



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Antimicrobial Resistance—Article

基于同一健康策略探究老挝人、动物和环境中的多黏菌素耐药性的传播特征

周宇晴^{a,b,c,*}, Refath Farzana^{a,b,c}, Somsavanh Sihalath^d, Sayaphet Rattanavong^d, Manivanh Vongsouvath^d, Mayfong Mayxay^{d,e,f}, Kirsty Sands^{a,b,c}, Paul N. Newton^{d,e,g}, David A.B. Dance^{d,e,g}, Brekhna Hassan^c, Timothy R. Walsh^{a,b}

^a Department of Zoology, University of Oxford, Oxford OX1 3SZ, UK

^b Ineos Oxford Institute for Antimicrobial Research (IOI), University of Oxford, Oxford OX1 3RE, UK

^c Department of Medical Microbiology, Institute of Infection and Immunity, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff CF14 4XN, UK

^d Lao-Oxford-Mahosot Hospital-Wellcome Trust Research Unit, Microbiology Laboratory, Mahosot Hospital, Vientiane PO Box 292, Lao PDR

^e Centre for Tropical Medicine & Global Health, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford OX3 7BN, UK

^f Institute of Research and Education Development, University of Health Sciences, Vientiane PO Box 7444, Lao PDR

^g Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London WC1E 7HT, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2021

Revised 30 December 2021

Accepted 27 January 2022

Available online 8 May 2022

关键词

多黏菌素耐药性

mcr

大肠杆菌

老挝

水平传播

摘要

本研究旨在用“同一健康”方法调查老挝可转移多黏菌素耐药性(*mcr*)的分子流行病学,并预测是否有任何优势质粒骨架和(或)菌株类型影响*mcr*的传播。2018年5—9月,在老挝万象,我们从人类(直肠正常菌群)、家禽和环境(水、苍蝇、鸟类等)中收集了673个样本。从非重复样品中分离了总共238株大肠杆菌(MCRPEC),包括98株MCR阳性大肠杆菌(MCRPEC) (“*mcr*”表示编码可转移多黏菌素耐药基因,“MCR”表示由*mcr*编码的功能蛋白)和140株MCR阴性大肠杆菌(MCRNEC),通过表型和Illumina测序对其进行特征分析。选择一部分MCRPEC进行MinION测序、接合转移试验、质粒稳定性和体外生长动力学研究。MCRPEC的比率为14.6%(98/673),在人类直肠拭子中的比率最高[45.9%(45/98), $p < 0.0001$,优势比(OR):0.125,95%优势区间(CI):0.077~0.202]。其他样品中MCRPEC的百分比为:狗粪14.3%(2/14),苍蝇12.0%(24/200),鸡肉11.0%(11/100),鸡泄殖腔8.9%(8/90),鸡盲肠8.0%(4/50),废水7.5%(4/53)。MCRPEC对复方阿莫西林、磺胺甲噁唑-甲氧苄啶、左氧氟沙星、环丙沙星和庆大霉素的耐药性显著高于MCRNEC($p < 0.05$)。基因组分析揭示了MCRPEC在不同克隆类型中的分布。与*mcr-1*相关的推定质粒Inc类型为IncX4、IncHI2、IncP1、IncI2和IncFIA,与*mcr-3*相关的质粒为IncFII、IncFIA、IncFIB、IncP1和IncR。苍蝇和其他样本中高度相似的质粒暗示了苍蝇在*mcr-1*传播中的作用。研究显示*mcr*阳性质粒能够进行接合转移,并且对高致病性克隆ST1193具有显著高的转移率。携带*mcr*的质粒,无论Inc类型如何,都是高度稳定的,并且在进入新的宿主时总是不产生适应性代价。这些发现表明,迫切需要一个标准的感染控制计划,从根源上消除耐药性。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

抗生素耐药性 (AMR) 现在被认为是健康和经济

最严重的全球威胁之一[1]。表达肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶 (KPC-1) 或新德里金属β-内酰胺酶 (NDM) [2–3]的耐碳青霉烯类肠杆菌 (CRE) 的迅速增加,已威胁到碳青

* Corresponding author.

E-mail address: yuqing.zhou@biology.ox.ac.uk (Y. Zhou).

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2022, 15(8): 45–56

引用本文: Yuqing Zhou, Refath Farzana, Somsavanh Sihalath, Sayaphet Rattanavong, Manivanh Vongsouvath, Mayfong Mayxay, Kirsty Sands, Paul N. Newton, David A.B. Dance, Brekhna Hassan, Timothy R. Walsh. A One-Health Sampling Strategy to Explore the Dissemination and Relationship Between Colistin Resistance in Human, Animal, and Environmental Sectors in Laos. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.01.013>

霉烯类药物的临床应用，这加剧了全球的关注。到目前为止，最近重新引入临床医学的黏菌素（多黏菌素E）已被认为是治疗由多药耐药（MDR）革兰氏阴性病原体（如CRE）引起的危及生命的感染的最后手段之一[4]。

自从2015年11月中国在食用动物和人源的肠杆菌中发现了可转移多黏菌素耐药性（*mcr*）机制*mcr-1*以来，从东南亚（SEA）、欧洲、非洲、北美洲、南美洲和大洋洲等六大洲45个国家的食用动物、动物产品、人和环境中分离出产生*mcr*的肠杆菌的报道越来越多[5–6]。人、动物和环境来源的多个*mcr*基因（*mcr-1*至*mcr-10*）已被描述。质粒被认为是*mcr*基因在全球传播的关键驱动因素。IncI2、IncH12和IncX4是已报道的与*mcr*相关的主要不相容组[6–8]。

在东南亚，在越南和泰国观察到肠杆菌属中*mcr*基因的流行率增加，多黏菌素的使用被认为是这种耐药性增加的驱动力[6,9–12]。老挝最近的一份报告显示，*mcr*在该国普遍流行，但没有分析*mcr*传播的驱动因素，如环境的作用或质粒载体传播*mcr*的潜力[13]。本研究旨在使用“同一健康”方法调查老挝*mcr*的分子流行病学，并通过评估遗传和功能特性来预测是否有任何优势质粒或菌株类型可能影响*mcr*的传播。

2. 材料和方法

研究大纲如图1所示。

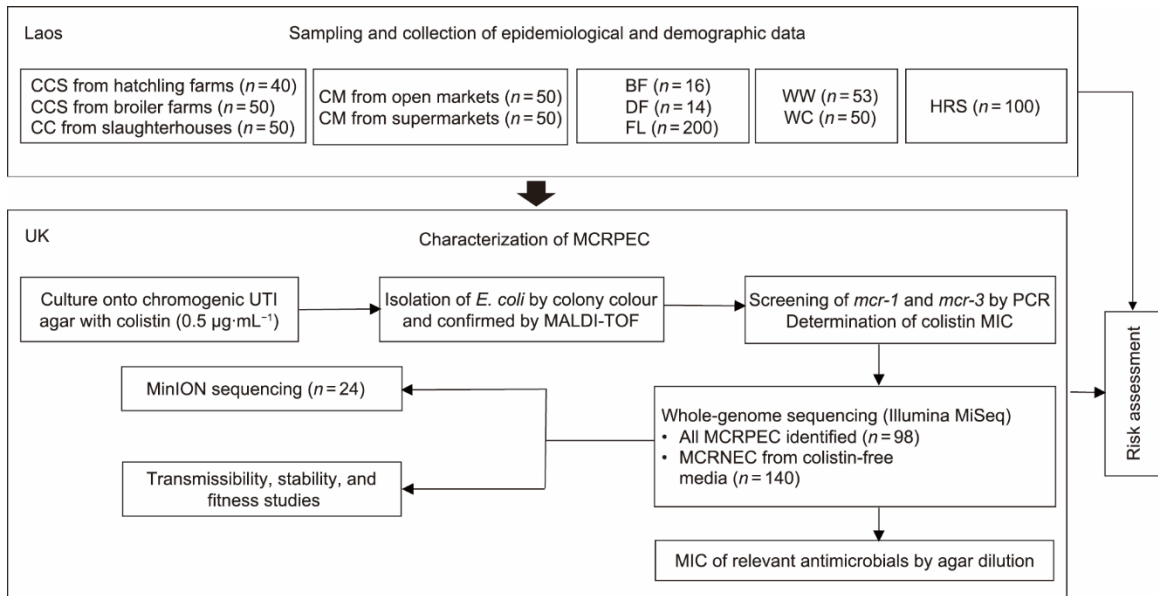


图1. 研究工作流程示意图。CCS: 鸡泄殖腔拭子; CC: 鸡盲肠; CM: 鸡肉; BF: 禽类粪便; DF: 狗粪; FL: 苍蝇; WW: 废水; WC: 运河、河流和水库的水; HRS: 人直肠拭子; *E. coli*: 大肠杆菌; MCRPEC: MCR阳性大肠杆菌; PCR: 聚合酶链反应; MALDI-TOF: 基质辅助激光解吸/电离飞行时间; UTI: 尿路感染; MIC: 最低抑菌浓度。

2.1. 抽样策略

2018年5—9月，在老挝万象实施了基于“同一健康”方法的全面采样战略。收集的673个样本包括来自健康志愿者（ $n = 100$ ）的人类直肠拭子（HRS），来自商业农场的鸡泄殖腔拭子（CCS, $n = 90$ ，包括雏和肉鸡）；来自屠宰场的鸡盲肠（CC, $n = 50$ ）；来自露天市场和超市的鸡肉（CM, $n = 100$ ）；鸟粪（BF, $n = 16$ ）；狗粪便（DF, $n = 14$ ）；来自露天市场和屠宰场的苍蝇（FL, $n = 200$ ）；来自农场、市场和屠宰场（WW）的废水（ $n = 53$ ）；以及来自运河、河流和水库的水（WC, $n = 50$ ）。采样地点选择在家禽养殖场半径10 km的范围内[附录A中的图S1（a）]。使用苍蝇胶板（PEST-STOP, UK）捕捉苍蝇，然后在无菌条件下将其单独转移到离心管中[14]。其他样本使用运输拭子（西班牙Deltalab）收集。收集志愿者的采样细节（即样本类型、位置和采样日期）和人口统计学信息（如性别、位置、基于农产品的职业、饮食习惯、饮酒习惯、卫生状况以及是否拥有农场）（附录A中的表S1）。这个项目得到了牛津大学牛津热带研究伦理委员会（524-18）和老挝国家健康研究伦理委员会（2018.62.MC）的批准。所有样品都是用UN3373集装箱（UN3373，荷兰）从老挝转移到英国，并附有相关文件。

2.2. MCR阳性大肠杆菌的表型特征

筛选包括在含有多黏菌素（ $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）的显色尿路感染（UTI）培养基（德国Merck Life Science）上培养标本，分离粉红色菌落，并通过基质辅助激光解吸/电离

飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱 (MS; 德国 Bruker Daltonics)。将苍蝇捣碎并用 Luria 培养基 (LB; 德国 Sigma-Aldrich) 培养 4 h, 然后用多黏菌素选择 ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 涂布在显色 UTI 培养基上。首先, 使用先前描述的引物 [15] 通过聚合酶链反应 (PCR) 筛选大肠杆菌的 *mcr-1* 和 *mcr-3*, 并测定多黏菌素的最低抑菌浓度 (MIC) [16]。将多黏菌素耐药性预测值阴性的样品 (即分离的大肠杆菌对多黏菌素敏感或为 *mcr-1* 或 *mcr-3* 阴性) 铺在不含多黏菌素的显色 UTI 上, 回收对多黏菌素敏感的大肠杆菌用于风险分析。在 673 株样本中, 本研究共分析了 238 株从非重复样本中分离的大肠杆菌, 其中包括 98 株 MCR 阳性大肠杆菌 (MCRPEC) 和 140 株 MCR 阴性大肠杆菌 (MCRNEC)。琼脂稀释法用于确定临床相关抗菌药物 (复方阿莫西林、哌拉西林-他唑巴坦、头孢曲松、头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、庆大霉素、替加环素、磷霉素和磺胺甲噁唑-甲氧苄啶) 的 MIC, 并根据欧洲委员会抗菌药物敏感性试验 (EUCAST) 折点对结果进行解释 [16]。

2.3. 全基因组测序

E. coli 使用 Illumina MiSeq 平台 (美国 Illumina 公司) 对从初级筛选中分离的大肠杆菌 ($n = 238$) 进行测序。基于 MiSeq 装配预测与 *mcr* 相关的质粒背景, 并相应地选择 24 个具有不同质粒背景的携带 *mcr* 的大肠杆菌用于 MinION 测序 (英国 Oxford Nanopore Technologies)。简而言之, 使用 QIAcube (德国 Qiagen) 从过夜培养物中提取基因组 DNA (gDNA)。使用 Nextera XT 制备用于配对末端测序 (2×301 个循环) 的 DNA 文库。原始读长的质量控制包括 fastqc (0.11.2), 使用 Trimgalore 进行接头微调 (0.4.3)。使用 novo assembler SPAdes (3.9.0) (.fasta) 将读长组装成重叠群并使用 Burrows-Wheeler 比对器 (BWA; 0.7.15)。使用 Pilon (1.22) 纠正任何错误。使用 Quast (2.1) 评估装配度量。然后用 Prokka (1.12 版) 对从头组装进行注释, 输出 (.gff) 进行核心基因组比对。我们使用 RA×ML-ng (v0.9.0.git-mpi) 对核心序列构建了最大似然 (ML) 树, 该树具有一般的时间可逆 (GTR) 进化模型和伽马校正迭代, 直到引导以 3% 的截止值收敛 (默认), 随后使用交互式生命树 (iTOL) (v5) 进行可视化。使用 Porechop (0.2.3) 对从 MinION 测序获得的原始读长进行解复用。Unicycler (0.4.4) 用于产生使用 Illumina 短读长和 MinION 长读长的杂交装配。本研究使用的数据库是来自基因组流行病学中心 (CGE) 的多位点序列分型 (MLST)

数据库 (v2.0.0)、Clermont 数据库 (v1.4.0) 以及 Resfinder 和 plasmid finder in ABRicate (v0.9.7)。来自该研究的所有全基因组测序数据已经以生物项目登记号 PRJNA763111 保存在 GenBank 中。

2.4. 接合转移、质粒稳定性和生长动力学

选择 10 个携带 5 种不同 *mcr* Inc 型质粒 [IncX4 ($n = 2$)、IncI2 ($n = 2$)、IncHI2 ($n = 2$)、IncP1 ($n = 2$) 和 IncFII ($n = 2$)] 的 MCRPEC 作为供体, 并选择来自不同地区的 4 个受体 [受体 1 (R1): ST10 来自该研究; R2: 来自巴西的 ST131; R3: 来自中国的 ST1193; R4: 来自孟加拉国的 ST167 和大肠杆菌 J53] 用于接合转移试验。供体和受体的选择标准如下: ① 供体和受体不属于同一序列类型 (STs); ② 受体为 *mcr* 阴性; 以及 ③ 受体属于流行病学上重要的大肠杆菌 STs (例如, ST10 被认为是 *mcr-1* 的最大宿主 [17], ST131 是 *bla*_{CTX-M-15} 的流行性克隆 [18], ST1193 是高毒性克隆 [19], ST167 是 *bla*_{NDM} 的高风险克隆 [3])。除了来自巴西和孟加拉国的分离株含有 IncFII 质粒 (附录 A 中的表 S2) 之外, 受体不含有与供体相同的 Inc 组质粒。每个受体对每个供体进行接合实验。供体和受体在 LB 培养基中于 37°C 下以 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度振荡生长, 直到它们达到指数生长期 [在 620 nm 处的光密度 (OD_{620}) 为 0.6]。用 1:3 的供体-受体混合物在液体培养基中于 37°C 过夜培养。然后将过夜培养物的系列稀释液铺在含有多黏菌素 ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和多黏菌素加选择性抗生素 (基于相关受体的敏感性模式) 的显色培养基上。在适当的情况下, 通过 *mcr* 的 PCR, 然后是 Clermont 分型、基于重复元件序列的 PCR (rep-PCR) 或 MLST (附录 A 中的表 S3) 来确认成功的接合。通过相对于供体的跨接合物的集落形成单位 (CFU) 计数来计算转移频率。

根据之前描述的方案 [20], 通过无抗生素环境中连续传代 15 天, 研究了获得的所有接合子 ($n = 41$) 的稳定性。将过夜培养物在不含黏菌素的新鲜 LB 培养基中稀释至 1:1000, 并在 37°C 下剧烈摇动 ($220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 24 h。对每个菌株进行三次生物学重复。使用煮沸裂解法在第 0 天、第 3 天、第 6 天、第 9 天、第 12 天和第 15 天提取总 gDNA [21]。使用 StepOnePlus qPCR 机器 (英国 Applied Biosystems) 通过定量 PCR (qPCR) 测量 15 天传代中携带 *mcr* 的质粒的丰度变化, 使用 *mcr* 变体的特异性引物和探针以及管家基因 (HKG) *rpoB* (表 S3)。与 HKG 相比, *mcr* 的相对丰度通过 delta-delta Ct 方法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 计算。实验重复进行三次。

研究了所有接合子 ($n = 41$) 和受体 ($n = 5$) 的生长

动力学[20]。将细菌过夜培养物(37 °C在新鲜LB培养基中)在新鲜LB培养基中以1:1000稀释。使用FLUOstar Omega酶标仪(英国BMG LABTECH公司)以100 r·min⁻¹的速度振荡24 h,每隔半小时监测OD₆₂₀,记录细菌生长。对每个菌株进行三次生物学重复和两次技术性重复。

2.5. 问卷和统计分析

使用SPSS (v26)进行单因素逻辑回归,以评估人类携带MCRPEC的潜在风险和社会人口学统计指标(即性别、地区、职业、饮食习惯、日常饮用水来源、厕所类型和最近三个月内抗生素的使用情况),并检查MCRPEC和其他相关变量(即MCRPEC在不同来源和地点的患病率、在不同STs中的分布、耐药性和毒力分布)之间的相关性。在GraphPad Prism (v7.04)中采用单因素方差分析(ANOVA)来研究供体、受体和质粒的细节对接频率的影响。经统计学处理,差异有统计学意义($p < 0.05$)。

3. 结果

3.1. MCRPEC的流行率

MCRPEC的总流行率为14.6% (98/673),其中,直肠拭子中的流行率最高[45.9% (45/98), $p < 0.0001$, OR: 0.125, 95% CI: 0.077~0.202]。其他样品中MCRPEC的百分比为:狗粪14.3% (2/14),苍蝇12.0% (24/200),鸡肉11.0% (11/100),鸡泄殖腔8.9% (8/90),鸡盲肠8.0% (4/50),废水7.5% (4/53)。在鸟类粪便或来自运河、河流和水库的水中没有发现MCRPEC(图S1和附录A中的表S4)。表1、图S1(b)和附录A中的表S5显示了来自万象不同地点的MCRPEC的相对流行率,这些数据显示,在Xaythany和Xaysetha, MCRPEC的流行率显著高于其他地点。*mcr*最常见的变体是*mcr-1* (14.3%, 96/673),其次是*mcr-3* (2.4%, 16/673)。发现大多数(87.5%, 14/16) *mcr-3*与*mcr-1*相关(表2)。

3.2. 与人类粪便携带MCRPEC相关的风险因素

单因素逻辑回归分析显示,携带MCRPEC患者与非MCRPEC患者相比,并不存在性别、地区、家庭饮水和卫生设施以及抗生素摄入量方面的显著关联。与没有家养动物的参与者相比,仅在有家养动物的参与者中观察到与携带MCRPEC相关的统计学显著性($p < 0.05$) (附录A中的表S6)。

3.3. MCRPEC的抗生素耐药性

MCRPEC对复方阿莫西林、复方新诺明、左氧氟沙

星、环丙沙星和庆大霉素的耐药率明显高于MCRNEC ($p < 0.05$),耐药率分别为94.9%、85.7%、56.1%、54.1%和26.5%。然而,只有6.1%、5.1%和1.0%的MCRPEC对替环素、头孢菌素和磷霉素耐药,所有MCRPEC对阿米卡星、哌拉西林-他唑巴坦、亚胺培南和美洛培南敏感(表3)。

氨基糖苷类耐药基因[*aac(3)-IId*、*aadA2*、*aph(3'')-Ib*、*aph(3')-Ia*和*aph(6)-Id*]、 β -内酰胺酶基因 bla_{TEM-1B} 、氯霉素耐药基因(*floR*、*cmlA1*和*dfiA12*)、大环内酯类耐药基因[*mef(B)*和*mph(A)*]、氟喹诺酮类耐药基因*qnrS1*、磺胺类和甲氧苄啶类耐药基因(*sul2*和*sul3*)和四环素耐药基因[*tet(A)*和*tet(M)*]与MCRPEC显著相关($p < 0.05$),其中,*oqxA*和*oqxB*仅在MCRPEC中存在(附录A中的表S7)。

3.4. 大肠杆菌群体的克隆分布

本研究中测序的238株大肠杆菌($n = 238$)分布在134个不同的STs中。最普遍的STs是ST48 ($n = 17$)、ST206 ($n = 10$)、ST10 ($n = 9$)和ST58 ($n = 9$) (图2)。特定的STs和*mcr*的存在之间没有显著的关联;然而,ST5229的所有分离株都携带*mcr* (附录A中的表S8)。大肠杆菌ST58仅从苍蝇中发现,属于ST48和ST206的大肠杆菌分别与鸡盲肠和鸡肉有显著相关性($p < 0.05$) (附录A中的表S9)。在98个MCRPEC中,大多数属于系统群A (59/98, 44.4%)和B1 (30/98, 42.9%) (图2和附录A中的表S10)。

3.5. 毒力基因与MCRPEC的关系

毒力相关基因编码肠杆菌素[*entC* (238/238, 100.0%)、*entE* (238/238, 100.0%)、*entB* (237/238, 99.6%)和*entS* (234/238, 98.3%)]和铁肠杆菌素[*fepD* (238/238, 100.0%)、*fepB* (237/238, 99.6%)、*fepC* (237/238, 99.6%)、*fepA* (233/238, 97.9%)、*fes* (237/238, 99.6%)]。此外,与大肠杆菌血红素摄取系统相关的毒力基因,如*chuU*、*chuV*、*chuW*、*shuA*和*shuX*,与MCRNEC显著相关($p < 0.05$),而只有*fimF*和*fimG* (I型菌毛)与MCRPEC相关($p < 0.05$) (附录A中的表S11)。

3.6. 携带*mcr-1*基因的质粒的特点

在这项研究中获得了携带*mcr-1.1*的完整环状质粒,属于33~34 kb的IncX4 ($n = 8$)、195~280 kb的IncHI2 ($n = 4$)、47~56 kb的IncP1 ($n = 4$)、59~87 kb的IncI2 ($n = 4$)和209 kb的IncFIA ($n = 1$)。在核苷酸水平上的基因组比较表明,IncX4质粒在99%的覆盖率下有99%的相似性,IncHI2在85%的覆盖率下有99%的相似性,IncP1在98%的

表1 万象不同采样地点MCRPEC流行率的单变量逻辑回归分析

Sampling locations for different sampling sector	MCRPEC, <i>n</i> (%)	OTHERS*, <i>n</i> (%)	<i>p</i> value	OR	95% CI
Sampling locations for HRS					
Xaysetha	20 (44.4)	31 (56.4)	0.237	1.615	0.730–3.570
Xaythany	25 (55.6)	24 (43.6)	0.237	1.615	0.730–3.570
Sampling locations for FL					
Xaysetha	3 (12.5)	30 (17.0)	0.575	1.438	0.403–5.132
Chanthabuly	14 (58.3)	79 (44.9)	0.219	0.582	0.245–1.380
Sisattanak	4 (16.7)	46 (26.1)	0.320	1.769	0.574–5.449
Sikhottabong	3 (12.5)	21 (11.9)	0.936	0.948	0.260–3.455
Sampling locations for CCS					
Xaythany	2 (25.0)	18 (22.0)	0.843	0.844	0.157–4.543
Pakngum	0	15 (18.3)	—	—	—
Hadxaifong	4 (50.0)	16 (19.5)	0.062	0.242	0.055–1.075
Sikhottabong	2 (25.0)	23 (28.0)	0.854	1.169	0.220–6.220
Naxaithong	0	10 (12.2)	—	—	—
Sampling locations for CC					
Chanthabuly	1 (25.0)	19 (41.3)	0.531	2.111	0.204–21.873
Sisattanak	3 (75.0)	17 (37.0)	0.172	0.195	0.019–2.031
Xaysetha	0	10 (21.7)	—	—	—
Sampling locations for CM					
Chanthabuly	1 (9.1%)	23 (25.8)	0.246	3.485	0.423–28.735
Sikhottabong	2 (18.2%)	22 (24.7)	0.634	1.478	0.297–7.363
Sisattanak	5 (45.5%)	23 (25.8)	0.181	0.418	0.116–1.501
Xaysetha	2 (18.2%)	18 (20.2)	0.873	1.141	0.226–5.748
Xaythany	1 (9.1%)	3 (3.4)	0.381	0.349	0.033–3.680
Sampling locations for DF					
Hadxaifong	1 (50.0%)	0	—	—	—
Naxaithong	0	6 (50.0)	—	—	—
Pakngum	0	4 (33.3)	—	—	—
Xaythany	1 (50.0%)	2 (16.7)	0.318	0.200	0.008–4.716
Sampling locations for Water					
Chanthabury	1 (25.0)	8 (8.1)	0.272	0.264	0.025–2.838
Hadxaifong	0	8 (8.1)	—	—	—
Naxaithong	1 (25.0)	18 (18.2)	0.732	0.667	0.066–6.784
Pakngum	0	20 (20.2)	—	—	—
Sikhottabong	0	9 (9.1)	—	—	—
Sisattanak	2 (50.0)	16 (16.2)	0.112	0.193	0.025–1.470
Xaysetha	0	13 (13.1)	—	—	—
Xaythany	0	7 (7.1)	—	—	—

OTHERS refers to samples from which MCRPEC were not isolated. Values in parentheses indicate column percentage. Data for bird feces was not shown in this table as no MCRPEC was isolated from this sampling sector. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

覆盖率为99%的相似性，而IncI2在91%覆盖率下有99%的相似性。IncX4、IncHI2、IncP1和IncI2质粒的宿主来源见附录A中的图S2。对*mcr-1*附近遗传环境的分析显示，所有质粒都有一个2300–2400 bp的保守片段，包含*mcr-1.1*和*pap2* (*mcr-1.1*的上游)。仅在IncFIA ($n = 1$)和

IncP1 ($n = 1$)两个质粒中，保守区被两个完整的*ISApII*括起来。质粒IncI2 ($n = 2$)和IncFIA ($n = 1$)在*mcr-1.1*下游有一个完整的*ISApII*。在本研究中其他质粒序列中发现*mcr-1.1*周围的*ISApII*完全缺失[图3 (a)和图S2]。所有属于IncX4的质粒、属于IncP1的三个质粒和属于IncI2的两个

表2 不同部门样本中 *mcr* 变体的百分率

Sampling sectors	Number of samples	Number of <i>mcr</i> variants (%)		
		<i>mcr-1</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-1</i> & <i>mcr-3</i>
Bird feces	16	0	0	0
Chicken caeca	50	4 (8.0)	0	0
Chicken cloacal	90	8 (8.9)	0	0
Chicken meat	100	11 (11.0)	2 (2.0)	2 (2.0)
Dog feces	14	2 (14.3)	0	0
Flies	200	23 (11.5)	6 (3.0)	5 (2.5)
Human rectal	100	44 (44.0)	8 (8.0)	7 (7.0)
Water from canal, rivers, and reservoirs	50	0	0	0
Wastewater	53	4 (7.5)	0	0
Total	673	96 (14.3)	16 (2.4)	14 (2.1)

Values in parentheses indicate column percentage.

表3 MCRPEC和MCRNEC抗生素耐药性的单变量逻辑回归分析

Antibiotics	Resistant to respective antibiotics, <i>n</i> (%)		<i>p</i> value	OR	95% CI
	MCRPEC	MCRNEC			
	(<i>n</i> =98)*	(<i>n</i> =140)			
AUG	93 (94.9)	109 (77.9)	0.001	0.189	0.071–0.506
FEP	5 (5.1)	2 (1.4)	0.122	0.270	0.051–1.419
CTX	5 (5.1)	2 (1.4)	0.122	0.270	0.051–1.419
CAZ	5 (5.1)	2 (1.4)	0.122	0.270	0.051–1.419
CRO	5 (5.1)	2 (1.4)	0.122	0.270	0.051–1.419
CIP	53 (54.1)	36 (25.7)	<0.0001	0.294	0.170–0.509
LVX	55 (56.1)	31 (22.1)	<0.0001	0.222	0.126–0.391
AMK	0 (0)	1 (0.7)	—	—	—
GEN	26 (26.5)	8 (5.7)	<0.0001	0.168	0.072–0.390
TGC	6 (6.1)	6 (4.3)	0.526	0.687	0.215–2.195
FOF	1 (1.0)	1 (0.7)	0.800	0.698	0.043–11.293
SXT	84 (85.7)	74 (52.9)	<0.0001	0.187	0.097–0.360

* Only *E. coli* confirmed for *mcr* by sequencing were included in this analysis. Values in parentheses indicate column percentage. AUG, co-amoxiclav; FEP, cefepime; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CRO, ceftriaxone; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TGC, tigecycline; FOF, fosfomycin; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim. All MCRPEC and MCRNEC tested in this study were susceptible to piperacillin-tazobactam, imipenem, and meropenem. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Values in parentheses indicate column percentage.

质粒仅携带 *mcr* 作为耐药基因；然而，所有的 IncHI2 质粒都显示为 MDR（附录 A 中的图 S3）。

3.7. 携带 *mcr-3* 的质粒的鉴定

IncFII 的质粒大小范围为 71~87 kb ($n = 3$)，IncP1 的质粒大小为 53 kb ($n = 1$)，IncR 的质粒大小为 64 kb ($n = 1$)，IncFIA 的质粒大小为 112 kb ($n = 1$)，IncFIB 的质粒大小为 103 kb ($n = 1$)，可以通过短读和长读序列数据的混合组装来闭合。表征的 *mcr-3* 变体是 IncFII ($n = 2$)、IncFIA 和 In-

cP1 上的 *mcr-3.5*，IncR 上的 *mcr-3.1*，IncFIB 上的 *mcr-3.19*，IncFII 上的 *mcr-3.21* ($n = 1$)，以及未测定质粒上的 *mcr-3.1* 和 *mcr-3.4*。携带 *mcr-3* 的 IncFII 质粒核苷酸水平的基因组比较显示，在 69%~86% 的覆盖率下，有 97% 的一致性。IncFII 质粒的宿主来源如附录 A 中的图 S4 所示。在除 IncFIA 以外的所有质粒中都发现了核心片段 Δ TnAs2-*mcr-3-dgkA*，其中，TnAs2 在 *mcr-3* 下游丢失。发现 ISKpn40 和 IS26 与 *mcr-3* 的保守区域相关，分布在不同 Inc 类型的质粒中。IncFIB、IncFII ($n = 1$) 和 IncR 质粒中，*dgkA* 的上游有 ISKpn40，在 IncP1 中，*dgkA* 的上游为 IS26。有趣的是，在 IncFIA 质粒中发现了 IS26 存在于（两端方向相同）*mcr-3-dgkA* 两侧。IS15DI 也与 *mcr-3* 的保守片段相关，但 IS15DI 的分布仅限于 IncFII ($n = 2$) 和 IncFIB 质粒 [图 3 (b)]。携带 *mcr-3* 的质粒除一个 IncFII 和一个 IncP1（仅编码 *mcr-3*）外均为 MDR，且耐药表型多样（图 S3）。

3.8. 质粒的可转移性、稳定性和适应性代价

所有结合转移实验产生的接合频率范围从低 (1×10^{-8}) 到高 (1×10^{-1})（附录 A 中的表 S12）；然而，在某些情况下接合不成功（IncHI2 到 ST10，ST131 和 ST167；IncI2 到 ST131；IncP1 到 ST167；以及 IncX4 到 ST131）（图 4 和表 S12）。ST1193 受体的平均接合频率显著高于其他 STs 受体 ($p < 0.05$)。在供体 STs、供体来源和质粒 Inc 类型方面，未观察到转移率的显著差异（附录 A 中的表 S13）。

在无抗生素培养基中连续传代的转接合子显示，与第 0 天相比，*mcr* 的拷贝数直到第 15 天都是稳定的。仅在携带 IncP1 的 CX-17 (ST1193) 的转接合子中观察到第 9 天后 *mcr-1* 的相对丰度下降。在经过 15 天传代后，具有 IncHI2 的转接合子中 *mcr-1* 的拷贝数显著低于具有其他 Inc

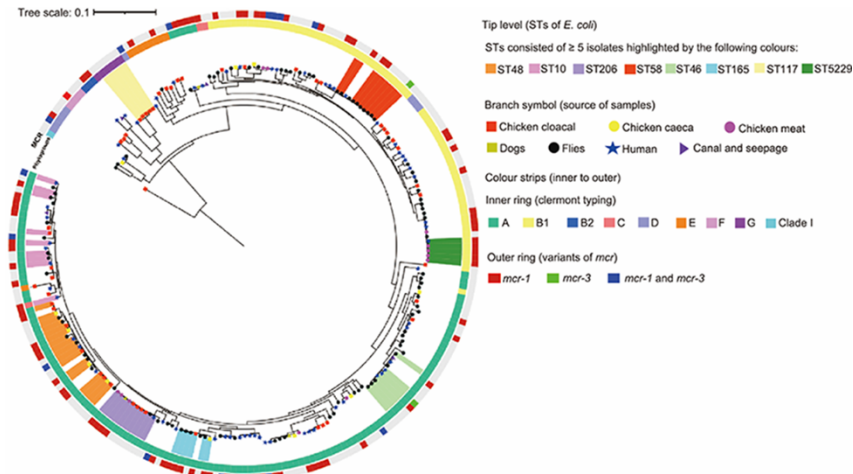


图2. 本研究中大肠杆菌 ($n = 238$) 核心基因组分析生成的ML树。使用Roary (v3.12.0) 进行核心基因组比对。使用GTR模型和具有自举的伽马校正, 用RA×ML-ng (v0.9.0.git-mpi)构建来自核心基因组的ML树。

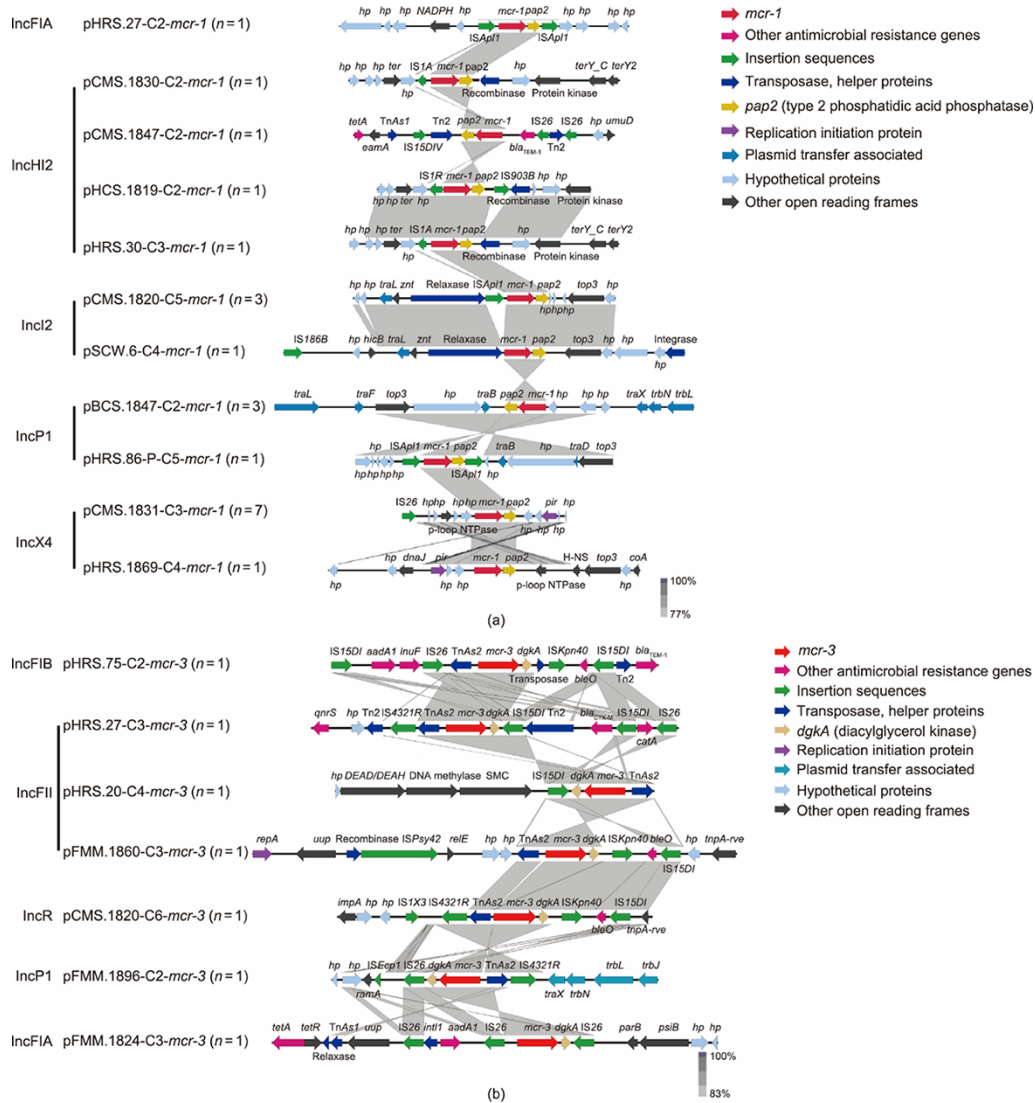


图3. 不同Inc型质粒上*mcr*遗传背景的线性比较。箭头代表开放阅读框的位置和转录方向。序列之间的灰色交联显示序列同源性区域 (大于77%同一性)。通过Easyfig (v2.2.5) 进行基因组比较。(a) IncFIA、IncHI2、IncI2、IncP1和IncX4质粒上*mcr-1*的遗传环境。(b) IncFIB、IncFII、IncR、IncP1和IncFIA质粒上*mcr-3*的遗传环境。NADPH: 还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸; DEAD: Asp-Glu-Ala-Asp氨基酸序列; DEAH: Asp-Glu-Ala-His氨基酸序列; SMC: 染色体家族蛋白的结构维持; NTPase: 核苷三磷酸酶。

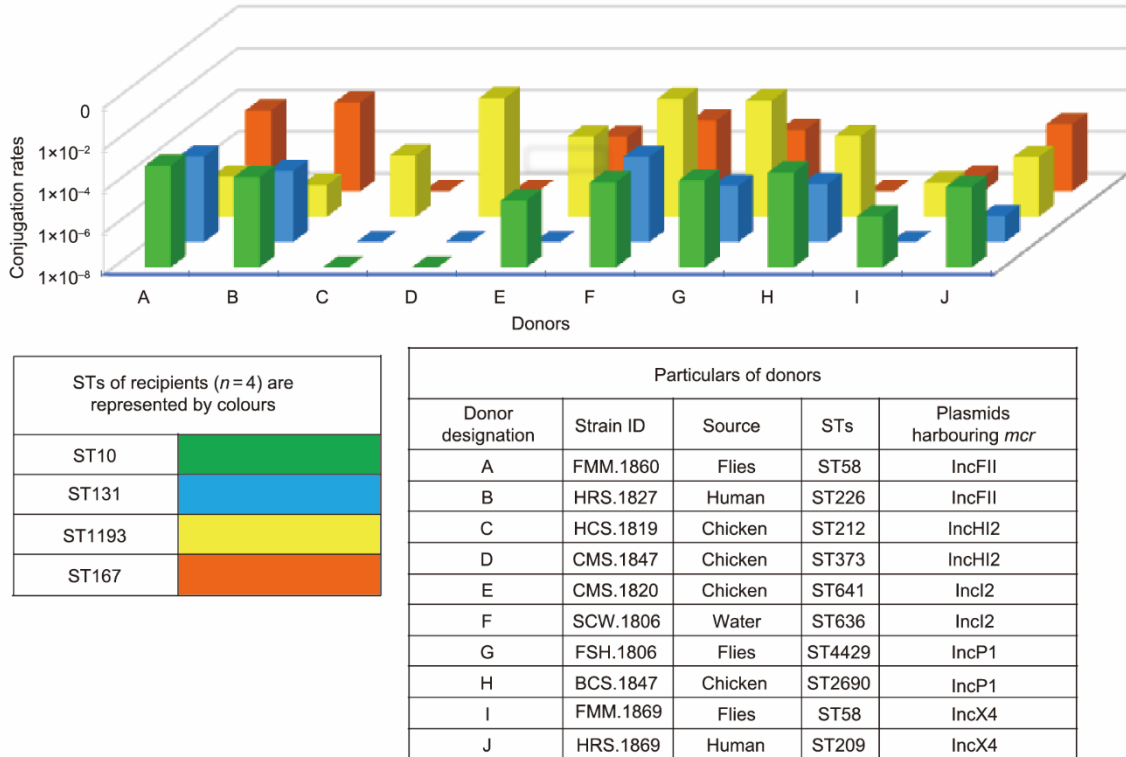


图4. 图表显示携带 *mcr* 的质粒在 10 个供体和 4 个 STs 受体中的不同转移率。大肠杆菌 J53 用作每个供体的对照，J53 的结合率未在该图中显示。

类型的转接合子（图5）。

生长动力学分析显示，在具有不同 Inc 类型的 *mcr* 性质粒的转接合子中，适应性代价的程度是不一样的。与受体相比，在获得 IncFII (FMM.1860:J, FMM.1860:R1, FMM.1860:R2, HRS.1827:R1, HRS.1827:R2 和 HRS.1827:R3)、IncHI2 (CMS.1847:J, CMS.1847:R3, HCS.1819:J 和 CMS) 的 *mcr* 阳性质粒的转接合子中观察到生长率的显著降低，然而，41 个接合子中的 26 个 (63.4%) 表现出低适应性代价（图6）。

4. 讨论

这项研究已经证实了 *mcr* 基因在老挝的人类、动物和环境水库中广泛存在，对人类健康构成潜在风险。*mcr-1* 是最常见的变体，其次是 *mcr-3*，如先前的研究[13,22–26]中所发现的。关于多黏菌素在老挝的使用情况，可用数据非常少，对科学文献的审查也没有提供其在老挝用于人医临床的证据[27–28]。然而，多黏菌素在泰国和越南等邻国的家畜中已被广泛用于预防疾病[9,12]。农业养殖动物已被证明是最常见的 *mcr* 来源，如最近在中国和老挝所描述的[6,13]；然而，在我们的研究中，*mcr* 在人类中的患病率最高，来自万象 Xaythany 和 Xaysetha 的人类样本表

明这两个地区产生最高的 *mcr* 率（表1、图S1和表S5）。这一结果不太可能是由多黏菌素在人类中的临床使用引起的，这在老挝非常罕见，但可能与食物链和环境的污染有关，苍蝇可能参与了 *mcr* 基因的传播[表2、图S1(b)]。有趣的是，我们发现 MCRPEC 的存在与拥有家畜的参与者之间存在显著的相关性 ($p < 0.05$) (表S6)，这表明动物与人类之间存在传播联系[40]。

大肠杆菌是一种机会致病菌，有利于包括人类在内的各种动物的肠道菌群，也可以在土壤和水生环境中持续存在[29]。这项研究中大肠杆菌耐药性的表型和基因组筛选为了解老挝 MDR 细菌的普遍性提供了依据。尤其令人担忧的是，14.6% 的受试大肠杆菌 (MCRPEC, $n = 98$) 对临床上重要的抗菌药物类别 (β -内酰胺类、氨基糖苷类和喹诺酮类) 表现出高耐药率，此外还有世界卫生组织上市的“储备”抗生素多黏菌素 (表3、图1和表S7) [30]。

如其他地方所述，包括在老挝[6,13]，*mcr* 的水平传播在各种环境传播中发挥了关键作用。我们还发现 *mcr* 在大肠杆菌 STs 中广泛存在 (图2)。此外，通过短读和长读数据的杂交装配，我们分析了 24 个携带 *mcr* 的质粒，这证明了在老挝 *mcr* 在不同遗传背景和不同质粒背景方面复杂的水平传播 (图3、图S1和图S3)。*mcr-1* 的原始载体被认为是 Tn6330 (ISAp11-*mcr-1*-pap2-ISAp11) [31,39]。本

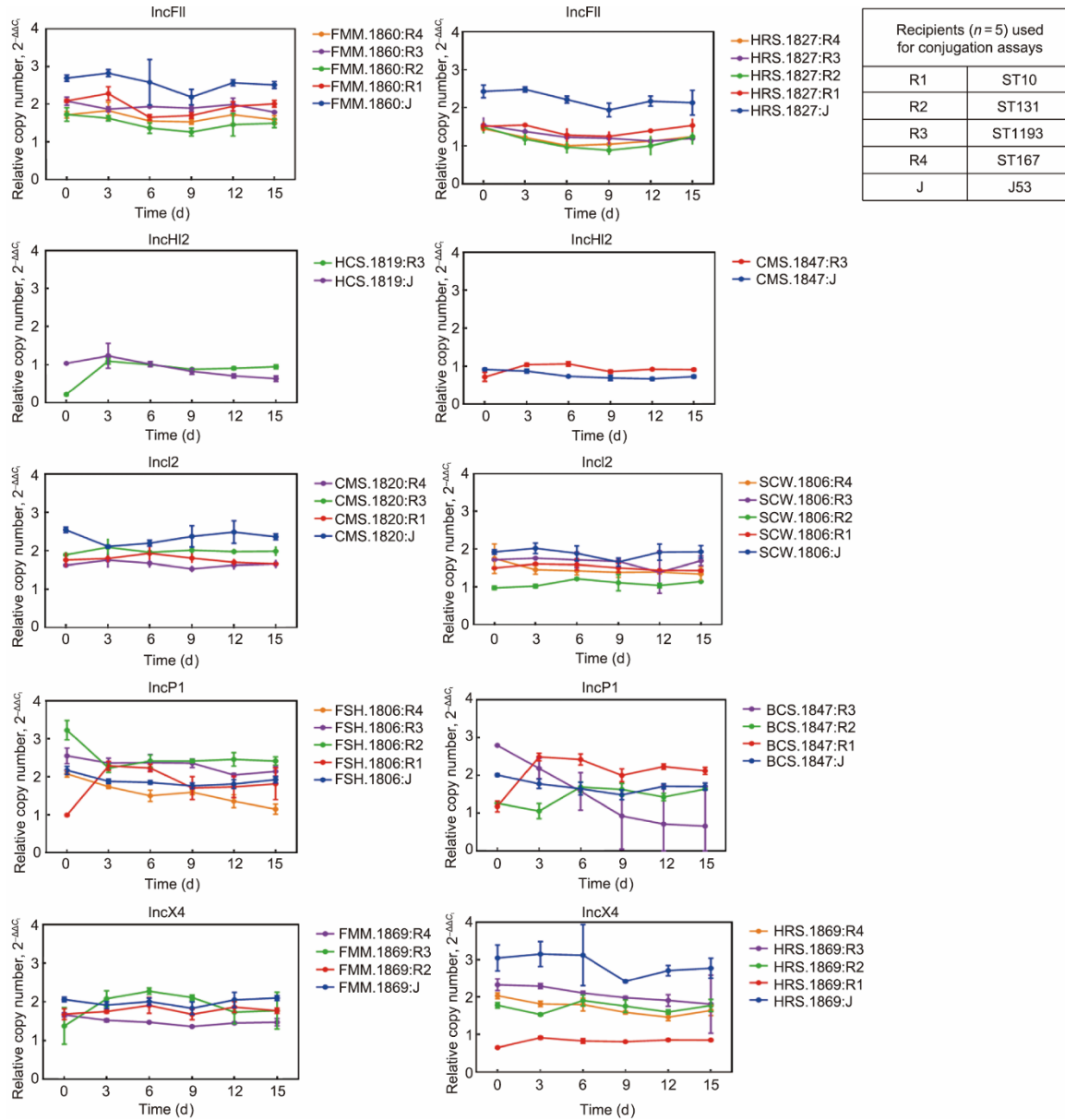


图5. 无抗生素条件下 *mcr* 质粒的丰度。通过传代15天的方法，研究了所有转接合子 ($n = 41$) 中 *mcr* 质粒拷贝数的动态变化。检测了携带5种 Inc 型质粒 [IncFII (含有 *mcr-3*)、IncHI2 (含有 *mcr-1*)、IncI2 (含有 *mcr-1*)、IncP1 (含有 *mcr-1*) 和 IncX4 (含有 *mcr-1*)] 的5个受体 (R1、R2、R3、R4、大肠杆菌 J53) 的转接合子。delta-delta C_t 方法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法) 用于模拟 *mcr* 拷贝数随时间的变化。 ΔC_t 指的是 *mcr* 和染色体编码基因之间的阈值循环差异。每个菌株包括三个独立的重复，数值代表三个独立分析的平均值。误差线代表标准偏差 ($n = 3$)。

研究中鉴定的两个质粒 (IncFII 和 IncP1) 具有 *mcr-1* 的经典特征 (Tn6330)。IncI2 上 *mcr-1.1* 下游 ISAp11 的存在也预测了插入序列 (IS) 衍生的 *mcr-1* 的移动，而 IncX4、IncHI2、一个 IncI2 和一些 IncP1 上 *mcr-1* 附近 ISAp11 的缺失表明 *mcr-1* 在各种质粒背景中的稳定性 [图 3 (a) 和图 S2] [32]。基于核苷酸位置和不同 IS 元件在不同质粒骨干中的分布，我们构建了老挝 *mcr-3* 移动的假设。我们假设 *mcr-3* 被 ISKpn40、TnAs2 或 IS26 捕获，随后分散到不同背景的质粒中 [图 3 (b) 和图 S4]。虽然移动元件，如 TnAs2 和 ISKpn40，通常被发现与 *mcr-3* 相关，但也有人

描述了 IS26 介导的 *mcr-3* 的移动性 [7,33]。其中，从老挝 [25] 分离株中分离到 ISKpn40 复合转座子 (ISKpn40-*mcr-3-dgka*-ISKpn40)。高度相似的 *mcr* 携带质粒在不同采样区域的分布 [例如，从人类和鸡的分离株中发现的 IncHI2] [图 S2 (a)]；从人类、水、苍蝇和鸡中分离出的 IncI2 [图 S2 (b)]；从人类、鸡和苍蝇分离的 IncP1 [图 S2 (c)]；人、狗、鸡和苍蝇分离株中的 IncX4 [图 S2 (d)]；人和蝇类分离株中的 IncFII (图 S4)，表明可能存在质粒介导的宿主间传播以及苍蝇在老挝 *mcr* 传播中的潜在作用。值得注意的是，在老挝最近的一项研究 [13] 中携

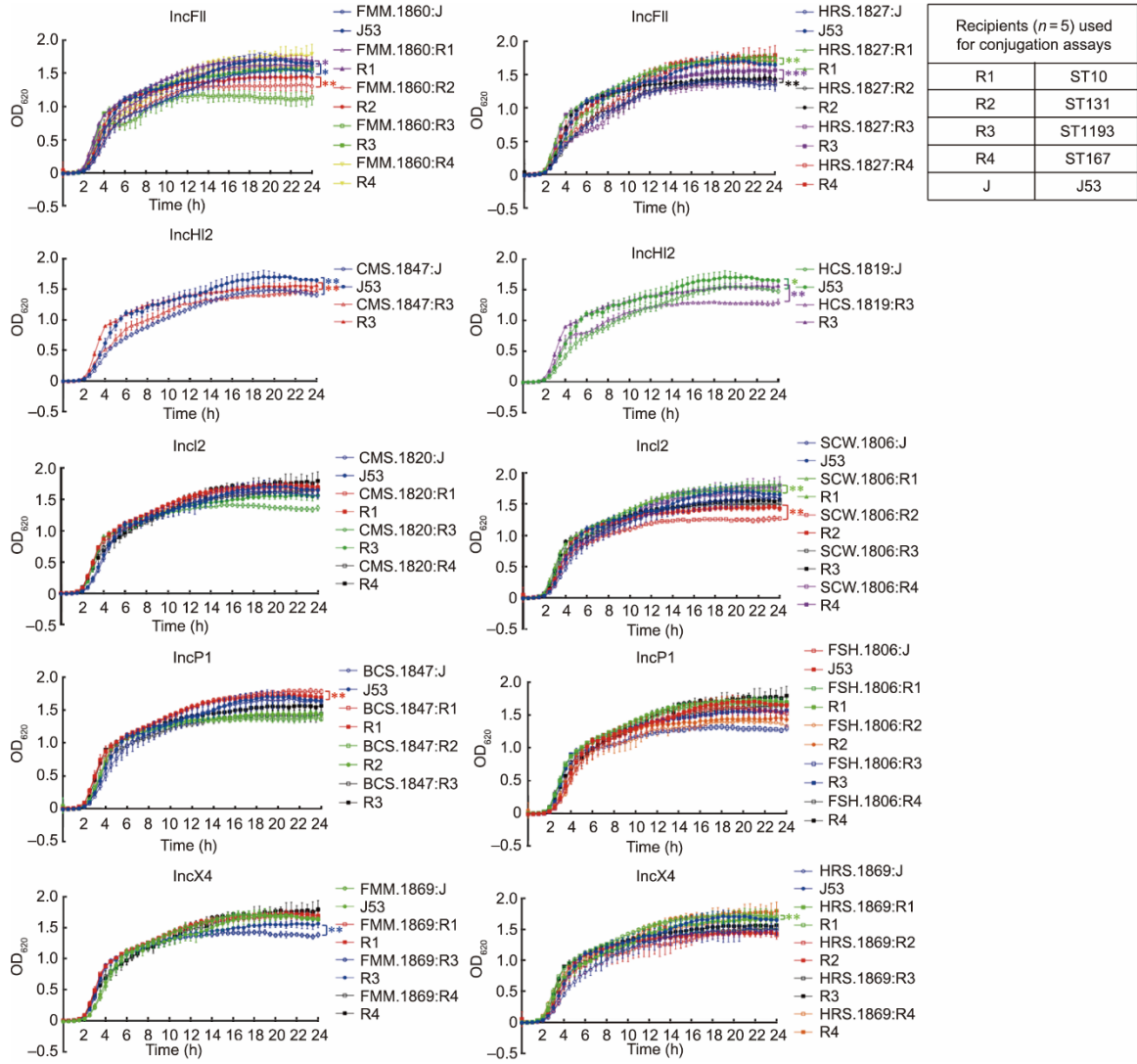


图6. 含和不含 *mcr* 质粒菌株的生长动力学。检查了5个受体 (R1、R2、R3、R4、大肠杆菌 J53) 及其相应的转接合子 ($n=41$)。对5种 Inc 类型的质粒进行生长适应性测试: IncFII (含有 *mcr-3*)、IncHI2 (含有 *mcr-1*)、IncI2 (含有 *mcr-1*)、IncP1 (含有 *mcr-1*) 和 IncX4 (含有 *mcr-1*)。对每个菌株进行三次生物重复和两次技术重复。OD_{620 nm} 表示在 620 nm 波长下测量的样品的光密度。数据点代表独立分析的平均值。误差线代表标准偏差 ($n=6$)。通过不成对 *t* 检验 (GraphPad v7.04) 检验适合度的差异。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

带 IncX4 的 *mcr-1.1* (序列号: CP063335) 和携带 IncFII 的 *mcr-3.5* (序列号: CP063484) 与本研究中发现的 *mcr* 阳性 IncX4 和 IncFII 质粒非常相似 (覆盖率 $\geq 97\%$, 同一性 $\geq 99\%$), 这突出了质粒在老挝 *mcr* 传播中的主导作用。接合试验证实了本研究中检测的所有 *mcr* 阳性质粒的可转移性; 然而, 观察到了可转移性的变化 (图4)。不成功的接合结果可以通过受体基因型和质粒背景的不同来解释 [34]。我们选择的受体不具有与供体相似 Inc 类型的质粒, 这潜在地排除了复制控制机制导致的接合失败 (表 S2 和表 S13) [41]。我们的研究表明, 与大肠杆菌 ST10、ST131 或 ST167 相比, ST1193 更倾向于获得 *mcr* (图4、表 S12)。还可能的是, 含有 *mcr* 的 IncHI2 不能转移到大肠杆菌 ST10、ST131 或 ST167 中, 因为其分子量大于

250 kb (表 S2 和表 S12) [37]。此外, ST1193 的高接合率应作为高致病性克隆中出现 *mcr* 的警告 (表 S13) [19]。

分离后杀伤系统在接合质粒中普遍存在, 这有助于质粒在细胞分裂期间在后代中的维持, 并且可能受到质粒或适应性进化引起的适应性代价的影响 [35–36]。本研究中发现的质粒 IncFII、IncHI2、IncI2、IncP1 和 IncX4 表现出适应性代价; 然而, 并不是在所有的接合子中都观察到这些效应, 并且并不局限于特定的接合子 STs (图6)。与早期的发现一致, 与其他 Inc 型质粒相比, *mcr* 阳性的 IncHI2 具有较高的分子量, 并携带更多的 ARG, 这可能造成了适应性负担 [图6、图 S1 (a) 和图 S2] [37]。尽管适应性代价有所不同, 但除了 BCS.1847:R3 外, *mcr* 阳性质粒在所有接合子中都是稳定的, 无论 Inc 类型如何, 也没

有任何抗生素选择（图5）。一些接合子可以在没有选择压力[38]的情况下保持质粒50代。同样值得注意的是，尽管有显著的适应性代价，但IncHI2的质粒在经过15天的传代后仍然保持在低拷贝数（图5和图6）。

5. 结论

我们证明了 *mcr* 相关的多黏菌素耐药的高流行率，这似乎已在老挝广泛的宿主和环境水平传播。这一发现意味着需要紧急实施跨越单个专业领域的理论和实际干预措施，包括该国医疗保健和农业部门的抗微生物药物管理计划，以阻止抗微生物药物耐药性的蔓延。

Acknowledgements

We thank the staff of the Lao-Oxford-Mahosot Hospital-Wellcome Trust Research Unit (LOMWRU) and the Mahosot Hospital Microbiology Laboratory for their advice and support in undertaking this investigation, particularly Anisone Chanthongthip and Sengkham Simanivong for logistical support. Dr. Vilada Chansamouth kindly shared pre-publication data from a review of AMR in Laos. We are grateful to the staff at the Ministry of Health, the University of Health Sciences, the directors of Mahosot Hospital and the late Dr. Ratanaphone Phetsouvanh for their support of this study and the work of LOMWRU. This project was funded partly by the Wellcome Trust (214207/Z/18/Z). For the purpose of open access, the author has applied a CCBY public copyright license to any Author Accepted Manuscript version arising from this submission.

Authors' contribution

Yuqing Zhou: conceptualization, methodology, validation, investigation, formal analysis, writing-review & editing, visualization. Refath Farzana: conceptualization, methodology, validation, investigation, formal analysis, writing-review & editing. Somsavanh Sihalath: investigation, writing-review & editing. Sayaphet Rattanavong: investigation, project administration, writing-review & editing. Manivanh Vongsouvath: project administration, writing-review & editing. Mayfong Mayxay: methodology, writing-review & editing. Kirsty

Sands: investigation, formal analysis, writing-review & editing. Paul N. Newton: writing-review & editing. David A. B. Dance: conceptualization, validation, writing-review & editing. Brekhna Hassan: conceptualization, methodology, investigation, writing-review & editing. Timothy R. Walsh: conceptualization, funding acquisition, methodology, validation, writing-review & editing, and a supervision.

Compliance with ethics guidelines

Yuqing Zhou, Refath Farzana, Somsavanh Sihalath, Sayaphet Rattanavong, Manivanh Vongsouvath, Mayfong Mayxay, Kirsty Sands, Paul N. Newton, David A. B. Dance, Brekhna Hassan, and Timothy R. Walsh declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.01.013>.

References

- [1] Review AMR. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations [Internet]. London: Review AMR; 2016 [cited 2021 Dec 20]. Available from: <https://amr-review.org/>.
- [2] Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Ch* 2015;59(10):5873–84.
- [3] Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM metallo-beta-lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin Microbiol Rev* 2019;32(2):e00115–8.
- [4] Loho T, Dharmayanti A. Colistin: an antibiotic and its role in multi-resistant Gram-negative infections. *Acta Med Indones* 2015;47(2):157–68.
- [5] Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis* 2016;16(3):293.
- [6] Luo Q, Wang Y, Xiao Y. Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr*) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosaf Health* 2020;2(2):71–8.
- [7] Wang Z, Fu Y, Schwarz S, Yin W, Walsh TR, Zhou Y, et al. Genetic environment of colistin resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* in *Escherichia coli* from one pig farm in China. *Vet Microbiol* 2019;230:56–61.
- [8] Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect* 2020;9(1):508–16.
- [9] Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen CV, Nguyen TV, Nguyen MT, Thai HQ, et al. Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2016;82(13):3727–35.
- [10] Nakayama T, Jinnai M, Kawahara R, Diep KT, Thang NN, Hoa TT, et al. Frequent use of colistin-based drug treatment to eliminate extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in backyard chicken farms in Thai Binh Province. *Vietnam Trop Anim Health Prod* 2017;49(1):31–7.
- [11] Davies M, Walsh TR. A colistin crisis in India. *Lancet Infect Dis* 2018;18(3):256–7.

- [12] Lekagul A, Tangcharoensathien V, Mills A, Rushton J, Yeung S. How antibiotics are used in pig farming: a mixed-methods study of pig farmers, feed mills and veterinarians in Thailand. *BMJ Glob Health* 2020;5(2):e001918.
- [13] Moser AI, Kuenzli E, Campos-Madueno EI, Büdel T, Rattanavong S, Vongsouvath M, et al. Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains and their plasmids in people, poultry, and chicken meat in Laos. *Front Microbiol* 2021; 12:708182.
- [14] Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and *MCR-1* in Chinese poultry production. *Nat Microbiol* 2017;2(4):16260.
- [15] Yang Q, Li M, Spiller OB, Andrey DO, Hinchliffe P, Li H, et al. Balancing *mcr-1* expression and bacterial survival is a delicate equilibrium between essential cellular defence mechanisms. *Nat Commun* 2017;8(1):2054.
- [16] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0 [Internet]. Copenhagen: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2021 [cited 2020 May 20]. Available from: <http://www.eucast.org>.
- [17] Matamoros S, van Hattem JM, Arcilla MS, Willemse N, Melles DC, Penders J, et al. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep* 2017;7(1):15364.
- [18] Day MJ, Hopkins KL, Wareham DW, Toleman MA, Elviss N, Randall L, et al. Extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. *Lancet Infect Dis* 2019;19(12): 1325–35.
- [19] Wu J, Lan F, Lu Y, He Q, Li B. Molecular characteristics of ST1193 clone among phylogenetic group B2 non-ST131 fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2017;8:2294.
- [20] Yang QE, MacLean C, Papkou A, Pritchard M, Powell L, Thomas D, et al. Compensatory mutations modulate the competitiveness and dynamics of plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* clones. *ISME J* 2020; 14(3):861–5.
- [21] Queipo-Ortuño MI, De Dios CJ, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(2):293–6.
- [22] Rolain JM, Kempf M, Leangapichart T, Chabou S, Olaitan AO, Le Page S, et al. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in France and Laos. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(11):6994–5.
- [23] Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, Morand S, Rolain JM. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 2016;16(2):147.
- [24] Okdah L, Le Page S, Olaitan AO, Dubourg G, Hadjadj L, Rolain JM. New therapy from old drugs: synergistic bactericidal activity of sulfadiazine with colistin against colistin-resistant bacteria, including plasmid-mediated colistin-resistant *mcr-1* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2018;51(5):775–83.
- [25] Hadjadj L, Baron SA, Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Co-occurrence of variants of *mcr-3* and *mcr-8* genes in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Laos. *Front Microbiol* 2019;10:2720.
- [26] Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol* 2019;4(9):1432–42.
- [27] Chansamouth V, Mayxay M, Dance DA, Roberts T, Phetsouvanh R, Vannachone B, et al. Antimicrobial use and resistance data in human and animal sectors in the Lao PDR: evidence to inform policy. *BMJ Glob Health* 2021;6(12):e007009.
- [28] Poupaud M, Putthana V, Patriarchi A, Caro D, Agunos A, Tansakul N, et al. Understanding the veterinary antibiotics supply chain to address antimicrobial resistance in Lao PDR: roles and interactions of involved stakeholders. *Acta Trop* 2021;220:105943.
- [29] van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J* 2011;5(2): 173–83.
- [30] World Health Organisation. WHO releases the 2019 AWaRe Classification Antibiotics [Internet]. Geneva: World Health Organisation; 2019 [cited 2020 Dec 20]. Available from: <https://www.who.int/news/item/01-10-2019-who-releases-the-2019-aware-classification-antibiotics/>.
- [31] Snesrud E, McGann P, Chandler M, Novick RP, Olaz F, Partridge S, et al. The birth and demise of the *ISAp11-mcr-1-ISAp11* composite transposon: the vehicle for transferable colistin resistance. *MBio* 2018;9(1).
- [32] Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun* 2018;9:1179.
- [33] Wang Z, Fu Y, Du XD, Jiang H, Wang Y. Potential transferability of *mcr-3* via *IS26*-mediated homologous recombination in *Escherichia coli*. *Emerg Microbes Infect* 2018;7(1):1–4.
- [34] Alderliesten JB, Duxbury SJN, Zwart MP, de Visser JAGM, Stegeman A, Fischer EAJ. Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: a meta-analysis. *BMC Microbiol* 2020;20(1):135.
- [35] Yang QE, Walsh TR. Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41(3): 343–53.
- [36] San MA. Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends Microbiol* 2018;26(12):978–85.
- [37] Ma K, Feng Y, Zong Z, Koraimann G. Fitness cost of a *mcr-1*-carrying IncHI2 plasmid. *PLoS ONE* 2018;13(12):e0209706.
- [38] Liu X, Lin J, Zhang Z, Bian J, Zhao Q, Liu Y, et al. Construction of conjugative gene transfer system between *E. coli* and moderately thermophilic, extremely acidophilic *Acidithiobacillus caldus* MTH-04. *J Microbiol Biotechnol* 2007; 17(1):162–7.
- [39] Li R, Xie M, Zhang J, Yang Z, Liu L, Liu X, et al. Genetic characterization of *mcr-1*-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *J Antimicrob Chemother* 2017;72(2):393–401.
- [40] Lei L, Wang Y, He J, Cai C, Liu Q, Yang D, et al. Prevalence and risk analysis of mobile colistin resistance and extended-spectrum b-lactamase genes carriage in pet dogs and their owners: a population based cross-sectional study. *Emerg Microbes Infect* 2021;10(1): 242–51.
- [41] Viroille C, Goldlust K, Djermoun S, Bigot S, Lesterlin C. Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. *Genes* 2020;11(11):1239.