

УСТОЙЧИВОСТЬ КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* К КОЛИСТИНУ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ФИТНЕС

О. В. Шамина¹✉, О. А. Крыжановская¹, А. В. Лазарева¹, Н. М. Алябьева¹, Н. А. Маянский²

¹ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

В последние годы широкое использование колистина в лечении инфекционных заболеваний привело к появлению и распространению колистинрезистентности. По данным литературы, формирование устойчивости может приводить к затратам внутренних биологических ресурсов и снижению уровня приспособленности и поддержания жизнедеятельности (бактериального фитнеса). Целью исследования было изучить молекулярные механизмы резистентности к колистину и их влияние на бактериальный фитнес карбапенемрезистентных (карба-Р) штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у пациентов в г. Москве в 2012–2017 гг. Из 159 карба-Р-изолятов 71 изолят (45%) обладал резистентностью к колистину (минимальная подавляющая концентрация больше 2 мг/л); секвенирование по методу Сенгера позволило обнаружить механизмы устойчивости у 26 (37%) изолятов. Кривые роста были построены путем измерения оптической плотности при длине волны 600 нм в течение 15 ч. Конкурентный рост колистинрезистентных (кол-Р) изолятов *K. pneumoniae* оценивали относительно колистинчувствительного (кол-С) изолята. Кол-Р- и кол-С-изоляты в экспоненциальной фазе роста смешивали в пропорции 1 : 1, инкубировали в среде Луриа–Бертани и затем наносили на агар Луриа–Бертани, содержащий 10 мг/л колистина, и без него. Индекс конкуренции рассчитывали как отношение выросших кол-Р- и кол-С-колоний. Резистентность к колистину не влияла на кинетику роста *K. pneumoniae*, но снижала конкурентоспособность относительно кол-С-изолята. Тем не менее были обнаружены кол-Р-изоляты с высоким уровнем конкурентоспособности по сравнению с кол-С-изолятами такого же сиквенс-типа. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования влияния резистентности к колистину на бактериальный фитнес.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, бактериальный фитнес, колистинрезистентность, *mgrB*, сиквенс-тип

Финансирование: исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

Благодарности: авторы благодарят С. В. Поликарпову из Городской клинической больницы № 15 имени О. М. Филатова и О. В. Карасеву из Научно-исследовательского института неотложной детской хирургии и травматологии за предоставление изолятов *K. pneumoniae*.

Вклад авторов: О. В. Шамина — планирование и проведение исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста публикации; О. А. Крыжановская, А. В. Лазарева, Н. М. Алябьева — планирование и проведение исследования; Н. А. Маянский — научное руководство, планирование и проведение исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование было проведено с соблюдением всех правил безопасности работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Вячеславовна Шамина
Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, г. Москва, 119991; olga.shamina@inbox.ru

Статья получена: 18.05.2020 **Статья принята к печати:** 02.06.2020 **Опубликована онлайн:** 12.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.032

COLISTIN RESISTANCE OF CARBAPENEM-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS: MOLECULAR MECHANISMS AND BACTERIAL FITNESS

Shamina OV¹✉, Kryzhanovskaya OA¹, Lazareva AV¹, Alyabieva NM¹, Mayanskiy NA²

¹ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The increasing use of colistin in the clinic has led to the emergence and spread of colistin resistance. According to the literature, antibiotic resistance can have a metabolic cost, resulting in poor adaptation and survival, i.e. reduced bacterial fitness. The aim of this study was to investigate molecular mechanisms underlying resistance to colistin and their effect on the bacterial fitness of carbapenem-resistant (carba-R) strains of *K. pneumoniae* isolated from the patients of Moscow hospitals in 2012–2017. Of 159 analyzed carba-R isolates, 71 (45%) were resistant to colistin (minimum inhibitory concentration over 2 mg/L). By conducting Sanger sequencing, we were able to identify the mechanisms underlying colistin resistance in 26 (37%) isolates. Growth curves were constructed by measuring optical density at 600 nm wavelength for 15 hours. The competitive growth of colistin-resistant (col-R) *K. pneumoniae* isolates was assessed relative to the colistin-susceptible (col-S) isolate. Col-R and col-S cultures harvested in the exponential phase were combined at the ratio of 1:1, incubated in the Luria-Bertani medium and plated onto Luria-Bertani agar plates with 10 mg/L colistin and without it. The competition index was calculated as the ratio of grown col-R and col-S colonies. Resistance to colistin did not affect the growth kinetics of *K. pneumoniae*, but did reduce the competitive ability of the bacteria as compared to the col-S isolates. However, some col-R isolates were more competitive than the col-S strains of the same sequence type. Further research is needed to elucidate the effects of colistin resistance on bacterial fitness.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, bacterial fitness, colistin resistance, *mgrB*, sequence type

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (Project ID 20-15-00235).

Acknowledgements: the authors thank Polikarpova SV of Filatov City Clinical Hospital № 15 and Karaseva OV of the Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology for *K. pneumoniae* isolates.

Author contribution: Shamina OV planned and conducted the study, analyzed the literature, analyzed and interpreted the obtained data, and wrote the manuscript; Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Alyabieva NM planned and conducted the study; Mayanskiy NA planned, conducted and supervised the study, analyzed the literature, collected, analyzed and interpreted the obtained data, and wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was carried out following the safety guidelines on the manipulations with pathogens of hazard groups III and IV.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga V. Shamina
Lomonosovskiy prospect, 2, str. 1, Moscow, 119991; olga.shamina@inbox.ru

Received: 18.05.2020 **Accepted:** 02.06.2020 **Published online:** 12.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.032

Klebsiella pneumoniae — одна из наиболее частых причин заболеваний, требующих оказания медицинской помощи [1]. Особую обеспокоенность вызывают появление и глобальное распространение отдельных сиквенс-типов *K. pneumoniae* высокого риска, которые обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [2, 3]. В первую очередь это относится к карбапенемрезистентным (карба-Р) *K. pneumoniae*, поскольку устойчивость к карбапенемам в большинстве случаев сочетается с резистентностью к другим антимикробным препаратам, что существенно ограничивает возможности терапии. Согласно данным мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ), большинство карба-Р-изолятов принадлежит к узкому ряду сиквенс-типов, доминирующих в структуре госпитальных популяций повсеместно [4, 5]. В настоящее время к числу глобально диссеминированных относят МЛУ-сиквенс-типы ST14/15, ST17/20, ST43, ST147, ST258, ST395 [5, 6], а также ST307, который приобрел значимость сравнительно недавно [7].

Одним из препаратов, сохраняющих активность в отношении карба-Р грамотрицательных организмов, является поликатионный антибиотик колистин (полимиксин Е). Возросшее использование колистина в клинике на фоне распространения устойчивости к карбапенемам привело к появлению колистинрезистентности [4, 8], которая может существенно снижать эффективность антимикробной терапии и проявляться увеличением показателей смертности инфицированных колистинрезистентными (кол-Р) *K. pneumoniae* [9].

Устойчивость к колистину обусловлена модификацией липополисахарида (ЛПС), например, путем изменения его структуры, что снижает связывание антибиотика с клеточной стенкой бактерии [10]. Модификация ЛПС связана с повреждением двухкомпонентной системы PhoPQ/PmrAB и ее регулятора MgrB в результате мутаций гена *mgrB*, а также с плазмидными *mcr*-подобными генами [8, 10].

Мутации, приводящие к развитию устойчивости, дают бактериям преимущество перед чувствительными штаммами в присутствии антибиотика, однако формирование и поддержание резистентности могут быть сопряжены с определенными биологическими затратами. Последние могут быть выражены в снижении темпов роста и уменьшении конкурентоспособности (т. е. уровня поддержания жизнедеятельности, который обозначают термином «бактериальный фитнес») [11, 12] по сравнению с чувствительными штаммами в отсутствие селективного действия антибиотика [13, 14]. С учетом того, что устойчивость к колистину связана с модификацией важнейшего компонента клеточной стенки бактерий — ЛПС, колистинрезистентность может быть сопряжена со снижением бактериального фитнеса.

Целью работы было охарактеризовать генотипы карба-Р-изолятов *K. pneumoniae*, выделенных у пациентов хирургических отделений и отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) в г. Москве, и описать молекулярные механизмы устойчивости к колистину, а также исследовать влияние колистинрезистентности на кинетику роста и конкурентоспособность этой популяции бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 159 карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* (минимальная подавляющая концентрация (МПК)

меропенема больше 8 мг/л и МПК имипенема больше 4 мг/л, согласно критериям EUCAST) [15], чувствительные и резистентные к колистину, собранные в течение 2012–2017 гг. в г. Москве от пациентов хирургических отделений и ОРИТ. В коллекцию были включены только недублирующиеся изоляты, т. е. от одного пациента — один изолят *K. pneumoniae*, включая изоляты из стерильных локусов (кровь, моча, ликвор), из респираторного тракта (аспират, мокрота), стомы, раны, зева, ануса.

МПК к меропенему, имипенему и тигециклину определяли с помощью метода Е-тестов (BioMerieux; Франция) на среде Мюллера–Хинтона (Bio Rad; Франция). Чувствительность к аминогликозидам (гентамицину, нетилмицину, амикацину), ципрофлоксацину, фосфомицину, цефотаксиму, цефепиму, цефтазидиму оценивали на автоматизированном бактериологическом анализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux; Франция). Субстанцию колистина в форме порошка (Sigma Aldrich; Германия) использовали для определения МПК колистина с помощью метода микроразведений в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010). В качестве контроля использовали штамм *Escherichia coli* ATCC 25922. Согласно критериям EUCAST [15], пограничные значения МПК колистина для *K. pneumoniae* составляют: чувствительные ≤ 2 мг/л, резистентные > 2 мг/л.

Выявление и/или секвенирование по методу Сенгера генов *mcr-1*, *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP* и *phoQ*, исследование аминокислотных последовательностей белков PmrA, PmrB, PhoP и PhoQ проводили согласно ранее описанным процедурам [16]. В качестве контроля выявления гена *mcr-1* использовали *mcr-1*-положительный штамм *E. coli* (штамм предоставил НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России). Для генотипирования штаммов *K. pneumoniae* использовали метод МЛСТ [17]. Идентификацию вставочных элементов проводили с помощью базы данных ISfinder [18].

Для исследования бактериального фитнеса были отобраны колистинчувствительные (кол-Ч) изоляты и колистинрезистентные (кол-Р) изоляты с поврежденными *mgrB* и *mgrB* дикого типа. Использовали суточные культуры *K. pneumoniae*, выращенные на агаре Луриа–Бертани, или LB (HiMedia Laboratories Pvt. Limited; Индия), согласно ранее описанным протоколам исследования бактериального фитнеса [14]. Готовили взвесь из одной колонии в среде LB и инкубировали в орбитальном шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSan; Латвия) при 37 °C в течение 3 ч при постоянном перемешивании 250 об./мин. Концентрацию микроорганизмов измеряли на проточном цитометре Novocyte (ACEA Biosciences; США).

Для сравнительного анализа кривых роста кол-Ч- и кол-Р-бактерий суспензию доводили до концентрации бактериальных клеток 5×10^6 в 1 мл. Полученную бактериальную взвесь в объеме 250 мкл инкубировали в 96-луночных плоскодонных планшетах в трех повторах для каждого штамма в присутствии колистина в концентрации 0, 1, 4, 16, 64 мг/л. Инкубацию проводили в многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200 (Tecan; Австрия) в течение 15 ч при 37 °C с параллельной оценкой оптической плотности при длине волны 600 нм (OP_{600}) каждые 30 мин. Данные регистрировали при помощи программы Magellan 6.6 (Tecan; Австрия). В качестве индикатора интенсивности роста использовали значение площади под кривой роста (ПКР), которую рассчитывали от начала экспоненциального роста до выхода кривой на плато (рис. 1) и выражали в OP_{600} за 1 ч.

Для оценки конкурентоспособности кол-Р- и кол-Ч-изолятов *K. pneumoniae* рассчитывали индекс конкуренции (ИК). Для этого суспензию кол-Р- и кол-Ч-изолятов доводили до концентрации $1,5 \times 10^3$ в 1 мл и смешивали в соотношении 1 : 1 ($1,5 \times 10^3$ в 1 мл КОЕ каждого штамма). Смесь кол-Р- и кол-Ч-изолятов, а также суспензии кол-Р- и кол-Ч-изолятов по отдельности выращивали в среде LB при 37 °C и 180 об./мин в течение 16–18 ч. По окончании инкубации бактериальные суспензии разводили в 10^5 раз и с помощью автомата для посева easySpiral (Interscience; Франция) наносили по 10 мкл на чашки Петри с агаром LB без колистина и с агаром LB, содержащим 10 мг/л колистина. Инкубацию проводили при 37 °C в течение 16–18 ч. Подсчет КОЕ производили с помощью автоматического счетчика Scan 500 (Interscience; Франция). ИК рассчитывали как отношение числа кол-Р-КОЕ на чашке LB с колистином к числу кол-Ч-КОЕ на чашке LB без колистина. ИК < 1 означал сниженную конкурентоспособность кол-Р-изолята по сравнению с кол-Ч-изолятом. Эксперименты выполняли в трех повторах.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM SPSS Inc; США). Значения ПКР и числа колоний представляли в виде медианы (P_{25} ; P_{75}), значения ИК выражали в виде среднего (стандартное отклонение). Различия ПКР оценивали при помощи теста Краскела–Уоллиса, парные сравнения проводили с использованием теста Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика карба-Р-изолятов *K. pneumoniae*

Все 159 карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* обладали МЛУ-фенотипом, т. е. были резистентными по меньшей мере к трем классам антимикробных препаратов. Все штаммы были устойчивы к цефалоспорином 3-го и 4-го поколений, а также имели высокий уровень резистентности к ципрофлоксацину (93%), фосфомицину (90%), нетилимицину (82%), гентамицину (84%), амикацину (50%) и колистину (45%). Большинство карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* сохраняло чувствительность к тигециклину: только у 7% была отмечена резистентность.

По данным МЛСТ, исследованные карба-Р-изоляты были распределены между 18 сиквенс-типами, но большинство (86%) относилось к пяти доминирующим сиквенс-типам: ST307 ($n = 46$, 29%), ST395 ($n = 40$, 25%), ST377 ($n = 17$, 10%), ST48 ($n = 17$, 10%) и ST23 ($n = 16$, 10%).

Механизмы устойчивости к колистину

Резистентностью к колистину обладал 71 (45%) карба-Р-изолят *K. pneumoniae*, МПК колистина для которых варьировала от 4 до 1024 мг/л и более. Расшифровка молекулярных механизмов устойчивости к колистину была начата с поиска плазмидного гена *mcr-1*, который, по данным литературы, служит наиболее частой причиной резистентности [19]. Ни в одном из 71 кол-Р-изолята *K. pneumoniae* ген *mcr-1* обнаружен не был.

Далее мы исследовали структуру гена *mgrB*, с повреждением которого может ассоциироваться устойчивость к колистину. Изменения *mgrB* были обнаружены у 23 (32%) кол-Р-изолятов (табл. 1). В 4 (17%) изолятах была выявлена делеция всего локуса *mgrB*. У 13 (56%) изолятов *mgrB* был поврежден вставочными

элементами четырех различных типов (IS1A, IS1R, ISKpn14 и ISKpn26) из семейств IS-1 и IS-5, внедренными в разные позиции *mgrB* (см. табл. 1). В гене *mgrB* у 6 (26%) кол-Р-изолятов был обнаружен новый мобильный элемент MITEKpn1, который охарактеризован в нашей недавней публикации [16].

Таким образом, 48 из 71 (68%) кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* содержали ген *mgrB* дикого типа, что требовало поиска других механизмов устойчивости к колистину. С этой целью во всех 48 кол-Р-изолятах, имевших *mgrB* дикого типа, мы проанализировали аминокислотные последовательности белков PmrA, PmrB, PhoP и PhoQ, участвующих в процессах модификации ЛПС, повреждение которых может вызывать устойчивость к колистину [10]. Значимые изменения PmrA и/или PmrB были выявлены у трех изолятов, которые принадлежали к трем разным сиквенс-типам (ST307, ST395, ST48) с МПК колистина в диапазоне от 128 до 1024 мг/л и более (см. табл. 1).

Влияние устойчивости к колистину на бактериальный фитнес

Кинетика роста кол-Р- и кол-Ч-изолятов *K. pneumoniae* в отсутствие колистина различалась незначимо, медианы ПКР составили 4,2 (3,9; 4,3) и 4,05 (3,9; 4,6) ОП₆₀₀ за 1 ч соответственно ($p = 0,842$; табл. 2). Добавление 1 мг/л колистина резко снижало ПКР кол-Ч-изолятов до 1,9 (0,95; 4,13) ОП₆₀₀ за 1 ч ($p = 0,065$), а более высокие концентрации колистина ожидаемо полностью подавляли рост чувствительных изолятов (см. табл. 2). Кол-Р-изоляты *K. pneumoniae* сохраняли обычную кинетику роста при содержании колистина 1 мг/л и демонстрировали ее значимое снижение в присутствии 4 и 16 мг/л колистина ($p = 0,016$ и $p < 0,001$ соответственно). Почти полное угнетение роста кол-Р-изолятов обнаружено при добавлении колистина в концентрации 64 мг/л, когда ПКР составила 0,9 (0; 3,0) ОП₆₀₀ за 1 ч (см. табл. 2).

При сравнении ПКР кол-Р-изолятов с поврежденным *mgrB* и *mgrB* дикого типа (см. табл. 2) оказалось, что статус *mgrB* незначимо влиял на кинетику роста бактериальной популяции вне зависимости от концентрации колистина.

Затем мы провели исследование 26 кол-Р-изолятов и рассчитали ИК в экспериментах по оценке конкурентоспособности относительно карба-Ч/кол-Ч-

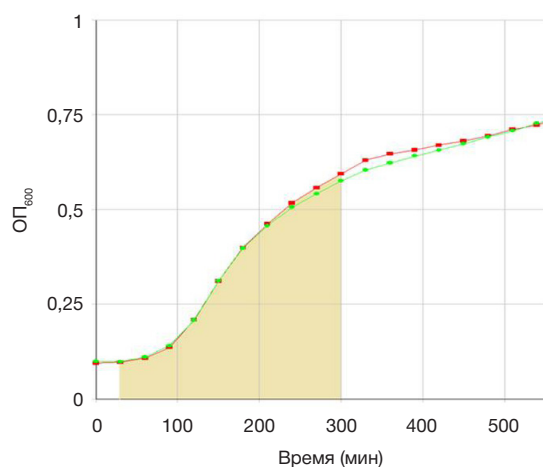


Рис. 1. Типичные кривые роста изолятов *K. pneumoniae* в среде без колистина. Заштрихованная область — площадь под кривой роста (ПКР). Красная линия — кривая роста кол-Ч-изолята; зеленая линия — кривая роста кол-Р-изолята

Таблица 1. Генотипы, фенотип и механизмы устойчивости к колистину у карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* (n = 26)

№ изолята	ST	МПК колистина, мг/л	Статус <i>mgrB</i> ^a
69-77	23	128	IS 1A, семейство IS-1 (+127/+128)
56-1790	307	64	IS 1R, семейство IS-1 (+36/+37)
68-66-1	48	16	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
58-2876	48	128	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
58-3431	48	128	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
58-2966	48	512	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
56-1678	48	≥ 1024	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
56-1053	48	≥ 1024	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
71-1375	307	512	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
76-2089	377	512	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
64-574	307	256	ISKpn26, семейство IS-5 (+74/+75)
4469	395	128	ISKpn26, семейство IS-5 (+74/+75)
52-1659	395	256	ISKpn26, семейство IS-5 (+74/+75)
58-1363	307	16	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
55-148	307	64	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
56-566	307	128	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
58-1286	307	128	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
56-613	307	512	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
48-1594	307	≥ 1024	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
78-296	37	16	Δ <i>mgrB</i> локуса
37262	147	64	Δ <i>mgrB</i> локуса
29423	70	128	Δ <i>mgrB</i> локуса
36-2246	395	128	Δ <i>mgrB</i> локуса
46-1574	307	128	Дикий тип ^b
48-2246	395	≥ 1024	Дикий тип ^b
56-410	48	128	Дикий тип ^c

Примечание: ST — сиквенс-тип; МПК — минимальная подавляющая концентрация; ^a — в скобках указана нуклеотидная позиция встраивания вставочного элемента; ^b — изменения PmrB (T157P); ^c — изменения PmrA (A141T) и PmrB (L213M, G256R); ^d — изменения PmrB (делеция 27–30 (QLIS)).

изолята *K. pneumoniae* при их совместном культивировании (рис. 2; см. табл. 2). Среднее значение ИК составило 0,15 (0,21), при этом у 25/26 (96%) кол-Р-изолятов ИК был < 1 и варьировал от 0,01 до 0,53, а один изолят имел ИК = 1. Изоляты с диким типом и повреждением *mgrB* обладали похожими ИК, которые составили 0,19 (0,26) и 0,1 (0,1) соответственно ($p = 0,283$; см. табл. 2). Таким образом, резистентность к колистину у подавляющего числа кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* была ассоциирована со снижением конкурентоспособности по отношению к карба-Ч/кол-Ч-изолятам *K. pneumoniae*, которое не зависело от статуса гена *mgrB*.

Влияние устойчивости к колистину на бактериальный фитнес было дополнительно исследовано в карба-Р/кол-Ч и карба-Р/кол-Р парах *K. pneumoniae*, относившихся к одному сиквенс-типу. Для данных экспериментов были отобраны изоляты пяти наиболее распространенных (ST23, ST48, ST307, ST377 и ST395) и одного редкого (ST147) сиквенс-типов, среди которых в коллекции имелся минимум один кол-Ч-изолят (табл. 3). Конкурентоспособность всех кол-Р-изолятов ST48, ST147, ST307 и ST377 относительно кол-Ч-изолятов аналогичных сиквенс-типов была снижена, о чем свидетельствовал ИК < 1. Результаты исследования изолятов двух других сиквенс-типов, ST23 и ST395, не были так однозначны. Один кол-Р-изолят ST23 (ИК = 1,3) и два кол-Р-изолята ST395 (ИК = 1,87 и ИК = 2,5) продемонстрировали повышенный фитнес относительно своих кол-Ч-аналогов (см. табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* в нашей коллекции относилось к пяти глобальным сиквенс-типам, причем два генотипа, ST307 и ST395, суммарно составляли 54%. По данным ряда авторов, ST307 ранее не входил в число доминирующих сиквенс-типов на территории нашей страны [20, 21], но в настоящее время становится одним из ведущих международных сиквенс-типов высокого риска [7], что согласуется с полученными нами данными.

Существенная доля (45%) исследованных нами карба-Р-изолятов была устойчива к колистину. По данным многоцентрового исследования «МАРАФОН» [2, 3], в большой выборке госпитальных *K. pneumoniae* распространенность кол-Р-изолятов была низкой, хотя и возросла с 4,5% в 2012 г. до 7,9% в 2014 г. Наши данные могут отражать общую тенденцию к повышению антибиотикорезистентности, которая затрагивает и устойчивость к колистину. Например, 15-летнее ретроспективное исследование в крупном госпитале в Афинах показало резкое увеличение доли кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* из гемокультур с 0% в 2002 г. до 26,9% в 2016 [22]. Вместе с тем высокая частота встречаемости кол-Р-штаммов в нашей коллекции могла быть связана с преобладанием изолятов, полученных в отделениях реанимации и интенсивной терапии, где, по данным Feretzakis и соавт. [23], доля кол-Р-изолятов

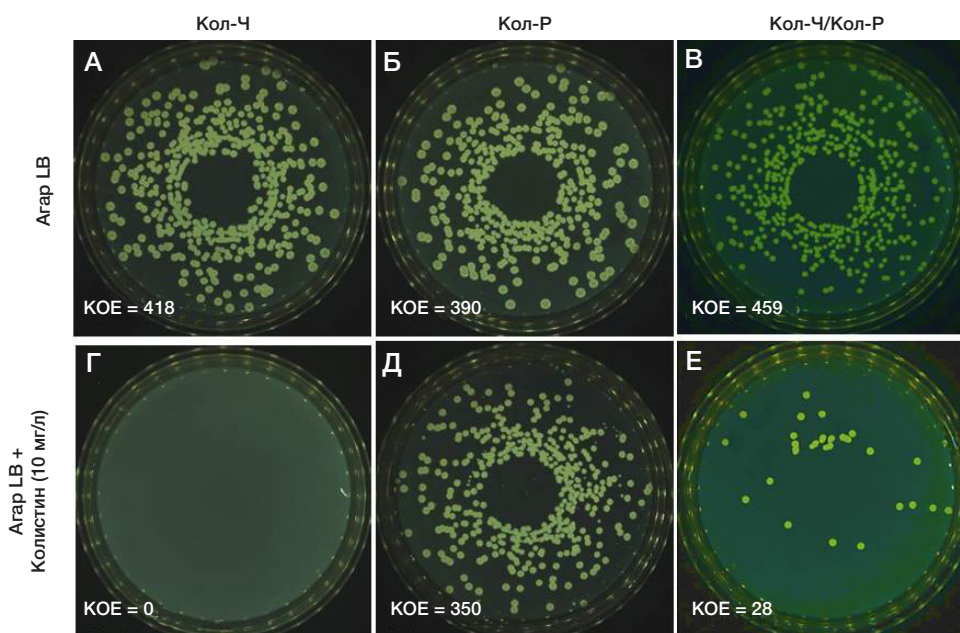


Рис. 2. Репрезентативный эксперимент по оценке конкурентоспособности колистинрезистентных *K. pneumoniae*. Кол-Ч — колистинчувствительные; кол-Р — колистинрезистентные; кол-Ч / кол-Р — смесь колистинчувствительных и колистинрезистентных изолятов; КОЕ — колониеобразующие единицы. Фотографии чашек Петри демонстрируют характер роста кол-Ч-изолятов (А, Г), кол-Р-изолятов (Б, Д) и смеси кол-Р / кол-Ч-изолятов (В, Е) *K. pneumoniae* на агаре LB без колистина (А-В) и агаре LB с содержанием 10 мг/л колистина (Г-Е). Цифры указывают число КОЕ на каждой чашке. Индекс конкурентоспособности (ИК) рассчитан как число КОЕ на LB + колистин / (число КОЕ на LB — число КОЕ на LB + колистин), т. е. КОЕ «Е» / (КОЕ «В» — КОЕ «Е»)

K. pneumoniae можеткратно превышать долю таковых в других отделениях (40 против 13,8%). Кроме того, прямое сравнение исследований, в которых использованы различные способы тестирования устойчивости к колистину, может иметь известные трудности. Так, эпсилонметрические E-тесты могут давать высокую долю ошибочных результатов по сравнению с референсным методом микроразведений, препятствуя выявлению реальной частоты колистинрезистентности [9, 20].

Наличие устойчивости к колистину не влияло на кинетику роста в отсутствие антибиотика и не зависело от статуса гена *mgrB*, что согласуется с результатами предыдущих исследований [24]. В противоположность этому, устойчивость к колистину у *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* сопровождается выраженными нарушениями динамики роста бактериальной популяции [13, 25], что может объяснять сравнительно высокую

распространенность энтеробактерий с хромосомной устойчивостью к колистину по сравнению с кол-Р *A. baumannii* и *P. aeruginosa*.

В то же время подавляющее большинство кол-Р-изолятов продемонстрировали снижение конкурентоспособности по сравнению с кол-Ч-изолятами *K. pneumoniae*, что характерно и для других видов бактерий, в частности *A. baumannii* [13] и *P. aeruginosa* [25]. Описано снижение бактериального фитнеса у кол-Р *K. pneumoniae*, являющихся носителями гена *mcr-1* [26].

Интересные результаты были получены в конкурентных экспериментах с кол-Р- и кол-Ч-изолятами *K. pneumoniae* одного сиквенс-типа, т. е. бактериями с очень схожим генотипом, но различающимися чувствительностью к колистину. Было исследовано шесть разных сиквенс-типов, и большинство протестированных кол-Р-изолятов продемонстрировали снижение ИК. В то же время у двух кол-

Таблица 2. Влияние устойчивости к колистину на бактериальный фитнес (кинетику роста и индекс конкуренции) карба-Р-изолятов *K. pneumoniae*

Изоляты	МПК колистина, мг/л; Me (P ₂₅ ; P ₇₅)	ПКР (ОП ₆₀₀ за 1 ч), Me (P ₂₅ ; P ₇₅)					ИК, среднее (СО)
		Концентрация колистина, мг/л					
		0	1	4	16	64	
Кол-Ч (n = 6)	< 1 (< 1; < 1)	4,05 (3,9; 4,6)	1,9 (0,95; 4,13)	0 (0; 4,03)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	НП
Кол-Р (n = 32)	256 (128; 512)	4,2 (3,9; 4,3) ^а	4,1 (3,7; 4,2) ^б	3,9 (3,2; 4,15) ^в	3,3 (2,2; 3,45) ^г	0,9 (0; 3) ^д	0,15 (0,21) ^е
Из них:							
<i>mgrB</i> , поврежденный (n = 15)	256 (128; 512)	4,1 (3,9; 4,2)	4 (3,9; 4,2)	3,9 (3,1; 4,1)	3,4 (0,9; 3,7)	1,1 (0; 3,3)	0,1 (0,1) ^ж *
<i>mgrB</i> , дикий тип (n = 17)	256 (96; 512)	4,3 (3,85; 4,4) ^а	4,2 (3,53; 4,25) ^а	3,8 (3,18; 4,25) ^а	3,25 (2,75; 3,43) ^а	0,9 (0; 3) ^а	0,19 (0,26) ^{а, и}

Примечание: МПК — минимальная подавляющая концентрация; ПКР — площадь под кривой роста; Me — медиана; P₂₅ и P₇₅ — 25-й и 75-й перцентили; ИК — индекс конкуренции; СО — стандартное отклонение; кол-Ч — колистинчувствительные; кол-Р — колистинрезистентные; НП — не применимо; ^а — p = 0,842 при сравнении с ПКР кол-Ч-изолятов; ^б — p = 0,19 при сравнении с ПКР кол-Р-изолятов при концентрации колистина 0 мг/л; ^в — p = 0,016 при сравнении с ПКР кол-Р-изолятов при концентрации колистина 0 мг/л; ^г — p < 0,001 при сравнении с ПКР кол-Р-изолятов при концентрации колистина 0 мг/л; ^д — p > 0,05 при сравнении с ПКР кол-Р-изолятов с поврежденным *mgrB*; ^е — n = 26; ^ж — n = 11; ^з — n = 15; ^и — p = 0,283 при сравнении с ИК кол-Р-изолятов с поврежденным *mgrB*.

Таблица 3. Индекс конкуренции кол-Р- и кол-Ч-изолятов карба-Р *K. pneumoniae* одинаковых сиквенс-типов

Кол-Р-изоляты		Механизм кол-Р	Число КОЕ (СО)		ИК (СО)
ST	№ изолята		Кол-Р (агар LB + колистин, 10 мг/л)	Кол-Ч + кол-Р (агар LB)	
ST23	37261	Неизвестный	80	141	1,3
	69–77	Поврежденный <i>mgrB</i>	39	168	0,3
	37243	Неизвестный	25	112	0,29
	37224	Неизвестный	5	114	0,05
Итого ST23:			37 (32)	134 (26)	0,48 (0,56)
ST395	52–1659	Поврежденный <i>mgrB</i>	88	135	1,87
	78–1127	Неизвестный	3	138	0,02
	59–397	Неизвестный	110	153	2,5
	4469	Поврежденный <i>mgrB</i>	17	141	0,14
Итого ST395:			55 (53)	142 (8)	1,1 (1,24)
ST377	76–1648	Неизвестный	90	335	0,37
	76–2053	Неизвестный	38	282	0,16
	76–2089	Поврежденный <i>mgrB</i>	79	232	0,52
Итого ST377:			69 (27)	283 (52)	0,35 (0,18)
ST307	64–574	Поврежденный <i>mgrB</i>	33	287	0,13
	56–566	Поврежденный <i>mgrB</i>	68	210	0,48
	71–1375	Поврежденный <i>mgrB</i>	63	196	0,47
Итого ST307:			55 (19)	231 (49)	0,36 (0,2)
ST147	37–262	Поврежденный <i>mgrB</i>	3	201	0,02
ST48	58–2966	Поврежденный <i>mgrB</i>	8	152	0,06

Примечание: ИК — индекс конкуренции; СО — стандартное отклонение.

Р-ST395-изолятов и одного кол-Р-ST23-изолята уровень конкурентоспособности оказался выше, чем у кол-Ч-изолятов аналогичных ST.

Это можно объяснить наличием в их геноме возможных компенсаторных мутаций, как было описано в случае с резистентностью к фторхинолонам и колистину у *Escherichia coli* [27] и *A. baumannii* [28]. Компенсаторные мутации в противовес мутациям, приводящим к резистентности, увеличивают бактериальный фитнес резистентных изолятов и тем самым способствуют распространению устойчивости даже в отсутствие селективного воздействия антибиотика [27, 28].

Таким образом, устойчивость к колистину широко распространена в популяции карба-Р-изолятов *K. pneumoniae*, выделенных у пациентов в г. Москве. Настораживающая эпидемиологическая ситуация в отношении кол-Р-бактерий требует проведения дальнейшего тщательного мониторинга.

ВЫВОДЫ

Среди сиквенс-типов карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* в нашей коллекции лидируют ST307 и ST395, а ведущим механизмом устойчивости к колистину является изменение гена *mgrB* различными вставочными элементами.

Изучение бактериального фитнеса кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* позволило определить, что устойчивость к колистину не влияет на кинетику роста в его отсутствие и не зависит от статуса гена *mgrB*; подавляющее большинство кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* имеют сниженную конкурентоспособность по сравнению с кол-Ч-изолятами, однако в рамках одного сиквенс-типа встречаются кол-Р-изоляты с повышенной конкурентоспособностью. Это определяет необходимость дальнейшего исследования бактериального фитнеса для понимания причин распространения резистентности к колистину среди энтеробактерий.

Литература

1. Суворова М. П., Яковлев С. В., Белобородов В. Б., Басин Е. Е., Елисева К. В., Ковеленов С. В. Распространенность и клиническое значение нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях России: исследование ЭРГИНИ. Антибиотики и химиотерапия. 2016; 61 (5–6): 32–42.
2. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Иванчик Н. В., Микотина А. В., Дехнич А. В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013–2014. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017; 19 (1): 49–56.
3. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Иванчик Н. В., Тимохова А. В., Дехнич А. В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014; 16 (4): 254–65.
4. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. Front Microbiol. 2016; 7: 1–30.
5. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. Trends Microbiol. 2016; 24 (12): 944–56.

6. Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Machulska M, Urbanowicz P, Fiett J, et al. *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73 (3): 620–25.
7. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74 (3): 577–81.
8. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2014; 44 (1): 8–15.
9. Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA et al. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clin Infect Dis.* 2017; 64 (6): 711–8.
10. Poirel L, Aurelie J, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30 (2): 557–96.
11. Guo B, Abdelraouf K, Ledesma KR, Nikolaou M, Tam VH. Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67 (4): 928–32.
12. Ternent L, Dyson RJ, Krachler AM, Jabbari S. Bacterial fitness shapes the population dynamics of antibiotic-resistant and -susceptible bacteria in a model of combined antibiotic and anti-virulence treatment. *J Theor Biol.* 2015; 372: 1–11.
13. Beceiro A, Moreno A, Fernandez N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58 (1): 518–26.
14. Choi MJ, Ko KS. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59 (11): 6763–73.
15. eucast.org [Internet]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Break-point tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0; c2018 [cited 2018 Dec 25]. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
16. Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Alyabieva NM, Polikarpova SV, Karaseva OV, et al. Emergence of a ST307 clone carrying a novel insertion element MITEKpn1 in the *mgrB* gene among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Moscow, Russia. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 55 (2): 105850.
17. *Klebsiella pneumoniae* MLST [база данных]. Доступно по ссылке: <http://www.pasteur.fr/mlst/>.
18. ISfinder database [Internet] [cited 2018 Nov 18]. Available from: <http://www-is.biotoul.fr/is.html>.
19. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents.* 2016; 48 (6): 583–91.
20. Шамина О. В., Крыжановская О. А., Лазарева А. В., Поликарпова С. В., Карасёва О. В., Чеботарь И. В. и др. Сравнение методов определения устойчивости к колистину у карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 646–50.
21. Агеевец В. А. Молекулярная характеристика продуцентов карбапенемаз семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в Санкт-Петербурге [диссертация]. СПб., 2016.
22. Tansarli GS, Papaparaskevas J, Balaska M, Samarkos M, Pantazatou A, Markogiannakis A, et al. Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: Evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52 (3): 397–403.
23. Feretzakis G, Loupelis E, Sakagianni A, Skarmoutsou N, Michelidou S, Velentza A, et al. A 2-year single-centre audit on antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* strains from an intensive care unit and other wards in a general public hospital in Greece. *Antibiotics (Basel).* 2019; 8 (2): 62.
24. Cannatelli A, Santos-Lopez A, Giani T, Gonzalez-Zorn B, Rossolini GM. Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59 (5): 2898–900.
25. Moskowicz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (2): 1019–30.
26. Nang SC, Morris FC, McDonald MJ, Han ML, Wang J, Strugnell RA, et al. Fitness cost of *mcr-1*-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73 (6): 1604–10.
27. Marcusson LL, Fridmott-Møller N, Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog.* 2009; 5 (8): e1000541.
28. Mu X, Wang N, Li X, Shi K, Zhou Z, Yu Y, et al. The Effect of Colistin Resistance-Associated Mutations on the Fitness of *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1715.

References

1. Suvorova MP, Yakovlev SV, Beloborodov VB, Basin EE, Eliseeva KV, Kovelonov SV. Rasprostranennost' i klinicheskoe znachenie nozokomial'nykh infektsiy v lechebnykh uchrezhdeniyakh Rossii: issledovanie ERGINI. Antibiotiki i khimioterapiya. 2016; 61 (5–6): 32–42. Russian.
2. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Skleenova EY, Ivanchik NV, Mikotina AV, Dekhnich AV et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013–2014. *CMAc.* 2017; 19 (1): 49–56.
3. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Skleenova EY, Ivanchik NV, Timokhova AV, Dekhnich AV et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates in Russia: results of national multicenter surveillance study «MARATHON» 2011–2012. *CMAc.* 2014; 16 (4): 254–65.
4. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1–30.
5. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends Microbiol.* 2016; 24 (12): 944–56.
6. Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Machulska M, Urbanowicz P, Fiett J, et al. *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73 (3): 620–25.
7. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74 (3): 577–81.
8. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2014; 44 (1): 8–15.
9. Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA et al. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clin Infect Dis.* 2017; 64 (6): 711–8.
10. Poirel L, Aurelie J, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30 (2): 557–96.
11. Guo B, Abdelraouf K, Ledesma KR, Nikolaou M, Tam VH. Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67 (4): 928–32.
12. Ternent L, Dyson RJ, Krachler AM, Jabbari S. Bacterial fitness shapes the population dynamics of antibiotic-resistant and -susceptible bacteria in a model of combined antibiotic and anti-

- virulence treatment. *J Theor Biol.* 2015; 372: 1–11.
13. Beceiro A, Moreno A, Fernandez N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58 (1): 518–26.
 14. Choi MJ, Ko KS. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59 (11): 6763–73.
 15. eucast.org [Internet]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Break- point tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0; c2018 [cited 2018 Dec 25]. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
 16. Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Alyabieva NM, Polikarpova SV, Karaseva OV, et al. Emergence of a ST307 clone carrying a novel insertion element MITEKpn1 in the *mgrB* gene among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Moscow, Russia. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 55 (2): 105850.
 17. *Klebsiella pneumoniae* MLST [baza dannyh]. Available from: <http://www.pasteur.fr/mlst/>. Russian.
 18. ISfinder database [Internet] [cited 2018 Nov 18]. Available from: <http://www-is.biotoul.fr/is.html>.
 19. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents.* 2016; 48 (6): 583–91.
 20. Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Polikarpova SV, Karaseva OV, Chebotar IV et al. The comparison of methods for determination of colistin susceptibility in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Klin Lab Diagn.* 2018; 63 (10): 646–50.
 21. Ageevets VA. Molekulyarnaya kharakteristika produktentov karbapenemaz semeystva Enterobacteriaceae, vydelennykh v Sankt-Peterburge [dissertatsiya]. Spb., 2016. Russian.
 22. Tansarli GS, Papaparaskevas J, Balaska M, Samarkos M, Pantazatou A, Markogiannakis A, et al. Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: Evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52 (3): 397–403.
 23. Feretzakis G, Loupelis E, Sakagianni A, Skarmoutsou N, Michelidou S, Velentza A, et al. A 2-year single-centre audit on antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* strains from an intensive care unit and other wards in a general public hospital in Greece. *Antibiotics (Basel).* 2019; 8 (2): 62.
 24. Cannatelli A, Santos-Lopez A, Giani T, Gonzalez-Zorn B, Rossolini GM. Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59 (5): 2898–900.
 25. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (2): 1019–30.
 26. Nang SC, Morris FC, McDonald MJ, Han ML, Wang J, Strugnell RA, et al. Fitness cost of *mcr-1*-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73 (6): 1604–10.
 27. Marcusson LL, Frimodt-Møller N, Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog.* 2009; 5 (8): e1000541.
 28. Mu X, Wang N, Li X, Shi K, Zhou Z, Yu Y, et al. The Effect of Colistin Resistance-Associated Mutations on the Fitness of *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1715.