификация липида А у *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* остатками L-Ara4N и PEtN происходит посредством группы трансфераз Pmr и регулируется двухкомпонентными системами PmrA/PmrB и PhoP/PhoQ [10]. Активация двухкомпонентной системы PhoP/PhoQ приводит к экспрессии трансферазы PmrD и последующей активации системы PmrA/PmrB. Активация системы PmrA/PmrB приводит к усилению экспрессии оперонов *arnBCADTEF-pmrE* (также известного как *pmrHFUKLM-ugd*) и *pmrCAB*, ответственных за синтез и присоединение к липиду А остатков L-Ara4N и PEtN соответственно, что в свою очередь ведет к изменению общего заряда ЛПС. Индукция двухкомпонентных систем *pmrA/pmrB* и *phoP/phoQ* может происходить путем возникновения в них случайных мутаций, а также под воздействием полимиксинов. Интересно отметить, что у *P. aeruginosa* гены *pmrE* и *pmrHFUKLM* объединены в единый оперон, который также может быть индуцирован низким содержанием Mg^{2+} [11].

Резистентность к колистину также может быть обусловлена мутациями в генах *lpxA*, *lpxC* и *lpxD*, которые приводят к полной потере бактериями ЛПС и липида А. Такой механизм в настоящее время был обнаружен только у бактерий вида *A. baumannii* [12]. Другими уникальными механизмами резистентности к полимиксинам являются продукция вязкой полисахаридной капсулы, способной захватывать антимикробные пептиды, у некоторых штаммов *K. pneumoniae* [13], а также экспрессия сериновой протеазы у *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa*, инактивирующей колистин путем разрушения связи между остатками диаминомасляной кислоты [14].

Характеристика генов группы *mcr*

Интересно отметить, что первая публикация об устойчивости к полимиксинам, связанной с конъюгативной плазмидой Inc-группы [15], не привлекла внимания специалистов, и вероятная роль плазмидного механизма устойчивости на долгие годы оказалась забытой. Второй «выход на сцену» плазмидных механизмов устойчивости к полимиксинам на фоне широкого распространения полирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий оказался гораздо более выраженным. Новый плазмидопосредованный механизм устойчивости бактерий к полимиксинам обусловлен экспрессией генов группы *mcr* [6]. В отличие от классических механизмов, обеспечивающих лишь вертикальную передачу резистентности

внутри штамма или клональной линии, гены группы *mcr* могут распространяться посредством горизонтального переноса в составе трансмиссивных плазмид между разными штаммами и видами бактерий.

Гены группы *mcr* кодируют фосфоэтаноламинотрансферазы, переносящие PEtN в позицию 1(4')-фосфатной группы глюкозамина на липид А ЛПС. Образующийся в результате 4'-фосфоэтаноламин-липид А препятствует связыванию полимиксинов [16, 17]. Фосфоэтаноламинотрансферазы MCR представляют из себя трансмембранные белки, локализованные на периплазматической стороне внутренней мембраны, и состоят из трансмембранного домена, представляющего собой 5 α -цепей на N-конце и каталитического периплазматического домена на C-конце.

Наиболее близкими предками *mcr* являются гены группы *icr* (англ. intrinsic colistin resistance – природная резистентность к колистину), обнаруженные в составе хромосомной ДНК *Moraxella* spp. и имеющие ~ 70% идентичности по нуклеотидной последовательности с генами групп *mcr-1* и *mcr-2* [18]. Трансферазы группы ICR имеют ~ 60% идентичных ферментам MCR аминокислот и аналогично модифицируют липид А, перенося на него фосфоэтаноламин [19]. Poirel L. и соавт. предполагают, что гены группы *mcr* произошли от генов группы *icr* посредством переноса в комплексе с мобильными элементами IS*Ap11* [20].

Большинство плазмид, несущих гены группы *mcr*, относятся к плазмидам группы несовместимости Inc [16]. Особенностью плазмид группы Inc является наличие нескольких систем токсин-антитоксин, которые обеспечивают высокую экспрессию генов в составе плазмиды [21]. Среди изученных плазмид наибольшую распространенность имели плазмиды групп IncX4 (35,2%), IncI2 (34,7%) и IncHI2 (20,5%), при этом плазмиды группы IncI2 преобладали в Азии, в то время как плазмиды группы IncHI2 – в Европе [22]. Разнообразие плазмид, несущих ген *mcr*, было показано как для человеческой микробиоты [23], так и для образцов, полученных от животных [24].

Перенос генов группы *mcr* происходит в составе транспозона Tn6330 [20], структура которого может различаться в зависимости от типа плазмиды. Инсерционная последовательность *Ap11* была обнаружена перед геном *mcr* в 77,8% исследованных плазмид группы IncHI2 и 37,9% плазмид группы IncI2, однако полностью отсутствовала в плазмидах группы IncX4 [22]. Наиболее часто гену *mcr* сопутствуют такие генетические элементы, как образующая шпильку последовательность *hp*, белок сборки пилей IV типа – *pilP* и белки системы секреции IV типа – *virD4* и *virB4* [7, 23].

На данный момент обнаружено 10 вариантов генов, входящих в группу *mcr*.

В группу генов *mcr-1*, согласно базе данных Pathogen Detection Reference Gene Catalog [25], на сегодняшний день входит 30 гомологов, которые отличаются в основном однонуклеотидными заменами, приводящими к изменению аминокислотного состава кодируемого ими белка [26]. Гены группы *mcr-2* имеют 77% идентичных нуклеотидных остатков с генами группы *mcr-1* [26] и, согласно филогенетическому анализу, составляют с ними единую субкладу I [27].

Субклада II включает гены групп *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* и *mcr-10* [28, 29]. Группа генов *mcr-3* является в настоящий момент наиболее широко представленной и насчитывает 40 разнообразных типов аллелей [25]. Гены семейства *mcr-3* имеют 45% сходства с *mcr-1* и 47% сходства с *mcr-2* [26]. Также в данную субкладу входят *mcr-4*-подобные гены, представленные у бактерий рода *Shewanella* и *A. baumannii* [27, 30]. Вариант гена *mcr-5* был впервые обнаружен Borowiak M. и соавт. у серотипа *Salmonella enterica* подвид *enterica* Paratyphi B (dTa+) [31]. Интересно отметить, что в работе Ma S. и соавт. был описан случай обнаружения варианта гена *mcr-5* в бактериях вида *Aeromonas hydrophila*, которые относятся к семейству *Aeromonadaceae* порядка *Aeromonadales* [32]. Ген *mcr-7* был обнаружен у бактерий *K. pneumoniae* в работе Yang Y. и соавт., где была показана 78% идентичность нуклеотидному составу *mcr-3* [33]. Гены внутри группы *mcr-8* отличаются между собой пятью нуклеотидными заменами [34] и имеют 50,23% сходства с вариантом *mcr-3* [35]. Гомолог *mcr-9* впервые был открыт Carroll L. и соавт. в бактериях *Salmonella enterica* серотипа Typhimurium и при анализе представленных в базе данных GenBank последовательностей был обнаружен в 335 геномах бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [36]. Ген *mcr-10* был обнаружен в составе плазмиды IncFIA у клинического штамма *Enterobacter roggenkampii* в 2020 г. Последовательность гена *mcr-10* на 79,69% идентична последовательности гена *mcr-9*.

К гомологам, представленным одним вариантом аллеля, относится *mcr-6* [25]. Ген *mcr-6* был обнаружен в *M. pluranimalium*-подобном штамме MSG47-C17 и изначально был отнесен к варианту *mcr-2* [37].

Белковые продукты генов субклады I – фосфоэтаноламинотрансферазы MCR-1 и MCR-2 – имеют 81% идентичных аминокислотных остатков [26]. Также было экспериментально доказано, что домены белков MCR-1 и MCR-2 являются взаимозаменяемыми [38, 39]. PEtN-трансфераза субклады II – MCR-3 с температурой плавления 66,2°C – является более термостабильной, чем MCR-1, температура плавления которой составляет 61,1°C [40]. Домены белков MCR-1 не являются взаимозаменяемыми с доменами белков субклады II [27]. Однако интересно отметить, что домены трансфераз внутри субклады II, MCR-3 и MCR-4, также не являются взаимозаменяемыми [27].

Согласно представленным данным, аминокислотная последовательность MCR-5 имеет сходство 36% с MCR-1, 35% с MCR-2, 35% с MCR-3 и 34% с MCR-4. Авторы также отмечают, что в настоящее время невозможно определение предположительного происхождения варианта MCR-5 [31]. Относимая ранее к варианту MCR-2 трансфераза MCR-6 обладает высокой степенью родства с MCR-2 и имеет с ней 88% идентичных аминокислот [37]. Вариант MCR-7 имеет 70% сходство аминокислотного состава с MCR-3 и 45% с MCR-4. При этом интересно отметить, что с остальными семействами генов сходство составляет ~ 35% [41]. Аминокислотная последовательность MCR-8 в среднем имеет идентичность с остальными около 34%, однако наиболее высокое сродство (40%) – с вариантом MCR-3 [35]. MCR-9

имеет 65% идентичности аминокислотной последовательности с MCR-3, однако структурно является схожим также с вариантами гена MCR-4 и MCR-7 [36]. MCR-10 является на 83% идентичной аминокислотному составу MCR-9 [42].

Для трансферазы MCR-1 были показаны такие ключевые аминокислотные остатки, как глутаминовая кислота (E246), треонин (T285), аспарагиновая кислота (D465) и гистидин (H395, H466, H478) [16]. Для MCR-2 набор аминокислот является идентичным (E244, T283, H393, D463, H464 и H476) [17]. Активные центры ферментов, кодируемые типами генов *mcr-3* и *mcr-4*, достаточно сильно отличаются по аминокислотному составу, хотя катализируют одинаковые биохимические реакции. Так, для трансферазы MCR-3 характерно наличие аспарагина (N103), глицина (G322) и лизина (K325) в дополнение к присутствующим у вариантов MCR-1 и MCR-2 треонину, глутаминовой кислоте и гистидину (T107, E111, H380, H463) [43]. Для варианта MCR-4 аминокислотный состав активного центра является схожим MCR-3 (N104, T108, E112, K326, H382, H465), однако его отличает замена глицина на серин (S323) [27].

Эпидемиология генов *mcr*

В настоящее время случаи возникновения резистентности к колистину, опосредованной геном *mcr*, были зафиксированы в 40 странах мира [44, 45]. В Российской Федерации на 2020 г., согласно представленным в базе AMRmap [46] данным, в клинической практике было зарегистрировано 35 случаев обнаружения варианта гена *mcr-1*. Было показано, что большая часть полимиксинорезистентных штаммов из России с множественной устойчивостью являются *mcr*-независимыми [47]. Это дает возможность предположить, что наиболее вероятной причиной появления *mcr*-положительных изолятов в России является попадание из соседних регионов [48].

Для Китая, где проблема стоит наиболее остро, было показано, что 28% обследованных пациентов являлись носителями бактерий-комменсалов, содержащих плазмиды с *mcr-1* [49]. В период с 2006 по 2016 г. распространение гена *mcr-1* в клинических изолятах бактерий рода *Salmonella* значительно увеличилось после 2012 г., причем 81% из них оказались полирезистентными [50]. Согласно исследованиям, проведенным Shen Y. и соавт., распространенность *mcr-1* составляла в среднем 15% (95% ДИ: 14–16%) среди населения 30 различных провинций и муниципалитетов Китая [51].

Резервуары *mcr* в окружающей среде

В окружающей среде, согласно работе Chen K. и соавт., бактерии, несущие ген *mcr-1*, в основном обнаруживаются в воде [49], в том числе в сточных водах [52, 53] и в природных водоемах [54], а также в фекалиях животных и продуктах питания. Так, множество работ по изучению распространения генов группы *mcr* проводилось именно с использованием образцов бактериальных культур, полученных от различных сельскохозяйственных птиц [41, 55–57] и животных [58–60]. Это дает возможность предположить, что основное распространение в популяции человека гены группы *mcr* получили за счет интенсивного использования колистина для сель-

скохозяйственных животных за последние 50 лет [44]. Однако интересно отметить, что 8,7% образцов, полученных от животных-компаньонов, также были *mcr*-положительными [61].

Mcr-положительные штаммы с множественной лекарственной устойчивостью

Особое внимание стоит уделить одной из основных угроз настоящего времени – нозокомиальным инфекциям, которые могут быть вызваны в том числе антибиотикорезистентными бактериями [62–65]. В исследовании Caselli E. и соавт. было показано, что 8,3% госпитальных изолятов *Enterobacteriaceae* в Италии имели устойчивость к колистину, опосредованную наличием *mcr-1* [66].

В работе Наеппи М. и соавт. 21% бактерий, содержащих гены бета-лактамаз расширенного спектра, были также и *mcr*-положительными [67]. В другом исследовании было показано, что 39,6% плазмид совместно с геном *mcr* содержали *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} и *bla*_{TEM} [68]. Также были описаны плазмиды, совместно с *mcr* несущие гены резистентности к карбапенемам (*bla*_{NDM-5}, *bla*_{NDM-9}), фосфомицину (*fosA3*), аминогликозидам (*rmtB*, *aadA1*, *aadA2*, *aph(6)-Ia*, *aph(3'')-Ib/strB*), цефалоспорином (*bla*_{CTX-M-65}), фениколам (*floR*, *cmlA1*), триметоприму (*dfrA1*), тетрациклину (*tetA*) и сульфаниламидам (*sul1*, *sul3*) [67, 69–71]. При этом нередко плазмиды содержат гены устойчивости сразу к нескольким классам антибиотиков [72–74].

Вероятные эпидемиологические цепочки распространения генов *mcr*

В связи с тем что открытие и последующее распространение *mcr-1* связывают с применением колистина в фермерской промышленности Китая [75], интересным является рассмотрение различных возможных путей и факторов передачи генов группы *mcr*. Так, в исследовании Liu X. и соавт. было показано, что около 33% изолятов *E. coli*, полученных из образцов мясной промышленности Китая, обладали резистентностью к колистину, при этом 0,4% также обладали резистентностью к меропенему [76]. В исследовании факторов передачи было показано, что наиболее существенной ($P < 0,05$) корреляцией, связанной с высокой распространенностью *mcr-1* среди людей в Китае, обладало высокое потребление продуктов мясной промышленности, особенно свинины и баранины ($\chi^2 = 0,6$; $P = 1 > 0,05$) [51]. Однако интересно отметить, что высокой корреляцией также обладала работа в аквакультурной промышленности (ОШ=0,5; 95%-й ДИ: 0,3–0,7) и потребление в пищу большого количества морепродуктов (ОШ=0,6; 95%-й ДИ: 0,5–0,7) [51].

Liu Y. и соавт. было показано, что несущая *mcr-1* плаزمида pHNSHP45 имела высокую скорость передачи *in vitro* среди штаммов *E. coli* (10^{-1} – 10^{-3}), а также между клиническими изолятами *E. coli* ST131, *K. pneumoniae* ST11 и *P. aeruginosa* HE26, причем трансконъюгаты являются стабильными даже без использования селективного давления с помощью полимиксинов [6]. В связи с этими данными важно отметить исследование Gianì T. и соавт., в котором было показано, что 38,3% здоровых детей в регионе Чако в Боливии были носителями изо-

лятов бактерий, содержащих ген *mcr-1*, несмотря на то что лишь 1,1% из обследованных детей ранее получали антимикробные препараты [77].

Также интересно отметить исследование Tarabai H. и соавт., в котором был обнаружен ген группы *mcr-1*, расположенный на плазмиде группы IncI2 pDR164, у изолята *E. coli*, полученного от дикого черного коршуна [78]. Черные коршуны являются перелетными птицами, сезонно мигрирующими из Европы в Азию и Африку. Впервые наличие у перелетных птиц *E. coli*, являющихся носителями гена *mcr-1*, было показано для европейской серебристой чайки [79]. В работе Ahmed Z. и соавт. было также показано наличие у перелетных птиц бактерий, несущих ген *mcr-2* [80]. Авторы статьи предполагают, что перелетные птицы могут вносить вклад в распространение генов резистентности к колистину.

Таким образом, можно предположить, что плазмиды, несущие гены группы *mcr*, не только быстро распространяются в кишечной микрофлоре и ключевых патогенах человека, но и их численность будет поддерживаться в популяциях бактерий различного происхождения, представленных порядком Enterobacterales.

Методы определения резистентности к колистину

На фоне многочисленных публикаций, указывающих на низкую согласованность результатов оценки чувствительности различными методами (диско-диффузионным, методами градиентной диффузии, методами разведений) [81], в 2016 г. был принят совместный документ американского Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST), в котором были приняты общие подходы к интерпретации результатов определения чувствительности к колистину для Enterobacterales, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [105], а два года спустя был опубликован еще один документ, который внес окончательную ясность в перспективы клинического применения колистина [82]. В соответствии с данным документом, штаммы, имеющие МПК колистина ≥ 4 мкг/мл, являются устойчивыми и относятся к категории «R», изоляты с МПК колистина < 2 мкг/мл должны быть отнесены к категории «I» (increased exposure – чувствительные, дозозависимые), что отражено и в последней редакции клинических интерпретационных критериев CLSI [83]. Несмотря на указанный выше согласительный документ EUCAST/CLSI, единой точки зрения на интерпретационные критерии не существует, и в последней редакции клинических пограничных значений комитета EUCAST категория “S” для колистина была сохранена со значением МПК ≤ 2 мг/л [84]. Итогом длительных дискуссий о клинических перспективах применения полимиксинов явилось «Международное согласительное руководство по оптимальному применению полимиксинов» [85].

В настоящее время «золотым стандартом» оценки чувствительности к колистину является метод микроразведений в бульоне Мюллера – Хинтона, сбалансированном по содержанию катионов. Однако методические ограничения метода микроразведений, связанные с вариативностью результатов в пределах 1–2 разведений

[86], существенно затрудняют интерпретацию результатов оценки чувствительности. Столь низкая согласованность является критичной, особенно ввиду последнего исследования Kieffer N. и соавт., где было показано, что субингибирующие концентрации колистина вызывали индукцию экспрессии *mcr-9*, что в свою очередь привело к повышению МПК [29].

Фенотипические методы определения резистентности

В соответствии с согласительным документом EUCAST/CLSI, в настоящее время BMD (англ. Broth MicroDilution – микроразведение в питательной среде) является единственным рекомендованным методом определения чувствительности к колистину [87]. Однако BMD является достаточно трудоемким, продолжительным и требующим высокой точности исполнения методом [88].

На сегодняшний день на основе BMD также существует ряд коммерческих тест-систем: Sensititre Colistin (ComASP, Италия) с 96% сходимостью результатов по отношению к BMD-тесту [89], UMIC Colistine (Biocentric, Франция) с воспроизводимостью 97,8% при тестировании МПК колистина, Sensititre System (Thermo Fisher Scientific, США) с чувствительностью $< 95\%$ при определении *mcr-1*-позитивных штаммов [90], MIC-Strip Colistin (MERLIN Diagnostika, Германия) [91] и Microtatest MIC Colistin (Erba Lachema, Чехия) [92], а также MAC-тест [93].

Однако существуют значительные нерешенные методические проблемы, связанные с высокой степенью сорбции колистина на полистироловых планшетах. В соответствии с согласительным документом EUCAST/CLSI [87], «золотым стандартом» определения МПК колистина является метод серийных микроразведений в полистироловых планшетах. Singhal и соавт. было показано, что при использовании рекомендованного метода микроразведений в качестве референсного сходимость результатов в пределах ± 1 МПК для микроразведений в планшетах со стеклянным напылением составляла 100%, для метода серийных разведений в агаре – 92,8%, для E-теста – 16,6% и 61,9% для теста на приборе Vitek. Процент верно определенных результатов по отношению ко всем исследованным образцам для всех тестов составил 92,8%, кроме серийных разведений в агаре, для которого он составил 78,5%. Также было показано, что при определении МПК 4 мг/мл рекомендованным согласительным документом методом 7,2% образцов были определены как резистентные, хотя при использовании других методов они определялись как чувствительные [94]. В исследовании Karvanen и соавт. также было показано, что сорбция колистина на различных материалах планшетов во время использования методики микроразведений влияет на корректное определение МПК исследуемых образцов. Так, начальная концентрация в полистироловых планшетах составила 4% от ожидаемой при концентрации колистина 8 мг/л и намного ниже порога определения при концентрациях 0,25 мг/л и 0,125 мг/л [95]. Несмотря на доказанное уменьшение адсорбции при применении различных сурфактантов, таких, например, как полисорбат 80, при внесении в бактериальную культуру или в среду Мюллера – Хинтона, согласительный документ EUCAST/CLSI [87] в настоя-

щее время не оговаривает подобные модификации референсного метода [96].

Однако существуют значительные нерешенные методические проблемы, связанные с высокой степенью сорбции колистина на полистироловых планшетах. В соответствии с согласительным документом EUCAST/CLSI [87] «золотым стандартом» определения МПК колистина является метод серийных микроразведений в полистироловых планшетах. Singhal L. и соавт. было показано, что при использовании рекомендованного метода микроразведений в качестве референсного сходимость результатов в пределах ± 1 МПК для микроразведений в планшетах со стеклянным напылением составляла 100%, для метода серийных разведений в агаре – 92,8%, для Е-теста – 16,6% и 61,9% для теста на приборе Vitek. Процент верно определенных результатов по отношению ко всем исследованным образцам для всех тестов составил 92,8%, кроме серийных разведений в агаре, для которого он составил 78,5%. Также было показано, что при определении МПК 4 мг/мл рекомендованным согласительным документом методом 7,2% образцов были определены как резистентные, хотя при использовании других методов они определялись как чувствительные [94]. В исследовании Karvanen M. и соавт. также было показано, что сорбция колистина на различных материалах планшетов во время использования методики микроразведений влияет на корректное определение МПК исследуемых образцов. Так, начальная концентрация в полистироловых планшетах составила 4% от ожидаемой при концентрации колистина 8 мг/л и намного ниже порога определения при концентрациях 0,25 мг/л и 0,125 мг/л [95]. Несмотря на доказанное уменьшение адсорбции при применении различных сурфактантов, таких, например, как полисорбат 80, при внесении в бактериальную культуру или в среду Мюллера – Хинтона, согласительный документ EUCAST/CLSI [87] в настоящее время не оговаривает подобные модификации референсного метода [96].

Методы выявления устойчивости, основанные на BMD, включают хелаторные, а также нехелаторные тесты на основе селективных сред [97]. Механизм действия хелаторных тестов основан на сходстве строения каталитического домена фосфотрансфераз MCR и металлопротеинов цинка [97]. К хелаторным относятся тесты на основе дипиколиновой кислоты, при которых уменьшение МПК происходит ≥ 8 раз у *mcr*-позитивных штаммов [93], а также на основе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) с чувствительностью 100% и специфичностью 95,8% в сравнении с методом молекулярного генотипирования [98]. К нехелаторным тестам относятся такие селективные среды, как CHROMagar™ COL-APSE (BioMérieux, Франция) [99], LBJMR на агаровой основе с бромкрезоловым пурпурным [100] и SuperPolymyxin™ (Elitech Microbio, Франция) с пороговой концентрацией определения колистина 3,5 мкг/мл [101, 102]. Также к нехелаторным тестам относится RPNP (англ. Rapid Polymyxin NP test – быстрый полимиксиновый NP-тест) с чувствительностью от 93,8% до 99,3% и специфичностью от 95,4% до 100%. Позже RPNP был коммерциализирован ElitechGroup (Франция) [97].

Полимеразная цепная реакция

Методы молекулярной детекции резистентности к колистину, обусловленной наличием у микроорганизмов генов *mcr*, также широко распространены.

Существует несколько разработанных и апробированных протоколов для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием мультиплексного анализа по конечной точке с детекцией в агарозном геле для генов *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* и *mcr-5* [103, 104], причем в исследовании Rebelo A. и соавт. выбранный набор праймеров был валидирован на 49 образцах *Escherichia coli* и *Salmonella*, полученных в Европе от животных [104]. Другие протоколы используют технологию ПЦР в реальном времени для определения генов группы *mcr-1* и *mcr-2* с использованием технологии ПЦР-зондов TaqMan® [105, 106]. Также представлены основанные на применении ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR® Green методики для определения *mcr-1* [107–109], *mcr-2* и *mcr-3* [110], а также мультиплексного определения генов *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* и *mcr-5*, дифференциация которых происходит благодаря различным точкам плавления ампликонов [111]. Также Borowiak M. и соавт. разработали протокол для определения генов *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8* и *mcr-9* [112]. При совместном использовании методик Rebelo и Borowiak и соавт. было показано, что в 254 из 407 (62,4%) изолятов *Salmonella enterica*, полученных из окружающей среды, кормов, животных и продуктов питания несли гены *mcr-1* ($n = 175$), *mcr-4* ($n = 53$), *mcr-5* ($n = 18$) или *mcr-1* и *mcr-9* ($n = 8$) [104, 112].

Коммерческие системы детекции генов *mcr* включают основанную на методе петлевой изотермической амплификации eazyplex® SuperBug (Amplex Biosystems GmbH, Германия), CT103XL [113] и Amplidiag® CarbaR+MCR (Mobidiag, Финляндия) [114], основанные на использовании ДНК-чипов. Также представлены системы регентов, основанные на методе ПЦР в реальном времени Colistin – R ELITE MGB® Kit (ELITech Group, Франция) с определением вариантов генов *mcr-1* и *mcr-2* [114] и ARM-D® Kit, MCR (Streck, США) с определением вариантов генов *mcr-1.1–1.9*, *1.11–1.15*, *mcr-2.1* и *mcr-3.1–3.16*, *3.18–3.25*, *4.1–4.6*, *5.1–5.3* [115].

Иммунохроматографические методы

На данный момент доступными являются сведения о единственной тест-системе, основанной на принципе иммунохроматографического анализа – NG-Test MCR-1 (NG Biotech, Нидерланды). Результаты исследований показали, что тест-система обладает 100% чувствительностью и 98% специфичностью при определении MCR-1-позитивных штаммов среди 298 клинических образцов, полученных из трех различных локаций [116]. Плюсами тест-системы, основанной на данной методике, являются простота использования и быстрое время тестирования. Авторы предполагают, что исследования в данном направлении необходимо расширить.

MALDI-TOF масс-спектрометрия

Было показано, что для MCR-1-позитивных колистинорезистентных штаммов при проведении спектрометрического анализа характерным является пик модифициро-

ванного фосфоэтаноломином липида А на 1919,2 масса/заряд, а также дополнительный пик на 1821,2 масса/заряд [117]. Основываясь на этой особенности, был разработан тест MALDIxip для штаммов вида *E. coli*. Тест отличается быстротой анализа и дает возможность различить, является ли резистентность к колистину обусловленной наличием плазмидной ДНК с *mcr* или хромосомными мутациями [118]. Однако требуются дополнительный исследование для проверки возможности использования данного теста на бактериях других видов.

Таргетное секвенирование

Исследование *mcr* с использованием секвенирования не только позволяет определять новые варианты аллелей гена [74, 119], но также и дифференцировать хромосомные гены устойчивости к колистину от плазмидных [120], исследовать разнообразие несущих гены группы *mcr* плазмид [121–126], а также частоту наличия у одного изолята генов множественной лекарственной устойчивости [72–74]. Полученные сиквенсы плазмидных ДНК на наличие генов резистентности *mcr* анализируют с помощью таких баз данных и алгоритмов, как Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [127], GenEpid-J [128], Antibiotic Resistance Genes Analyzer (ARGA) [129], Antibiotic Resistance Genes Database (ARGD) [130] и ResFinder [131].

Заключение

Первый вариант гена *mcr* был открыт в 2015 г. [6], в настоящее время известно еще 9 вариантов гена, каждый из которых также имеет большое количество разнообразных подтипов внутри варианта [127]. В мета-исследовании Khedher M. и соавт. было показано, что все варианты генов *mcr* имеют происхождение из ДНК бактерий окружающей среды, причем их природным резервуаром являются в основном сточные воды [132]. Учитывая, что гены резистентности *mcr*, вероятно, могут переноситься как в составе плазмиды, так и посредством транспозона [133], можно предположить, что чрезвычайно широкое распространение в природе таких детерминант неизбежно приведет к появлению новых вариантов генов *mcr*.

Стоит обратить внимание на весьма неоднородное распространение *mcr* среди различных грамотрицательных микроорганизмов. В основном распространение генов резистентности *mcr* характерно среди *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp.* [134]. Однако вариант гена *mcr-3* распространен также среди *Aeromonas spp.* [135]. Генетически близкий к нему вариант гена *mcr-7*, возможно, также имеет сходное происхождение, однако он был обнаружен в изоляте *K. pneumoniae* [33]. Ген *mcr-8*, как правило, обнаруживается у *K. pneumoniae* [134], однако также описаны случаи обнаружения *mcr-8* у *K. quasipneumoniae* [34] и *Raoultella ornithinolytica* [136].

Для видов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* присуща низкая частота выделения *mcr*-положительных изолятов. В настоящее время количество случаев, в которых представлено наличие генов *mcr* у *A. baumannii*, ограничивается обнаружением вариантов генов *mcr-4* [119, 137–139]

и единственным случаем обнаружения варианта *mcr-1* [140], в то время как у *P. aeruginosa* были обнаружены варианты *mcr-1* [104, 140] и *mcr-5* [141]. Авторы предполагают, что при наличии природной резистентности к колистину при отсутствии селективного давления бактерии быстро утрачивают плазмиду, однако эта гипотеза требует дальнейшего исследования.

Усугубляющаяся угроза антибиотикорезистентности является причиной не только для поиска новых антимикробных препаратов, но также и для разработки новых систем диагностики наличия детерминант резистентности у бактериальных инфекционных агентов. Появление высокоточных и простых в использовании систем диагностики поможет контролировать распространение патогенных антибиотикорезистентных штаммов, а также на ранних этапах определять подходящий для пациента курс лечения антимикробными препаратами.

Стоит отметить, что, согласно имеющемуся документу EUCAST/CLSI, принятые интерпретационные критерии несут исключительно компромиссный характер, и даже при МПК ≤ 2 мкг/мл данный документ все исследуемые изоляты рекомендует рассматривать как «промежуточные» [84], в то время как рекомендованная методика для определения чувствительности имеет высокую степень ошибок в определении МПК при низких концентрациях колистина. Столь низкая согласованность является критичной, так как субингибирующие концентрации колистина могут вызывать индукцию экспрессии генов *mcr* [29] или образование биопленок [142, 143].

В настоящее время 60% случаев выявления генетических детерминант устойчивости к колистину *mcr* в России приходится на нозокомиальные штаммы, причем большинство штаммов было получено из Сибирского федерального округа [45]. В связи с тем что природными резервуарами *mcr* являются в основном распространенные в окружающей среде бактерии [132], а также принимая во внимание недавние исследования, показывающие возможность переноса генов *mcr* перелетными птицами [78], можно предположить, что появление генов *mcr* в России обусловлено территориальной близостью к месту первого обнаружения [6] генов мобильной резистентности к колистину.

Антибиотикорезистентность является одной из основных проблем как в сфере здравоохранения, так и в экономическом аспекте. Так, согласно исследованиям Aslam B. и соавт., к 2050 г. неуклонно нарастающая угроза резистентности приведет к смерти около 444 млн человек, а экономические затраты на устранение проблемы составят 120 трлн долларов [144]. Однако важно акцентировать внимание не только на поиске новых средств антимикробной терапии, но также и на сохранении эффективности препаратов так называемого последнего резерва, в том числе колистина [145]. С открытием генетических детерминант резистентности, передающихся посредством плазмидной ДНК [146], исследование таких генов, механизмов их передачи и способов лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями, является одной из приоритетных задач.

Литература

1. Wanty C., Anandan A., Piek S., Walshe J., Ganguly J., Carlson R.W., et al. The structure of the neisserial lipooligosaccharide phosphoethanolamine transferase A (LptA) required for resistance to polymyxin. *J Mol Biol.* 2013;425(18):3389-3402. DOI: 10.1016/J.JMB.2013.06.029
2. Dickstein Y., Lellouche J., Ben Dalak Amar M., Schwartz D., Nutman A., Daitch V., et al. Treatment outcomes of colistin and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: an exploratory subgroup analysis of a randomized clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2019;69(5):769-776. DOI: 10.1093/cid/ciy988
3. Farajzadeh Sheikh A., Shahin M., Shokoohzadeh L., Halaji M., Shahcheraghi F., Ghanbari F. Molecular epidemiology of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing NDM-1 from hospitalized patients in Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2019;22(1):38-42. DOI: 10.22038/ijbms.2018.29264.7
4. Sheu C.-C., Chang Y.-T., Lin S.-Y., Chen Y.-H., Hsueh P.-R. Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: an update on therapeutic options. *Front Microbiol.* 2019;10:80. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00080
5. WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Available at: www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM-WHO.pdf.
6. 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
7. Wang R., Van Dorp L., Shaw L.P., Bradley P., Wang Q., Wang X., et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun.* 2018;9(1):1-9. DOI: 10.1038/s41467-018-03205-z
8. Muyembe T., Vandepitte J., Desmyter J. Natural colistin resistance in *Edwardsiella tarda*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1973;4(5):521-524. DOI: 10.1128/AAC.4.5.521
9. 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
10. Chen H.D., Groisman E.A. The Biology of the PmrA/PmrB Two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67(1):83-112. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155751
11. Mayers D.L., Sobel J.D., Ouellette M., Kaye K.S., Marchaim D., eds. *Antimicrobial Drug Resistance*. Cham: Springer International Publishing; 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-46718-4
12. Da Silva G., Domingues S. Interplay between colistin resistance, virulence and fitness in *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics.* 2017;6(4):28. DOI: 10.3390/antibiotics6040028
13. Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Llopart C.M., Alberti S., Bengoechea J.A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 2004;72(12):7107-7114. DOI: 10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004
14. Yin J., Wang G., Cheng D., Fu J., Qiu J., Yu Z. Inactivation of polymyxin by hydrolytic mechanism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(6). DOI: 10.1128/AAC.02378-18
15. Lamousin-White M., O'Callaghan R.J. Association between colistin resistance and broad-spectrum recipient deficiency in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;30(6):964-965. DOI: 10.1128/AAC.30.6.964
16. 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
17. Sun J., Xu Y., Gao R., Lin J., Wei W., Srinivas S., et al. Deciphering MCR-2 colistin resistance. *mBio.* 2017;8(3):e00625-17. DOI: 10.1128/mBio.00625-17
18. Kieffer N., Nordmann P., Poirel L. *Moraxella* species as potential sources of *mcr*-like polymyxin resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6). pii: e00129-17. DOI: 10.1128/AAC.00129-17
19. Wei W., Srinivas S., Lin J., Tang Z., Wang S., Ullah S., et al. Defining ICR-Mo, an intrinsic colistin resistance determinant from *Moraxella osloensis*. *PLoS Genet.* 2018;14(5):e1007389. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007389
20. Poirel L., Kieffer N., Nordmann P. *In vitro* study of IS*ApI1*-mediated mobilization of the colistin resistance gene *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7). pii: e00127-17. DOI: 10.1128/AAC.00127-17
21. Bardaji L., Añorga M., Echeverría M., Ramos C., Murillo J. The toxic guardians – multiple toxin-antitoxin systems provide stability, avoid deletions and maintain virulence genes of *Pseudomonas syringae* virulence plasmids. *Mob DNA.* 2019;10(1):7. DOI: 10.1186/s13100-019-0149-4
22. Matamoros S., van Hattem J.M., Arcilla M.S., Willemsse N., Melles D.C., Penders J., et al. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep.* 2017;7(1):15364. DOI: 10.1038/s41598-017-15539-7-7
23. Ye H., Li Y., Li Z., Gao R., Zhang H., Wen R., et al. Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. *mBio.* 2016;7(2):e00177-16. DOI: 10.1128/mBio.00177-16
24. Wang Q., Li Z., Lin J., Wang X., Deng X., Feng Y. Complex dissemination of the diversified *mcr-1*-harbouring plasmids in *Escherichia coli* of different sequence types. *Oncotarget.* 2016;7(50):82112-82122. DOI: 10.18632/oncotarget.12621

25. The NCBI Pathogen Detection project. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/.
26. Partridge S.R. *mcr-2* in the IncX4 plasmid pKP37-BE is flanked by directly oriented copies of ISEc69. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(5):1533-1535. DOI: 10.1093/jac/dkw575
27. Zhang H., Hou M., Xu Y., Srinivas S., Huang M., Liu L., et al. Action and mechanism of the colistin resistance enzyme *mcr-4*. *Commun Biol.* 2019;2(1):36. DOI: 10.1038/s42003-018-0278-1
28. Zhang H., Zong Z., Lei S., Srinivas S., Sun J., Feng Y., et al. A genomic, evolutionary, and mechanistic study of *mcr-5* action suggests functional unification across the *mcr* family of colistin resistance. *Adv Sci.* 2019;1900034. DOI: 10.1002/advs.201900034
29. Kieffer N., Royer G., Decousser J.-W., Bourrel A.-S., Palmieri M., Ortiz De La Rosa J.-M., et al. *mcr-9*, an inducible gene encoding an acquired phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(9). pii: e00965-19. DOI: 10.1128/AAC.00965-19
30. 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
31. Borowiak M., Fischer J., Hammer J.A., Hendriksen R.S., Szabo I., Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(12):3317-3324. DOI: 10.1093/jac/dkx327
32. Ma S., Sun C., Hulth A., Li J., Nilsson L.E., Zhou Y., et al. Mobile colistin resistance gene *mcr-5* in porcine *Aeromonas hydrophila*. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(7):1777-1780. DOI: 10.1093/jac/dky110
33. Yang Y.-Q., Li Y.-X., Lei C.-W., Zhang A.-Y., Wang H.-N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(7):1791-1795. DOI: 10.1093/jac/dky111
34. Yang X., Liu L., Wang Z., Bai L., Li R. Emergence of *mcr-8.2*-bearing *Klebsiella quasipneumoniae* of animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(9):2814-2817. DOI: 10.1093/jac/dkz213
35. Wang X., Wang Y., Zhou Y., Li J., Yin W., Wang S., et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):1-9. DOI: 10.1038/s41426-018-0124-z
36. Carroll L.M., Gaballa A., Guldemann C., Sullivan G., Henderson L.O., Wiedmann M. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *mBio.* 2019;10(3). pii: e00853-19. DOI: 10.1128/mBio.00853-19
37. AbuOun M., Stubberfield E.J., Duggett N.A., Kirchner M., Dormer L., Nunez-Garcia J., et al. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(10):2745-2749. DOI: 10.1093/jac/dkx286
38. Xu Y., Wei W., Lei S., Lin J., Srinivas S., Feng Y. An evolutionarily conserved mechanism for intrinsic and transferable polymyxin resistance. *mBio.* 2018;9(2):e02317-17. DOI: 10.1128/mBio.02317-17
39. Xu Y., Lin J., Cui T., Srinivas S., Feng Y. Mechanistic insights into transferable polymyxin resistance among gut bacteria. *J Biol Chem.* 2018;293(12):4350-4365. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000924
40. Li H., Yang L., Liu Z., Yin W., Liu D., Shen Y., et al. Molecular insights into functional differences between *mcr-3*- and *mcr-1*-mediated colistin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(9). DOI: 10.1128/AAC.00366-18
41. Yang Y.-Q., Li Y.-X., Song T., Yang Y.-X., Jiang W., Zhang A.-Y., et al. Colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5). DOI: 10.1128/AAC.01204-16
42. Wang C., Feng Y., Liu L., Wei L., Kang M., Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):508-516. DOI: 10.1080/22221751.2020.1732231
43. Xu Y., Zhong L.-L., Srinivas S., Sun J., Huang M., Paterson D.L., et al. Spread of *mcr-3* colistin resistance in China: an epidemiological, genomic and mechanistic study. *EBioMedicine.* 2018;34:139-157. DOI: 10.1016/j.EBIO.2018.07.027
44. Al-Tawfiq J.A., Laxminarayan R., Mendelson M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *Int J Infect Dis.* 2017;54:77-84. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.11.415
45. Azizov I., Shek E., Sukhorukova M., Edelstein M. V. Plasmid-mediated resistance to colistin in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*: results of large retrospective surveillance in Russia. In: *European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases*. Paris; 2019:1413. DOI: 10.13140/RG.2.2.34812.59527
46. Kuzmenkov A.Yu., Trushin I.V., Avramenko A.A., Edelstein M.V., Dekhnich A.V., Kozlov R.S. AMRmap: an online platform for monitoring antibiotic resistance. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2017;19(2):84-90. Russian. (Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017;19(2):84-90.)
47. Shaidullina E.R., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Sukhorukova M.V., Kozlov R.S. Antimicrobial resistance of nosocomial carbapenemase-producing Enterobacterales in Russia: results of surveillance, 2014-2016. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2018;20(4):362-369. Russian. (Шайдуллина Э.Р., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Сухорукова М.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных карбапенемазопродуцирующих штаммов Enterobacterales в

- России: результаты эпидемиологического исследования 2014–2016 гг. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018;20(4):362-369. DOI: 10.36488/смач.2018.4.362-369
48. Ageevets V., Lazareva I., Mrugova T., Gostev V., Lobzin Y., Sidorenko S. IncX4 plasmids harbouring *mcr-1* genes: further dissemination. J Glob Antimicrob Resist. 2019;18:166-167. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.07.002
 49. Chen K., Chan E.W.-C., Xie M., Ye L., Dong N., Chen S. Widespread distribution of *mcr-1*-bearing bacteria in the ecosystem, 2015 to 2016. Eurosurveillance. 2017;22(39). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00206
 50. Lu X., Zeng M., Xu J., Zhou H., Gu B., Li Z., et al. Epidemiologic and genomic insights on *mcr-1*-harbouring *Salmonella* from diarrhoeal outpatients in Shanghai, China, 2006–2016. EBioMedicine. 2019;42:133-144. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.03.006
 51. Shen Y., Zhou H., Xu J., Wang Y., Zhang Q., Walsh T.R., et al. Anthropogenic and environmental factors associated with high incidence of *mcr-1* carriage in humans across China. Nat Microbiol. 2018;3(9):1054-1062. DOI: 10.1038/s41564-018-0205-8
 52. Ovejero C.M., Delgado-Blas J.F., Calero-Caceres W., Muniesa M., Gonzalez-Zorn B. Spread of *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. J Antimicrob Chemother. 2017;72(4):1050-1053. DOI: 10.1093/jac/dkw533
 53. Zhao F., Feng Y., Lü X., McNally A., Zong Z. An IncP plasmid carrying the colistin resistance gene *mcr-1* in *Klebsiella pneumoniae* from hospital sewage. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(2). pii: e02229-16. DOI: 10.1128/AAC.02229-16
 54. Yang D., Qiu Z., Shen Z., Zhao H., Jin M., Li H., et al. The Occurrence of the colistin resistance gene *mcr-1* in the Haihe River (China). Int J Environ Res Public Health. 2017;14(6):576. DOI: 10.3390/ijerph14060576
 55. Schrauven E.J.A., Huizinga P., van Spreuwel N., Verhulst C., Kluytmans-van den Bergh M.F.Q., Kluytmans J.A.J.W. High prevalence of the *mcr-1* gene in retail chicken meat in the Netherlands in 2015. Antimicrob Resist Infect Control. 2017;6(1):83. DOI: 10.1186/s13756-017-0242-8
 56. Carfora V., Alba P., Leekitcharoenphon P., Ballarò D., Cordaro G., Di Matteo P., et al. Colistin resistance mediated by *mcr-1* in ESBL-producing, multidrug resistant *Salmonella infantis* in broiler chicken industry, Italy (2016–2017). Front Microbiol. 2018;9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01880
 57. Zając M., Sztromwasser P., Bortolaia V., Leekitcharoenphon P., Cavaco L.M., Ziętek-Barszcz A., et al. Occurrence and characterization of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Poland, 2011–2016. Front Microbiol. 2019;10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01753
 58. Huang X., Yu L., Chen X., Zhi C., Yao X., Liu Y., et al. high prevalence of colistin resistance and *mcr-1* gene in *Escherichia coli* isolated from food animals in China. Front Microbiol. 2017;8:562. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00562
 59. Hernández M., Iglesias M.R., Rodríguez-Lázaro D., Gallardo A., Quijada N., Miguela-Villoldo P., et al. Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. Eurosurveillance. 2017;22(31):30586. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30586
 60. Yamamoto Y., Calvopina M., Izurieta R., Villacres I., Kawahara R., Sasaki M., et al. Colistin-resistant *Escherichia coli* with *mcr* genes in the livestock of rural small-scale farms in Ecuador. BMC Res Notes. 2019;12(1):121. DOI: 10.1186/s13104-019-4144-0
 61. Lei L., Wang Y., Schwarz S., Walsh T.R., Ou Y., Wu Y., et al. *mcr-1* in Enterobacteriaceae from companion animals, Beijing, China, 2012–2016. Emerg Infect Dis. 2017;23(4):710-711. DOI: 10.3201/eid2304.161732
 62. Hormozi S.F., Vasei N., Aminianfar M., Darvishi M., Saeedi A.A. Antibiotic resistance in patients suffering from nosocomial infections in Besat Hospital. Eur J Transl Myol. 2018;28(3). DOI: 10.4081/ejtm.2018.7594
 63. Denys G.A., Relich R.F. Antibiotic resistance in nosocomial respiratory infections. Clin Lab Med. 2014;34(2):257-270. DOI: 10.1016/j.cll.2014.02.004
 64. Heydarpour F., Rahmani Y., Heydarpour B., Asadmobini A. Nosocomial infections and antibiotic resistance pattern in open-heart surgery patients at Imam Ali Hospital in Kermanshah, Iran. GMS Hyg Infect Control. 2017;12:Doc07. DOI: 10.3205/dgkh000292
 65. Liu S., Wang M., Zheng L., Guan W. Antimicrobial resistance profiles of nosocomial pathogens in regional China: a brief report from two tertiary hospitals in China. Med Sci Monit. 2018;24:8602-8607. DOI: 10.12659/MSM.911229
 66. Caselli E., D'Accolti M., Soffritti I., Piffanelli M., Mazzacane S. Spread of *mcr-1*-driven colistin resistance on hospital surfaces, Italy. Emerg Infect Dis. 2018;24(9):1752-1753. DOI: 10.3201/eid2409.171386
 67. Haenni M., Poirel L., Kieffer N., Châtre P., Saras E., Métayer V., et al. Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. Lancet Infect Dis. 2016;16(3):281-282. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00007-4
 68. Shafiq M., Huang J., ur Rahman S., Shah J.M., Chen L., Gao Y., et al. High incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* coharboring *mcr-1* and *bla*CTX-M-15 recovered from pigs. Infect Drug Resist. 2019;12:2135-2149. DOI: 10.2147/IDR.S209473
 69. Yao X., Doi Y., Zeng L., Lv L., Liu J.-H. Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. Lancet Infect Dis. 2016;16(3):288-289. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00057-8
 70. Hammad A.M., Hoffmann M., Gonzalez-Escalona N., Abbas N.H., Yao K., Koenig S., et al. Genomic features of colistin resistant *Escherichia coli* ST69 strain harboring *mcr-1* on IncHI2 plasmid from raw milk cheese in Egypt. Infect Genet Evol. 2019;73:126-131. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.04.021
 71. He T., Wei R., Zhang L., Sun L., Pang M., Wang R., et al. Characterization of NDM-5-positive extensively

- resistant *Escherichia coli* isolates from dairy cows. *Vet Microbiol.* 2017;207:153-158. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.06.010
72. Wu L., Chen J., Wang L., Wu Z. Whole genome sequence of an MCR-1-carrying, extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* ST746 isolate recovered from a community-acquired urinary tract infection. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;13:171-173. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.03.014
 73. Garza-Ramos U., Tamayo-Legorreta E., Arellano-Quintanilla D.M., Rodriguez-Medina N., Silva-Sanchez J., Catalan-Najera J., et al. Draft genome sequence of a multidrug- and colistin-resistant *mcr-1*-producing *Escherichia coli* isolate from a swine farm in Mexico. *Genome Announc.* 2018;6(10). DOI: 10.1128/genomeA.00102-18
 74. Zurfluh K., Stevens M., Bucher M., Poirel L., Nordmann P., Stephan R. Full genome sequence of pT3, a multiresistant plasmid carrying the *mcr-3.5* colistin resistance gene, recovered from an extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolate from crickets sold as food. *Microbiol Resour Announc.* 2019;8(29). pii: e00647-19. DOI: 10.1128/MRA.00647-19
 75. Poirel L., Nordmann P. Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2326-2327. DOI: 10.1093/jac/dkw074
 76. Liu X., Geng S., Chan E.W.-C., Chen S. Increased prevalence of *Escherichia coli* strains from food carrying *bla*NDM and *mcr-1*-bearing plasmids that structurally resemble those of clinical strains, China, 2015 to 2017. *Eurosurveillance.* 2019;24(13). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.13.1800113
 77. Giani T., Sennati S., Antonelli A., Di Pilato V., di Maggio T., Mantella A., et al. High prevalence of carriage of *mcr-1*-positive enteric bacteria among healthy children from rural communities in the Chaco region, Bolivia, September to October 2016. *Eurosurveillance.* 2018;23(45). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800115
 78. Tarabai H., Valcek A., Jamborova I., Vazhov S.V., Karyakin I.V., Raab R., et al. Plasmid-mediated *mcr-1* colistin resistance in *Escherichia coli* from a black kite in Russia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(9):e01266-19. DOI: 10.1128/AAC.01266-19
 79. Ruzauskas M., Vaskeviciute L. Detection of the *mcr-1* gene in *Escherichia coli* prevalent in the migratory bird species *Larus argentatus*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2333-2334. DOI: 10.1093/jac/dkw245
 80. Ahmed Z.S., Elshafiee E.A., Khalefa H.S., Kadry M., Hamza D.A. Evidence of colistin resistance genes (*mcr-1* and *mcr-2*) in wild birds and its public health implication in Egypt. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8(1):197. DOI: 10.1186/s13756-019-0657-5
 81. Pfennigwerth N., Kaminski A., Korte-Berwanger M., Pfeifer Y., Simon M., Werner G., et al. Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in Enterobacteriales. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(11):1385-1389. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.03.017
 82. Satlin M.J., Lewis J.S., Weinstein M.P., Patel J., Humphries R.M., Kahlmeter G., et al. Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Position Statements on Polymyxin B and Colistin Clinical Breakpoints. *Clin Infect Dis.* 2020;71(9):e523-e529. DOI: 10.1093/cid/ciaa121
 83. Weinstein M.P., Kirn Jr. T.J., Lewis II J.S., Limbago B., Bobenchik A.M., Mathers A.J., et al. CLSIM100-ED30:2020 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition.
 84. Bardet L., Rolain J.-M. Development of new tools to detect colistin-resistance among Enterobacteriaceae strains. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2018;2018:1-25. DOI: 10.1155/2018/3095249
 85. Tsuji B.T., Pogue J.M., Zavascki A.P., Paul M., Daikos G.L., Forrest A., et al. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 2019;39(1):10-39. DOI: 10.1002/phar.2209
 86. Mouton J.W., Muller A.E., Canton R., Giske C.G., Kahlmeter G., Turnidge J. MIC-based dose adjustment: facts and fables. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(3):564-568. DOI: 10.1093/jac/dkx427
 87. CLSI-EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016. Available from: www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf.
 88. Jerke K.H., Lee M.J., Humphries R.M. Polymyxin susceptibility testing: a cold case reopened. *Clin Microbiol Newsl.* 2016;38(9):69-77. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2016.04.003
 89. Carretto E., Brovarone F., Russello G., Nardini P., El-Bouseary M.M., Aboklaish A.F., et al. Clinical validation of SensiTest Colistin, a broth microdilution-based method to evaluate colistin MICs. *J Clin Microbiol.* 2018;56(4). pii: e01523-17. DOI: 10.1128/JCM.01523-17
 90. 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
 91. 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
 92. Bosacka K., Kozińska A., Stefaniuk E., Rybicka J., Mikołajczyk A., Młodzińska E., et al. Colistin antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria – evaluation of tests available in Poland. *Proceedings of 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21-24 April, 2018, Madrid, Spain.* E0116.

93. Coppi M., Cannatelli A., Antonelli A., Baccani 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
94. Singhal L., Sharma M., Verma S., Kaur R., Britto X.B., Kumar S.M., et al. Comparative evaluation of broth microdilution with polystyrene and glass-coated plates, agar dilution, E-Test, Vitek, and disk diffusion for susceptibility testing of colistin and polymyxin B on carbapenem-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist.* 2018;24(8):1082-1088. DOI: 10.1089/mdr.2017.0251
95. Karvanen M., Malmberg C., Lagerbäck P., Friberg L.E., Cars O. Colistin is extensively lost during standard *in vitro* experimental conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11). DOI: 10.1128/AAC.00857-17
96. Hindler J.A., Humphries R.M. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1678-1684. DOI: 10.1128/JCM.03385-12
97. Osei Sekyere J. Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *Microbiologyopen.* 2019;8(4):e00682. DOI: 10.1002/mbo3.682
98. Bell D.T., Bergman Y., Kazmi A.Q., Lewis S., Tamma P.D., Simner P.J. A novel phenotypic method to screen for plasmid-mediated colistin resistance among Enterobacteriales. *J Clin Microbiol.* 2019;57(5). pii: e00040-19. DOI: 10.1128/JCM.00040-19
99. 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
100. 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
101. Nordmann P., Jayol A., Poirel L. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. *J Clin Microbiol.* 2016;54(5):1395-1399. DOI: 10.1128/JCM.00446-16
102. 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
103. Lescat M., Poirel L., Nordmann P. Rapid multiplex polymerase chain reaction for detection of *mcr-1* to *mcr-5* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;92(4):267-269. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.010
104. Rebelo A.R., Bortolaia V., Kjeldgaard J.S., Pedersen S.K., Leekitcharoenphon P., Hansen I.M., et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance.* 2018;23(6). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672
105. 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
106. Daniels J.B., Campbell D., Boyd S., Ansari U., Lutgring J., Rasheed J.K., et al. Development and validation of a clinical laboratory improvement amendments-compliant multiplex real-time PCR assay for detection of *mcr* genes. *Microb Drug Resist.* 2019;25(7):991-996. DOI: 10.1089/mdr.2018.0417
107. Bontron S., Poirel L., Nordmann P. Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (*mcr-1*) from cultured bacteria and stools. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2318-2320. DOI:10.1093/jac/dkw139
108. 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
109. Nijhuis R.H.T., Veldman K.T., Schelfaut J., Van Essen-Zandbergen A., Wessels E., Claas E.C.J., et al. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in clinical isolates and stool specimens obtained from hospitalized patients using a newly developed real-time PCR assay: Table 1. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2344-2346. DOI: 10.1093/jac/dkw192
110. Li J., Shi X., Yin W., Wang Y., Shen Z., Ding S., Wang S. A multiplex SYBR Green real-time PCR assay for the detection of three colistin resistance genes from cultured bacteria, feces, and environment samples. *Front Microbiol.* 2017;8:2078. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02078
111. Tolosi R., Apostolakis I., Laconi A., Carraro L., Grilli G., Cagnardi P., et al. Rapid detection and quantification of plasmid-mediated colistin resistance genes (*mcr-1* to *mcr-5*) by real-time PCR in bacterial and environmental samples. *J Appl Microbiol.* 2020;129(6):1523-1529. DOI: 10.1111/jam.14738
112. Borowiak M., Baumann B., Fischer J., Thomas K., Deneke C., Hammerl J.A., et al. Development of a novel *mcr-6* to *mcr-9* multiplex PCR and assessment of *mcr-1* to *mcr-9* occurrence in colistin-resistant *Salmonella enterica* isolates from environment, feed, animals and food (2011-2018) in Germany. *Front Microbiol.* 2020;11:80. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00080
113. Bernasconi O.J., Principe L., Tinguely R., Karczmarek A., Perreten V., Luzzaro F., et al. Evaluation of a new commercial microarray platform for the simultaneous detection of β -lactamase and *mcr-1* and *mcr-2* genes in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2017;55(10):3138-3141. DOI: 10.1128/JCM.01056-17
114. WHO. Landscape of Diagnostics against Antibacterial Resistance, Gaps and Priorities.; 2019. Available at: www.who.int/publications/i/item/10665326480.
115. Alao E., Torres M.P., Cossette S., Connelly C. Detection of mobilized colistin resistance (*mcr*) genes by multiplex real-time PCR: improving surveillance of an emerging threat. 2019. Available at: www.streck.com/wp-content/

- uploads/2020/03/Detection-of-Mobilized-Colistin-Resistance-Genes-Esther-Alao.pdf.
116. Volland H., Vogel A., Bernabeu S., Boutal H., Haenni M., Madec J.-Y., et al. A multicentric validation of a rapid detection test for MCR-1 producing bacteria. Proceedings of 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21-24 April, 2018, Madrid, Spain. P2460.
 117. Liu Y.-Y., Chandler C.E., Leung L.M., McElheny C.L., Mettus R.T., Shanks R., et al. Structural modification of lipopolysaccharide conferred by *mcr-1* in Gram-negative ESKAPE pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):e00580-17. DOI: 10.1128/AAC.00580-17
 118. Dortet L., Bonnin R.A., Pennisi I., Gauthier L., Jousset A.B., Dabos L., et al. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: the MALDIxin test. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(12):3359-3367. DOI: 10.1093/jac/dky330
 119. Bitar I., Medvecky M., Gelbicova T., Jakubu V., Hrabak J., Zemlickova H., et al. Complete nucleotide sequences of *mcr-4.3*-carrying plasmids in *Acinetobacter baumannii* sequence type 345 of human and food origin from the Czech Republic, the first case in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(10). pii: e01166-19. DOI: 10.1128/AAC.01166-19
 120. Zurfluh K., Tasara T., Poirel L., Nordmann P., Stephan R. Draft genome sequence of *Escherichia coli* S51, a chicken isolate harboring a chromosomally encoded *mcr-1* gene. *Genome Announc.* 2016;4(4). pii: e00796-16. DOI: 10.1128/genomeA.00796-16
 121. Gilrane V.L., Lobo S., Huang W., Zhuge J., Yin C., Chen D., et al. Complete genome sequence of a colistin-resistant *Escherichia coli* strain harboring *mcr-1* on an IncHI2 plasmid in the United States. *Genome Announc.* 2017;5(42):e01095-17. DOI: 10.1128/genomeA.01095-17
 122. Borowiak M., Hammerl J.A., Fischer J., Szabo I., Malorny B. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B sequence type 28 harboring *mcr-1*. *Genome Announc.* 2017;5(37):e00991-17. DOI: 10.1128/genomeA.00991-17
 123. Lindsey R.L., Batra D., Rowe L., Loparev V.N., Stripling D., Garcia-Toledo L., et al. High-quality genome sequence of an *Escherichia coli* O157 strain carrying an *mcr-1* resistance gene isolated from a patient in the United States. *Genome Announc.* 2017;5(11). pii: e01725-16. DOI: 10.1128/genomeA.01725-16
 124. Ewers C., Göttig S., Bülte M., Fiedler S., Tietgen M., Leidner U., et al. Genome sequence of avian *Escherichia coli* strain IHIT25637, an extraintestinal pathogenic *E. coli* strain of ST131 encoding colistin resistance determinant *mcr-1*. *Genome Announc.* 2016;4(5):e00863-16. DOI: 10.1128/genomeA.00863-16
 125. Xavier B.B., Lammens C., Butaye P., Goossens H., Malhotra-Kumar S. Complete sequence of an IncFII plasmid harbouring the colistin resistance gene *mcr-1* isolated from Belgian pig farms. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2342-2344. DOI: 10.1093/jac/dkw191
 126. Gao R., Wang Q., Li P., Li Z., Feng Y. Genome sequence and characteristics of plasmid pWH12, a variant of the *mcr-1*-harbouring plasmid pHNSHP45, from the multi-drug resistant *E. coli*. *Virulence.* 2016;7(6):732-735. DOI: 10.1080/21505594.2016.1193279
 127. Jia B., Raphenya A.R., Alcock B., Waglechner N., Guo P., Tsang K.K., et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 2016;45(D1):D566-D573. DOI: 10.1093/nar/gkw1004
 128. Suzuki S., Ohnishi M., Kawanishi M., Akiba M., Kuroda M. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):284-285. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00008-6
 129. Gupta S.K., Padmanabhan B.R., Diene S.M., Lopez-Rojas R., Kempf M., Landraud L., et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):212-220. DOI: 10.1128/AAC.01310-13
 130. Liu B., Pop M. ARDB – Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D443-D447. DOI: 10.1093/nar/gkn656
 131. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2640-2644. DOI: 10.1093/jac/dks261
 132. Khedher M. Ben, Baron S.A., Riziki T., Ruimy R., Diene S.M., Rolain J.-M. Massive analysis of 64'628 bacterial genomes to decipher a water reservoir and origin of mobile colistin resistance (*mcr*) gene variants: is there another role for this family of enzymes? *bioRxiv.* 2019;33:763474. DOI: 10.1101/763474
 133. Bozcal E. Insight into the mobilome of *Escherichia coli*. *Intech.* 2016;i(tourism):13. DOI: 10.5772/57353
 134. 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
 135. Eichhorn I., Feudi C., Wang Y., Kaspar H., Feßler A.T., Lübke-Becker A., et al. Identification of novel variants of the colistin resistance gene *mcr-3* in *Aeromonas* spp. from the national resistance monitoring programme GERM-Vet and from diagnostic submissions. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(5):1217-1221. DOI: 10.1093/jac/dkx538
 136. Wang X., Wang Y., Zhou Y., Wang Z., Wang Y., Zhang S., et al. Emergence of colistin resistance gene *mcr-8* and its variant in *Raoultella ornithinolytica*. *Front Microbiol.* 2019;10:228. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00228
 137. Ma F., Shen C., Zheng X., Liu Y., Chen H., Zhong L., et al. Identification of a novel plasmid carrying *mcr-4.3* in an *Acinetobacter baumannii* strain in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(6). pii: e00133-19. DOI: 10.1128/AAC.00133-19
 138. Gelbíčová T., Baráková A., Florianová M., Karpíšková R. [Detection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* with the *mcr-4* gene]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2019;25(1):4-6. PMID: 31266086
 139. Martins-Sorenson N., Snesrud E., Xavier D.E., Cacci L.C., Iavarone A.T., McGann P., et al. A novel plasmid-encoded

- mcr-4.3* gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. J Antimicrob Chemother. 2020;75(1):60-64. DOI: 10.1093/jac/dkz413
140. Hameed F., Khan M.A., Muhammad H., Sarwar T., Bilal H., Rehman T.U. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;52:e20190237. DOI: 10.1590/0037-8682-0237-2019
141. Snesrud E., Maybank R., Kwak Y.I., Jones A.R., Hinkle M.K., McGann P. Chromosomally encoded *mcr-5* in colistin-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(8):e00679-18. DOI: 10.1128/AAC.00679-18
142. Wojnicz D., Tichaczek-Goska D. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. Braz J Microbiol. 2013;44(1):259-265. DOI: 10.1590/S1517-83822013000100037
143. Sato Y., Unno Y., Ubagai T., Ono Y. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. PLoS One. 2018;13(3):e0194556. DOI: 10.1371/journal.pone.0194556
144. Aslam B., Wang W., Arshad M.I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M.H., et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infect Drug Resist. 2018;11:1645-1658. DOI: 10.2147/IDR.S173867
145. Sharland M., Pulcini C., Harbarth S., Zeng M., Gandra S., Mathur S., et al. Classifying antibiotics in the WHO Essential Medicines List for optimal use-be AWaRe. Lancet Infect Dis. 2018;18(1):18-20. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30724-7
146. Harbottle H., Thakur S., Zhao S., White D.G. Genetics of antimicrobial resistance. Anim Biotechnol. 2006;17(2):111-124. DOI: 10.1080/10495390600957092