

ĐẶC ĐIỂM CÁC GEN KHÁNG COLISTIN VÀ MỘT SỐ KHÁNG SINH QUAN TRỌNG CỦA VI KHUẨN *Escherichia coli* PHÂN LẬP TỪ CHẤT THẢI CỦA LỢN VÀ NGƯỜI CHĂN NUÔI TẠI SÓC SƠN, HÀ NỘI

Đặng Thị Thanh Sơn^{1*}, Trần Thị Nhật¹,
Phan Thị Phương Thảo², Nguyễn Thị Thanh Thủy², Etienne Loire³, Trương Nhật Mỹ⁴

¹Viện Thú y

²Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Tổ chức CIRAD

⁴Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt Đức (VGCARE)

*Tác giả liên hệ: thanhsonnivr@gmail.com

Ngày nhận bài: 22.07.2024

Ngày chấp nhận đăng: 18.12.2024

TÓM TẮT

Vi khuẩn mang gen kháng kháng sinh là mối đe dọa đối với sức khỏe cộng đồng. Kết quả nghiên cứu từ 50 hộ chăn nuôi quy mô nhỏ tại Sóc Sơn - Hà Nội cho thấy tỷ lệ phát hiện *E. coli* kháng colistin trong chất thải lợn là 72% (36/50 hộ) và mẫu chất thải người chăn nuôi là 16% (8/50 hộ). Giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS) 10 chủng *E. coli* kháng colistin phân lập từ 5 hộ chăn nuôi (1 chủng phân lập từ người và 1 chủng từ lợn) bằng kỹ thuật Oxford Nanopore Technologies (ONT) cho biết có 38 kiểu gen kháng (14 gen nằm trên chromosome và 31 gen kháng nằm trên plasmids) với 9 nhóm kháng sinh và các chủng mang đồng thời từ 7 đến 22 loại gen kháng, bao gồm Beta-lactams, colistin, tetracycline, sulfonamide, quinolon, phenicol, aminoglycoside, marcolide, và trimethoprim. Các gen *mcr-1* và/hoặc *mcr-3* được phát hiện trong 100% (10/10) chủng *E. coli* kháng colistin. Kết quả cũng cho biết có 3 chủng phân lập từ lợn và 1 chủng từ người mang đồng thời 2 gen *mcr-1* và *mcr-3*. Nghiên cứu đã phát hiện được 1 chủng *E. coli* (barcode 60 - PCE 20.1) phân lập từ lợn 1 chủng phân lập từ người (barcode 67- PCE 31.1) được xác định thuộc cùng 1 nhánh và có mối quan hệ gần gũi về mặt di truyền mặc dù thuộc 2 hộ chăn nuôi khác nhau.

Từ khóa: *E. coli*, kháng kháng sinh, gen kháng thuốc, chất thải lợn

Characteristics of Colistin and Other Important Antibiotics Resistance Genes of *Escherichia coli* Isolated from Pig and Farm-Workers in Soc Son, Ha Noi

ABSTRACT

Antibiotic-resistant bacteria and the circulation of drug-resistant genes are a threat to public health globally. Research results show that the rate of detected of colistin resistant *E. coli* from pigs in small-scale pig farm in Soc Son - Hanoi was 72% (36/50 farms) and from farm-workers was 16% (8/50 farms). Of these, 10 *E. coli* strains from 05 farms were selected for analyzing their genomic sequences by Oxford Nanopore Technologies (ONT) system (one strain from pig and one strain from farm-worker each of five farms). The studied results showed that 38 resistance genes (14 genes located on chromosome và 31 genes located on plasmids) with 9 antibiotic group. 10 strains were determined to carry to 7-22 resistance genes simultaneously. *E. coli* strains carried resistance genes of β -lactams, colistin, tetracycline, sulfonamide, quinolon, phenicol, aminoglycoside, marcolide, trimethoprim. The *mcr-1* and/or *mcr-3* were found in 10 *E. coli* strains carrying colistin-resistance phenotype. One strain isolated from farmer and 3 strains isolated from pigs carried 2 *mcr-1* and *mcr-3* simultaneously. One *E. coli* strain (barcode 60 - PCE 20.1) was detected from pigs and another (barcode 67- PCE 31.1) was isolated from farm-workers were of the same resistance gen characteristic eventhought they were detected from two different farms.

Keywords: *E. coli*, antibiotic resistance, colistin, resistant-genes, pig.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành chăn nuôi lợn tại Việt Nam đóng vai trò quan trọng và là nguồn cung cấp thực phẩm chính cho người tiêu dùng trong nước và hướng tới xuất khẩu. Sóc Sơn là huyện ngoại thành Hà Nội có vị trí địa lý và khí hậu thuận lợi cho ngành chăn nuôi phát triển. Tuy nhiên, tại Sóc Sơn các mô hình chăn nuôi lợn quy mô nông hộ (từ 1 đến 30 con) là phổ biến. Đây là mô hình chăn nuôi chưa được giám sát chặt chẽ về việc sử dụng kháng sinh cho vật nuôi, tiềm ẩn nguy cơ lây nhiễm vi khuẩn kháng thuốc giữa vật nuôi và người thông qua chuỗi cung cấp thực phẩm. Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã xếp Việt Nam vào nhóm các nước có nhiều nguy cơ đối với sức khỏe cộng đồng do vi khuẩn kháng thuốc.

Escherichia coli là vi khuẩn chỉ thị (indicator) lĩnh vực vi khuẩn kháng thuốc cần được giám sát để đánh giá thực trạng vi khuẩn kháng thuốc ở mỗi quốc gia nhằm kịp thời hỗ trợ công tác lựa chọn kháng sinh điều trị các bệnh nhiễm trùng thường gặp ở người và vật nuôi. Đồng thời giúp ngăn chặn hậu quả của vi khuẩn kháng thuốc đối với hệ thống y tế công cộng toàn cầu (Breijyeh & cs., 2020).

Colistin là kháng sinh thuộc nhóm polymyxin được sử dụng phổ biến từ năm 1950 với mục đích điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn Gram âm (Falagas & Kasiakou, 2005). Tuy nhiên, tình trạng kháng colistin của vi khuẩn nhóm *Enterobacteriaceae* ngày càng được cảnh báo với tần suất lớn ở nhiều nơi trên thế giới (Du & cs., 2016; Lomonaco & cs., 2018). Đến nay, colistin là kháng sinh được xếp vào nhóm kháng sinh rất quan trọng, thuộc nhóm “lựa chọn cuối cùng” để điều trị các bệnh nhân bị nhiễm trùng nặng do vi khuẩn đa kháng thuốc (Barlaam & cs., 2019). Theo các nghiên cứu trước đây mô tả cơ chế kháng colistin của vi khuẩn có thể do đột biến gen trên bộ nhiễm sắc thể làm thay đổi phân tử liên kết với màng LPS dẫn đến giảm tương tác tĩnh điện với colistin, làm mất tác dụng diệt khuẩn (Falagas & cs., 2000). Bên cạnh đó, một số nghiên cứu khác đã đề cập đến cơ chế kháng colistin qua plasmid xảy ra thông qua việc thu nhận các yếu tố di

truyền mang gen kháng colistin (Liu & cs., 2016). Các yếu tố di truyền quyết định tính kháng nằm trên plasmid là phổ biến nên rất dễ xảy ra hiện tượng truyền ngang hoặc truyền dọc giữa các vi khuẩn cùng loài hoặc khác loài lưu cữu trong chất thải của vật nuôi và người, tạo tiền đề cho sự lây truyền gen kháng thuốc xuyên suốt chuỗi sản xuất thịt lợn ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng (Luo & cs., 2020). Tình trạng kháng colistin của các vi khuẩn nhóm *Enterobacteriaceae* ngày càng được cảnh báo tại nhiều quốc gia (Kim & cs., 2019); Tuo & cs., 2018). Tại Việt Nam, theo một khảo sát tại Hà Nội, Hải Dương và Thái Bình trong khoảng thời gian từ tháng 7/2009 đến tháng 3/2010, có ít nhất 45 loại kháng sinh thuộc hơn 10 nhóm kháng sinh đã được sử dụng trong chăn nuôi lợn và gia cầm (Dang & cs., 2013). Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã đưa ra dữ liệu cho thấy colistin là kháng sinh được người chăn nuôi lựa chọn và sử dụng để phòng ngừa và điều trị rối loạn tiêu hóa do vi khuẩn Gram âm gây ra ở gà (22/210 hộ; 10,48%) và lợn con (56/210 hộ; 26,67%) (Dang & cs., 2013). Tình trạng kháng colistin của vi khuẩn ngày càng gia tăng với tốc độ nhanh cũng được đề cập trong nhiều nghiên cứu trước đó tại Việt Nam. Theo Tada & cs. (2017) trong số 18 chủng vi khuẩn *E. coli* đa kháng thuốc tại một bệnh viện của Việt Nam có 2 chủng (11,11%) kháng colistin và đây là báo cáo đầu tiên về các chủng vi khuẩn *E. coli* chứa gen kháng *mcr-1* trong cơ sở y tế tại Việt Nam. Một nghiên cứu khác tại Việt Nam cũng đã phát hiện 36,8% các chủng *E. coli* kháng colistin phân lập từ người khỏe mạnh mang gen *mcr-1* trên plasmid (Yamaguchi & cs., 2010). Nhóm tác giả Nguyễn Vinh Trung & cs. (2017) cũng có báo cáo về sự hiện diện của gen *mcr-1* trên các chủng *E. coli* phân lập từ mẫu phân gà (12,8%) và mẫu phân của người chăn nuôi gà (4,0%) ở Việt Nam. Trong một nghiên cứu mới đây, tỷ lệ kháng colistin của vi khuẩn *E. coli* phân lập được trên người chăn nuôi là 14,9% và trên lợn là 45,7% (53/116 mẫu) (Sơn & cs., 2021). Với xu hướng tăng nhanh tỷ lệ kháng đối với colistin, cần thiết phải giám sát chặt chẽ đối với vi khuẩn kháng thuốc để có thể xây dựng bản đồ

Đặc điểm các gen kháng colistin và một số kháng sinh quan trọng của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ chất thải của lợn và người chăn nuôi tại Sóc Sơn, Hà Nội

dịch tế quốc gia về phân bố kiểu hình, kiểu gen kháng nhằm chủ động can thiệp ngăn chặn tỷ lệ kháng của vi khuẩn đối với các nhóm kháng sinh quan trọng.

Nghiên cứu này nhằm tiếp tục thu thập bằng chứng khoa học về đặc điểm kiểu gen kháng colistin và một số kháng sinh quan trọng khác và sự đa dạng gen kháng của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn và chủ hộ chăn nuôi tại địa bàn Sóc Sơn - ngoại thành Hà Nội nhằm hỗ trợ các bên liên quan tăng cường giám sát sử dụng kháng sinh, bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Mẫu nghiên cứu: mẫu chất thải lợn và mẫu chất thải người chăn nuôi từ 50 hộ chăn nuôi nhỏ (mỗi hộ 1 mẫu từ lợn và 1 mẫu từ người chăn nuôi) trên địa bàn huyện Sóc Sơn, Hà Nội.

- Môi trường phân lập và khẳng định vi khuẩn *E. coli* (Oxoid/ Merck): MacConkey agar, Trypt Soy Broth, Blood agar base, Kligler agar, Thuốc thử Kovac's, VP-MR, Simmon citrate, Urea, Lysine, Brain Heart Infusion.

- Môi trường hóa chất dùng để kiểm tra kiểu hình kháng colistin: Mueller-hinton broth No.2 (MHB, Oxoid), kháng sinh bột (colistin, Sigma), NaCl (Merck).

- Hoá chất tách chiết DNA và giải trình tự gen: Bộ kit Monarch® Genomic DNA Purification Kit (NEB #T3010S, BioLab), bộ sinh phẩm Rapid sequencing gDNA-barcoding (SQK-RBK110.96).

- Trang thiết bị: nồi hấp, cân điện tử, tủ ủ, máy đập mẫu, vortex, máy ly tâm, buồng cấy sinh học, máy ủ nhiệt, máy PCR, thiết bị nanodrop, máy Qubit 4.0 fluorometer, bộ thiết bị Minikon và hệ thống máy giải trình tự gen Oxford Nanopore, tủ lạnh (4°C/ -20°C/ -40°C).

- Thời gian nghiên cứu: tháng 7/2022 đến tháng 3/2023.

- Địa điểm phân tích mẫu: Bộ môn Vệ sinh

Thú y, Viện Thú y và Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt Đức - VGcare, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập và xác định kiểu hình kháng colistin của các chủng *E. coli* phân lập từ mẫu phân lợn và người chăn nuôi.

- Giải trình tự toàn bộ hệ gen một số chủng vi khuẩn *E. coli* có kiểu hình kháng colistin để phát hiện gen kháng colistin và sự đa dạng gen kháng với một số kháng sinh khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu thập mẫu

Thực hiện theo hướng dẫn của QCVN 01-83:2011/BNNPTNT và quy trình lấy mẫu thường quy của Bộ môn Vệ sinh Thú y, Viện Thú y.

- Quy trình lấy mẫu phân lợn: Tại mỗi hộ chăn nuôi, mẫu phân lợn được thu thập tại 3-5 vị trí khác nhau trên sàn chuồng nuôi bằng cách dùng tăm bông quét mẫu tại 3 vị trí khác nhau và cho vào lọ đựng mẫu chuyên dụng có chứa môi trường bảo quản mẫu, vận chuyển nắp và ghi nhãn (ký hiệu trại/ loại mẫu/ ngày lấy mẫu). Bảo quản mẫu ở 4-8°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 24h.

- Quy trình lấy mẫu phân người chăn nuôi: Người chăn nuôi tự thu thập mẫu phân bằng tăm bông vô trùng. Sau đó tăm bông mẫu được đặt vào ống bảo quản mẫu chuyên dụng, vận chuyển nắp và ghi ký hiệu mẫu. Bảo quản mẫu ở 4-8°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 24h.

2.3.2. Quy trình phân lập vi khuẩn *E. coli*

Tăm bông chứa mẫu phân được ria cấy trực tiếp trên đĩa thạch MacConkey có bổ sung colistin (MacConkey-COL) với nồng độ 4 µg/ml. Nuôi cấy tủ ấm ở 37°C trong 20 ± 2h. Chọn tối đa 5 khuẩn lạc *E. coli*/mẫu để kiểm tra đặc tính sinh hóa đặc trưng để khẳng định, bao gồm khả năng lên men đường (glucose, lactose), indol, gas, ureas, citrate, VP-MR, H₂S. Các chủng vi

khuẩn phân lập được sẽ được lưu giữ trong ống Eppendorf 1,5ml có chứa 1ml dung dịch BHI glycerin 15% và bảo quản trong tủ lạnh âm sâu ở điều kiện -30°C .

2.3.3. Kiểm tra kiểu hình kháng với colistin bằng kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu trên đĩa 96 giếng (MIC-microbroth dilution test)

Sử dụng đĩa 96 giếng đã được bổ sung dung dịch pha loãng colistin theo dãy nồng độ 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 $\mu\text{g/ml}$. Thêm 50 μl của dung dịch vi khuẩn vi khuẩn (10^6 CFU/ml) vào các giếng và nuôi ủ ấm ở $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 18-20h. Đọc kết quả bằng cách quan sát từ đáy giếng để xác định sự phát triển của vi khuẩn (hiện tượng đục hoặc lắng cặn) tại các nồng độ kháng sinh khác nhau. Chúng đối chứng *E. coli* ATCC 25922 được sử dụng trong nghiên cứu. Các chủng vi khuẩn cho giá trị $\text{MIC} \geq 4$ $\mu\text{g/ml}$ được xác định kháng colistin (CLSI, 2021).

2.3.4. Giải trình tự hệ gen (WGS)

Tổng số 10 chủng *E. coli* có kiểu hình kháng colistin được lựa chọn, tách chiết DNA và giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS) bằng hệ thống giải trình tự thế hệ mới Oxford Nanopore Technologies (ONT) và theo quy trình hướng dẫn của bộ sinh phẩm Rapid sequencing gDNA-barcoding (SQK-RBK110.96).

2.3.5. Xử lý số liệu

Số liệu về kết quả phân lập và tính kháng thuốc được tổng hợp và phân tích thường quy bằng phần mềm Microsoft Excel. Dữ liệu về trình tự chuỗi và các gen kháng kháng sinh được tổng hợp và phân tích theo quy trình được công khai trên GitHub. (<https://github.com/loire/paceupnanoporeWGS> AMR)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* từ phân lợn và người chăn nuôi

Kết quả phân tích mẫu trên môi trường MacConkey có bổ sung colistin với nồng độ 4 mg/l (MacConkey- COL) cho thấy sự có mặt của vi khuẩn *E. coli* trong 43/50 (86%) mẫu phân lợn và 15/50 (30%) mẫu phân người. Trong đó sự có mặt của các chủng *E. coli* phân lập trên mẫu phân lợn có tỷ lệ cao hơn mẫu phân người chăn nuôi (Bảng 1).

3.2. Kết quả xác định kiểu hình kháng colistin của vi khuẩn *E. coli* phân lập được

Với mỗi mẫu dương tính lựa chọn ngẫu nhiên 1 chủng vi khuẩn *E. coli* (43 chủng đại diện cho 43 mẫu phân lợn dương tính và 15 chủng từ các mẫu chất thải người) để xác định kiểu hình kháng colistin bằng cách xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) bằng phương pháp vi pha loãng trên đĩa 96 giếng.

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* trên môi trường có bổ sung colistin (4 mg/l) từ mẫu phân lợn (n = 50) và phân người chăn nuôi (n = 50)

Loại mẫu	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Mẫu phân lợn	50	43	86,0
Mẫu chất thải của người chăn nuôi	50	15	30,0

Bảng 2. Sự phân bố giá trị MIC với colistin của chủng *E. coli* theo CLSI, 2021

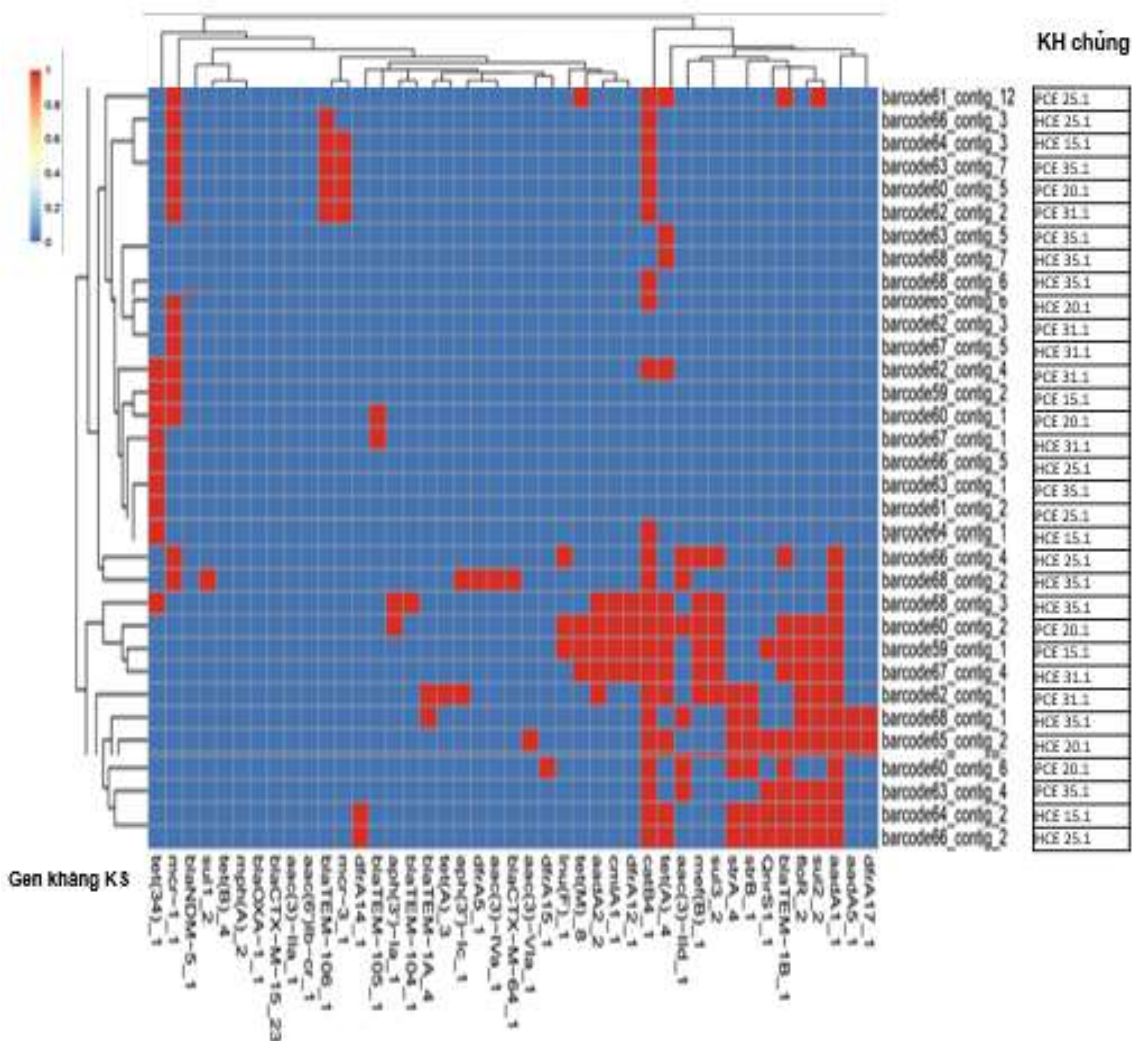
Nguồn gốc chủng	Số chủng kiểm tra	Sự phân bố giá trị MIC kháng colistin ($\mu\text{g/ml}$)										Điểm cutoff* ($\mu\text{g/ml}$)	Số chủng kháng (%)
		0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32		
Mẫu phân lợn	43	3	1	2	1	0	0	12	19	4	1	≥ 4	36/43 (83,7%)
Mẫu chất thải của người chăn nuôi	15	2	1	1	0	2	1	1	6	1	0	≥ 4	8/15 (53,3%)
Tổng số	58	5	2	3	1	2	1	13	25	5	1	≥ 4	44/58 (75,86%)

Đặc điểm các gen kháng colistin và một số kháng sinh quan trọng của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ chất thải của lợn và người chăn nuôi tại Sóc Sơn, Hà Nội

Theo hướng dẫn của CLSI 2021, các chủng vi khuẩn đường ruột có giá trị MIC với colistin ≥ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ là các chủng kháng colistin (kiểu hình kháng colistin). Bảng 2 cho thấy 36/43 (83,7%) số chủng *E. coli* phân lập từ lợn và 8/15 (53,3%) chủng phân lập từ người chăn nuôi kháng với colistin. Các chủng *E. coli* kháng colistin ở người và lợn đều phân bố tập trung trong khoảng giá trị MIC từ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kết quả này tương đồng với một nghiên cứu khác của chúng tôi năm 2021 ở một số trại chăn nuôi lợn tại Bắc Ninh (Son & cs., 2021). Tuy nhiên tại nghiên cứu này đã phát hiện chủng *E. coli* phân lập từ

lợn có giá trị MIC là 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cho thấy hiện nay các chủng *E. coli* phân lập từ lợn kháng với colistin có xu hướng tăng cao.

Trong khuôn khổ nghiên cứu của tác giả Lê Thị Nga & cs. (2021) tại thành phố Hồ Chí Minh cũng cho biết các chủng *E. coli* kháng colistin phân lập từ thịt lợn là 41,9% và mẫu phân người bán thịt là 36,1%. Một nghiên cứu khác tại một số trang trại lợn tại ở Indonesia năm 2018 cho thấy 34,1% chủng *E. coli* phân lập từ mẫu phân lợn kháng với colistin (Kallau & cs., 2018).



Ghi chú: Các ô vuông màu đỏ biểu thị sự hiện diện của các gen kháng, các ô màu xanh biểu thị không có gen kháng theo nhóm kháng sinh. KH chủng là ký hiệu chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được trong nghiên cứu này. Gen kháng KS: biểu thị tên các gen kháng kháng sinh được tìm thấy trong DNA của vi khuẩn *E. coli*

Hình 1. Kết quả phân tích gen kháng thuốc của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn và người chăn nuôi

Colistin thuộc nhóm “lựa chọn cuối cùng” trong điều trị bệnh cho nhân y, nhưng lại là thuốc đang được sử dụng phổ biến trong chăn nuôi lợn, gà. Cụ thể trong nghiên cứu này, tỷ lệ hộ chăn nuôi phát hiện vi khuẩn *E. coli* kháng colistin từ mẫu phân lợn là 72% (36/50 hộ) và từ mẫu phân người chăn nuôi là 16% (8/50 hộ). Đây có thể là mối nguy dẫn đến việc tăng mức độ kháng và lan truyền vi khuẩn kháng colistin giữa người và vật nuôi.

3.3. Kết quả xác định gen kháng colistin và một số kháng sinh các chủng *E. coli* phân lập được

Bằng phương pháp giải trình tự gen Oxford Nanopore Technologies, 10 chủng *E. coli* có kiểu hình kháng colistin (5 chủng từ lợn và 5 chủng từ người chăn nuôi) được lựa chọn và tiến hành giải trình tự toàn bộ hệ gen. Kết quả cho thấy, kích thước bộ gen của các chủng *E. coli* (gồm chromosome và plasmids) trong nghiên cứu này nằm trong khoảng từ 4.779.918-5.687.806 nucleotide, tương đương một số công bố trước đây đã được đăng tải trên ngân hàng gen (Genbank) là lớn hơn 4,6 triệu nucleotide (Blattner & cs., 1997). Tỷ lệ nhận dạng nucleotide dao động từ 98,32-99,77%.

Mười chủng *E. coli* có kiểu hình kháng colistin sau khi giải trình tự cho thấy sự hiện diện của 38 gen kháng với 9 nhóm kháng sinh khác nhau. Các chủng *E. coli* này mang đồng thời từ 7 đến 22 loại gen kháng khác nhau. Trong đó, có 14 gen kháng được xác định nằm trên chromosome và 31 gen kháng nằm trên plasmids. Điều này cho thấy sự đa dạng về gen kháng thuốc được xác định trong nghiên cứu này. Kết quả được trình bày tại hình 1 và bảng 3

Bảng 3 cho thấy 10 chủng *E. coli* có kiểu hình kháng colistin đều gen kháng *mcr-1* hoặc/và *mcr-3*. Trong đó, gen *mcr-1* có mặt ở tất cả các chủng *E. coli* phân lập từ lợn và người chăn nuôi. Có 1 chủng phân lập từ người chăn nuôi và 3 chủng phân lập từ lợn mang đồng thời 2 gen *mcr-1* và *mcr-3*. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu của chúng tôi tại Bắc Ninh năm 2021 cũng xác định được sự hiện diện *mcr-1* trong *E. coli* phân lập từ lợn (95,1%) và người chăn nuôi (91,1%) là phổ biến và chỉ có 1 chủng phân lập từ lợn mang đồng

thời 2 gen *mcr-1* và *mcr-3* (Son & cs., 2021). Và tương đồng với các nghiên cứu khác trên lợn và gà tại Việt Nam cũng xác định được sự hiện diện của 2 gen *mcr-1* và/ hoặc *mcr-3* (Kawahara & cs., 2019; Nga & cs., 2021). Những bằng chứng khoa học này cho thấy gen kháng colistin *mcr-1* và *mcr-3* là phổ biến tại Việt Nam.

Bên cạnh đó, nghiên cứu này còn cho thấy sự đa dạng gen kháng nhóm kháng sinh khác nhau trong 10 chủng *E. coli* được phân tích. Các chủng này mang từ 1 đến 3 loại gen kháng nhóm kháng sinh β -lactam phổ rộng, bao gồm *bla*_{TEM-1A} (2/10 chủng), *bla*_{TEM-1B} (8/10 chủng), *bla*_{TEM-104} (1/10 chủng), *bla*_{TEM-105} (2/10 chủng), *bla*_{TEM-106} (5/10 chủng) và *bla*_{CTX-M-64} (1/10 chủng). Gen *bla*_{TEM-104}, *bla*_{TEM-105} chỉ được tìm thấy trên chromosome, trong khi các gen *bla*_{TEM-1A}, *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{TEM-106} và *bla*_{CTX-M-64} được xác định nằm trên plasmid. Các gen *sul1*, *sul2* và *sul3* là gen kháng sulfonamide đã được xác định. Trong đó, gen *sul2* được xác định là gen phổ biến nhất và được phát hiện trong cả 10 chủng và nằm trên plasmid, tiếp đến là *sul3* được tìm thấy trong 6/10 chủng và nằm trên chromosome và chỉ có 1 chủng được xác định mang đồng thời cả 3 gen *sul1*, *sul2* và *sul3*. Bên cạnh đó, 3 gen kháng tetracycline bao gồm gen *tet(34)*, *tet(A)*, *tet(M)* cũng được xác định. Trong đó, gen kháng *tet(34)* là phổ biến nhất có mặt ở 10/10 chủng và là gen kháng được xác định nằm trên chromosome của vi khuẩn. Gen *qnrS1* là gen kháng nhóm kháng sinh quinolone cũng được tìm thấy trong 2 chủng *E. coli* phân lập từ mẫu phân lợn và 3 chủng phân lập từ người chăn nuôi. Các gen kháng nhóm marcolide bao gồm *mef(B)*, *lnu(F)* cũng được tìm thấy trong 3 chủng phân lập từ lợn và 3 chủng phân lập từ người chăn nuôi của các hộ chăn nuôi khác nhau. Trong đó gen *mef(B)* là gen được tìm thấy phổ biến (6/10 chủng). Gen kháng trimethoprim có mặt trong 7/10 chủng, bao gồm *dfrA17*, *dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA15*, *dfrA5* và phổ biến nhất là gen *dfrA12* (4/10 chủng) và *dfrA17* (2/10 chủng). Tiếp đến là ba gen kháng phenicol cũng được tìm thấy trong các chủng *E. coli* trong nghiên cứu này bao gồm *catB4*, *floR* và *cmlA1*, trong đó gen *catB4* và *floR* là phổ biến nhất và có mặt trong 10/10 và 9/10 chủng *E. coli*. Nghiên cứu xác định được 11 loại gen nhóm aminoglycosides được tìm thấy trong 9/10 chủng *E. coli*, bao gồm *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IId*, *aac(3)-VIa*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-Ic*, *strA*, *strB*.

Đặc điểm các gen kháng colistin và một số kháng sinh quan trọng của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ chất thải của lợn và người chăn nuôi tại Sóc Sơn, Hà Nội

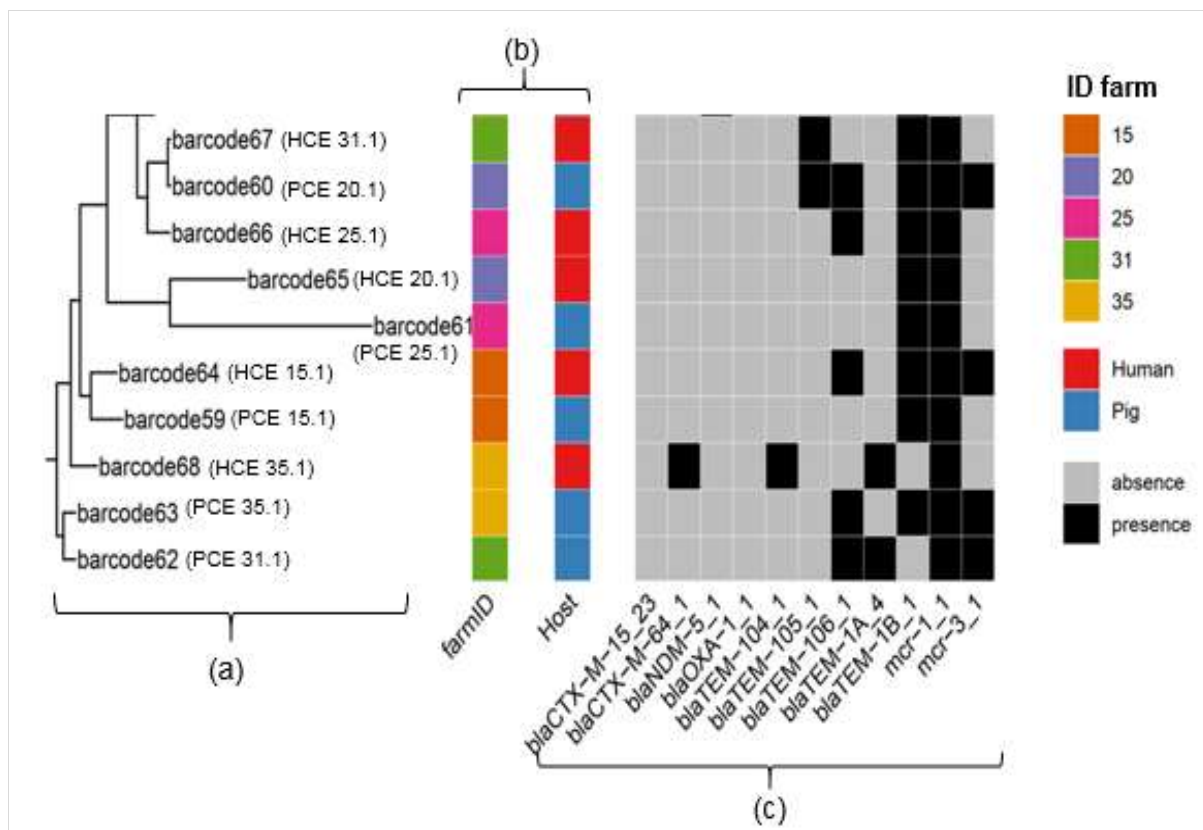
Bảng 3. Kết quả nghiên cứu xác định gen kháng colistin và một số kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn và người chăn nuôi

Ký hiệu hộ chăn nuôi	Nguồn gốc mẫu	Ký hiệu chủng	Kháng colistin		Gen kháng β -lactamase	Gen kháng Sulfonamide	Gen kháng Tetracycline	Gen kháng quinolone	Gen kháng phenicol	Gen kháng aminoglycosides	Gen kháng trimethoprim	Gen kháng macrolide
			Kiểu hình	Kiểu gen								
15	Lợn	PCE 15.1	COL+	<i>mcr-1</i>	<i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>sul2, sul3</i>	<i>tet(34), tet(A), tet(M)</i>	<i>QnrS1</i>	<i>catB4, cmlA1, floR</i>	<i>aadA1, aadA2</i>	<i>dfrA12</i>	<i>mef(B), lnu(F)</i>
15	Người	HCE 15.1	COL+	<i>mcr-1; mcr-3</i>	<i>bla_{TEM-1B}, bla_{TEM-106}</i>	<i>Sul2</i>	<i>tet(A), tet(34)</i>	<i>QnrS1</i>	<i>floR, catB4</i>	<i>aadA1, strA, strB</i>	<i>drfA14</i>	
20	Lợn	PCE 20.1	COL+	<i>mcr-1, mcr-3</i>	<i>bla_{TEM-1B}, bla_{TEM-105}, bla_{TEM-106}</i>	<i>sul2, sul3</i>	<i>tet(34), tet(A), tet(M)</i>		<i>catB4, cmlA1, floR</i>	<i>aac(3)-IId, aadA1, aadA2, aph(3')-Ia, strA, strB</i>	<i>dfrA12, dfrA15</i>	<i>mef(B), lnu(F)</i>
20	Người	HCE 20.1	COL+	<i>mcr-1</i>	<i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>QnrS1</i>	<i>catB4, floR,</i>	<i>aac(3)-Via, aadA1, strA, strB</i>	<i>dfrA17</i>	
25	Lợn	PCE 25.1	COL+	<i>mcr-1</i>	<i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(34), tet(A), tet(M)</i>		<i>catB4</i>			
25	Người	HCE 25.1	COL+	<i>mcr-1</i>	<i>bla_{TEM-1B}, bla_{TEM-106}</i>	<i>sul3</i>	<i>tet(34)</i>		<i>catB4</i>	<i>aac(3)-IId, aadA1,</i>	<i>drfA14</i>	<i>mef(B), lnu(F)</i>
31	Lợn	PCE 31.1	COL+	<i>mcr-1, mcr-3</i>	<i>bla_{TEM-106}, bla_{TEM-1A}</i>	<i>sul2, sul3</i>	<i>tet(34), tet(A)</i>		<i>catB4, floR</i>	<i>aadA1, aadA2, aph(3')-Ic, strA, strB</i>		<i>mef(B)</i>
31	Người	HCE 31.1	COL+	<i>mcr-1</i>	<i>bla_{TEM-1B}, bla_{TEM-105}</i>	<i>Sul2, sul3</i>	<i>tet(A), tet(M), tet(34)</i>		<i>floR, catB4, cmlA1</i>	<i>aadA1, aadA2</i>	<i>dfrA12</i>	<i>mef(B)</i>
35	Lợn	PCE 35.1	COL+	<i>mcr-1, mcr-3</i>	<i>bla_{TEM-1B}, bla_{TEM-106}</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(34), tet(B)</i>	<i>QnrS1</i>	<i>catB4, floR</i>	<i>aac(3)-IId, aadA1, aadA5</i>		
35	Người	HCE 35.1	COL+	<i>mcr-1</i>	<i>bla_{CTX-M-64}, bla_{TEM-1A}, bla_{TEM-104}</i>	<i>sul1, Sul2, sul3</i>	<i>tet(A); tet(34)</i>		<i>floR, catB4, cmlA1</i>	<i>aadA5, aadA1, aadA2, aac(3)-IId, aac(3)-Iva, aph(3')-Ic, aph(3')-Ia, strA, strB</i>	<i>dfrA5, dfrA12, dfrA17</i>	<i>mef(B)</i>

Sự có mặt của một lượng lớn các gen kháng kháng sinh trong các chủng *E. coli* phân lập từ lợn và người chăn nuôi cho thấy mối nguy ảnh hưởng đến sức khỏe vật nuôi và con người do nhiễm *E. coli* đa kháng và mang đồng thời nhiều gen kháng kháng sinh. Đặc biệt là các chủng mang đồng thời các gen kháng β -lactams (cephalosporin) hoặc/và gen kháng colistin. Đây là 2 nhóm kháng sinh nằm trong danh sách các loại kháng sinh rất quan trọng và đặc biệt quan trọng trong điều trị bệnh cho vật nuôi và con người cũng được tác giả Hounmanou & cs. (2021) phát hiện trên lợn. Sự hiện diện của các gen kháng β -lactam này còn được xác định trong các nghiên cứu khác trong các chủng *E. coli* phân lập từ thịt bò, gà và cá ở Việt Nam (Ueda & cs., 2015; Nguyen & cs., 2016; Hinenoya &

cs., 2018). Các gen kháng kháng sinh được phát hiện trong nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu của tác giả Trương Thị Quý Dương và cs. (2021) từ các chủng *E. coli* phân lập từ chất thải lợn tại Bắc Ninh cũng cho thấy sự hiện diện của các gen kháng với nhiều nhóm kháng sinh khác nhau, bao gồm gen kháng nhóm β -lactams ($bla_{CTX-M-65}$, $bla_{CTX-M-55}$, $bla_{CTX-M-14}$, $bla_{CTX-M-27}$, $bla_{CTX-M-15}$ và bla_{OXA-10}), colistin ($mcr-1$ và $mcr-3$), trimethoprim ($dfrA1$, $dfrA12$, $dfrA14$, $dfrA15$, $dfrA16$, $dfrA17$ và $dfrA27$) và gen kháng với nhóm sulfonamide ($sul1$, $sul2$, $sul3$).

Phân tích phát sinh loài của các chủng *E. coli* phân lập được từ lợn và người chăn nuôi được xây dựng dựa theo trình tự bộ gen và kết quả phân tích về sự có mặt của các gen kháng kháng sinh khác nhau (Hình 2).



Ghi chú: (a): Bản đồ phân tích phát sinh loài của các chủng *E. coli* phân lập từ lợn và người chăn nuôi; (b): Thang màu thể hiện nguồn gốc các chủng *E. coli* phân lập từ người chăn nuôi (các ô vuông màu đỏ) và lợn (các ô màu xanh dương); Các ô vuông màu cam, nâu, xanh lá, tím, hồng biểu thị mã số hộ chăn nuôi tương ứng với các chủng *E. coli* phân lập được. (c) Bản đồ biểu thị sự có (ô vuông màu đen) hoặc không có (ô vuông màu xám) gen kháng nhóm β -lactam và colistin.

Hình 2. Phân tích phát sinh loài từ trình tự bộ gen của các chủng *E. coli* phân lập ở lợn và người chăn nuôi

Kết quả phân tích phát sinh loài (Hình 2) cho thấy 10 chủng *E. coli* kháng colistin phân lập từ lợn và người chăn nuôi phân bố thành 9 nhánh khác nhau và không có các chủng phân lập từ lợn và người chăn nuôi trong cùng một hộ chăn nuôi lợn thuộc cùng 1 nhánh. Điều này cho thấy trong nghiên cứu này, chúng tôi đã không tìm thấy mối liên hệ về mặt di truyền giữa các chủng *E. coli* phân lập trên người và lợn của cùng một hộ chăn nuôi. Tuy nhiên, một kết quả quan trọng của nghiên cứu này là đã phát hiện được 1 chủng *E. coli* (barcode 60 - PCE 20.1) phân lập từ lợn và 1 chủng phân lập từ người (barcode 67- PCE 31.1) được xác định thuộc cùng 1 nhánh và có mối quan hệ gần gũi về mặt di truyền mặc dù thuộc 2 hộ chăn nuôi khác nhau (Hình 2). Các chủng *E. coli* này mang nhiều gen kháng kháng sinh khác nhau và phân bố phổ biến trên plasmid (31 gen kháng thuốc) và được phân lập từ các mẫu trong cùng 1 huyện, cho thấy nguy cơ truyền lây vi khuẩn kháng thuốc và các gen kháng thuốc. Kết quả nghiên cứu phản ánh nguy cơ lây lan gen kháng và thêm bằng chứng về sự lưu hành gen kháng kháng sinh thuộc nhóm quan trọng (colistin, nhóm cephalosporin) giữa người chăn nuôi và lợn. Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của tác giả Kawahara & cs. (2029) về nguy cơ *E. coli* kháng có thể lây lan giữa người và vật nuôi. Các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh này có thể là nguyên nhân gây ra các bệnh nhiễm trùng cơ hội gây khó khăn cho công tác phòng và trị bệnh cho người và vật nuôi. Một trong những nguyên nhân chính của sự gia tăng vi khuẩn kháng thuốc là do việc sử dụng kháng sinh cho vật nuôi và cho người chưa được kiểm soát chặt chẽ. Việc tăng cường vệ sinh môi trường, an toàn sinh học trong chăn nuôi, và quan tâm đến phúc lợi động vật nhằm tối giảm sử dụng kháng sinh là rất quan trọng.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định mức độ kháng colistin của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ chất

thải lợn và người chăn nuôi tại 50 hộ chăn nuôi nhỏ lẻ tại Sóc Sơn, Hà Nội với mức độ kháng phổ biến ở 4-16 µg/ml. Tuy nhiên, ở lợn đã phát hiện một chủng có giá trị MIC ở mức độ cao là 32 µg/ml. Nghiên cứu cũng đã phát hiện sự tương đồng gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ người và vật nuôi; sự phổ biến của gen kháng colistin (*mcr-1* và/hoặc *mcr-3*) và sự đa dạng gen kháng thuốc (38 kiểu gen) kháng với 8 nhóm kháng sinh khác, bao gồm nhóm β -lactamase sulfonamide, tetracycline, quinolone, phenicol, aminoglycosides, trimethoprim và macrolide. Các gen kháng thuốc nằm phổ biến trên plasmid của *E. coli* cho thấy nguy cơ lây truyền gen kháng (truyền dọc và truyền ngang) của vi khuẩn kháng thuốc. Qua kết quả nghiên cứu cho thấy, cần giám sát chặt chẽ việc sử dụng kháng sinh (đặc biệt là colistin) trong chăn nuôi lợn và trong nhân y, tuân thủ các quy định về sử dụng kháng sinh cho vật nuôi và cho người. Tăng cường các biện pháp nhằm giám sát chặt chẽ sử dụng kháng sinh đảm bảo sức khỏe cộng đồng là các hoạt động cấp thiết hiện nay.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi trân trọng cảm ơn Dự án “The PAN-ASEAN coalition for Epidemic and Outbreak Preparedness (PACE-UP; DAAD, Project ID: 57592343) đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barlaam A., Parisi A., Spinelli E., Caruso M., Taranto P. DI. and Normanno G. (2019). Global emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* in food chains and associated food safety implications: a review, J Food Prot. 2019 Aug. 82(8):1440-1448. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-19-116.
- Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B. & Shao Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science. 277(5331):1453-62. doi: 10.1126/science.277.5331.1453.

- Borowiak M., Fischer J., Hammerl J.A., Hendriksen R.S., Szabo I., Malorny B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B, J Antimicrob Chemother. 72(12):3317-3324. doi: 10.1093/jac/dkx327.
- Brejijeh Z., Jubeih B. & Karaman R. (2020). Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. Molecules: 25(6): 1340. doi.org/10.3390/molecules25061340
- CLSI, M100 Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing, 31st edition. (2021). doi: 10.1007/978-3-662-48986-4_300418.
- Dang P.K. Saegerman C., Douny C., Ton V.D., Bo H.X., Binh D.V., Ngan P.H. & Scippo M.L. (2013). First survey on the use of antibiotics in pig and poultry production in the Red River Delta region of Vietnam. Food and Public Health. 3(5): 247-256. doi:10.5923/j.fph.20130305.03.
- Duong T.Q.T, Hounmanou Y.M.G., Son T.T.D., Olsen J.E., Giang T.H.T., Nhat T.T., Scheutz F. & Dalsgaard A. (2021). Genetic comparison of esbl-producing *Escherichia coli* from workers and pigs at vietnamese pig farms, Antibiotics (Basel). 25;10(10):1165. doi: 10.3390/antibiotics10101165.
- Trương Thị Quý Dương, Trần Thị Nhật, Trương Thị Hương Giang, John Elmerdahl Olsen, Mahuton Gildas Hounmanou, Anders Dalsgaard, Đặng Thị Thanh Sơn (2021). Kết quả nghiên cứu kiểu hình và kiểu gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* sản sinh ESBL phân lập từ chất thải lợn. Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y. 28 (2).
- Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis 2005;40:1333-41.
- Hinenoya A., Ha N.C., Ngu N.T., Yamasaki S., Hassan J., Awasthi S.P., Phuong H.H., Suong T.T., Duy L.N.D, Yamamoto Y. & Sumimura Y. (2018). Isolation and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* from industrial food animals in Mekong Delta, Vietnam, Japanese journal of veterinary research. 66(1): 1-12, doi: 10.14943/jjvr.66.1.1
- Hounmanou Y.M.G. Bortolaia V., Son D.T.T., Duong T.Q., Olsen J.E. & Dalsgaard A. (2021). ESBL and AmpC β -lactamase encoding genes in *E. coli* from pig and pig farm workers in Vietnam and their association with mobile genetic elements. Front Microbiol. 11:12:629139. doi: 10.3389/fmicb.2021.629139.
- Kallau N.H.G., Wibawan I.W.T., Lukman D.W. & Sudarwanto M.B. (2018). Detection of multi-drug resistant (MDR) *Escherichia coli* and tet gene prevalence at a pig farm in Kupang, Indonesia, J Adv Vet Anim Res. 5(4): 388–396. doi: 10.5455/javar.2018.e289.
- Kawahara R., Diep T.K., Ha V.L., Quang N.P., Thang N.N., Yamaguchi T., Kumeda Y. & Yamamoto Y. (2019). Prevalence of *mcr-1* among cefotaxime-resistant commensal *Escherichia coli* in residents of Vietnam, Infect Drug Resist. 23:12:3317-3325. doi: 10.2147/IDR.S224545.
- Kim S., Woo J.H., Kim N., Kim M.H., Kim S.Y., Son J.H., Moon D.C., Lim S.K., Shin M. & Lee J.C. (2019). Characterization of chromosome-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* isolates from livestock in Korea, Infect Drug Resist; 12: 3291–3299. doi: 10.2147/IDR.S225383.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J., (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. 2016 Feb;16(2):161-8.
- Luo Q., Wang Y. & Xiao Y. (2020). Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr*) gene in bacteria common to animals and humans. Biosafety and Health: 2(2): 71-78. doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.05.001.
- Lê Thị Nga, Hoàng Hoài Phương, Bùi Thị Kiều Anh, Lê Thị Hiên, Ngô Thanh Phong, Trần Nguyễn Minh Đoàn, Huỳnh Thị Kim Phần, Lê Thị Hảo, (2021). Tỷ lệ vi khuẩn *Escherichia coli* có mang gen đề kháng colistin phân lập từ thịt heo và người bán thịt heo sống tại Thành phố Hồ Chí Minh. Tạp chí y học dự phòng. 31(7): 25-32. doi.org/10.51403/0868-2836/2021/395
- Nguyen D.P., Nguyen T., Le T.H., Tran N., Ngo T.P., Dang V., Kawai T., Kanki, M., Kawahara R., Jinnai M., Yonogi S., Hirai Y., Yamamoto Y. and Kumeda Y. (2016). Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* within the food distribution system of Ho Chi Minh City, Vietnam, BioMed Res. Int., 9. doi: 10.1155/2016/8182096
- Son D.T.T, Duong T.T.Q., Olsen J.E., Nhat T.T., Giang T.H.T, Hue T.K.V & Dalsgaard A. (2021). Research note: Occurrence of *mcr*- encoded colistin resistance in *Escherichia coli* from pigs and pig farm workers in Vietnam, FEMS Microbes. 1(1). doi.org/10.1093/femsmc/xtaa003
- Tada T., Nhung P.H., Shimada K., Tsuchiya M., Phuong D.M., Anh N.Q., Ohmagari N. & Kirikae

Đặc điểm các gen kháng colistin và một số kháng sinh quan trọng của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ chất thải của lợn và người chăn nuôi tại Sóc Sơn, Hà Nội

- T. (2017). Emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates harboring *mcr-1* in Vietnam, *Int. J. Infect. Dis.* 63: 72-73. doi: 10.1016/j.ijid.2017.07.003.
- Trung N.V., Matamoros S., Carrique-Mas J.J., Nghia N.H., Nhung N.T., Chieu T.T.B., Mai H.H., van Rooijen W., Campbell J., Wagenaar J.A., Hardon A., Mai N.T.N., Hieu T.Q., Thwaites G., de Jong M.D., Schultsz C. & Hoa N.T. (2017). Zoonotic Transmission of *mcr-1* colistin resistance gene from small-scale poultry farms, Vietnam, *Emerg Infect Dis.* 23(3): 529-532. doi: 10.3201/eid2303.161553
- Tuo H., Yang Y., Tao X., Liu D., Li Y., Xie X., Li P., Gu J., Kong L., Xiang R., Lei C., Wang H. & Zhang A. (2018). The prevalence of colistin resistant strains and antibiotic resistance gene profiles in Funan river, China. *Front Microbiol.* 9: 3094. doi: 10.3389/fmicb.2018.03094.
- Ueda S., Ngan B.T.K, Huong B.T.T, Hirai I., Tuyen L., Yamamoto Y. (2015). Limited transmission of blaCTX-M-9-type-positive *Escherichia coli* between humans and poultry in Vietnam, *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 59: 3574-3577. doi:10.1128/AAC.00517-15.
- Yamaguchi T., Kawahara R., Hamamoto K., Hirai I., Khong D. T., Nguyen T. N., Tran H., Motooka D., Nakamura S. & Yamamoto Y. (2020). High prevalence of colistin-resistant *Escherichia coli* with chromosomally carried *mcr-1* in healthy residents in Vietnam, *mSphere:* 5(2). doi.org/10.1128/msphere.00117-20.