วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.3) September – December 2022 บทความวิจัย

# การดื้อยาปฏิชีวนะและความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากมูลสุกรในจังหวัดพะเยา

# Antibiotic Resistance and Genetic Variation of *Escherichia coli* Isolated from Swine Feces in Phayao Province

นิศรา บุญเกิด[1*] และ สุรศักดิ์ ใจเขียนดี[2]

Nitsara Boonkerd[1*] and Surasak Chaikhiandee[2]

[1] *จุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา*

[2]*โภชนาการและการกำหนดอาหาร คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา*

[1]*Microbiology and Parasitology, School of Medical Science, University of Phayao*

[2] *Nutrition and Dietetics, School of Medical Science, University of Phayao*

Received : 31 July 2021

Revised : 3 February 2022

Accepted : 21 February 2022

## บทคัดย่อ

เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะถือเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่ทั่วโลกให้ความสำคัญ ซึ่งปัจจุบันพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ดังนั้นการติดตามเฝ้าระวังเชื้อจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพิจารณาเลือกใช้ยาที่เหมาะสมในสุกร โดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกร ในอำเภอเมือง จังหวัดพะเยา จำนวน 166 ไอโซเลต จากผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Disc Diffusion แสดงให้เห็นว่า *E.coli* 154 ไอโซเลต (ร้อยละ 92.77) ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยพบอัตราการดื้อต่อยา ampicillin ใน *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกรมีค่าเท่ากับร้อยละ 80, 80 และ 95.7 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาของ *E. coli* พบว่ามีทั้งหมด 16 รูปแบบ โดยรูปแบบการดื้อยาที่พบได้มากที่สุดคือการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิดได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, sulfamethoxazole/trimethoprim และ tetracycline ซึ่งพบในเชื้อที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกร ร้อยละ 20, 23.33 และ 39.33 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรทั้งสามกลุ่มมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งจัดเป็น multidrug resistance มีค่าร้อยละ 36.66, 66.66 และ 82.62 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) พบว่ามีความหลากหลายของรูปแบบ rep-PCR 15 รูปแบบ (A-O) โดยรูปแบบ rep-PCR ที่พบมากที่สุดคือรูปแบบ D คิดเป็นร้อยละ 43.14 (22/51) แสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อในฟาร์มสุกร ผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงสถานการณ์การดื้อยาและการแพร่กระจายของ *E. coli* ในสุกร ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการควบคุมป้องกันปัญหาเชื้อดื้อยาและใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในสุกรต่อไป

**คำสำคัญ** : การดื้อยาปฏิชีวนะ ; *Escherichia coli* ; สุกร ; rep-PCR

## Abstract

Antibiotic resistance is one of the problems of public health worldwide. Currently, the improper use of antibiotics is an important factor in the spread of drug resistance. Therefore, the monitoring of the drug resistance is crucial for the selection of appropriate drugs in swine. The objectives were investigated the resistance patterns and genetic relationships of 166 *E. coli* isolates that were isolated from adult swine, sick swine and piglet feces in Muang District, Phayao Province. The results showed that 154 *E. coli* isolates (92.77%) were resistant to all antibiotics used in this study. It was found that the highest resistance rate to ampicillin, which is equal to 80, 80 and 95.7 % in isolates from adult swine, sick swine, and piglets, respectively. From the analysis of resistance patterns of *E. coli*, it was found 16 resistance patterns. The highest drug resistance pattern that could be found is ampicillin, chloramphenicol, sulfamethoxazole/trimethoprim and tetracycline. The rate of this drug resistance pattern is 20, 23.33 and 39.13 % in isolates from adult swine, sick swine and piglets, respectively. In addition, 36.66, 66.66 and 82.62 % of these groups were resistant to more than three drug types. The genetic variation *of E. coli* was studied by repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR). It found 15 rep-PCR patterns (A-O). The most common rep-PCR pattern is the pattern D that found about 43.14 % (22/51 isolates) and indicated the spread of *E. coli* in pig farms. The results of all showed the resistance situation of *E. coli* in swine, which is the basic information in the planning, controlling, and prevention of drug resistance. In addition, it can be used as a guideline for the selection of antibiotics in swine.

**Keywords :** antibiotic resistance ; *Escherichia coli* ; swine ; rep-PCR

***Corresponding author. E-mail :** Nitsara.bo@up.ac.th

**บทนำ**

การใช้ยาปฏิชีวนะทั้งในมนุษย์และสัตว์ เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและสามารถถ่ายทอดลักษณะการดื้อยาไปยังเชื้อที่อยู่ข้างเคียงได้ทั้งทางตรงและทางอ้อมไปยังมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม โดยการติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในประเทศไทยนั้นมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างมาก ผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยามีอัตราการเสียชีวิตมากถึงร้อยละ 43 ในปี ค.ศ.2000 – 2010 พบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในมนุษย์เพิ่มขึ้นร้อยละ 36 โดยกลุ่มยาที่ใช้มากที่สุด ได้แก่ cephalosporins และ broad- spectrum penicillin (Boeckel *et al*., 2014) ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาในประเทศไทย คือการใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินความจำเป็นและไม่เหมาะสม (Lim *et al.,* 2016) ส่งผลทำให้เชื้อก่อโรคและเชื้อจุลชีพประจำถิ่นนั้นเกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ และเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง โดยเชื้อสามารถถ่ายทอดจากสัตว์สู่คนโดยการติดต่อทางการสัมผัสหรือผ่านห่วงโซ่อาหาร (Bogaard & Stobberingh,1999) ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินไปในฟาร์มปศุสัตว์ เนื่องจากขาดความรู้ในการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างถูกต้องและการใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษาโรคเพื่อลดความเสี่ยงในการประกอบการนั้น (Prapatigul, 2004) ส่งผลให้เกิดปัญหายาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์และเป็นสาเหตุให้เกิดเชื้อดื้อต่อยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อหมูซึ่งเป็นเนื้อสัตว์ที่คนไทยนิยมบริโภคค่อนข้างมาก ทำให้เชื้อดื้อยานั้นสามารถติดต่อมาสู่มนุษย์ได้ จากการศึกษาการดื้อยาในเชื้อที่แยกได้จากนักท่องเที่ยวชาวยุโรปที่เดินทางมาเที่ยวในประเทศแถบเอเชียรวมถึงประเทศไทย ทั้งหมด 370 คน พบเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8.6 เป็นร้อยละ 30.5 หลังกลับจากการเดินทาง (Paltansing *et al.,* 2013) และจากข้อมูลและการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาในสัตว์ป่วย (สุกรและสัตว์ปีก) ในช่วง พ.ศ. 2552 – 2555 โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ พบว่าภาพรวมอัตราการดื้อยาของ *E. coli* ต่อยา amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin และ colistin ในสุกรนั้นสูงกว่าในสัตว์ปีก (Tongkumkun, 2015) นอกจากนี้พบรายงานเกี่ยวกับ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรที่ดื้อต่อยา tetracycline (ร้อยละ 96.2) และ ampicillin (ร้อยละ 91.6) และมีอัตราการดื้อต่อยา streptomycin, chloramphenicol, trimethoprim ร้อยละ 82.6 และ 79.4 ตามลำดับ (Lay *et al*., 2015) จากการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* จากมูลของสุกรในประเทศกรีซ พบว่าดื้อต่อยา tetracycline และ amoxicillin ร้อยละ 50 และดื้อต่อยา ampicillin ร้อยละ38 (Valiakos *et al.,* 2016) จึงเห็นได้ว่าเชื้อ *E. coli* สามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะในหลายชนิด ซึ่ง *E. coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ซึ่งหากเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะอาจส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายหรือติดต่อถึงกันได้ ดังนั้นสหภาพยุโรป (EU) จึงแนะนำให้มีการตรวจติดตามการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ด้วย (EFSA, 2012) ซึ่งในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อโดยการจัดจำแนกรูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อนั้นมีหลายวิธี โดย Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) ซึ่งถือว่าเป็น gold standard แต่อย่างไรก็วิธีการนี้ไม่สามารถทำได้ในทุกห้องปฏิบัติการ เนื่องจากใช้ระยะเวลานานต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญ และอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาสูง ส่วนเทคนิค rep-PCR นั้นอาศัยหลักการของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันจะมีช่วงลำดับเบสซ้ำกันที่ตำแหน่ง non-coding region เหมือน กัน ซึ่งทำให้สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลักษณะพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งวิธีนี้ให้ผลเร็ว ง่าย ราคาถูกและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป จากข้อมูลข้างต้น

การศึกษาสถานการณ์การดื้อต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบของการดื้อยาของเชื้อนั้นเป็นตัวชี้วัดการดื้อต่อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในฟาร์มสุกรที่สำคัญและเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา รวมถึงการพิจารณาในเลือกใช้ยาที่เหมาะสมในสุกร ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสุกร รวมถึงรูปแบบการดื้อยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลของสุกรด้วยวิธี rep-PCR

## วิธีดำเนินการวิจัย

*1. การเก็บตัวอย่าง*

สุ่มเก็บตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มสุกรขนาดกลาง (ที่มีจำนวนสุกรในฟาร์ม 21-100 ตัว) ในอำเภอเมือง จังหวัดพะเยา โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 3 กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างมูลจากสุกรโตเต็มวัย (สุกรขุนปกติที่มีอายุตั้งแต่ 10 สัปดาห์จนถึง 24 สัปดาห์) สุกรป่วย (สุกรที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคอุจจาระร่วง) และลูกสุกร (ลูกสุกรหย่านมจนถึงช่วงอายุ 10 สัปดาห์) รวมทั้งสิ้น 80 ตัวอย่าง โดยใช้ไม้สำลีพันปลายไม้ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave) แล้วป้ายมูลของสุกรที่ถ่ายออกมาใหม่ โดยเลือกบริเวณที่ไม่สัมผัสกับพื้นจากนั้นทำการเก็บในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Cary-Blair transport medium แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการทันที

*2. การแยก E. coli จากมูลสุกร*

เพาะเชื้อโดยตรง (direct planting) โดยป้ายตัวอย่างมูลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสุ่มโคโลนีที่มีลักษณะสีแดงชมพูขนาดใหญ่ที่คาดว่าจะเป็น *E.coli* จำนวน 5 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง

*3. การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test)*

นำเชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ มาทำจัดจำแนกโดยการย้อมสีแกรมและการทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้การทดสอบ IMViC ซึ่งประกอบด้วยการทดสอบการเคลื่อนที่ การทดสอบการสร้าง indole การสร้างเอนไซม์ oxidase การทดสอบการใช้ไลซีน การทดสอบการใช้ยูเรีย การทดสอบการใช้ citrate การทดสอบ methyl red-Voges-Proskauer และการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครส (TSI) เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *E. coli*

*4. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี Disc Diffusion Method*

นำ *E. coli* ที่แยกได้ทั้งหมดมาทำการตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับความขุ่นให้มีค่าเท่ากับ 0.5 McFarland standard จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงใน suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้แล้วนำไป swab ลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร จากนั้นทำการวาง antibiotic disk ที่ต้องการทดสอบได้แก่ กลุ่ม penicillin (ampicillin) กลุ่มยา sulfonamide (sulfamethoxazole/trimethoprim) กลุ่มยาquinolones (ciprofloxacin) กลุ่มยา tetracyclines (tetracycline) กลุ่มยา carbapenem (meropenem) และกลุ่มยา Cephalosporins (cefotaxime และ ceftazidime) และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และใช้ *E. coli* ATCC 25922 ในการควบคุมคุณภาพของการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ การตรวจวัดผลโดยทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งมีหน่วยเป็น

มิลลิเมตร และทำการแปลผลการทดสอบความไวของเชื้อที่ดื้อต่อยาแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบกับตาราง CLSI (2017) โดยเชื้อที่มีลักษณะเป็น multidrug resistant (MDR) หมายถึงเชื้อที่มีลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 กลุ่ม

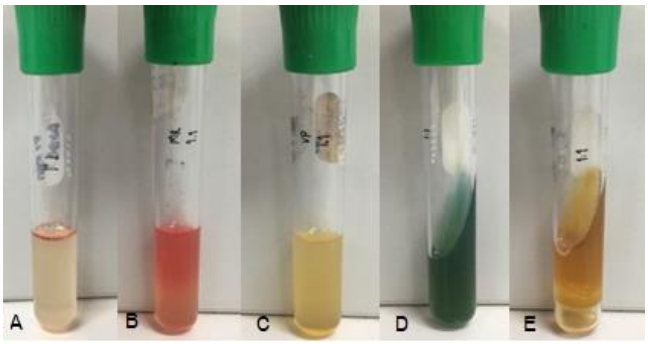
*5. การศึกษารูปแบบพันธุกรรมของ E. coli ที่แยกจากมูลสุกรด้วยวิธี rep-PCR*

rep-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งของลำดับเบสที่ซ้ำกัน (repetitive sequence) โดยในแบคทีเรียที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันจะมีช่วงลำดับเบสที่ซ้ำกัน เริ่มจากการการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยใช้ gene JET genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) จากนั้นนำ DNA ที่ได้มาใช้เป็น DNA template โดยในปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X buffer,1.5 mM $MgCl_2$ , 0.2 mM dNTPs, 1 µM primer ( rep-1R 5´-IIIICDICDICATCIGGC-3´ และrep-2I 5´TCGTCTTATCTGGCCTAC-3´) (Punyadi *et al*., 2018), DNA template 1 ไมโครลิตร และ 1 U *Taq* polymerase) จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ภายใต้สภาวะ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 7 นาที, 90 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 40 องศาเซลเซียส 1 นาที, 65 องศาเซลเซียส 5 นาที 30 รอบ, final extension 65 องศาเซลเซียส 10 นาที ตามวิธีของ Versalovic และคณะ (1991) และทำการตรวจสอบผลด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาเปรียบเทียบรูปแบบของดีเอ็นเอ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันจะมีช่วงลำดับเบสซ้ำกันที่ตำแหน่ง non-coding region เหมือนกัน ซึ่งทำให้สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลักษณะพันธุกรรมของแบคทีเรียได้

**ผลการวิจัย**

*1. การคัดแยกเชื้อ*

จากการเก็บตัวอย่างจากมูลสุกรทั้งหมด 80 ตัวอย่างโดยเก็บจากสุกรโตเต็มวัยจำนวน 40 ตัวอย่าง สุกรป่วยจำนวน 20 ตัวอย่างและลูกสุกรจำนวน 20 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกเชื้อบนอาหาร MacConkey agar โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีแดงชมพูขนาดใหญ่จำนวน 5 โคโลนีต่อตัวอย่างที่คาดว่าจะเป็น *E. coli* นำไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดมายืนยันผลโดยทำการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยการทดสอบ IMViC ซึ่ง ประกอบด้วยการทดสอบ indole ซึ่ง *E. coli* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก โดยจะพบวงแหวนสีแดงบริเวณผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Red ring) (ภาพที่ 1A) การทดสอบ Methyl Red (MR) ซึ่ง *E. coli* ให้ผลการทดสอบเป็นบวก โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดง (ภาพที่ 1B) การทดสอบ Voges Proskauer (VP) ซึ่ง *E. coli* ให้ผลการทดสอบเป็นลบ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อคงสีเดิมไม่เปลี่ยนเป็นสีแดง (ภาพที่ 1C) และการทดสอบ Citrate ซึ่ง *E. coli* ให้ผลการทดสอบเป็นลบ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน (ภาพที่ 1D) และการทดสอบ TSI ซึ่ง *E. coli* จะเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอดและเกิดแก๊ส (A/A, $G^+$) (ภาพที่ 1E) จากผลการทดสอบสามารถยืนยันเชื้อได้ว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด 166 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย 60 ไอโซเลต สุกรป่วย 60 ไอโซเลตและลูกสุกร 46 ไอโซเลต




***ภาพที่ 1*** การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยการทดสอบ IMViC test

*2. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี Disc Diffusion Method*

ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่า *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย 4 ไอโซเลต และสุกรป่วย 8 ไอโซเลต มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และเมื่อทำการเปรียบเทียบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรทั้งสามกลุ่มพบว่าเชื้อที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกร มีอัตราร้อยละการดื้อต่อยา ampicillin เท่ากับ 80, 80 และ 95.7 ตามลำดับ ส่วนยาปฏิชีวนะอื่นที่พบการดื้อยาสูงเกินกว่าร้อยละ 50 ในเชื้อที่แยกได้จากสุกรทั้งสามกลุ่มตัวอย่างได้แก่ tetracycline อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าเราพบอัตราการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรป่วยและลูกสุกรสูงกว่าในสุกรโตเต็มวัย โดยเฉพาะ chloramphenicol และ sulfamethoxazole/trimethoprim ในขณะที่ทุกไอโซเลตของทั้งสามกลุ่มตัวอย่างนั้นมีความไวต่อยา meropenem

***ตารางที่ 1*** อุบัติการณ์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสุกร

| **ยาปฏิชีวนะ** | **จำนวนไอโซเลตของ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (ร้อยละ)** | | |
|---|---|---|---|
| | **สุกรโตเต็มวัย** | **สุกรป่วย** | **ลูกสุกร** |
| Ampicillin | 48 (80) | 48 (80) | 44 (95.7) |
| Chloramphenicol | 16 (26.7) | 38 (63.3) | 32 (69.6) |
| Ciprofloxacin | 2 (3.3) | 6 (10) | 8 (17.4) |
| Sulfamethoxazole/trimethoprim | 26 (43.3) | 38 (63.3) | 40 (87) |
| Cefotaxime | 2 (3.3) | 2 (3.3) | 8 (17.4) |
| Ceftazidime | 4 (6.7) | 6 (10) | 6 (13) |
| Meropenem | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Tetracycline | 30 (50) | 32 (53.3) | 34 (73.9) |

จากการวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ทั้งสามกลุ่มตัวอย่าง พบว่า *E. coli* มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 1-6 ชนิด แบ่งออกเป็น 16 รูปแบบ โดยรูปแบบการดื้อยาที่พบได้มากที่สุดของเชื้อที่แยกได้จากสุกรทั้งสามกลุ่มคือ การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิดได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, sulfamethoxazole/trimethoprim และ tetracycline โดยมีอัตราร้อยละ 20, 23.33 และ 39.13 ในเชื้อที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วย และลูกสุกรตามลำดับ ดังตารางที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรป่วยนั้นมีรูปแบบการดื้อยาที่มีความหลากหลายมากที่สุด และรูปแบบการดื้อยาที่พบในเชื้อที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัยมากที่สุดคือการดื้อต่อยา ampicillin เพียงชนิดเดียว (ร้อยละ 23.33) และรูปแบบการดื้อต่อยา 3 ชนิดได้แก่ ampicillin, chloramphenicol และsulfamethoxazole/trimethoprim เป็นรูปแบบที่พบรองลงมาในสุกรป่วยและลูกสุกรซึ่งมีอัตราการพบที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 13) ในขณะที่รูปแบบการดื้อยานี้ไม่พบในเชื้อที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกร มีลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 กลุ่ม (ดังตารางที่ 2 ) มีอัตราร้อยละ 36.66, 66.66 และ 82.62 ตามลำดับ ซึ่ง *E. coli* ในกลุ่มนี้จัดเป็น multidrug resistant

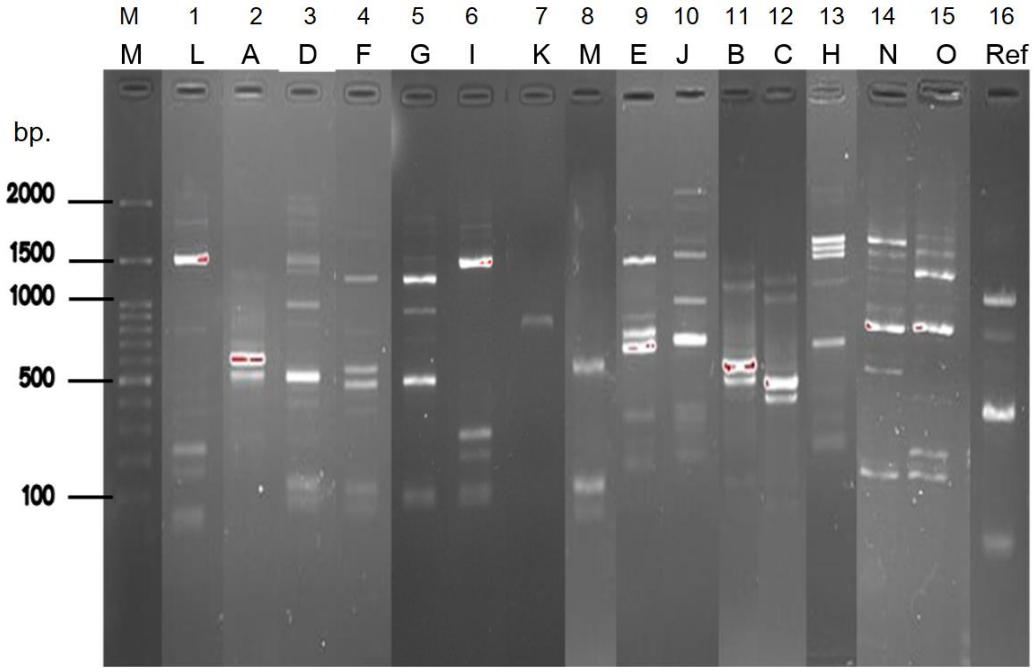
***ตารางที่ 2*** รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสุกร

| **รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ** | **จำนวนไอโซเลตของ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (ร้อยละ)** | | | **จำนวนไอโซเลต** |
|---|---|---|---|---|
| | **สุกรโตเต็มวัย** | **สุกรป่วย** | **ลูกสุกร** | **รวม** |
| Amp | 14 (23.33) | 4 (6.67) | 2 (4.35) | 20 |
| CAZ | 4 (6.67) | - | 2 (4.35) | 6 |
| C | 2 (3.33) | 2 (3.33) | - | 4 |
| TE | 2 (3.33) | 2 (3.33) | - | 4 |
| Amp-TE | 8 (13.33) | - | 2 (4.35) | 10 |
| Amp-SXT | 4 (6.67) | 4 (6.67) | 2 (4.35) | 10 |
| Amp-SXT-TE | 8 (13.33) | 4 (6.67) | 2 (4.35) | 14 |
| Amp-C-TE | - | 4 (6.67) | - | 4 |
| Amp-C-SXT | - | 8 (13.33) | 6 (13.04) | 14 |
| Amp-C-SXT-TE | 12 (20) | 14 (23.33) | 18 (39.13) | 44 |
| Amp-C-CAZ-TE | - | 2 (3.33) | - | 2 |
| Amp-C-CIP-SXT-CTX | 2 (3.33) | - | - | 2 |
| Amp-C-CIP-SXT-TE | - | 4 (6.67) | 4 (8.7) | 8 |
| Amp-C-SXT-CAZ-TE | - | 2 (3.33) | - | 2 |
| Amp-SXT-CTX-CAZ-TE | - | - | 4 (8.7) | 4 |
| Amp-C-CIP-SXT-CTX-TE | - | 2 (3.33) | 4 (8.7) | 6 |
| **จำนวนไอโซเลตรวม** | **56** | **52** | **46** | **154** |

Amp; Ampicillin, C; Chloramphenicol, CIP; Ciprofloxacin, SXT; Sulfamethoxazole/trimethoprim, CTX; Cefotaxime, CAZ; Ceftazidime, MEM; Meropenem, TE; Tetracycline

*3. การศึกษารูปแบบพันธุกรรมของ E. coli ด้วยวิธี repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR)*

เมื่อทำการสุ่มตัวอย่าง *E. coli* ที่แยกได้สุกรทั้งสามกลุ่มที่มีรูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกันทั้ง 16 รูปแบบ ทำการวิเคราะห์รูปแบบพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธีการ rep-PCR ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึง rep-PCR pattern ที่แตกต่างกันทั้งหมด 15 รูปแบบ โดย rep-PCR pattern ที่พบมากที่สุดได้แก่รูปแบบ D คิดเป็นร้อยละ 43.14 (22/51) แสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อรูปแบบนี้ในสุกรโตเต็มวัย รองลงมาคือรูปแบบ E และ F คิดเป็นร้อยละ 11.76 (6/51) (ภาพที่ 2)




***ภาพที่ 2*** รูปแบบ rep-PCR ของ *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสุกร

Lane M : 100 bp ladder DNA maker (Invitrogen)

Lane 1-15 : rep-PCR pattern, Lane 16 : *E. coli* ATCC 25922 (reference strain)

ใน *E. coli* ที่ให้รูปแบบ D ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดใน *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสุกรนั้นพบว่ามีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 4 ชนิด ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, sulfamethoxazole/trimethoprim และ tetracycline คิดเป็นร้อยละ 45.83 (11/24) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อในกลุ่มนี้มีรูปแบบของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่หลากหลายอีกด้วย (ตารางที่ 3)

***ตารางที่ 3*** ความสัมพันธ์ของรูปแบบ rep-PCR และรูปแบบการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกร

| รูปแบบ rep-PCR | จำนวนไอโซเลต-ของ *E. coli* (ร้อยละ) ที่แยกได้จากสุกร | | | รูปแบบการดื้อยา |
|---|---|---|---|---|
| | สุกรโตเต็มวัย | สุกรป่วย | ลูกสุกร | ปฏิชีวนะ |
| A | 1 (1.82) | - | - | Amp |
| | - | 1 (1.82) | - | Amp-C-SXT |
| B | 1 (1.82) | - | - | TE |
| | 1 (1.82) | - | - | Amp-TE |
| C | - | 1 (1.82) | - | Amp-SXT-TE |
| D | 2 (3.64) | - | - | Amp-TE |
| | 2 (3.64) | - | - | Amp-SXT-TE |
| | 2 (3.64) | 1 (1.82) | - | Amp-C-SXT |
| | 4 (7.27) | 3 (5.45) | 4 (7.27) | Amp-C-SXT-TE |
| | 1 (1.82) | - | - | Amp-C-CIP-SXT-CTX |
| | 2 (3.64) | - | - | Amp-C-SXT-CAZ-TE |
| | 1 (1.82) | - | - | Amp-SXT-CTX-CAZ-TE |
| E | - | 4 (7.27) | - | Amp-C-CIP-SXT-TE |
| | - | 2 (3.64) | - | Amp-C-SXT-CAZ-TE |
| F | 1 (1.82) | - | - | CAZ |
| | - | 2 (3.64) | 1 (1.82) | Amp-SXT |
| | - | 1 (1.82) | - | Amp-C-TE |
| | - | 1 (1.82) | - | Amp-C-SXT-TE |
| G | - | 1 (1.82) | - | C |
| H | - | - | 1 (1.82) | CAZ |
| I | 1 (1.82) | - | - | Amp-C-CIP-SXT-CTX |
| | - | 1 (1.82) | 2 (3.64) | Amp-C-CIP-SXT-CTX-TE |
| J | - | - | 1 (1.82) | Amp |
| K | 1 (1.82) | - | - | Amp |
| L | | 1 (1.82) | - | C |
| M | 1 (1.82) | - | - | C |
| N | - | 1 (1.82) | - | TE |
| O | - | - | 1 (1.82) | Amp-TE |

Amp; Ampicillin, C; Chloramphenicol, CIP; Ciprofloxacin, SXT; Sulfamethoxazole/trimethoprim, CTX; Cefotaxime, CAZ; Ceftazidime, TE; Tetracycline

**วิจารณ์ผลการวิจัย**

เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะถือเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญที่สุดในโลก การใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินความจำเป็นและไม่เหมาะสมทำให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยา โดยเฉพาะการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ ซึ่งสามารถแพร่สู่คนมนุษย์ได้โดยผ่านทางการสัมผัสกับงานหรือผ่านห่วงโซ่อาหาร (Bogaard & Stobberingh,1999) โดยในปัจจุบันมีการใช้นิยมใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า *E. coli* ดื้อต่อยา ampicillin มากที่สุดในทั้งสามกลุ่มตัวอย่าง โดยอัตราการดื้อต่อยา ampicillin ของ *E. coli* ที่แยกจากมูลสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกรสูงถึงร้อยละ 80, 80 และ 95.7 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Herrero-Fresno และคณะ ในปี 2017 ซึ่งพบการอัตราและความถี่ของการดื้อต่อยา ampicillin มากที่สุด เนื่องจากที่กลุ่มยาปฏิชีวนะพื้นฐานที่ใช้ในฟาร์มสุกร ส่วนอัตราการดื้อต่อยารองลงมาได้แก่ยา sulfamethoxazole/trimethoprim และ tetracycline นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* ที่แยกได้จากมูลสุกรป่วยนั้นดื้อต่อยาทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบมากกว่าสุกรที่โตเต็มวัย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mathew และคณะ ในปี 1993 พบว่า *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรป่วยจะพบการดื้อยามากกว่าสุกรที่มีสุขภาพแข็งแรง เนื่องจากมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา นอกจากนี้ยังพบการดื้อต่อยาสูงในลูกสุกร เนื่องจากลูกสุกรในช่วงระยะเวลาหลังหย่านมนั้นมีความสามารถในการย่อยและการดูดซึมอาหารมีจำกัด (Tsiloyiannis *et al*., 2001) และมีอัตราการกินลดลงเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการท้องเสีย (Busser *et al*., 2011) ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารเกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ (Bogaard & Stobberingh, 1999)

จากการศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะพบว่าการดื้อต่อยา 4 ชนิดคือ ampicillin, chloramphenicol, sulfamethoxazole/trimethoprim และ tetracycline เป็นรูปแบบหลักที่พบในเชื้อที่แยกได้จากสุกรทั้ง 3 กลุ่มโดยพบอัตราการดื้อยาร้อยละ 20, 23.33 และ 39.13 ในเชื้อที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกรตามลำดับ รองลงมาคือการดื้อต่อยาทั้ง 3 ชนิดได้แก่ ยา ampicillin, chloramphenicol และ sulfamethoxazole/trimethoprim ร้อยละ 13 ใน *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรป่วยและลูกสุกร นอกจากนี้ยังพบว่าการดื้อต่อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งบ่งชี้ลักษณะ MDR ของ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกรมีค่า 36.66, 66.66 และ 82.62 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Borriello ในปี 2016 พบว่า *E. coli* ที่แยกจากมูลลูกสุกรมีเชื้อดื้อยามากกว่าสุกรโตเต็มวัย โดยการศึกษาของ Chen และคณะในปี 2018 พบว่า *E. coli* ดื้อยาในลำไส้ของลูกสุกรนั้นได้รับอิทธิพลจากแม่และจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในบริเวณกรง นอกจากนี้การเคลื่อนย้ายลูกสุกรหลังคลอดทำให้มีโอกาสได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนจากสภาพแวดล้อมเข้ามาอาศัยในระบบทางเดินอาหารและเพิ่มจำนวนในลูกสุกรหลังคลอดและจัดว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีการดื้อยาหลายชนิดหรือ multidrug resistant bacteria (Magiorakos *et al*., 2012) โดย *E. coli* ที่ปนเปื้อนมากับอุจจาระนี้สามารถในการส่งผ่านยีนดื้อยาไปสู่แบคทีเรียกลุ่มอื่นผ่านทางพลาสมิด (Sayah *et al*., 2005) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เช่น ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายยา การสร้าง efflux pump เพื่อนำส่งยาออกจากเซลล์ จากกลไกการดื้อยาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อทางเลือกในการใช้ยารักษาที่น้อยลง เสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นและอาจเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยได้

ผลการศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมของ *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรทั้ง 3 กลุ่มด้วยวิธี rep-PCR แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ พบว่ามีรูปแบบ rep-PCR และรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* ค่อนข้าง

หลากหลาย (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามจะพบว่า *E. coli* บางสายพันธุ์มีรูปแบบ rep-PCR เหมือนกัน แต่มีรูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกัน อาจเป็นเพราะเชื้อได้รับยีนดื้อยาในภายหลังผ่าน mobile genetic element เช่น พลาสมิด ทรานโปซอน ส่งผลทำให้เชื้อมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ และส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาหลายขนานเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว (Wintersdorff *et al*., 2016) ในปัจจุบันเกษตรกรมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ค่อนข้างมาก จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงในเห็นถึงการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดใน *E.coli* ที่แยกได้จากมูลสุกรโตเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกร โดยเฉพาะยาในกลุ่มที่มีการใช้กันมาเป็นเวลานาน ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, sulfamethoxazole/trimethoprim และ tetracycline ซึ่งสอดคล้องกับยาปฏิชีวนะหลักที่ใช้ในฟาร์มในการวิจัยครั้งนี้คือยา penicillin, amoxicillin (ยาในกลุ่ม penicillin) และ enrofloxacin (ยาในกลุ่ม quinolone) ซึ่งพบอัตราการดื้อยาของเชื้อค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบของเชื้อส่วนใหญ่มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันแสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าวในพื้นที่ อย่างไรก็ตาม การติดตามเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาจำเป็นต้องมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ทราบถึงสภาวการณ์การดื้อยาตลอดจนการให้ความรู้กับเกษตรกรในเรื่องของการใช้ยา เพื่อให้ตระหนักถึงปัญหาเชื้อดื้อยาที่สามารถพบได้ในการเลี้ยงสุกรและสามารถใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงการใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในสุกรต่อไป

## สรุปผลการวิจัย

การใช้ยาปฏิชีวนะที่ค่อนข้างมากในฟาร์มปศุสัตว์ ส่งผลให้เกิดปัญหาในเรื่องยาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์ และทำให้เกิดเชื้อดื้อยา ในการศึกษาครั้งนี้พบการดื้อยาของ *E. coli* ในมูลของสุกรในระดับสูงในยาปฏิชีวนะที่มีการใช้มานาน เช่น ampicillin, tetracycline และ sulfamethoxazole/trimethoprim แต่พบการดื้อต่อยาในกลุ่มของ cephalosporin third generation ระดับต่ำในเชื้อที่แยกได้จากสุกรตัวเต็มวัย สุกรป่วยและลูกสุกร อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า *E.coli* ที่แยกได้จากสุกรป่วยและลูกสุกรมีแนวโน้มการดื้อยาที่สูงกว่า ซึ่งเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่เพิ่มมากขึ้นในขณะนั้น การพบเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะในฟาร์มสุกรนั้น อาจจะนำไปสู่การดื้อยาปฏิชีวนะในมนุษย์ โดยผ่านการบริโภคผลิตภัณฑ์ ซึ่งส่งผลทำให้ประสิทธิภาพหรือทางเลือกในการรักษาโรคต่างๆ ด้วยยาปฏิชีวนะในมนุษย์ลดลง และในส่วนของรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะและความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *E. coli* ด้วยวิธี rep-PCR โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือรูปแบบ D คิดเป็นร้อยละ 43.14 (22/51) แสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าวในพื้นที่ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อบางตัวมีรูปแบบการดื้อยาที่แตกต่างกันอาจเป็นเพราะเชื้อได้รับยีนดื้อยาในภายหลัง ซึ่งการติดตามเฝ้าระวังการดื้อต่อยามีความจำเป็นต้องดำเนินการอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ทราบสภาวะการดื้อยาของเชื้อ ตลอดจนให้ความรู้แก่เกษตรกรเพื่อให้ตระหนักถึงปัญหาเชื้อดื้อยาในสัตว์ที่สามารถปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อมและสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงการใช้ยาปฏิชีวนะในสุกรต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ จากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

## เอกสารอ้างอิง

Boeckel, TP., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q. *et al.* (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010. an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet infectious disease*, *14*(8), 742-750.

Bogaard, AE. & Stobberingh, EE. (1999). Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*, *58,* 589–607.

Borriello, P. (2016). UK-veterinary antibiotic resistance and sales surveillance report. *Veterinary Medicines Directorate*, *3*, 11-15.

Busser, E.V., Dewulf, J., Zutter, L.D., Haesebrouck, F., Callens, J., Meyns, T., Maes, W. & Maes, D. (2011). Effect of administration of organic acids in drinking water on faecal shedding of *E. coli*, performance parameters and health in nursery pigs. *The Veterinary Journal*, *188,* 184–188.

Chen, X., Xu, J., Ren, E., Su, Y. & Zhu, W. (2018). Co-occurrence of early gut colonization in neonatal piglets with microbiota in the maternal and surrounding delivery environments. Anaerobe, *49,* 30-40.

European Food Safety Authority. (2012). Technical specifications on the harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in *Salmonella, Campylobacter* and indicator *Escherichia coli* and Enterococcus spp. bacteria transmitted through food. *European Food Safety Authority Journal*, *10*(6), 27-42.

Herrero-Fresno, A., Ahmed, S., Hansen, M.H., Denwood, M., Zachariasen, C. & Olsen, J.E. (2017). Genotype variation and genetic relationship among Escherichia coli from nursery pigs located in different pens in the same farm. *BMC Microbiology, 17*(5), 1-10.

Lay, K.K., Koowattananukul, C., Chansong, N. & Chuanchuen, R. (2012). Antimicrobial resistance, virulence, and phylogenetic characteristics of Escherichia coli isolates from clinically healthy swine. *Foodborne Pathogens and Disease*, *9*(11), 992-1001.

Lim, C., Takahashi, E., Hongsuwan, M., Wuthiekanun, V., Thamlikitkul, V., Hinjoy, S., Day, N., Peacock, S.J., Limmathurotsakul, D. (2016). Epidemiology and burden of multidrugresistant bacterial infection in a developing country. *Epidemiology and Global Health*, *5*, 180-182.

Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R. B. and Carmeli, Y. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18,* 268–281.

Paltansing, S., Vlot, J.A., Kraakman, M, Mesman, R., Bruijning, M.L., Bernards, A.T., Visser, L.G. & Veldkamp, K.E. (2013) Extended-Spectrum β-Lactamase–producing Enterobacteriaceae among travelers from the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(8), 1206-1213.

Prapatigul, P. (2004). Farmers' knowledge and practices on antibiotic utilization in broiler production in Chiangmai province, Department of agricultural extension, Faculty of agriculture, Chiangmai university.

Punyadi, P., Thongngen, P., Assawatheptawee, K., Kiddee, A., Tansawai, U., Bunchu, N. & Ritvirool, P. (2018). Dissemination of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from blowflies in open air markets Phitsanulok province. The 19th National Graduate Research Conference.769-779. (in Thai).

Sayah, R.S., Kaneene, J.B., Johnson, Y. & Miller, R.A. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in Escherichia coli isolates obtained from domestic and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology Journal, 71*, 1394-1404.

Tongkumkun, P. (2015). Projects and work related to solving drug resistance problems of the Department of Livestock Development. Veterinary Research and Development Center. National Institute of Animal Health Department of Livestock Development. Retrieved July 16, 2020. https://niah.dld.go.th/th/Section/bact/kitjakum/kitjakum_1/ Drug Resistance Project in Thailand.pdf.

Tsiloyiannis, V.K., Kyriakis, S.C., Vlemmas, J. & Sarris, K., (2001). The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, *70*, 287–293.

Valiakos, G., Vontas, A., Tsokana, C.N., Giannakopoulos, A., Chatzopoulos, D. & Billinis, C. (2016). Resistance in *Escherichia coli* strain isolated from pig faecal sample and pig farm workers, Greece. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, *11*(4),142-144.

Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, *19*(24), 6823-6831.

Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., Alphen, L.B, Savelkoul, P.H.M.& Wolffs, P.F.G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7(173), doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173.