



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Департман за ветеринарску медицину



Лара Шиљкут

КОЛИСТИН-УПОТРЕБА, ЗНАЧАЈ И
ПОЈАВА РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

Дипломски рад

Нови Сад, 2021.



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Департман за ветеринарску медицину



Кандидат:
Лара Шиљкут

Ментор:
проф. др Весна Лалошевић

КОЛИСТИН-УПОТРЕБА, ЗНАЧАЈ И ПОЈАВА РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

Дипломски рад

Нови Сад, 2021.

КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ ДИПЛОМСКОГ РАДА

Др Весна Лалошевић, редовни професор - Ментор

*за ужу научну област Ветеринарска микробиологија и заразне болести
животиња*

Пољопривредни факултет, Нови Сад

Департман за ветеринарску медицину

Др Вук Врачар, доцент - Председник комисије

за ужу научну област Болести животиња и хигијена анималних производа

Пољопривредни факултет, Нови Сад

Департман за ветеринарску медицину

Др Станислав Симин, доцент – III члан

*за ужу научну област Ветеринарска микробиологија и заразне болести
животиња*

Пољопривредни факултет, Нови Сад

Департман за ветеринарску медицину

КРАТАК САДРЖАЈ

Колистин, такође познат и под називом полимиксин Е припада фамилији катјонских полипептида. Овај антибиотик је откривен још давне 1947. године изолацијом из бактерије *Paenibacillus polymixa* (претходно: *Bacillus polymixa* var. *colistinus*). Колистин се користио за третирање инфекција изазваних Грам-негативним бактеријама (ферментативне: *Escherichia coli*; *Klebsiella* spp.; *Salmonella* spp. и неферментативне: *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*). Наиме, механизам деловања полимиксина није у потпуности изучен, али се сматра да укључује везивање за липополисахариде и фосфолипиде у спољашњој мембрани Грам-негативних бактерија што доводи до пуцања ћелијске мембране и резултира ћелијском смрћу. Колистин се употребљава у облику соли сулфата (колистин сулфат) за оралну, инхалаторну и топикалну примену и у облику колистин метансулфонат натријума за парентералну употребу. У хуманој и ветеринарској медицини, колистин је први пут употребљен 1952. године, међутим, открићем других, ефикаснијих и мање токсичних антибиотика, употреба овог лека је готово потпуно занемарена у периоду од 1970их година па на даље. Примена у ветеринарској медицини, поготово код фармских животиња, пре свега живине, свиња и говеда је настављена и након овог периода, те се тако колистин користио како у клиничком лечењу (пре свега код инфекција изазваних бактеријама из *fam. Enterobacteriaceae.*), тако и у профилактичке сврхе и као промотор раста.

У последњих десетак година значајан пораст у преваленцији мултирезистентних сојева Грам-негативних бактерија је поново пробудио интересовање за полимиксине, нарочито за полимиксин Е, због његове ефикасности, поготово код сојева резистентних на карбапенеме. Колистин се показао ефикасним у случају мултипле резистенције бактерија отпорних на β -лактаме, аминогликозиде или хинолоне, те се сматра да представља последњу линију одбране код мултирезистентних бактеријских инфекција људи. Из овог разлога је Светска здравствена организација (World Health Organisation-WHO)

колистин сврстала у групу пресудно значајних антибиотика у хуманој медицини, под категоријом Б, тиме подразумевајући ограничавање администрације у ветеринарској медицини како би се смањила опасност по јавно здравље. Према Европској агенцији за одобравање медицинских производа (ЕМА) антибиотици из Б категорије би требало да се користе искључиво у случајевима када антимикуробна средства из категорија Ц и Д нису ефикасна са клиничког становишта или не постоји друга алтернатива.

До пре пар година појава резистенције на колистин је била занемарљива и сматрало се да је ограничена само на хромозомске мутације, међутим крајем 2015. године откривен је преносиви плазмидом-посредовани ген који има способност да се великом брзином шири међу бактеријским врстама и домаћинима, који је изазвао значајну бригу за опште здравље широм света. Епидемиолошка испитивања и велика раширеност употребе колистина при узгоју животиња су довела до уверења да се резистенција на ово антимикуробно средство заиста појавила, те да постоји могућност преношења исте са животиња на људе. У новембру 2015. године, група кинеских научника је пријавила појаву преносивог плазмидом-посредованог гена за резистенцију названог *mcr-1* (*mobile colistin resistance*) чиме је овај наизглед контролисани проблем постао глобалан.

Кључне речи: колистин, резистенција, плазмиди, гени резистенције, *mcr*, јавно здравље

SUMMARY

Colistin, also known as polymyxin E is a member of the family of cationic polypeptides. This antibiotic was primarily isolated in 1947 as a fermentation product of *Bacillus polymyxa* (prev. *Bacillus polymixa* var. *colistinus*). Colistin was used in the treatment of Gram-negative bacterial infections (fermentative: *Escherichia coli*; *Klebsiella* spp.; *Salmonella* spp. and nonfermentative: *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*). Although its mechanism of action isn't completely known, it is considered to include binding to the lipopolysaccharides (LPS) and phospholipids in the outer membrane of Gram-negative bacteria, in that way disrupting the cell's membrane and resulting in the cell's death. Colistin is used in the form of sulfate salts (colistin sulfate) for oral, inhalational, and topical use, and also in the form of colistin methanesulfonate sodium for parenteral use. In human and veterinary medicine, colistin was first used in 1952, however, with the discovery of other, more efficient and less toxic antibiotics, usage of this drug was almost entirely abandoned since the 1970s. Usage in veterinary medicine, especially in farm animals, primarily chicken, swine, and cattle has continued even after this period, so colistin was used both in clinical treatment (infections caused by species from fam. *Enterobacteriaceae*), but also for prophylactic purposes and as a growth promoter.

The significant increase in the prevalence of multi-drug resistant strains of Gram-negative bacteria over the past decade has lead to a renewed interest in polymyxins, especially in polymyxin E because of its efficiency, particularly in carbapenem-resistant strains. Colistin has shown to be efficient in cases of multi-resistant bacteria which are unsusceptible to β -lactams, aminoglycosides, or quinolones, so it is considered to be the last line of defense against human infections caused by MDR (multidrug-resistant) bacteria. Because of this, the World Health Organisation (WHO) has reclassified colistin in the category of "very high importance for human medicine (category B)", meaning its administration in veterinary medicine should be limited to reduce the danger to public health. European Medicines Agency (EMA) states

that antibiotics in category B should be reserved for treatment when antimicrobials in categories C or D are not, from a clinical point of view, effective and there is no other alternative.

Until recently, resistance to colistin was considered to be low and it was thought to be acquired solely via chromosomal point mutations. However, at the end of 2015, a plasmid-mediated colistin resistance gene was discovered, which could rapidly spread between bacterial species and hosts and has raised worldwide concern. Epidemiological researches and the widespread use of colistin in animal husbandry have led to the belief that transmissible colistin resistance had emerged and is being transferred from animals to humans. In November 2015, a group of Chinese scientists has reported an occurrence of a transferable plasmid-mediated gene of resistance named *mcr-1* (*mobile colistin resistance*) which made this seemingly contained problem global.

Keywords: colistin, resistance, plasmids, resistance genes, mcr, public health

САДРЖАЈ

КРАТАК САДРЖАЈ	1
SUMMARY	1
1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. Механизам деловања колистина.....	3
2.2. Дозирање КМС/колистин базе	5
2.3. Токсичност и нежељени ефекти.....	6
2.4. Употреба колистина код људи	7
2.5. Употреба колистина у ветеринарској медицини.....	11
2.6. Резистенција на колистин.....	16
2.7. Плазмидом посредована резистенција и откриће <i>mcr</i> (multiple colistin resistance) гена	20
2.7.1. Откриће детерминанти мобилне колистинске резистенције	22
2.7.2. Типови гена мобилне колистинске резистенције (<i>mcr</i>)	23
2.7.3. Преваленција <i>mcr</i> гена код животиња и продуката животињског порекла	27
2.7.4. Преваленција <i>mcr</i> гена у аквакултури.....	29
2.7.4. Трансмисија између људи и животиња путем ланца производње хране.....	30
2.7.5. Епидемиолошки приступи	31
2.7.6. Испитивања осетљивости на колистин	32
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА.....	33
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	34
5. ЗАКЉУЧАК	35
6. ЛИТЕРАТУРА	36

1. УВОД

Полимиксини су стара класа цикличних полипептидних антибиотика која је откривена 1947. године изолацијом из *Paenibacillus polymyxa* (раније *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*). Полимиксин Б и полимиксин Е су секундарни метаболити нерибозомалних пептида продукованих од стране бактерије тла *P. polymyxa*. [1] Колистин (полимиксин Е) је поликатјонски пептид, откривен у Јапану. Спада у групу полимиксинских антибиотика са хидрофилним и липофилим својствима. Полимиксинска група обухвата пет различитих хемијских једињења (полимиксини А, Б, Ц, Д и Е), међутим само два (полимиксин Б и полимиксин Е) су у клиничкој употреби. Доступне су две форме колистина за клиничку употребу, а то су колистин метансулфонат натријум за парентералну употребу и колистин сулфат за оралну, инхалаторну или топикалну употребу. [2]

У хуманој и ветеринарској медицини, колистин је први пут употребљен 1952. године, међутим током 1970их и 1980их у хуманој медицини готово да престаје да се користи, док се употреба у ветеринарској медицини и даље практикује. [2] Иако се показао ефикасним против хуманих инфекција изазваних узрочницима из фамилије *Enterobacteriaceae*, убрзо је замењен услед његове системске токсичности. У ветеринарској медицини, колистин се широко користио за превенцију, третман, метафилаксу и промоцију раста. [3]

Током последње деценије колистин почиње да се користи код људи као последњи вид одбране код инфекција мултирезистентним сојевима Грам-негативних бацила (пре свега карбапенемаза-продукујућих ентеробактерија, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Acinetobacter baumannii*). Светска здравствена организација (World Health Organisation-WHO) и друге владине организације попут Health Canada су рекласификовале колистин у категорију од веома високог значаја за хуману медицину. [2]

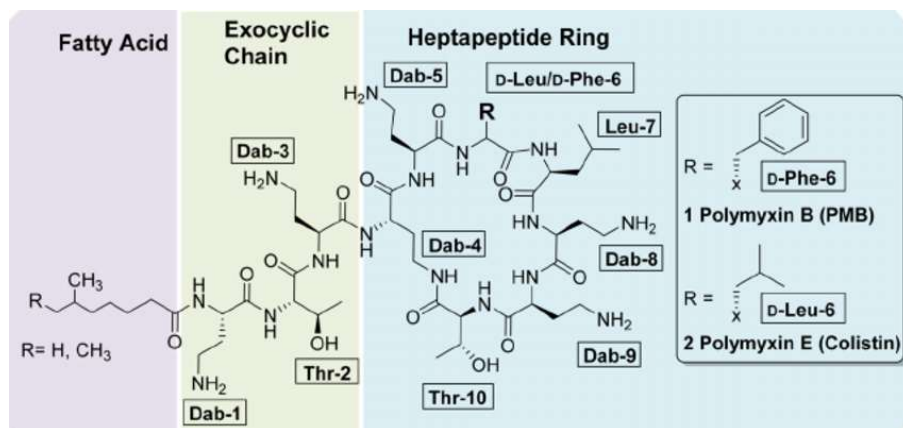
Светска здравствена организација је колистин сврстала у групу пресудно значајних антибиотика, под категоријом Б, тиме подразумевајући ограничавање

администрације у ветеринарској медицини како би се смањила опасност по јавно здравље. Према Европској агенцији за одобравање медицинских производа (ЕМА) антибиотици из Б категорије би требало да се користе искључиво у случајевима када антимикумна средства из категорија Ц и Д нису ефикасна са клиничког становишта или не постоји друга алтернатива. У овој категорији се поред полимиксина налазе и хинолони (флуорохинолони и други хинолони), цефалоспорини треће и четврте генерације (осим инхибитора бета лактамаза). Генерално, употреба антибиотика би требало да се обавља на основу антибиограма, поготово за антибиотике из категорије Б. [2]

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Механизам деловања колистина

Полимиксин Б и колистин (полимиксин Е) спадају у полимиксински комплекс, у цикличну липопептидну групу антимикуробних лекова. Полимиксин-декапептид закачен за масни бочни ланац је први пут изолован 1947. године као продукт ферментације *Paenibacillus polymixa* (раније: *Bacillus polymixa*) [4]. Полимиксин Б и колистин се разликују само у једној аминокиселини на позицији 6 пептидног прстена и због тога се колистин примењује као инактивисана форма, у облику колистин метансулфоната. Обе супстанце имају сличан механизам и спектар деловања [5,7]. Колистин врши компетитивну размену бивалентних катјона у липидној мембрани и то путем везивања липида А липополисахарида спољашње мембране Грам-негативних бактерија. Ова електростатска интеракција између катјона колистина и негативно наелектрисаног липополисахарида доводи до промене у организацији спољашње мембране, „цурења“ бактеријског садржаја и ћелијске смрти [8].



Слика 1: Приказ грађе полимиксина Б и полимиксина Е (https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-Polymyxin-B-1-and-Polymyxin-E-Colistin-2_fig1_289524053)

Колистин је мултикомпонентни, полипептидни антибиотик који се у већем делу састоји од колистина А и колистина Б. Полимиксин Б и колистин су секундарни метаболити нерибозомалних пептида који имају сличну примарну секвенцу која се разликује само у позицији 6 где се код полимиксина Б налази D-Phe, а код полимиксина Е D-Leu. Колистин сулфат и колистин метансулфонат (КМС) су две форме колистина. КМС настаје у реакцији колистина са формалдехидом и натријум бисулфатом, што резултира додавањем сулфометил група примарним аминима у колистину [9]. Иако је КМС облик колистина који се апликује парентерално, пролази конверзију *in vivo* у форму колистина која је одговорна за антибактеријску активност и стога би КМС требало да се сматра инактивном формом. Важност Н-терминалног масног ацил сегмента за антимикуробна својства полимиксина су првобитно постала евидентна када су откривени полимиксин нонапептиди. Иако полимиксин Б и колистин нонапептиди немају директну антимикуробну активност, имају исту способност везивања за липополисахариде са великом специфичношћу и оштећењем спољашње мембране, што такође помаже повећавању осетљивости Грам-негативних бактерија за хидрофобне антибиотике који нормално не делују на њих [10].

Колистин Л-диаминобутерна киселина, која је позитивно наелектрисана се везује путем електростатичке интеракције за негативно наелектрисане фосфатне групе липида А, значајне компоненте липополисахарида Грам-негативних бацила. Липид А има круцијалну улогу у пропустљивости ћелијског зида бактерија и разменом са спољашњом средином. Колистин компетитивно инхибира двовалентне катјоне калцијума (Ca^{2+}) и магнезијума (Mg^{2+}) тиме оштећујући структуру липополисахарида. Колистин потом убацује хидрофобни терминални ацил масни ланац, што доводи до ширења спољашње мембране и уласка колистина у бактеријску ћелију. Долази до продирања спољашње мембране, дозвољавајући тиме колистину да прође кроз спољашњу мембрану. Фосфолипидни двослој унутрашње мембране присутан само код Грам-негативних бактерија губи стабилност, укључивањем хидрофилних група у масним ланцима, мењајући интегритет и доводећи до оштећења и ћелијске лизе, при чему не може да одржи ћелијски садржај што доводи до ћелијске лизе. Везивањем за липид А,

колистин такође испољава анти-ендотоксинску активност, спречавајући индукцију шока од стране ендотоксина. Суштински, колистин лизира ћелијску мембрану у бактерија, доводећи до бактерицидног ефекта [2].

Због природе свог антибактеријског деловања, колистин је инактиван против Грам-позитивних бактерија, Грам-негативних кока и *Mycoplasma spp.* Штавише *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, и *Burkholderia spp.* су урођено резистентне на овај лек, стога је спектар деловања колистина узак и обухвата ферментативне (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*) и неферментативне (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*) Грам-негативне бактерије [7].

2.2. Дозирање КМС/колистин базе

Дозирање колистин метансулфоната код људи, предложено од стране произвођача у Сједињеним Америчким Државама износи 2,5-5 mg/kg (31,250-62,500 IU/kg) дневно, подељено у две једнаке дозе [5]. Препоручљиво је прилагођавање доза код пацијената са благом до умереном бубрежном дисфункцијом, нарочито у случају да је ниво креатинина у серуму 1,3-1,5; 1,6-2,5 или $\geq 2,6$ mg/dl, у том случају, препоручена доза код озбиљних инфекција износи 2 милиона IU на сваких 12,24 или 36h [6]. Код пацијената са бубрежном инсуфицијенцијом, који захтевају хемодијализу, препоручена доза износи 2-3 mg/kg након сваког третмана хемодијализе, односно 2mg/kg дневно током перитонеалне дијализе [1].

Два најчешћа комерцијално доступна препарата колистин метансулфоната су Colomycin (Dumex-Alpha A/S, Copenhagen, Denmark) и Coly-Mycin (Parkdale Pharmaceuticals, NY, USA). Значајно је истаћи да је препоручена дневна доза Colomycin-а (400-800mg) готово дупло већа од препоручене дневне дозе за Colomycin (240-480mg) код пацијената са нормалном бубрежном функцијом и телесном тежином од око 60kg [1].

Треба истаћи и да постоје значајне разлике у препорученим дозама за Европске и Америчке производе. Доза препоручена од стране произвођача у Уједињеном Краљевству је 4-6 mg/kg (50.000-75.000 IU/kg) и то у три подељене

дозе за одрасле и децу телесне масе ≤ 60 kg, док износи 80-160 mg (1-2 милиона IU) на сваких 8 часова за особе телесне масе >60 kg. Када се колистин даје путем инхалације, препоручена доза од стране произвођача у Уједињеном Краљевству износи 40mg (500.000 IU) на сваких 12h за пацијенте телесне масе ≤ 40 kg и 80 mg (1 million IU) на сваких 12 часова за пацијенте телесне масе >40 kg [5].

Чист колистин има потентност од 30.000IU/mg, док колистин метансулфонат има потентност од 12.500IU/mg, те је важно нагласити да се препоруке у вези са дозирањем односе на колистинску базу и колистин мета сулфонат, како би се избегла евентуална конфузија [1].

КМС се углавном даје у трајању од 10-14 дана, а режими дозирања значајно варирају. Дозе су прилагођене на основу бубрежне функције, зависно од нивоа серумског креатинина или клиренса креатинина [1].

2.3. Токсичност и нежељени ефекти

Нефротоксичност и неуротоксичност су најчешћи нежељени ефекти полимиксина. Токсичност зависи од дозе и реверзибилна је по престанку третмана. Тачни механизми токсичности, међутим нису познати. Полимиксини су довођени у везу са високим нивоом нефротоксичности. Укупна кумулативна доза КМС-а (колистин метансулфоната) се доводи у везу са оштећењем бубрега, при чему важи мишљење да скраћивањем трајања третмана може доћи до пада инциденције нефротоксичности. Претходне студије су показале да је нефротоксичност на КМС упоредива са оном код аминогликозида, за које се првобитно мислило да су мање токсични, те су заменили употребу колистина пре 40ак година. Употреба полимиксина је напуштена током раних 1970их година због појаве пацијената са абнормалном бубрежном функцијом због нефротоксичних нуспојава. Просечно 10-37% пацијената који су примали КМС у дозама 5-12mg/kg/дан су имали повишен ниво креатинина у серуму. Ретроспективна кохортна студија спроведена од стране *Kwon*-а и сар. је идентификовала предикторе акутног оштећења бубрега у вези са интравенском употребом колистин метансулфоната. Посматрана су 72 пацијента (одрасле особе)

који су примали КМС $\geq 72h$. Средња укупна доза КМС је износила 54,3mg/kg. У овој студији акутно оштећење бубрега се развило код 53,5% пацијената [11]. Неуротоксичност се није испоставила као значајан проблем током третмана колистином. Инциденција неуротоксичности у претходним студијама је износила просечно 7% [12]. Изузетно, у ретким случајевима су уочени вртоглавица, слабост, сметње при виду и неуромускуларне блокаде које доводе до инсуфицијенције дисања [13].

2.4. Употреба колистина код људи

Након открића, колистин је употребљаван у хуманој медицини за третман инфекција изазваних Грам-негативним бактеријама, међутим због појаве озбиљних нуспојава попут неуро и нефротоксичности, потентнији и мање токсични лекови попут хинолона и β -лактама су током 1970их година заменили колистин. Током наредних 20 година, администрација колистина је била углавном ограничена на топикалну и офталмолошку примену, док се системска употреба сводила на третман секундарних инфекција код пацијената који болују од цистичне фиброзе [7]. Током последње две деценије, ситуација се драстично променила. Појава мултирезистентних, екстремно резистентних или чак панрезистентних бактеријских сојева се сматра одговорном за смрт око 700 000 људи годишње и верује се да ће овај број само расти и до 2050. бити већи од броја људи оболелих од рака. Обзиром да смо се довели веома близу „постантибиотске ере“, колистин је поново враћен у употребу као лек последње линије одбране за инфекције изазване карбапенемаза продукујућим бактеријама, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [14].

У последњих неколико година, са несташицом антимикробних средстава, постоји повећано интересовање за застареле антибиотике попут колистина. Колистин се испоставио као лек избора код инфекција Грам-негативним бактеријама које испољавају мултиплу резистенцију на различите антибиотике. Због испољене нефротоксичности и неуротоксичности, употреба колистина је скоро у потпуности напуштена још прошлог века, међутим употреба овог антибиотика је доживела препород у лечењу критично болесних пацијената. У вези

са интравенском употребом колистина, сматра се да постоје три значајна раздобља: 1950-1970 за лечење Грам-негативних инфекција генерално; 1990-2000 код цистичне фиброзе праћене мултирезистентним Грам-негативним инфекцијама и од почетка миленијума па до сада, за лечење инфекција изазваних мултирезистентним сојевима Грам-негативних бактерија [2].

Постоји интернационални консензус за коришћење колистина у терапији, односно препоруке за оптималну клиничку употребу колистина [15]. Колистин често представља последњу линију одбране против мултирезистентних Грам-негативних бактерија попут карбапенемаза-продукујућих *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, и *Acinetobacter spp.* Упркос томе Грам-негативне бактерије, попут *Brucella spp.*, *Burkholderia cepacia*, *Helicobacter pylori*, *Edwardsiella spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria spp.*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, и *Stenotrophomonas mallei*, генерално не показују осетљивост на колистин, док осетљивост *Campylobacter spp.* значајно варира. Међутим, нарочито је коришћен у критичним клиничким стањима попут бактеријемije и сепсе или пнеумоније у вези са респираторима на одељењима за интензивну негу. За још неколико клиничких стања попут инфекција уринарног тракта, пнеумонија, апсцеса, пиодерме и инфекција меких ткива, као и инфекција ока и уха, колистин се показао као добра алтернатива. Са друге стране миастениа гравис и хиперсензитивност на полимиксине су стања у којима је контраиндикована употреба колистина, а поред тога не постоје ни научне чињенице за безбедност употребе колистина код жена које доје. Колистин би требало да буде примењиван пажљиво уз правилну корекцију дозе и то под константним надзором пацијената са бубрежним оштећењима због могуће нефротоксичности. Интравенска употреба полимиксина је препоручена за третман озбиљних мултирезистентних инфекција изазваних *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, и *Enterobacteriaceae* врстама. Интравезикална примена колистина у терапији перзистентних инфекција уринарног тракта изазваних са *Acinetobacter baumannii* је описана, као и интратекална употреба у случајевима менингитиса због мале пермеабилности колистина кроз хематоенцефалну баријеру [16]. Селективна деконтаминација дигестивног тракта се користи при интензивној нези, при чему се колистин може употребљавати орално заједно са третманом парентералним антибиотицима широког спектра. Упркос постојању научних чињеница које иду у прилог овој

пракси за превенцију бактеријемije, односно морталитета, на жалост у дужем временском периоду примећен је пораст резистенције на колистин код ESBL-продукујућих сојева *K. pneumoniae* [17]. Поједини аутори предлажу инхалацију колистина као монотерапију или у вези са системском терапијом код третмана хроничних упала плућа и пнеумоничних процеса изазваних мултирезистентним сојевима Грам-негативних бактерија [18].

За парентералну употребу, колистин се даје у виду колистин метансулфоната (КМС). Употреба колистин метансулфоната је почела током раних 1990их година и то путем интравенске и инхалаторне примене за лечење инфекција изазваних *P.aeruginosa* код деце и одраслих пацијената са цистичном фиброзом. Третман са колистин метансулфонатом је описан у последњих 10-15 година. Велика кохортна студија спроведена од стране Falagas-а и сар. је показала да је колистин значајан антибиотик са прихватљивим нивоом нефротоксичности и значајном ефикасношћу која зависи од дневне дозе и места инфекције. Ова студија је укључивала колистинску терапију за 258 пацијената који су добијали колистин интравенским путем у трајању од најмање 72h за лечење инфекција изазваних мултирезистентним Грам-негативним бактеријским инфекцијама и то 65.9% *A. baumannii*, 26.4% *P. aeruginosa*, 7.0% *K. pneumoniae*, 0.4% *Stenotrophomonas maltophilia* и 10.4% *Enterobacter cloacae*. Укупно 79,1% пацијената је излечено, док је 10% испољило нефротоксичност. Ефикасност колистина није била зависна од типа патогена [1].

Колистин је такође употребљаван код пнеумонија људи на респиратору и бактеријемije проузроковане мултирезистентним бактеријама, попут *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii*. Иако се употреба колистина показала ефикасном, други антибиотици се често користе у комбинацији са колистином. Многе студије су показале добар исход како код пацијената третираних монотерапијом колистином или у комбинацији са са другим антибиотикима [1].

Фармакодинамика и фармакокинетика даје значајне информације за употребу колистина у виду монотерапије. Наиме, мало је вероватно да ће монотерапијом бити постигнути довољни нивои у плазми, међутим вероватноћа за појаву резистенције је значајна. Из овог разлога, комбинована терапија изгледа да има већи клинички успех, док је појава резистенције смањена. *In vitro*

испитивања такође указују на предност комбиноване у односу на монотерапију колистином. Неколико истраживања (*in vitro* и *in vivo*-модел на мишевима) су показала да употреба колистина са другим антибиотцима, попут рифампицина и имипенема има боље перформансе у односу на самосталну примену полимиксина, међутим научници предлажу да се такав приступ треба додатно испитати *in vivo*, те да овај вид терапије треба бити резервисан за критично болесне пацијенте са пнеумонијом изазваном мултирезистентним Грам-негативним бактеријама. Овакав терапеутски приступ захтева додатна клиничка испитивања, нарочито у вези са испитивањем стварне ефикасности и потенцијалног утицаја на појаву резистенције [19]. Lee и сарадници су спровели студију где су дошли до закључка да комбинована терапија колистина и карбапенема, триглицерина или рифампицина показује бољи ефекат у односу на монотерапијски третман за инфекције карбапенемаза позитивним сојевима *Klebsiella pneumoniae* [20]. Нове генерације цефалоспорина, које садрже инхибиторе бета-лактамаза попут цефтазидима или авибактама би могли бити алтернатива код неких карбапенемаза продукујућих бактерија (нарочито *Enterobacteriaceae* KPC и OXA-48), што клиничаре ставља у незгодну ситуацију: или ће наставити да лече пацијенте старим, добро познатим антибиотцима, или ће развити нове антибиотике са недовољно доказа о њиховој функционалности [21]. За терапију инфекција изазваних *Pseudomonas* сојевима, добром се показала синергистичка активност колистина са цефтазидином, као и комбинација колистина са рифампицином и амикацином. Колистин и рифампицин су се такође показали ефикасним за мултирезистентне сојеве *Pseudomonas aeruginosa* [2].

Garnacho-Montero и сар. су извели прелиминарну евалуацију 35 случајева код пацијената на респиратору са пнеумонијом услед инфекције *A.baumannii*, где су пацијенти третирани интравенским колистином или имипенемом. Клиничко побољшање је запажено код 57% пацијената [22]. Ови резултати указују да су полимиксини ефикасни попут карбапенема, мада су у скоријим студијама примећени колистин-резистентни клинички изолати *A.baumannii* [23]. Kallel и сар. су утврдили ефикасност и безбедност употребе колистина у третирању пнеумонија изазваних панрезистентним *A.baumannii* и *P.aeruginosa* код пацијената на респиратору. У ову студију је било укључено 60 пацијената и свима је колистин дат интравенозно. Повољан терапијски ефекат је уочен код 45

пацијената (75%), а нико од пацијената није развио бубрежну инсуфицијенцију, потврђујући да колистин може бити сигуран и ефикасан избор код лечења овог типа инфекција [24]. *Cho* и сар. су објавили ефикасност колистина код третмана пацијената са озбиљним опекотинама у Јужној Кореји, док су *López-Alvarez* и сар. и *Dalgic* и сар. уочили да интравентрикуларна администрација колистин метансулфоната може бити ефикасна код вениткулитиса изазваног са мултирезистентним сојевима *A. baumannii* [25, 26, 27].

Како *in vitro*, тако и *in vivo* студије показују да долази до повећане појаве антимикробне резистенције када су бактеријски агенси изложени недовољним и неадекватним колистинским градијентима, што је посматрано у значајном броју пацијената, нарочито у случајевима изолације хетерорезистентних сојева, попут *Acinetobacter baumannii* [28]. У вези са карбапенемима, дорипенемимима или меропенемима, као и са неколико других антимикробних супстанци попут рифампицина, гликопептида, даптомицина и фусидинске киселине, које су генерално неефикасне у случају Грам-негативних микроорганизама, примећен је синергистички ефекат у случају *Acinetobacter baumannii*. Сматра се да се овај позитивни синергистички терапијски ефекат заснива на деловању полимиксина који доводи до промене у пропустљивости спољашње мембране што олакшава већим молекулима антимикробних лекова да доспеју у цитоплазму и испоље бактерицидни ефекат [29]. Мониторинг над терапеутском употребом колистина је неопходан због његове варијабилне фармакокинетице и уске терапијске ширине, Овај аспект чини управљање употребом колистина веома изазовном, наглашавајући потребу за практичним и једноставним методама са брзим добијањем резултата, као и тестовима мониторинга самог лека [2].

2.5. Употреба колистина у ветеринарској медицини

У ветеринарској медицини, колистин је интензивно употребљаван за профилаксу, метафилаксу, третман бактеријских инфекција и као промотор раста. У Европској Унији, мало се зна о историји употребе овог антибиотика у узгоју животиња. Данас производи који садрже колистин се контролишу на националном нивоу. Са једне стране према ЕМА, полимиксини су пети

најпродаванији антимикиробни лекови за употребу код фармских животиња, док са друге стране United States Food and Drug Administration (FDA) и Public Health Agency (РНА) Канаде нису никада регистровале производе који садрже колистин за оралну употребу у сточарству. На глобалном нивоу, Кина је значајно највећи произвођач колистина (17,5 милиона тона), а у исто време је и највећи потрошач са око 90% потрошње [30].

Колистин је антибиотик који је и даље у широкој употреби у ветеринарској медицини, пре свега код свиња за оралну употребу код третирања инфекција изазваних бактеријама из фамилије *Enterobacteriaceae* [31]. Администрација антибиотика попут колистина је била погодна за модерну и растућу фармску индустрију јер омогућава успешније залучивање, већу густину држања животиња и вероватно већу економску исплативост због лакше контроле патогена попут веротоксигених сојева *E. coli* (VTEC) [32]. Колистин се слабо апсорбује из гастроинтестиналног тракта што наглашава вероватноћу појаве резистенције на колистин као резултат селективног притиска на цревну микрофлору. Свиње третиране колистином имају генерално већу пропорцију резистентних изолата у поређењу са нетретираним свињама. Колистин се такође користи и код телади (перорално) за третман гастроинтестиналних обољења изазваних Грам-негативним бактеријама. Ова употреба би могла објаснити изолацију колистин-резистентних сојава бактерија код телади упркос недостатку адекватних података о његовој администрацији [33]. У индустријској свињарској производњи широм света, убедљиво најчешћи начин примене колистина је орални и за профилактичке сврхе [34]. Колистин се превасходно животињама даје путем хране, међутим такође и путем воде за пиће. Ова пракса представља медијацију свих животиња на истој фарми, што подразумева истовремено третирање како јединки са испољеним клиничким симптомима, тако и клинички здравих животиња. Европска медицинска агенција (The European Medicines Agency-EMA) је направила препоруке за употребу колистина 2016. године. Закључено је да колистинска употреба у профилактичке сврхе носи висок ризик за појаву резистенције, те би стога требало да буде забрањена, док би клиничка употреба требало да буде ограничена на ентеричне инфекције изазване пријемчивим неинвазивним сојевима *E. coli* и то према резултатима антибиограма кад год је то могуће [35]. Колистин се обично употребљава у облику сулфата или у

сулфометилираној форми названој колистин сулфат премикс, који се орално примењује путем хране код свиња, пилића и у мањој мери говеда. У овој форми, колистин значајно стимулише раст младих животиња, побољшава конверзију хране и повећава економски принос држаоцима животиња. Поред оралне примене, парентерална примена колистина има важну улогу у третману Грам-негативних бактеријских инфекција код свиња и говеда, што обухвата 13,6% укупне продаје полимиксина [36]. Сматра се да, на глобалном нивоу, 96% укупне употребе колистин сулфата отпада на свињарску и живинску индустрију (свиње; 47,41%; живина 49,01%), при чему је глобална потражња за колистин сулфатом достигла око 14906 тона до 2014. године. На сву срећу количина глобалне продукције колистина се драматично смањила у последњих неколико година, од 13746 тона у 2016. до 4725 тона у 2017. и око 4292 тоне у 2019. години, иако свињарска и живинска индустрија и даље користе око 96% ове количине. Забрана употребе колистин сулфата у сврху додатка исхрани у Кини (2017.) је свакако значајно утицала на смањење глобалне продукције колистин сулфата, с обзиром на чињеницу да је Кина одговорна за око 80% продукције и потрошње ове супстанце. Поред овога, продаја колистин сулфата у Кини је такође опала са 63,33% у 2016. на 20,47% у 2017. години [37].

Иако се колистин за оралну употребу превасходно користи као монотерапија, постоје одређени фармацеутски облици попут сулфатних соли које омогућују комбиновану терапију. Најчешће употребљивана комбинована терапија колистина је са β -лактамима и амоксицилином. *In vitro* подаци показују да комбинација амоксицилина са колистином доводи до синергистичког ефекта, односно ефекта појачавања против патогених *E. coli* изолованих из птица [38]. Комбиновање амоксицилина са колистином и цинк оксидом (ZnO) у фази пре и након залучивања су такође коришћене. Студија спроведена на фекалним узорцима узетим од залучене прасади је показала да комбинација три антибиотика: колистина, бацитрацин-цинка и хлортетрациклина инхибира раст појаве гена резистенције на тетрациклине (*tetX*, *tetC*, *tetL*, и *tetW*) [39]. Упркос супресији у *tet*-резистентним генима, готово да и не постоје други подаци везано за резистенцију на колистин након коришћења комбиноване терапије. Због недостатка доказа, комбинована терапија не може бити научно одржива, нарочито за свиње. Узимајући у обзир све доступне и најновије податке, Комитет за

медицинске производе за ветеринарску употребу (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use-CVMP), заснивајући одлуку на принципима предострожности је предложио повлачење са тржишта свих фармацеутских производа и формула које повезују колистин и друге атибиотике [35].

Употреба колистина као промотора раста код фармских животиња, која се и даље користи, нарочито у Азији, би требало да буде забрањена. Ниске неинхибиторне концентрације антибиотика коришћене да увећају раст животиња су повезиване са појавом антибиотске резистенције [32]. Оно што је важно напоменути је да се антимикуробна средства за сврхе промотора раста могу генерално набавити без ветеринарске контроле чак и у Европској Унији. У Француској, на пример, изложеност свиња колистину је износила трећину од укупне изложености антимикуробним средствима, а за живину је овај број још већи [33]. Постоји приметан недостатак података о конзумацији колистина за сваку категорију животиња и тренутно су доступни само групни подаци [38]. Колистин се преобладајно користи код свиња и говеда за контролу ентеричних инфекција проузрокованих са *E. coli* и *Salmonella* или за метафилаксу. Код живине, не постоје значајне индикације за његову употребу, осим евентуално код третмана благе колибацилозе, међутим доказано је да је биолошка расположивост колистина код живине веома ниска након оралне администрације јер се не апсорбује добро из дигестивног тракта [35]. Висок ниво санитације, уз контролу микробиолошког стања на фарми је кључни фактор за спречавање злоупотребе антибиотика на фарми [2].

Како генерални став према свим антимикуробним средствима, али нарочито у вези са колистином, ветеринари би требало да осигурају да се преписани лек користи стриктно за лечење болесних животиња, по препоруци ветеринара и у складу са упутством на етикети. Било каква одступања од ЕМА смерница би требало да буду оправдана и забележена. У овом контексту употреба колистина, на пример, у земљама где овај антибиотик није одобрен код свиња, мора да се врши под валидним ветеринарским препорукама заснованом на резултатима антибиограма и то уколико није доступна ни једна друга терапеутска алтернатива. Додатна истраживања су обавезна како би се утврдио период каренце и смањио ризик да ће животиње на линији клања бити носиоци колистин-резистентних бактерија односно носача гена резистенције [2].

Ветеринарски хирурзи и клиничари би требало да употребљавају колистин само у случајевима када клиничка слика циљано захтева његову употребу, требало би избегавати његову употребу када год је то могуће. Едукативне кампање за подизање свести о овом проблему код држалаца свиња и њихових запослених су од пресудног значаја, а детаљни записи о употреби колистина код животиња су подједнако важни јер омогућавају развој стратегија и смерница за процену максималног ефекта код неопходне употребе колистина. Показало се да су колистин-резистентни сојеви *E. coli* изоловани из здравих јединки које никада нису биле третиране колистином [42].

Извештаји из Италије описују детекцију колистин-резистентних сојева *E. coli* из дивљих зечева (*Oryctolagus cuniculus* и *Lepus europaeus*) који нису претходно третирани колистином. Због оваквог проналаска се сматра да дивље животиње такође имају улогу у појави колистинске резистенције, јер могу бити потенцијални резервоари и допринети трансмисији на друге животиње и/или људе путем контаминираних хране и воде или директним контактом са људима [43].

Обзиром да су до сада бактерије резистентне на колистин изоловане из стајњака, птица селица, воде и поврћа, екотоксичност овог антимикубног средства и његов утицај на средину је значајно питање које свакако треба узети у обзир [40]. Колистин који је у великим количинама присутан у отпадним водама са фарми свиња се доводи у везу са токсичношћу испољеном код бактерија одговорних за оксидацију амонијака, биотрансформација ксенобиотичких супстанци заједно са хемијском трансформацијом амонијака у нитрите у постројењима задуженим за обраду отпадних вода се обезбеђује од стране бактерија одговорних за оксидацију амонијака. Значајна штета нанесена цревном епителу и повећаној експресији стрес-зависних гена код кишне глисте *Eisenia fetida* представља још један егзотоксични маркер који је у порасту, што говори у прилог токсичности за животну средину проузроковану елиминацијом колистина у отпадним водама [2].

Важно је напоменути да се апликовани лекови не метаболишу 100% од стране животиња или људи, већ се велики број екскретије у активној форми путем фецеса или урина. Ова екскреција је значајно изражена код оралне примене колистина који се веома слабо апсорбује путем гастроинтестиналног тракта [32].

Сматра се да одређене методе компостирања могу да елиминишу 50-70% одређених антимикуробних средстава, попут хлортетрациклина, моненсина и тилосина [45]. На жалост, нису се добро показале када је у питању смањење количине колистина или *mcr* гена у свињском ђубрету. Метода којом је ђубре третирано има различит утицај на ефикасност у смањењу гена резистенције на антибиотике у свињском ђубрету. Неопходно је обезбедити ефикасност процеса за обраду ђубрета, нарочито када је у питању свињски стајњак због његове употребе у фертилизацији као и одсуству регулација и смерница за контролу и употребу свињског ђубрета [32].

2.6. Резистенција на колистин

Појава резистенције на колистин може бити објашњена различитим механизмима. До 2015. године, сматрало се да до резистенције долази искључиво путем тачкастих (*point mutations*) хромозомских мутација. С обзиром да је липополисахаридна мембрана мета колистина, било какве промене у овој структури доводе до измењеног деловања колистина [46]. Стечена резистенција на колистин код нерезистентних врста може природно да се појави услед модулација на површини бактеријске ћелије, укључујући варијације у структури липополисахарида или услед одбацивања капсуларних полисахарида за које се колистин везује [42].

Механизми резистенције путем хромозома се углавном свде на везивање катјонских група 4-амино-4-деокси-Л-арабинозе и фосфоетаноламина са липидом А у липополисахариду. Додавање ових молекула је регулисано путем велике групе гена и оперона, попут двокомпонентног система *s* PhoPQ и *PmrAB* који контролишу синтезу и *pmrC-pmrE* гена који кодирају протеине одговорне за убацивање L-Ara4N и pEtN у липополисахарид [5]. Овај механизам доводи до квалитативне модификације липополисахарида и тако смањује афинитет полимиксина за бактеријску површину. Иако ово резултира значајним смањењем минимале инхибиторне концентрације мутираног соја, ризик за појаву резистенције је сматран ниским из два разлога: пре свега механизми мутације су

доказано нестабилни *in vitro*, а као друго резистентни сојеви могу само вертикално да се дисеминују [51].

Salmonella и *E. coli* имају способност мењања липополисахарида путем измене липида А синтезом 4-амино-4-деокси-Л-арабинозе(Л-Ара4Н) и/или фосфостаноламина, чија биосинтеза се доводи у везу са хромозомски посредованом резистенцијом, зависном од двокомпонентног регулатора одговора и сензор-киназа система: PmrA/PmrB и PhoP/PhoQ. Први систем PmrA/PmrB такође контролише pmr HIJKLM оперон који промовише синтезу N4-аминоарабинозе, што као резултат, при хемијском везивању за фрагменте липида А, доводи до измене негативног набоја ћелијске мембране неутралисањем негативно наелектрисаних фосфолипиди. Овакав тип микробне резистенције се јавља код *Pseudomonas aeruginosa* [38]. Lee и сарадници су 2006. године први уочили појаву хетерорезистенције на полимиксине код *A. baumannii*. Примећено је да резистентне субпопулације које већ постоје у инокулуму доводе до појаве ране резистенције [20].

Код *Acinetobacter baumannii*, откривена су два есенцијална хромозомски посредована механизма у вези са колистинском резистенцијом. Први механизам је приписан неадекватној продукцији липополисахарида, док насупрот томе, други механизам врши модулацију бактеријског одговора на услове окружења, што доводи до промене у мембранским липидима доводећи до смањења у пермеабилности бактеријске мембране [42]. Према једној студији примећено је да резистенција на колистин код *A. baumannii* има везе са мутацијама у PmrAB двокомпонентном систему. Механизам резистенције код *A. baumannii* је испитиван путем селекције *in vitro* деривата мултирезистентних сојева *A. baumannii*. У овој студији мутација у генима који кодирају двокомпонентни систем протеина PmrA и/или PmrB је запажена путем метода ДНК секвенцирања [52]. Новија студија је показала да је разлог за појаву резистенције код *A. baumannii* потпуни губитак липополисахарида [53]. Пронађене су мутације на три гена *pxA*, *lpxC* и *lpxD* за 13 колистин-резистентних сојева *A. baumannii*. Ове мутације код *lpxA*, *lpxC* и *lpxD* су одговорне за потпуни губитак продукције липополисахарида. Beceiro и сарадници су објавили да тачкаста мутација у PmrB резултира додавањем фосфостаноламина липиду А, што проузрокује колистинску резистенцију код *A. baumannii* [54] Park и сар. су описали улогу

повећане експресије PmrAB система за резистенцију на колистин код *A. baumannii* [55].

Студије везане за *P. aeruginosa* наводе улогу OprH, протеина који је у претераној мери изражен у средини са ниским дозама Mg^{2+} што доводи до резистенције на полимиксине. OprH је мали протеин за који је примећено да према структури спада у фамилију порина. Под условима ниског Mg^{2+} , OprH постаје велики протеин који не доводи до стварања пора, већ спречава продор антимикумног лека. Примећено је да OprH окупира места за везивање јона на Mg^{2+} у стањима дефицита овог елемента, те на тај начин доприноси стабилности мембране и резистенцији на полимиксине [56,57].

У вези са резистенцијом коју показује *K. pneumoniae* у односу на полимиксине, њени механизми резистенције су засновани на инактивацији mgrB гена и поремећају двокомпонентног регулаторног система PhoPQ и PmrAB. Инактивације у mgrB гену су одговорне за испољавање резистенције од стране *K. pneumoniae* на колистин. Када се PhoP/PhoQ сигнални систем активира, мали трансмембрански регулаторни протеин, сачињен од 47 аминокиселина се продукује (MgrB). Овај протеин спречава фосфорилацију PhoP, вероватно путем супресије PhoQ-киназе или промоције фосфатазе. С обзиром да PhoP фосфорилација доводи до повећања транскрипције mgrB гена и са друге стране, MgrB инхибира ову фосфорилацију, онда се сматра да је овај протеин очигледно медијатор негативне повратне информације у PhoQ/PhoP сигналу [46].

Појава резистенције на полимиксин је посматрана код колистин-продукујуће *B. polymixa* [47]. Ово представља механизам самоодбране јер се производи само од стране *B. polymixa var. colistinus*. Док су радили испитивање осетљивости 24 изолата мултирезистентних сојева *P. aeruginosa* и тестове осетљивости на полимиксине Schurek и сар. су приметили да резистенција на колистин може бити индукована путем гајења бактеријских изолата у растућим концентрацијама полимиксина Б или полимиксина Е [48]. Индукована полимиксинска резистенција је последица способности бактеријске ћелије да „осети“ специфичне полимиксинске концентрације и индукује PhoP–PhoQ и PmrA–PmrB системе. Fernández и сар. су описали и идентификовали новог двокомпонентног регулатора код *P. aeruginosa* који утиче на адаптивну

резистенцију на полимиксине (ParR–ParS) Овај систем је неопходан за активацију *arnBCADTEF* LPS модификационог оперона у присуству субинхибиторних концентрација полимиксина [49].

Код фамилије *Enterobacteriaceae*, промене у регулаторним локусима *pmrA* и *phoP* су одговорне за резистенцију на полимиксине. Два регулаторна локуса *pmrA* и *phoP* контролишу резистенцију код *Salmonella Typhimurium*. При чему *pmrA* локус кодира двокомпонентни систем PmrA–PmrB и главни мембрански протеин PmrC [47]. Други локус (*phoP*) кодира други двокомпонентни систем PhoP–PhoQ који управља резистенцијом на неколико амфипатичних антимикуробних пептида који се такође сматра неопходним за резистенцију на полимиксине [50].

У својој студији Sun и сар. су изоловали 44 независна мутанта *S. enterica* var. *Typhimurium* са смањеном осетљивошћу на колистин и идентификовали 27 различитих тачкастих мутација лоцираних на *pmrA* и *pmrB* генима који су показали повећан ниво резистенције [51].

На територији Србије Нововић и сарадици су идентификовали 27 колистин-резистентних, карбапенемаза- продукуюћих *Klebsiella pneumoniae* изолата у периоду од 2013 до 2016. Године. Од овог броја 12, изолата је прикупљено из Клиничког центра Војводине, 4 изолата из Клиничког центра Ниш, док је остатак прикупљен из приватне лабораторије у Београду. Већина ових изолата је прикупљена од одраслих пацијената, при чему е постоје докази о претходној употреби колистина код ових пацијената. [96]. Тестирање антимикуробне пријемчивости је спроведено на 174 појединачна изолата са живинских фарми у Србији и утврђено је да чак седам *Salmonella* spp. Поседује мултиплу резистенцију на антибиотике. Детектовано је 16 серотипова, међутим само је код серотипа *Infantis* потврђена смањена пријемчивост а колистин, при чему су примећене измене у експресији *phoP/Q*, *mgtB* и *pmrA/B* гена. [97]

2.7. Плазмидом посредована резистенција и откриће *mcr* (multiple colistin resistance) гена

У новембру 2015., група кинеских истраживача је објавила појаву преносивог плазмидом посредованог гена резистенције званог *mcr-1*, што је довело до тога да појава резистенције на колистин од наизглед контролисаног, постане глобални проблем. Ген 1626-bp који кодира рЕtN трансферазу је изолован из животиња, људи и меса у Кини [30]. Накнадна ретроспективна анализа је показала да је *mcr-1* ген циркулисао од 1980их, при чему су најстарији изолати откривени код пилића. Најстарији изолат из Европе је откривен код дијареичног телета у Француској 2005. [34]. Додатна испитивања су открила глобалну дисеминацију *mcr-1* у различитим бактеријским врстама и домаћинима, обухватајући велики број земаља у Европи, Азији, Африци и Америци. Широка дистрибуција гена у животињским изолатима уз коегзистенцију са бета лактамазама углавном пронађеним код животиња, као и широка употреба колистина у ветеринарској медицини у поређењу са хуманом медицином у разлози због којих се „животињски свет“ сматра резервоаром резистентних бактерија и примарним извором трансмисије на људе [59]. Трансфер гена резистенције *mcr-1* са животиња на човека је потегло питање у вези са последицама употребе колистина у ветеринарској индустрији, (како код третмана кућних љубимаца, фармској индустрији тако и продору у ланац исхране) пре свега због могућих последица по људско здравље. Сматра се да би *mcr-1* могао бити присутан у окружењу и на неколико начина преносив на људе и стога, могао би додати на значају потенцијалном преносу *mcr-1* гена са животиња на људе. Овакви типови трансмисије захтевају додатне и свеобухватније студије [7].

Недавне публикации су објавиле континуирану појаву нових *mcr* гена и алелских варијација које су тешке за идентификацију у рутинском мониторингу [60]. Надаље *mcr* гени су откривени на различитим плазмидским носачима са високом стопом *in vitro* трасфера и често се налазе заједно са другим детерминантама резистенције, попут β -лактамаза [1]. Колистинска резистенција је постала велики изазов за лечење инфекција опасних по живот, нарочито због кохабитације *mcr-1* гена са другим генима резистенције на антибиотике попут MBL, ESBL, и NDM гена са потенцијалом да се развија панрезистенција на

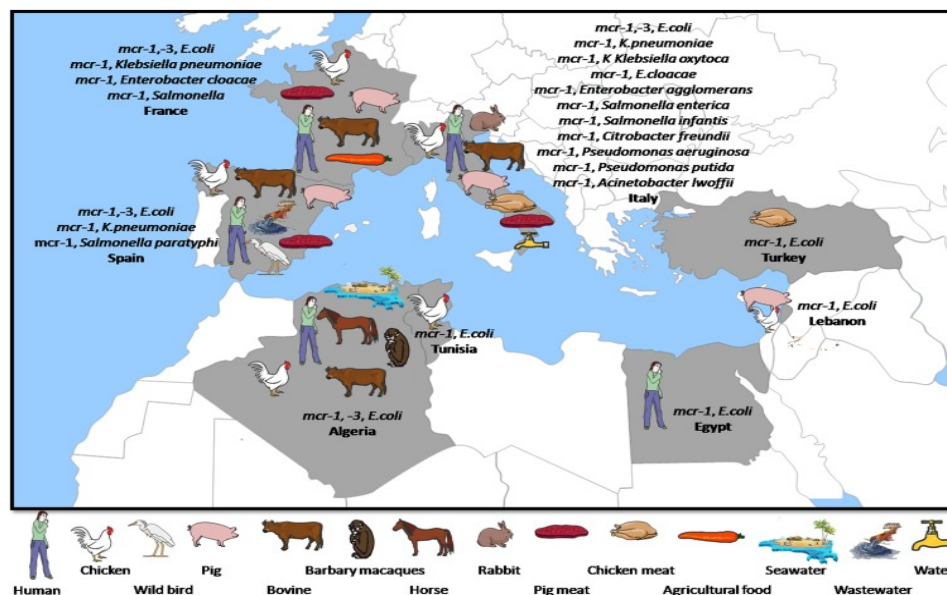
лекове. Колистин се сматра последњом линијом одбране за лечење озбиљних инфекција, чинећи појаву колистин-резистентних изолата претњом здравственим системима јер доводи до пораста у броју неизлечивих инфективних обољења [1].

Првобитно пријављена у Кини 2015. године, а потом у Азији, Африци, Европи и Америци, плазмидом посредована резистенција путем *mcr-1* гена је описана код *Escherichia coli*. *mcr-1* је ензим који мења липид А присутан у липополисахаридима са метаболитом фосфоетаноламином, на тај начин супримирајући његово везивање за колистин. Шансе за пренос бактеријске резистенције на колистин, заједно са резистенцијом на цефалоспорине широког спектра су значајно порасле могућношћу једног плазида да истовремено носи *mcr-1* заједно са геном β -лактамаза проширеног спектра (*extended-spectrum beta-lactamase* - ESBL). Ова чињеница представља огромне изазове при лечењу инфекција изазваних Грам-негативним бактеријама. Овај *mcr-1* ген лоциран на хромозому је први пут запажен на два *E. coli* изолата, прикупљена од телади [56]. Касније, у Белгији нови ген колистинске резистенције је откривен (*mcr-2*), нађен у *E. coli* изолатима из свињских и говеђих узорака, такође заједно са ESBL генима. Оно што је интересантно је да коегзистенција неколико *mcr* гена на *E. coli* не подразумева нужно значајну разлику у минималној инхибиторној концентрацији у поређењу са резистентним изолатима *Salmonella* који само носе појединачни плазмид *mcr-1* ген. [62]. Бактерије резистентне на колистин такође неретко имају резистенцију и на друге антибиотике како што су аминогликозиди, тетрациклини, сулфонамиди и триметоприм, линкозамин, β лактами, хинолони као и цефалоспорини треће генерације при чему се јављају различити механизми резистенције попут ензимског, ефлукса, непропустљивости и тачкастих мутација [2].

Седам додатних *mcr* хомолога (*mcr-3* до *mcr-9*) су идентификовани код *Enterobacteriaceae* врста, а PCR тестови су развијени како би омогућили њихову детекцију. Овај механизам резистенције може бити стечен током терапије и лако пренесен, што потпомаже ширење резистенције [2].

Појава резистенције на колистин, једне од свега неколико преосталих терапеутских алтернатива за пацијенте инфициране са *K. pneumoniae* сојевима

резистентним на карбапенеме и друге важне антимикробне групе је стога зачајна брига, нарочито код људи [2].



Слика 2: Дистрибуција *mcr-1* и *mcr-3* гена у медитеранском басену

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716519302553>)

2.7. 1. Откриће детерминанти мобилне колистинске резистенције

Плазмид рHNSHP45 је први плазмид за који је откривено да ј носач *mcr* гена. Овај плазмид је откривен код *E.coli* изоловане из свиње у Шангају, јула 2013. Новооткривени ген резистенције назван *mcr-1* је поседовао резистенцију и на колистин (8 mg/l) и полимиксин Б (4 mg/l) [30]. Протеин *mcr-1*, састављен од 541 аминокиселине се испоставило да је фосфоетаноламин трансфераза која је високо хомологна са другим фосфоетанол трансферазама пронађеним у *Paenibacillus sophorae*, *Enhydrobacter aerosaccus*, *Moraxella catarrhalis* и *Dichelobacter nodosus* [30]. Додатни експерменти су потврдили да плаزمиди који носе *mcr-1* могу бити пренесени међу *Enterobacteriaceae* врстама, па чак и не-*Enterobacteriaceae* врстама. До данас, откривене су секвенце за 21 варијанту *mcr-1s* (*mcr-1.2* до *mcr-1.22*), а поред тога откривено је још девет *mcr* протеина (*mcr-1* до *mcr-10*) који показују различиту подударност аминокиселинске секвенце у односу на *mcr-1* [60].

Бактерије које носе одговарајуће *mcr* гене су првобитно изоловане из животиња, укључујући свиње (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-6* и *mcr-8*) и пилиће (*mcr-5* и *mcr-7*). Само су *mcr-9* и *mcr-10* идентификовани у изолатима *Salmonella enteric* var. *Typhimurium* и *Enterobacter roggkampii* који су изоловани од људских пацијената [63]. Уз изузетак *Moraxella spp.* изолата (*mcr-6*), све бактерије носиоци *mcr* гена су биле из фамилије ентеробактерија укључујући *E. coli* (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*), *Salmonella enterica* (*mcr-4*, *mcr-5* и *mcr-9*), *Klebsiella pneumoniae* (*mcr-7* and *mcr-8*) и *E. roggkampii* (*mcr-10*) [60].

2.7.2. Типови гена мобилне колистинске резистенције (*mcr*)

До маја 2019. Откривено је 9 гена мобилне колистинске резистенције (*mcr-1* до *mcr-9*) 2020. је откривен и *mcr-10*. Сви *mcr* гени су функционално идентични једни другима. Ови гени кодирају ензиме фосфостаноламин трансферазе који везују фосфостаноламин (PEtN) за липид А у спољашњој мембрани Грам-негативних бактерија, доводећи до смањења у нето негативном набоју што омогућава појаву резистенције [63].

2.7.2.1. *mcr-1* ген

2015. године откривен је први плазмидом посредовани ген колистинске резистенције код изолата *Escherichia coli*. Плазмидни *mcr-1* ген је први пут пријављен пред крај 2015. године код *E. coli* изолата и животињске хране и меса код изолата узетих 2011-2014. године у Кини. Током 2014. године овај ген је запажен код *K. pneumoniae* и *E. coli* изолата код хоспитализованих пацијената у Кини [64]. Иако је колистин био широко употребљиван код фармских животиња за производњу хране и то током дугог низа година, код људи у Кини није употребљиван до 2017. године што налаже да је ветеринарска употреба колистина довела до ширења *mcr-1* гена [65]. Кратко након открића и његове примарне карактеризације примећено је да је *mcr-1* ген широко распрострањен код *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *Salmonella spp.* изолованих из људи, животиња и околине [30].

2.7.2.2. Како *mcr-1* потврђује резистенцију на колистин?

Трансфер колистинске резистенције путем плазида је приписан *mcr-1* гену који представља предоминантан тип *mcr* гена. *mcr-1* је фосфатидил-етаноламин трансфераза која модулира резидуе липида А у липополисахариду доводећи до смањеног афинитета за везивање за колистин на његово циљно место [66]. *mcr-1* ген доводи до резистенције путем модификације циљног места колистина, а потом стимулише трансмисију РЕА у глукозамин, сахарид липида А у спољашњој мембрани бактерија доводећи до смањења негативног набоја липида А и смањеног везивања за колистин [67].

2.7.2.3. Дисеминација и раширеност *mcr-1* гена

Природна појава *mcr-1* гена је била ограничена на пет бактеријских врста *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *E. cloacae* и *E. aerogenes* (такође експериментално пренесен на *P. aeruginosa* коњугацијом). Подаци из 2016. године указују да се *mcr-1* ген раширио у више од 18 држава и оно што је још више забрињавајуће примећена је коегзистенција овог гена са другим генима мултипле резистенције што даље имплицира да је број панрезистентних микроорганизама у порасту [68]. *Ye* и сар. су објавили присуство *mcr-1* гена у шеснаест држава, укључујући седам држава југоисточне Азије (Тајланд, Кина; Вијетнам, Лаос, Јапан, Малезија и Камбоџа) као и девет европских земаља (Уједињено Краљевство, Данска, Француска, Холандија, Португал, Швајцарска, Белгија, Немачка и Алжир). Поред овог, примећено је и ширење *mcr-1* гена са животиња на људе у Тајланду, Кини, Данској и Лаосу, доводећи до озбиљне забринутости због могућности глобалне дисеминације овог гена [69].

2.7.2.4. *mcr-2* ген

Након открића *mcr-1* интересовање научника је довело до открића његових варијација. [65] *Xavier* и сар. су објавили појаву неколико додатних *mcr* типова, укључујући и *mcr-2* код *E. coli* у Белгији. За *mcr-2* протеин се претпоставља да има два домена, при чему први (резидуа 1–229) служи као транспортер, док други

(резидуе 230–538) служи као трансфераза домен [60]. *mcr-1* и *mcr-2* протеи показују 80,65% сличности, такође *mcr-2* показује 64% сличности РЕА трансферази бактерије *Moraxella osloensis* [60].

2.7.2.5. *mcr-3*

mcr-3 ген показује 47,0% нуклеотидну идентичност са *mcr-2*, односно 45,0% у односу на *mcr-1*, штавише секвенца аминокиселина код *mcr-3* показује 31,7% и 32,5% сличности са секвенцама аминокиселина код *mcr-2* односно *mcr-1*. Као и код *mcr-1* и *mcr-2*, претпоставља се да и *mcr-3* има два домена. Први домен укључује пет трансмембранских α -хеликса, док други домен представља периплазматични домен за који се сматра да претставља каталитички центар [71]. Секвенце аминокиселина код *mcr-3* се у великој мери поклапају са РЕА трансферазама код *Enterobacteriaceae* и *Aeromonas spp.* Изолованих из клиничких узорака, као и узорака узетих из околине из дванаест различитих држава [71] *mcr-3* ген је пронађен код *E.coli* и *Aeromonas* и *Proteus* врста изолованих из животиња и људи у Европи, Јужној Америци и Азији [72].

2.7.2.6. *mcr-4* ген

Carattoli и сар. су објавили да је од 125 изолата у њиховој студији, 32 позитивно на *mcr-1* и три на *mcr-2*, док је у 11 изолата пронађен нови *mcr-4* ген који је идентификован у *Salmonella* R3445. Касније *mcr-4* ген је детектован у *S.enterica* var. *Typhimurium* и *E. coli* изолата од људи и свиња у Италији, Шпанији и Белгији [73]. Претпоставља се да *mcr-4* протеин садржи два домена повезана флексибилним повезивачем на интегралном 5- α хеликс домену, који повезује протеин *mcr-4* за унутрашњу мембрану и спаја је са периплазматичним каталитичним доменом. Периплазматични каталитични домен модулира групе липида А додавањем фосфоетаноламинских група [74].

2.7.2.7. *mcr-5* ген

Недавно су Borowiak и сар. пријавили нови ген *mcr-5* код *S. enterica* *susp. Enterica* var. *Typhimurium* код изолата из свиња и свињског меса у Немачкој. Још једна студија је детектовала три *mcr-5* гена код *E. coli* изолата из узорак прикупљених из цекалног садржаја свиња на кланици и фекалних узорак код свиња на фармама. Ова открића указују да *E. coli* сојеви који носе *mcr-5* спорадично бујају у гастроинтестиналном тракту свиња, што представља разлог за бригу јер може да доведе до вертикалног ширења кроз ланац исхране, што ће у крајњој линији доћи и до човека. [75] *mcr-5* ген је откривен и код *Aeromonas hydrophila* изолованих из фецеса свиња држаних у домаћинству, што је навело научнике да дођу до закључка да *mcr-5* може да се дисеминује код различитих врста и родова бактерија [67].

2.7.2.8. *mcr-6* ген

mcr-6 ген је откривен на хромозому *Moraxella pluranimalium*. Овај ген показује 87,9% сличности са *mcr-2* из *E. coli*. *M. pluranimalium* изолована из Европе, животињског порекла је, једини познати изолат који носи *mcr-6* ген [76].

2.7.2.9. *mcr-7* ген

Овај ген је детектован код *Klebsiella pneumoniae* изолата из пилића у Кини, а плазмидном посредовани ген колистинске резистенције *mcr-7.1* дели 70% сличности са *mcr-3* геном [77].

2.7.2.10. *mcr-8* ген

Нова *mcr* варијанта је откривена код *K. pneumoniae* изолата из свиња и људи у Кини. Секвенце аминокиселина показују у просеку 37,46%, 30,43%, 33,51%, 37,85%, 39,96%, 30,26% и 31,08% сличности са *mcr-7*, *mcr-6*, *mcr-6*, *mcr-5*, *mcr-4*, *mcr-3*, *mcr-2*, *mcr-1*. Попут претходно описаних *mcr* протеина и *mcr-8* поседује два домена [78].

2.7.2.11. *mcr-9* ген

До 2018. године детектовано је осам *mcr* гена, међутим током рутинског секвенционирања *Salmonella* генома на гене антимикуробне резистенције, откривен је *mcr-9*. Секвенца аминокиселина код *mcr-9* из мултирезистентних изолата *S. enterica* var *Typhimurium* изолованих у Вашингтону из човека је била веома слична *mcr-3* са подударањем од 64,5%. Тродимензионална структура *mcr* протеина је показала да су *mcr-9*, *mcr-7*, *mcr-4* и *mcr-3* задржали сличну структуру [63].

2.7.2.12 *mcr-10* ген

Wang и сар су описали *mcr-10* ген откривен код изолата *Enterobacter roggenkampii*. *mcr-10* има највећу нуклеотидну подударност са *mcr-9* геном (79,69%). Овај ген је откривен код многих *Enterobacteriaceae* врста у многим државама, указујући да се већ раширио великим делом света [67]

2.7.3. Преваленција *mcr* гена код животиња и продуката животињског порекла

Иако је до сада откривено десет гена широм света, *mcr-1* и даље представља ген са највећом преваленцијом. Од првог пријављивања *mcr-1*, овај ген је идентификован код бактерија изолованих из различитих животиња и производа животињског порекла у преко 30 држава и на пет различитих континената. Shen и сарадници су открили да порекло *mcr-1* датира још из 1980их година, те је изолован из *E. coli* пронађене код пилића, што је значајно јер је управо у овом периоду колистин први пут почео да се користи код животиња за производњу хране за људе [79]. Током наредне две деценије, *mcr-1* је само спорадично детектован код бактерија из пилића у Кини, након чега је преваленција *mcr-1* почела драматично да расте са 5,2% у 2009. на 30,0% у 2014 години [79]. У једној дугогодишњој ретроспективној студији која је испитивала *E. coli* из уинутих свиња широм Јапана у периоду 1991-2014. године, први *mcr-1* позитиван изолат је откривен 2007. године, а такође је потврђено да је преваленција

позитивних изолата значајно порасла након 2009. , слично резултатима у Кини [80]. У Европи, први забележен *mcr-1* изолат је откривен код β -лактамаза продукујуће *E.coli* проширеног спектра, добијене од телета у Француској 2005. [34]. У Африци, *mcr-1* је први пут пријављен 2010. из авијарне патогене *E.coli* изоловане из кокошака у Египту [81], док је први изолат из Јужне Америке откривен 2012. код *E.coli* изолата из свиње у Бразилу [82]. Сви ови налази указују на то да се *mcr-1* појавио потенцијално и доста раније пре него што је први пут описан и највероватније је да је резултат ове појаве управо употреба колистина код фармских животиња, односно животиња држаних у сврху производње хране [30].

Већина студија о колистинској резистенцији је концентрисано у пределу источне и југоисточне Азије и у пределу северне и јужне Европе, при чему се јавља неједнака дистрибуција, која је вероватно настала као последица разлика у фокалим тачкама локалних испитивања. Више од 40 студија везано за колистинску резистенцију је спроведено у Кини, где је преваленција *mcr-1* ишла и до 76,2% код изолата *E.coli* пореклом из свиња, док је износила 69,0% код ентеробактерија изолованих из ланца производње живине [78]. Слично овоме, преваленција је била веома висока у Вијетнаму(59,4% код бактерија живинског порекла), Либану(94,6% код бактерија живинског порекла), Француској (88,6% код бактерија свињског порекла), Италији (72,5% код бактерија изолованих из свиња), Португалу (98,0% код бактерија изолованих из свиња) и Тунису (55,8% код бактерија живинског порекла) [79]. Упркос овим чињеницама, преваленција *mcr-1* код млечних раса говеда је остала ниска, са варијацијама од 0,5% до 0,8% у Кини, 2,6% у Египту и 0% у Бразилу [83, 84, 85]. Постоји већи број студија спроведених у Европи, које су вршене код говеда, и то у Холандији, Немачкој, Француској, Италији, Белгији, Шпанији и Португалу, у поређењу са Азијским земљама где већина таквих студија потиче из Кине и Јапана. Оно што је заједничко овим студијама је да су нивои колистинске резистенције доследно ниски [79].

Ген *mcr-1* је такође изолован из бактерија пореклом од оваца, патака, гускака и голубова, кућних љубимаца, па чак и дивљих животиња. Први пријављени случај *mcr-1* гена код дивљих животиња датира још из 2012. када је *mcr-1* позитиван сој *E.coli* изолован из галебова *Larus dominicanus* у Аргентини. У

Пакистану је *mcr-1* позитиван сој *E.coli* изолован из *Fulica atra* миграторне врсте птица. У Европи је овај ген изолован из Црног лешинара у Шпанији, док су два *mcr-1* позитивна изолата пронађена код увезених гуштера из Азије [79]-

Поред животиња и производи животињског порекла су домаћини *mcr-1* позитивних бактерија. У вези са високом преваленцијом ових изолата код пилића, живинско месо је такође показало високу преваленцију *mcr-1* позитивних изолата. Највиша пријављена преваленција *mcr-1* позитивних бактерија је била у пилећим узорцима меса у Вијетнаму (38,9%), потом Холандији (24,8%) и Бразилу (19,5%) [86, 87, 88]. У поређењу са овим подацима, код свињског меса, преваленција *mcr-1* позитивних бактерија значајно мања у односу на пилеће месо те износи 13,2% у Кини, односно 5,9% у Вијетнаму [30]. Поред овога, *mcr-1* позитивне *Salmonella spp.* су пронађене у свињском месу у Бразилу, Португалу, Белгији и Кини, а *mcr-1* позитивни сојеви бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* су откривени још и у говеђем, овчијем месу и узорцима сира [89]. До данас, *mcr-2* је детектован само код *E. coli* и *Salmonella spp.* и то код изолата из Кине и Белгије са високом преваленцијом (29,0%) *mcr-2* код различитих животињских врста у Кини [60]. Неколико студија је потврдило да су носиоци *mcr-3*: *E. coli*, *K. pneumoniae* и *Aeromonas spp.* откривени код различитих животиња и њихових продуката у девет различитих држава [79].

2.7.4. Преваленција *mcr* гена у аквакултури

Иако се колистин такође употребљава за третман бактеријских инфекција код акватичних животињских врста, количина и домет употребе у аквакултури је много мања у односу на пилиће и фармске животиње [33]. Ова ограничена употреба је пријављена у југоисточној Азији у земљама попут Вијетнама и Бангладеша које имају богату индустрију слатководне аквакултуре. [33] Важно је напоменути да ове државе имају доста интегрисан систем аквакултуре где се рибе неретко хране фецесом животиња које су одгајане у условима екстензивне употребе антибиотика. Ова пракса може да убрза трансмисију гена антимикробне резистенције између сточарске индустрије и рибарства [90].

Прва *mcr* резистентна бактерија из акватичних организама је идентификована 1995. Шест изолата *Vibrio cholerae* резистентних на колистин су показала да је резистенција на колистин не тако ретка појава код ове бактерије, као и да није плазмидом посредована [91]. Упркос проналаску бактерија резистентних на колистин у аквакултури, мобилна колистиска резистенција је доста дуго занемаривана у овој сфери те је значајно мање радова и студија објављено. Једна кинеска студија је идентификовала 7 *mcr* позитивних *E. coli* изолата од 700 узорака амура (*Ctenopharyngodon idella*) користећи PCR испитивања [92]. Још две студије су идентификовале *mcr-1* позитивне изолате из узорака хране и то код рачића [93,94].

Поред гена мобилне колистинске резистенције, недавне публикације су објавиле постојање нове породице непреносивих гена колистинске резистенције (*nonmobile colistin resistance: nmcl-nmcl.8*) из водених бактерија рода *Shewanella* [84]. Досадашња испитивања сугеришу да аквакултура и водена средина представљају резервоаре и потенцијално порекло гена колистинске резистенције, иако је потребно још доказа како би се са сигурношћу потврдила ова тврдња [79].

2.7.4. Трансмисија између људи и животиња путем ланца производње хране.

Заснивајући се на разликама у преваленцији *mcr* позитивних бактерија код животиња и људи, вероватно је да *mcr-1* потиче од бактерија пореклом од животиња, те да се последично проширио на бактерије пронађене код људи [60]. Како би боље разумели дистрибуцију *mcr-1* гена у живинској производњи, Wang и сар. су спровели студију која је обухватала сваки корак у ланцу производње живинског меса у Кини (2014-2015.). Користећи методу DST (drill stem test) чак 69,0% узорака и 32,9% изолата је било позитивно на *mcr*, при чему је овај ген пронађен на свакој контролној тачки у производњи, укључујући и кокошиње, комерцијалне фарме, кланице и супермаркете [64]. Shen и сар. су уочили снажну повезаност између високе приваленције *mcr-1* позитивних бактерија код људи и антропогених фактора, укључујући и конзумирање продуката животињског порекла, као и водених организама [79].

2.7.5. Епидемиолошки приступи

Код епидемиолошких анализа постоји доста недостатака, те тако тип и дизајн студија недостају у многим извештајима. Поред овога, величина узорка је у већини случајева премала за пружање поузданих података о преваленци, а прикупљени подаци често немају интервал поузданости (*confidence interval*). Код поређења резултата, најважији фактор је метода коришћена за испитивање преваленце *mcr* гена. Различите аналитичке методе могу довести до великих разлика у резултатима што може значајно да отежа, ако не и онемогући поређење резултата међу студијама. Постоје две главне методе које се користе за детекцију преваленције *mcr* гена: директна инокулација узорка на подлогу са колистином, која је праћена PCR анализама насумичних колонија и метода заснована на PCR анализама укупне ДНК екстраховане из узорка позната још и као DST (*drill stem test*). Неколико студија је показало да је употреба DST методе резултирала већом стопом детекције, тиме указујући да постоји далеко потцењени сектор резистома тзв. „фантомски резистом“. Како би се побољшала детекција овог сектора, неопходно је лоцирати *mcr* гене у индивидуалним бактеријским врстама и користити специфичне методе за култивацију ових врста [79].

Према Европском центру за превенцију и контролу болести (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)), у 2017. години, изолати резистентни на колистин су представљали 8.5%(2,4% од тога је пријављено код изолата *K. pneumoniae* и само спорадично код *E coli*). Већина ових случајева (88,5%) је пријављена у Грчкој и Италији. [61]. Са друге стране 2016. године ECDC је објавио да је свега 51.3% свих *P. aeruginosa* осетљиво на колистин. У вези са *Acinetobacter spp* сматра се да се осетљивост на колистин креће до 51.3% од укупног броја изолата. Међутим 2018. године ECDC је упозорила да ови подаци не морају нужно бити репрезентативни за читаву Европу због малог броја тестираних изолата и релативно високом пропорцијом изолата са подручја високе резистенције, као и техничке комплексности везане за тестове осетљивости на колистин. Потврђена је могућност трансмисије колистин-резистентне *E. coli* међу врстама, пре свега са свиња или љубимаца који су у блиском контакту са људима. [2]

2.7.6. Испитивања осетљивости на колистин

Како за индивидуалне, тако и у епидемиолошке сврхе, веома је значајно да антимикуробна испитивања бактеријске осетљивости у вези са бактеријама изолованим из инфицираних људи и животиња буду тачна. Истраживање из 2017. је открило да постоје многи технички недостаци у вези са тестирањем пријемчивости на колистин, те да се неретко јављају погрешни резултати, пре свега јер доста лабораторија није локално тестирала осетљивост на колистин или нису коришћене препоручене методе. Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) и European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) су удружиле снаге како би одредили општа правила за осетљивост на колистин. Према њиховим препорукама микродилуција је (за сада) једина валидна метода за тестирање пријемчивости на колистин [2].

Неколико потешкоћа везано за методологију се јавило у процени осетљивости на колистин. За испитивање осетљивости на колистин сматра се да је 20776-1 стандардна метода микродилуције (БМД- бујон микродилуција) референтна метода и једина за сада потврђена за *Enterobacterales*, *P. aeruginosa*, и *Acinetobacter spp.* Медијум за култивацију, формулација колистина, па чак и тип пластике употребљаван на микроплочама је стандардизован. Међутим овај метод је непрактичан и захтева дуже време за постизање резултата (минимум 24-48 h). Испитивање осетљивости другим методама, укључујући агар дилуцију, диск-дифузију, градијентну дифузију као и аутоматизоване методе (попут Vitek2, Phoenix) није препоручљиво, што доводи у питање тачност већине досадашњих епидемиолошких података. Новије методе, укључујући молекуларне методе још увек захтевају оптимизацију, јер иако могу да детектују неколико познатих гена резистенције, не могу формално бити признати као тестови осетљивости. Детекција гена резистенције попут *mcr* подразумева да је ген резистентан на колистин, иако његово одсуство не подразумева осетљивост на овај лек. Нова метода, базирана на проточној цитометрији која омогућава испитивање осетљивости у року од 2 сата насупрот 2 дана из директно позитивних култура крви или из колонија (1 дан) може променити дијагностичку парадигму. Брзи тестови у ери антимикуробне резистенције су стога ургентно потребни [95].

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА

Циљеви овог дипломског рада су:

- дати преглед основних информација о полимиксинима, механизму и спектру деловања, са посебним освртом на полимиксин Е(колистин)
- установити раширеност употребе колистина у свету, од његовог открића па до сад, као и у које је све сврхе кориштен
- установити географску раширеност резистентних сојева код различитих домаћина
- механизме појаве резистенције, као и начин ширења
- навести и поредити предлоге и мишљења стручњака у вези са сузбијањем и контролисањем појаве ове резистенције

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Приликом израде дипломског рада рађена је анализа доступне актуелне научне литературе која се одоси на колистин, његово откриће, примену, механизме деловања, спектар деловања, токсичност, ефикасност и појаву резистенције.

На основу ових података издвојене су најзначајније информације везане за колистин, са посебним освртом на различите механизме резистенције, као и преваленцију и раширеност резистентних сојева бактерија код различитих врста животиња и људи

Методе које су кориштене су три неексперименталне методе: метода дескрипције, метода компилације и дедуктивна метода.

5. ЗАКЉУЧАК

Сарадња и комуникација међу различитим научним дисциплинама је неопходна како би се развила универзална стратегија за редукцију појаве резистенције на колистин како код људи, тако и у ветеринарској медицини и окружењу. Научници, стручњаци и владине организације ургирају да се смањи употреба колистина, препоручујући његову прескрипцију само за третман инфекција изазваних мултирезистентним бактеријама и то као последњи избор под датим околностима. Употреба колистина би требало да укључује научну процену ефикасности других лекова и да примени алтернативне стратегије за третирање инфекција проузрокованих ентеробактеријама кад год је то могуће, избегавајући антимикубна средства у потпуности, а нарочито у превентивне сврхе.

mcr-1 ген је изолован на четири континета и што је још више забрињавајуће, не само код животиња већ и из околине и људи. Додатно, поједини изолати *E. coli*, који су носиоци плазмидно-посредованих *mcr* гена (до сада их је познато 10) су уједно и ESBL или карбапенемаза-продукујуће. Ове чињенице веома забрињавају због могућег губитка ефикасности колистина код третмана мултирезистентних Грам-негативних бацила код људи.

Услед брзе појаве и ширења резистенције на антибиотике, неопходно је праћење употребе антибиотика као и усвајање одговарајућих начина лечења како би се смањила непотребна и неадекватна употреба антибиотика.

Управо због овог испитивање гена одговорних за резистенцију на различите антибиотике код бактерија је императив, укључујући гене задужене за резистенцију на колистин (*mcr*).

6.ЛИТЕРАТУРА

1. Biswas S., Brunel J.M., Dubus J.C., Gaubert M.G., Rolain J.M. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2012; 10:8, 917-934.
2. Andrade F., Silva D., Rodrigues A., Pina-Vaz C.. Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. *Microorganisms*. 8(11), 1716 (2020)
3. Apostolakos I. & Piccirillo A. A review on the current situation and challenges of colistin resistance in poultry production. *Avian Pathology*; 47:6, 546-558. (2018)
4. Bryskier, A. Peptide antibiotics. In A. Bryskier (Ed.), *Antimicrobial agents: Antibacterials and antifungals* 1st edn (pp. 826–879). Sterling: ASM Press.Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 40(9), 1333–1341 (2005)
5. Falagas ME, Kasiakou SK, Tsiodras S, Michalopoulos A. The use of intravenous and aerosolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: a review of the recent literature. *Clin. Med. Res.* 4(2), 138–146 (2006).
6. Falagas ME, Kasiakou SK, Tsiodras S, Michalopoulos A. The use of intravenous and aerosolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: a review of the recent literature. *Clin. Med. Res.* 4(2), 138–146 (2006).
7. Poirel, L., Jayol, A. & Nordmann, P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30, 557–596 (2017)
8. Olaitan, A.O.; Morand, S.; Rolain, J.M. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: A new worry and cause for vigilance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 47, 1–3. (2016)
9. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(6), 1953–1958 (2006).
10. Vaara M, Vaara T. Sensitization of Gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. *Nature* 303(5917), 526–528 (1983).
11. Kwon JA, Lee JE, Huh W et al. Predictors of acute kidney injury associated with intravenous colistin treatment. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35(5), 473–477 (2010)

12. Falagas ME, Rizos M, Bliziotis IA, Rellos K, Kasiakou SK, Michalopoulos A. Toxicity after prolonged (more than four weeks) administration of intravenous colistin. *BMC Infect. Dis.* 5, 1 (2005).
13. Bosso JA, Liptak CA, Seilheimer DK, Harrison GM. Toxicity of colistin in cystic fibrosis patients. *DICP* 25, 1168–1170 (1991).
14. WHO. (2017). Critically important antimicrobials for human medicine. Geneva: World Health Organization
15. Tsuji, B.T.; Pogue, J.M.; Zavascki, A.P.; Paul, M.; Daikos, G.L.; Forrest, A.; Giacobbe, D.R.; Viscoli, C.; Giamarellou, H.; Karaikos, I.; 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), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy* 2019, 39, 10–39.
16. Michalopoulos, A.; Falagas, M.E. Colistin and Polymyxin B in Critical Care. *Crit. Care Clin.* 2008, 24, 377–391.
17. De Jonge, E.; Schultz, M.J.; Spanjaard, L.; Bossuyt, P.M.M.; Vroom, M.B.; Dankert, J.; Kesecioglu, J. Effects of selective decontamination of digestive tract on mortality and acquisition of resistant bacteria in intensive care: A randomised controlled trial. *Lancet* 2003, 362, 1011–1016.
18. Lu, Q.; Luo, R.; Bodin, L.; Yang, J.; Zahr, N.; Aubry, A.; Golmard, J.L.; Roubay, J.J. Efficacy of high-dose nebulized colistin in ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* and *acinetobacter baumannii*. *Anesthesiology* 2012, 117, 1335–1347.
19. Lagerbäck, P.; Khine, W.W.T.; Giske, C.G.; Tängdén, T. Evaluation of antibacterial activities of colistin, rifampicin and meropenem combinations against NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in 24 h in vitro time-kill experiments. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016, 71, 2321–2325
20. Lee, G.C.; Burgess, D.S. Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: A review of published case series and case reports. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2012, 11, 32
21. Durante-Mangoni, E.; Andini, R.; Zampino, R. Management of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019, 25, e943–e950.
22. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ et al. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin. Infect. Dis.* 36(9), 1111–1118 (2003).
23. Rodriguez CH, Hernan RC, Bombicino K et al. Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit

- with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65(2), 188–191 (2009).
24. Kallel H, Hergafi L, Bahloul M et al. Safety and efficacy of colistin compared with imipenem in the treatment of ventilator-associated pneumonia: a matched case-control study. *Intensive Care Med.* 33(7), 1162–1167 (2007).
25. Cho YS, Yim H, Yang HT et al. Use of parenteral colistin for the treatment of multiresistant Gram-negative organisms in major burn patients in South Korea. *Infection* (2011)
26. López-Alvarez B, Martín-Láez R, Fariñas MC, Paternina-Vidal B, García-Palomo JD, Vázquez-Barquero A. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventriculitis: successful treatment with intraventricular colistin. *Acta Neurochir. (Wien)* 151(11), 1465–1472 (2009)
27. Dalgic N, Ceylan Y, Sancar M et al. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventriculitis with intravenous and intraventricular colistin. *Ann. Trop. Paediatr.* 29(2), 141–147 (2009)
28. Tsuji, B.T.; Landersdorfer, C.B.; Lenhard, J.R.; Cheah, S.E.; Thamlikitkul, V.; Rao, G.G.; Holden, P.N.; Forrest, A.; Bulitta, J.B.; Nation, R.L.; et al. Paradoxical effect of polymyxin B: High drug exposure amplifies resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016, 60, 3913–3920.
29. Bergen, P.J.; Bulman, Z.P.; Landersdorfer, C.B.; Smith, N.; Lenhard, J.R.; Bulitta, J.B.; Nation, R.L.; Li, J.; Tsuji, B.T. Optimizing Polymyxin Combinations Against Resistant Gram-Negative Bacteria. *Infect. Dis. Ther.* 2015, 4, 391–415.
30. Liu Y-Y et al (2016) 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* 16(2):161–168
31. Burow, E.; Rostalski, A.; Harlizius, J.; Gangl, A.; Simoneit, C.; Grobbel, M.; Kollas, C.; Tenhagen, B.A.; Käsbohrer, A. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Prev. Vet. Med.* 2019, 165, 52–62.
32. Rhouma, M.; Beaudry, F.; Letellier, A. Resistance to colistin: What is the fate for this antibiotic in pig production? *Int. J. Antimicrob. Agents* 2016, 48, 119–126.
33. Kempf, I., Fleury, M.A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec, J.-Y. & Jouy, E. (2013). What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42, 379–383.

34. Haenni, M.; Poirel, L.; Kieffer, N.; Châtre, P.; Saras, E.; Métayer, V.; Dumoulin, R.; Nordmann, P.; Madec, J.Y. Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *Lancet Infect. Dis.* 2016, 16, 281–282
35. Trauffler, M.; Griesbacher, A.; Fuchs, K.; Köfer, J. Antimicrobial drug use in Austrian pig farms: Plausibility check of electronic on-farm records and estimation of consumption. *Vet. Rec.* 2014, 175, 402
36. QYResearch Medical Research Centre. (2015) The global polymyxin industry report 2015. August URL [http:// www.qyresearch.com](http://www.qyresearch.com)
37. QYResearch Medical Research Centre. (2019) Global colistin sulphate market research report 2019. April URL [http:// www.qyresearch.com](http://www.qyresearch.com)
38. European Medicines Agency. Updated Advice on the Use of Colistin Products in Animals within the European Union: Development of Resistance and Possible Impact on Human and Animal Health (EMA/CVMP/CHMP/231573/2016). 2016.
39. Li, H.; Chu, Q.; Xu, F.; Fu, L.; Liang, T.; Li, Y.; Zhou, B. Combination of antibiotics suppressed the increase of a part of ARGs in fecal microorganism of weaned pigs. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016.
40. Hamouda, A.; Elbanna, H.; Haddad, M.; Aggarwal, T.; Khatri, A.; Siddiqui, S.S. Combined antimicrobial effect against some isolated bacteria from chickens. *J. Physiol. Pharmacol. Adv.* 2011, 1, 1–25
41. Li, H.; Chu, Q.; Xu, F.; Fu, L.; Liang, T.; Li, Y.; Zhou, B. Combination of antibiotics suppressed the increase of a part of ARGs in fecal microorganism of weaned pigs. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016
42. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M (2014) Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 5:643
43. Dotto, G.; Giacomelli, M.; Grilli, G.; Ferrazzi, V.; Carattoli, A.; Fortini, D.; Piccirillo, A. High prevalence of oqxAB in *Escherichia coli* isolates from domestic and wild lagomorphs in Italy. *Microb. Drug Resist.* 2014, 20, 118–123
44. Bressan, C.R.; Kunz, A.; Schmidell, W.; Soares, H.M. Toxicity of the colistin sulfate antibiotic used in animal farming to mixed cultures of nitrifying organisms. *Water Air Soil Pollut.* 2013, 224, 1441
45. Pruden, A.; Joakim Larsson, D.G.; Amézquita, A.; Collignon, P.; Brandt, K.K.; Graham, D.W.; Lazorchak, J.M.; Suzuki, S.; Silley, P.; Snape, J.R.; et al. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.* 2013, 121, 878–885
46. López-Camacho, E.; Gómez-Gil, R.; Tobes, R.; Manrique, M.; Lorenzo, M.; Galván, B.; Salvarelli, E.; Moatassim, Y.; Salanueva, I.J.; Pareja, E.; et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *klebsiella pneumoniae* outbreak

- including carbapenem and colistin resistance. J. Antimicrob. Chemother. 2014, 69, 632–636.
47. Ito-Kagawa M, Koyama Y. Selective cleavage of a peptide antibiotic, colistin by colistinase. J. Antibiot. 33(12), 1551–1555 (1980).
48. Schurek KN, Sampaio JL, Kiffer CR, Sinto S, Mendes CM, Hancock RE. Involvement of pmrAB and phoPQ in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 53(10), 4345–4351 (2009)
49. Fernández L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock RE. Adaptive resistance to the ‘last hope’ antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. Antimicrob. Agents Chemother. 54(8), 3372–3382 (2010).
50. Helander IM, Kilpeläinen I, Vaara M. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*: a ³¹P-NMR study. Mol. Microbiol. 11(3), 481–487 (1994).
51. Sun S, Negrea A, Rhen M, Andersson D, Genetic Analysis of Colistin Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53 (6) 2009, Pages2298-2305
52. Moskowitz, S.M., Ernst, R.K. & Miller, S.I. (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. Journal of Bacteriology, 186, 575–579..
53. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. Antimicrob. Agents Chemother. 53(9), 3628–3634 (2009).
54. Moffatt JH, Harper M, Harrison P et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrob. Agents Chemother. 54(12), 4971–4977 (2010)
55. Beceiro A, Llobet E, Aranda J et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. Antimicrob. Agents Chemother. 55(7), 3370–3379 (2011).
56. Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter*
57. Bell A, Bains M, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH: expression from the cloned gene and function in EDTA and gentamicin resistance. J. Bacteriol. 173(21), 6657–6664 (1991).

58. Macfarlane EL, Kwasnicka A, Ochs MM, Hancock RE. PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol.* 34(2), 305–316 (1999)
59. Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, et al. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46, 297–306.
60. Xavier BB et al (2016) Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance* 21(27):30280
61. Veldman, K.; van Essen-Zandbergen, A.; Rapallini, M.; Wit, B.; Heymans, R.; van Pelt, W.; Mevius, D. Location of colistin resistance gene *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* from livestock and meat. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016, 71, 2340–2342
62. Quesada, A.; Ugarte-Ruiz, M.; Iglesias, M.R.; Porrero, M.C.; Martínez, R.; Florez-Cuadrado, D.; Campos, M.J.; García, M.; Píriz, S.; Sáez, J.L.; et al. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Res. Vet. Sci.* 2016, 105, 134–135
63. Carroll LM et al (2019) Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistinsusceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *MBio* 10(3):e00853–e00919
64. Wang C et al (2020) Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect* 9(1):508–516
65. Skov RL, Monnet DL (2016) Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill* 21(9):30155
66. Moosavian M, Emam N (2019) The first report of emerging mobilized colistin-resistance (*mcr*) genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran. *Infect Drug Resist* 12:1001
67. Hussein, N.H., AL-Kadmy, I.M.S., Taha, B.M. *et al.* Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Mol Biol Rep* 48, 2897–2907 (2021).
68. Gao R et al (2016) Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance. *PLoS Pathog* 12(11):e1005957
69. Ye H et al (2016) Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. *MBio* 7(2):e00177–e216
70. Partridge SR et al (2018) Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (*mcr*) genes. *J Antimicrob Chemother* 73(10):2625–2630
71. Yin W et al (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio* 8(3):e00543–e617

72. Carattoli A et al (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
73. Carretto E et al (2018) Detection of *mcr-4* positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. *Eurosurveillance* 23(2):17–00821
74. Zhang H et al (2019) Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4. *Commun Biol* 2(1):1–1
75. Borowiak M. et al (2019.) Characterization of *mcr-5*-Harboring *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Animal and Food Origin in Germany;
76. AbuOun M et al (2017) *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother* 72(10):2745–2749 *Antimicrob Chemother* 63(6);
77. Yang Y-Q et al (2018) Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 73(7):1791–1795
78. Wang X et al (2018) Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* 7(1):1–9
79. Yingbo Shen , 1,2 Rong Zhang , 3 Stefan Schwarz , 4 Congming Wu, 1 Jianzhong Shen , 1 Timothy R. Walsh 5 and Yang Wang 1; Farm animals and aquaculture: significant reservoirs of mobile colistin resistance genes
80. Kusumoto, M., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T., and Akiba, M. (2016) Colistin-resistant *mcr-1*-positive pathogenic *Escherichia coli* in swine, Japan, 2007-2014. *Emerg Infect Dis* 22: 1315–1317
81. Lima Barbieri, N., Nielsen, D.W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S.G., et al. (2017) *mcr-1* identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PLoS One* 12: e0172997
82. Fernandes, M.R., Moura, Q., Sartori, L., Silva, K.C., Cunha, M.P., Esposito, F., et al. (2016) Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill* 21: 30214.
83. Grami, R., Mansour, W., Mehri, W., Bouallegue, O., Boujaafar, N., Madec, J.Y., and Haenni, M. (2016) Impact of food animal trade on the spread of *mcr-1*-mediated colistin resistance, Tunisia, July 2015. *Euro Surveill* 21: 30144.
84. Zheng, B., Feng, C., Xu, H., Yu, X., Guo, L., Jiang, X., and Song, X. (2019) Detection and characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* expressing *mcr-1* from dairy cows in China. *J Antimicrob Chemother* 74: 321–325.

85. Khalifa, H.O., Ahmed, A.M., Oreiby, A.F., Eid, A.M., Shimamoto, T., and Shimamoto, T. (2016) Characterisation of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr1* in *Escherichia coli* isolated from animals in Egypt. *Int J Antimicrob Agents* 47: 413–414.
86. Yamaguchi, T., Kawahara, R., Harada, K., Teruya, S., Nakayama, T., Motooka, D., et al. (2018) The presence of colistin resistance gene *mcr-1* and *-3* in ESBL producing *Escherichia coli* isolated from food in Ho Chi Minh City, Vietnam. *FEMS Microbiol Lett* 365: pii: 4978414.
87. Schrauwen, E.J.A., Huizinga, P., van Spreuwel, N., Verhulst, C., Kluytmans-van den Bergh, M.F.Q., and Kluytmans, J. (2017) High prevalence of the *mcr-1* gene in retail chicken meat in The Netherlands in 2015. *Antimicrob Resist Infect Control* 6: 83
88. Monte, D.F., Mem, A., Fernandes, M.R., Cerdeira, L., Esposito, F., Galvao, J.A., et al. (2017) Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 61: e02718–e02716.
89. Rau, R.B., de Lima-Morales, D., Wink, P.L., Ribeiro, A.R., Martins, A.F., and Barth, A.L. (2018) Emergence of *mcr-1* producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from retail meat: first detection in Brazil. *Foodborne Pathog Dis* 15: 58–59.
90. Dang, S.T., Petersen, A., Van Truong, D., Chu, H.T., and Dalsgaard, A. (2011) Impact of medicated feed on the development of antimicrobial resistance in bacteria at integrated pig-fish farms in Vietnam. *Appl Environ Microbiol* 77: 4494–4498.
91. Dalsgaard, A., Bjergskov, T., Jeppesen, V.F., Jorgensen, L.B., Echeverria, P., and Dalsgaard, I. (1996) Prevalence and characterization of *Vibrio cholerae* isolated from shrimp products imported into Denmark. *J Food Prot* 59: 694–697
92. Lv, L., Cao, Y., Yu, P., Huang, R., Wang, J., Wen, Q., et al. (2018) Detection of *mcr-1* gene among *Escherichia coli* isolates from farmed fish and characterization of *mcr-1*-bearing IncP plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 62: e02378–e02317.
93. Liu, X., Geng, S., Chan, E.W., and Chen, S. (2019) 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. *Euro Surveill* 24: 1800113.
94. Liu, D., Song, H., Ke, Y., Xia, J., Shen, Y., Ou, Y., et al. (2020) Co-existence of two novel phosphoethanolamine transferase gene variants in *Aeromonas jandaei* from retail fish. *Int J Antimicrob Agents* 55: 105856
95. Fonseca e Silva, D.; Silva-Dias, A.; Gomes, R.; Martins-Oliveira, I.; Ramos, M.H.; Rodrigues, A.G.; Cantón, R.; Pina-Vaz, C. Evaluation of rapid colistin susceptibility directly from positive blood cultures using a flow cytometry assay. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2019, 54, 820–823. [CrossRef] 42. Van Belkum, A.; Burnham, C.A.D.; Rossen, J.W.A.; Mallard, F.; Rochas, O.; Dunne, W.M. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020, 18, 299–311.

96. Novović K, Trudić A, Brkić S, Vasiljević Z, Kojić M, Medić D, Ćirković I, Jovičić B. 2017. Molecular epidemiology of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02550-16.
97. Jovčić, B.; Novović, K.; Filipić, B.; Velhner, M.; Todorović, D.; Matović, K.; Rašić, Z.; Nikolić, S.; Kiškarolj, F.; Kojić, M. Genomic Characteristics of Colistin-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Infantis from Poultry Farms in the Republic of Serbia. *Antibiotics* **2020**, *9*, 886.