



ความชุกและการวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนมของเชื้อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาไคโซคลิน
จากลูกสุกรหย่านมในประเทศไทย



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏ
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
ปีการศึกษา 2569
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยราชภัฏ

ความชุกและการวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนมของเชื้อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาไคโทไคลน
จากอุกสรุกรหย่านมในประเทศไทย



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
ปีการศึกษา 2569
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนครสวรรค์

วิทยานิพนธ์ เรื่อง “ความชุกและการวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนมของเชื้อ *Escherichia coli* ที่ดื้อยาไทกิไซคลิน จากลูกสุกรหย่านมในประเทศไทย”

ของ นางสาวภัทริรา อินมณี

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.อนุพงษ์ ทานกระโทก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นสพ.ดร.นิรันดร์ เอกศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิลาสินี อินญาวิเลิศ)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลยาภัสร์ วุฒิจาริ)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประยุทธ์ ภูวรรตนาวิวิช)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ความชุกและการวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนมของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ที่ดื้อยาไทกิไซคลิน จากลูกสุกรหย่านมในประเทศไทย
ผู้วิจัย	ภัทริรา อินมณี
ประธานที่ปรึกษา	ผศ.นสพ.ดร.นิรันดร์ เอกศิริ
กรรมการที่ปรึกษา	รศ.ดร.วิลาสินี อินญาวิเลิศ
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาสัตวศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2569
คำสำคัญ	<i>Escherichia coli</i> , ดื้อยาไทกิไซคลิน, <i>tet(X4)</i> ,ลูกสุกรหย่านม การดื้อยาปฏิชีวนะ

บทคัดย่อ

การดื้อยาด้านจุลชีพ (antimicrobial resistance; AMR) โดยเฉพาะการดื้อต่อยา ไทกิไซคลิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะทางเลือกสุดท้ายสำหรับรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาหลายขนาน กำลังเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขทั่วโลก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุก ลักษณะการดื้อยา และลักษณะทางจีโนมของเชื้อ *E. coli* ที่มียีนดื้อยา ไทกิไซคลิน จากลูกสุกรหย่านม เก็บตัวอย่างมูลลูกสุกรจำนวน 305 ตัวอย่าง จากฟาร์มสุกรในจังหวัดสระบุรี นครราชสีมา และ เพชรบูรณ์ ทำการแยกและยืนยันชนิดเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค PCR ตรวจหาความรุนแรงและยีนดื้อยา ไทกิไซคลิน ได้แก่ *tet(X1)–tet(X5)* และ *tet(X)Uni* ประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ทดสอบการถ่ายทอดยีนด้วยวิธี conjugation assay และวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคนิค whole-genome sequencing ด้วยเทคนิค Illumina และ Oxford Nanopore sequencing ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อ *E. coli* ได้จำนวน 260 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 85.2 โดยตรวจพบยีน EAST1 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 31.1 และตรวจพบยีน *tet(X4)* จำนวน 4 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 1.5 โดยมีค่า MIC ต่อ ไทกิไซคลิน เท่ากับ ≤ 0.5 , 1, ≤ 0.5 และ 4 mg/L ตามลำดับ ไอโซเลต T8 แสดงความไวต่อ ไทกิไซคลิน ในระดับ intermediate ผลการทดสอบ conjugation assay แสดงให้เห็นว่ายีน *tet(X4)* สามารถถ่ายทอดไปยังเชื้อรับ *E. coli* J53 ได้สำเร็จ ผลการวิเคราะห์จีโนมพบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตอยู่ใน sequence types ที่แตกต่างกัน และมียีนดื้อยาหลายกลุ่มร่วมกัน รวมถึงตรวจพบ virulence-associated genes และ mobile genetic elements ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของยีนดื้อยา ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าลูกสุกรหย่านมอาจเป็นแหล่งกักเก็บของเชื้อ *E. coli* ที่มียีน *tet(X4)* และอาจมีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในภาคปศุสัตว์ภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว (One Health)

Title PREVALENCE AND GENOMIC INSIGHTS INTO TIGECYCLINE-RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* FROM WEANED PIGLETS IN THAILAND

Author Phattira Ainmani

Advisor Asst. Prof. Dr. Niran Aeksiri, D.V.M.

Co-Advisor Associate Professor Dr. wilasinee Inyawilert, Ph.D.

Academic Paper Thesis M.S. in Animal Science, Naresuan University, 2026

Keywords *Escherichia coli* , Tigecycline resistance, *tet(X4)*, Weaned piglets, Antimicrobial resistance

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR), particularly resistance to tigecycline, a last-resort antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections, has become a major global public health concern. This study investigated the prevalence and genomic characteristics of Tigecycline -resistant *E. coli* isolated from weaned piglets. A total of 305 fecal samples were collected from swine farms in Thailand. *E. coli* isolates were identified by PCR and screened for virulence-associated genes and Tigecycline resistance genes, including *tet(X1)–tet(X5)* and *tet(X)Uni*. Antimicrobial susceptibility testing, conjugation assays, and whole-genome sequencing were performed. Among 260 recovered *E. coli* isolates (85.2%), EAST1 was the most prevalent virulence-associated gene (31.1%). Four isolates (1.5%) carried *tet(X4)*, with Tigecycline MIC values ranging from ≤ 0.5 to 4 mg/L. Isolate T8 exhibited intermediate susceptibility to Tigecycline. Conjugation assays confirmed successful transfer of *tet(X4)* to *E. coli* J53. Genomic analysis revealed that the *tet(X4)*-positive isolates belonged to different sequence types and carried multiple antimicrobial resistance genes, virulence-associated genes, and mobile genetic elements. These findings suggest that weaned piglets may serve as reservoirs of *tet(X4)*-harboring *E. coli* and contribute to the dissemination of antimicrobial resistance under the One Health framework.

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.นิรันดร์ เอกศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการดำเนินงานวิจัยและการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ อันประกอบด้วยท่าน รองศาสตราจารย์ ดร.อนุพงษ์ ทานกระโทก กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รองศาสตราจารย์ ดร.วิลาสินี อินญาวิเลิศ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลยาภัสร์ วุฒิจารี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าของฟาร์มสุกรในจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดสระบุรี และจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างมูลสุกรเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จำนวน 10,000 บาท และขอขอบพระคุณคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จำนวน 5,000 บาท ซึ่งมีส่วนสำคัญในการสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วง

เหนือสิ่งอื่นใด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ ให้การสนับสนุน และเป็นแรงผลักดันสำคัญในทุกด้านตลอดมา คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่คุณอาจารย์ ผู้มีพระคุณ ตลอดจนผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน และหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษา การวิจัย และการพัฒนาองค์ความรู้ด้านการดื้อยาปฏิชีวนะในอนาคตต่อไป

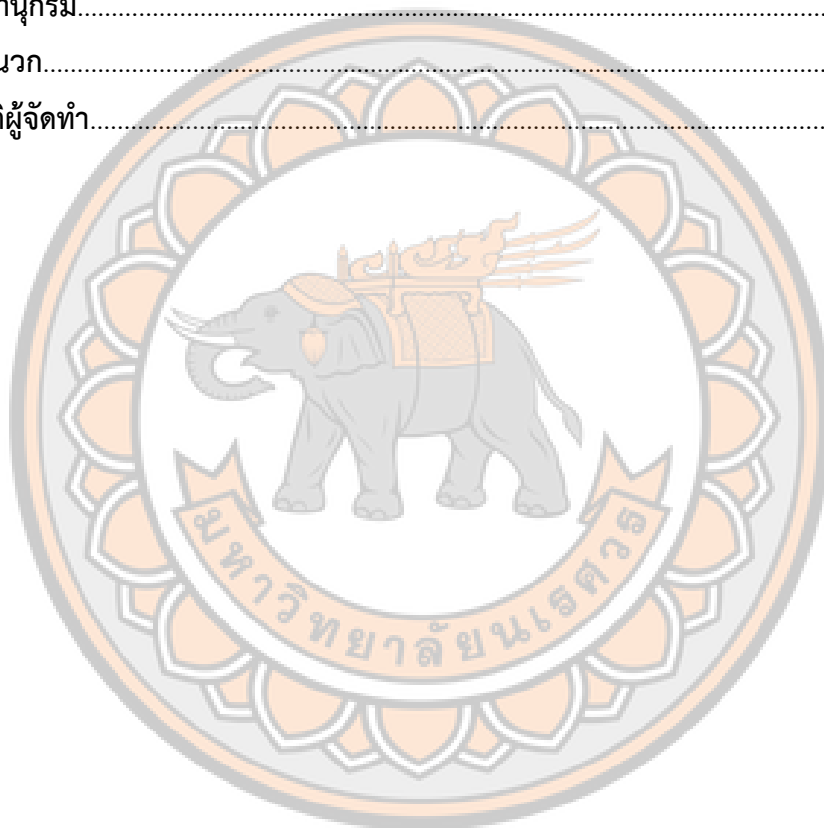
ภัทธีรา อินมณี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ค
ABSTRACT.....	จ
ประกาศนุญการ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตการวิจัย.....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	5
สมมุติฐานของการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เชื้อแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae.....	7
2.2 เชื้อ <i>E. coli</i>	7
2.3 ปัจจัยก่อโรคของ <i>E. coli</i>	8
2.3.1 Adhesion factors.....	8
2.3.2 Enterotoxins.....	8
2.3.3 Shiga toxins.....	8
2.3.4 EAST1 toxin.....	9
2.4 ยากลุ่ม ไทกิไซคลิน.....	9
2.4.1 โครงสร้างทางเคมี (Chemical structure)	9
2.4.2 กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of Action)	10
2.4.3 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ (Mechanisms of tigecycline resistance)	11
2.4.4 การขับยาออกจากเซลล์โดย efflux pumps.....	15
2.4.5 การทำลายหรือดัดแปลงยาโดยเอนไซม์.....	18

	หน้า
2.4.6 การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของยา.....	21
2.4.7 การลดการซึมผ่านของยาผ่านเยื่อหุ้มเซลล์.....	21
2.4.8 กลไกเสริมและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทกิไซคลิน.....	22
2.5 สถานการณ์การตรวจพบยีน <i>tet(X4)</i> ในสัตว์และสิ่งแวดล้อม.....	24
2.6 การถ่ายทอดยีน.....	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (Sample collection).....	27
3.2 การแยกเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> (Isolation of <i>E. coli</i>).....	27
3.3 การสกัด DNA โดยวิธีการ boiling method (DNA extraction)...	27
3.4 ตรวจสอบความจำเพาะเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยวิธี PCR.....	28
3.5 การตรวจหายีนก่อโรครุนแรง (Virulence Gene Detection) และ การระบุ Virotype ของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยวิธี PCR.....	28
3.6 การตรวจสอบยีนดื้อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic resistance genes detection) ด้วยวิธี PCR.....	29
3.7 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Minimum Inhibitory Concentration).....	30
3.8 การทดสอบการถ่ายทอดยีนดื้อยา <i>tet(X4)</i>	29
3.9 การศึกษา Whole-genome sequencing ของเชื้อ <i>E. coli</i> โดย เทคนิค Illumina และ Nanopore sequencing.....	30
3.10 วิธีการคำนวณความชุกของเชื้อ <i>E. coli</i> ยีนดื้อยาและยีนก่อโรค....	31
3.11 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics).....	31
บทที่ 4 ผลวิจัย	
4.1 ความชุกและการยืนยันความจำเพาะของเชื้อ <i>E. coli</i>	36
4.2 ยีนความรุนแรง (Virulence Gene Detection) ของเชื้อ <i>E. coli</i> ...	36
4.3 ความชุกการพบยีนดื้อยากลุ่ม และ ไทกิไซคลิน ของเชื้อ <i>E. coli</i>	37
4.4 ผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดต่อยา ไทกิไซคลิน.....	40

	หน้า
4.5 ผลการทดสอบการถ่ายยีนดื้อยาปฏิชีวนะ ไทกิไซคลิน โดยวิธีการ conjugation assay.....	41
4.6 การศึกษา Whole-genome sequencing ของเชื้อ <i>E. coli</i> โดยเทคนิค Illumina และ Nanopore sequencing.....	41
บทที่ 5 บทสรุป	46
บรรณานุกรม.....	49
ภาคผนวก.....	57
ประวัติผู้จัดทำ.....	65



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ระบบ efflux pump และยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทกิไซคลิน ในแบคทีเรียแกรมลบ.....	13
ตารางที่ 2 การกระจายของยีน <i>tet(X)</i> ในวงศ์ Enterobacteriaceae และตำแหน่งทางพันธุกรรม.....	17
ตารางที่ 3 ลักษณะสำคัญของยีนตระกูล เตตราไซคลิน ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทกิไซคลิน.....	18
ตารางที่ 4 ความชุกของการดื้อยา ไทกิไซคลิน ในเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับสัตว์และบริบทที่เกี่ยวข้อง.....	23
ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทป์ (primer) ใช้ในการระบุลักษณะทาง virotype ของเชื้อ <i>E. coli</i>	23
ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทป์ (primer) ใช้ในการตรวจหาชนิดดื้อยาในกลุ่ม ไทกิไซคลิน.....	33
ตารางที่ 7 ความชุก และยีนก่อโรครุนแรงเชื้อ <i>E. coli</i>	36
ตารางที่ 8 ความชุกยีนดื้อปฏิชีวนะของเชื้อ <i>E. coli</i>	37
ตารางที่ 9 การทดสอบค่า MIC เชื้อ <i>E. coli</i>	39
ตารางที่ 10 แสดงผลการทดลองการถ่ายทอดยีน <i>tet(X4)</i> ไปยัง <i>E. coli</i> J53 โดยวิธีการ conjugation assay.....	41
ตารางที่ 11 แสดงผลการศึกษาลักษณะทางจีโนมของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่มียีน <i>tet(X4)</i>	43

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีที่ตำแหน่ง C9 ของวงแหวน D จาก มิโนไซคลิน (ซ้าย) ไปเป็น ไทกิไซคลิน (ขวา) โดยการเติมหมู่แทนที่ 9-t-butylglycylamido	9
ภาพที่ 2 ภาพรวมกลไกการออกฤทธิ์และกลไกการดื้อยา ไทกิไซคลิน ในแบคทีเรียแกรมลบ.....	11
ภาพที่ 3 กลไกการดื้อยา ไทกิไซคลิน ในแบคทีเรียแกรมลบ แสดงการทำงานของ efflux pumps การดัดแปลงยาโดยเอนไซม์ในกลุ่ม <i>tet(X)</i> และการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของยา.....	14
ภาพที่ 4 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการลดความไวต่อ ไทกิไซคลิน ในแบคทีเรียแกรมลบ.....	14
ภาพที่ 5 การยืนยันผลการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยเทคนิค PCR จากการทดสอบคอนจูเกชัน (Conjugation assay) ระหว่างเชื้อ <i>E. coli</i> ไอโซเลทที่ดื้อยา (Donor) และ <i>E. coli</i> J53 (Recipient).....	40
ภาพที่ 6 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการระดับจีโนม (phylogenomic analysis).....	44
ภาพที่ 7 การวิเคราะห์เปรียบเทียบพลาสมิดที่มียีน <i>tet(X4)</i>	46

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

การดื้อยาต้านจุลชีพ (antimicrobial resistance; AMR) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่ทวีความรุนแรงมากขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก โดยส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งในมนุษย์และสัตว์ รวมถึงมีความเชื่อมโยงกับความมั่นคงทางอาหาร เศรษฐกิจ และสิ่งแวดล้อม มีรายงานว่าผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1.27 ล้านคนทั่วโลก และอาจเพิ่มขึ้นสูงถึง 10 ล้านคนต่อปีภายในปี พ.ศ. 2593 หากไม่มีมาตรการควบคุมและเฝ้าระวังที่มีประสิทธิภาพ (World Health Organization & UN Interagency Coordinating Group on AMR, 2019) การเกิดและการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพมีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย โดยเฉพาะการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมในมนุษย์ สัตว์ และภาคการเกษตร นอกจากนี้ มีรายงานว่าปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในภาคปศุสัตว์ของหลายประเทศมีสัดส่วนสูงกว่าการใช้ในมนุษย์อย่างชัดเจน โดยเฉพาะในประเทศที่มีอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ขนาดใหญ่ เช่น สหรัฐอเมริกาและสหภาพยุโรป ซึ่งมีการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์คิดเป็นร้อยละ 70–82 ของการใช้ทั้งหมด ขณะที่ประเทศจีนมีการใช้ยาปฏิชีวนะรวมสูงถึงประมาณ 162,000 ตันต่อปี และมากกว่าครึ่งหนึ่งถูกใช้ในภาคการเลี้ยงสัตว์ การใช้ยาปฏิชีวนะในระดับสูงดังกล่าวส่งผลให้เกิดแรงกดดันเชิงคัดเลือก (selective pressure) ต่อแบคทีเรียในระบบการผลิตสัตว์ และมีส่วนสำคัญต่อการเกิดและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาต้านจุลชีพในสิ่งแวดล้อม การศึกษาความชุกของยีนดื้อยา (antibiotic resistance genes; ARGs) ในของเสียจากสัตว์ยังพบว่า มูลสุกรและมูลไก่มีปริมาณยีนดื้อยาสูงกว่าสัตว์ชนิดอื่น โดยตรวจพบยีนดื้อยาหลายกลุ่ม เช่น *tet*, *sul*, *erm* และ *bla* ในระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งบางกรณีมีปริมาณสูงกว่าที่พบในของเสียจากโรงพยาบาลและชุมชน ข้อมูลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าฟาร์มปศุสัตว์และของเสียจากการเลี้ยงสัตว์อาจเป็นแหล่งกักเก็บ (reservoir) และแหล่งแพร่กระจายที่สำคัญของเชื้อและยีนดื้อยาสู่สิ่งแวดล้อม ผ่านน้ำ ดิน และห่วงโซ่อาหาร ซึ่งเพิ่มความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาระหว่างสัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อมภายใต้แนวคิด One Health (He et al., 2020) นอกจากนี้ปัจจัยด้านการใช้ยาปฏิชีวนะแล้วสุขภาพสุขาภิบาลที่ไม่เหมาะสม การจัดการของเสียที่ไม่มีประสิทธิภาพ และการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ ดิน และมูลสัตว์ ยังมีบทบาทสำคัญต่อการคงอยู่ของเชื้อดื้อยาในระบบนิเวศ เชื้อดื้อยาสามารถถ่ายทอดระหว่างมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารและการถ่ายทอดยีนในแนวนอน (horizontal gene transfer; HGT) ซึ่งเป็นการกลไกสำคัญที่ส่งเสริมการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในระดับประชากร (Bello & Dingle, 2018) ใน

ภาคปศุสัตว์ เชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยเฉพาะ *E. coli* มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลื้อยคลาน แต่สามารถก่อโรคได้ทั้งในระบบทางเดินอาหารและโรคนอกลำไส้ อีกทั้งยังเป็นตัวชี้วัดสำคัญของการแพร่กระจายยีนดื้อยาต้านจุลชีพในระบบการเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะในฟาร์มสุกรที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจก่อให้เกิดแรงกดดันเชิงคัดเลือกต่อการเกิดและการคงอยู่ของเชื้อดื้อยา (Prapasarakul et al., 2010) ช่วงลูกสุกรหย่านมเป็นระยะที่มีความสำคัญทางการผลิต เนื่องจากสัตว์อยู่ในภาวะเครียดจากการเปลี่ยนแปลงอาหาร การแยกจากแม่สุกร และการปรับตัวของระบบทางเดินอาหาร ส่งผลให้มีความไวต่อการติดเชื้อ *E. coli* มากขึ้น และมักสัมพันธ์กับการสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมสุกร นอกจากนี้ การใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงดังกล่าวยังอาจส่งเสริมการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการดื้อยาเพิ่มขึ้น ทำให้ลูกสุกรหย่านมเป็นกลุ่มตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในระบบปศุสัตว์ (Nguyet et al., 2022) ไทกิไซคลิน เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม ไกลซิลไซคลิน ที่พัฒนามาจาก ยากลุ่มเตตราไซคลิน และถือเป็นหนึ่งในยาทางเลือกสำคัญหรือยาทางเลือกสุดท้าย (last-resort antibiotic) สำหรับรักษาการติดเชื้อจากเชื้อดื้อยาหลายขนาน โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากนำมาใช้ในทางคลินิก มีรายงานการลดความไวต่อยาและการเกิดดื้อต่อยาไทกิไซคลิน เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งก่อให้เกิดความกังวลต่อประสิทธิภาพในการรักษา (Wang et al., 2021) กลไกการดื้อ ไทกิไซคลิน มีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ ได้แก่ การเพิ่มการทำงานของระบบปั๊มยาออกจากเซลล์ การลดการซึมผ่านของยา การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของยาในไรโบโซม และการทำลายหรือดัดแปลงยาโดยเอนไซม์ ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องเช่น *tet(A)* variant, *tet(X)* และยีนควบคุมการแสดงออกของ efflux pumps มีบทบาทสำคัญต่อการลดความไวต่อยา นอกจากนี้ ยีนดื้อยาดังกล่าวยังสามารถถ่ายทอดระหว่างแบคทีเรียผ่านกระบวนการ horizontal gene transfer ซึ่งเพิ่มศักยภาพในการแพร่กระจายของการดื้อยาในระดับประชากร (Korczak et al., 2024) แม้ว่าการศึกษาดังกล่าว ไทกิไซคลิน จะมีรายงานอย่างแพร่หลายในเชื้อทางคลินิก แต่ข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายของเชื้อ *E. coli* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อ ไทกิไซคลิน ในแหล่งสัตว์ โดยเฉพาะในลูกสุกรหย่านม ยังมีจำกัดอย่างมาก โดยเฉพาะในระดับระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลในประเทศไทย ช่องว่างขององค์ความรู้มีความสำคัญต่อการทำความเข้าใจแหล่งกำเนิดและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในบริบทของภาคปศุสัตว์

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยเฉพาะ *E. coli* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อ ไทกิไซคลิน จากลูกสุกรหย่านม รวมทั้งตรวจประเมินความไวต่อยาและจำแนกลักษณะของเชื้อก่อโรคที่แยกได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเฝ้าระวังการดื้อยาต้านจุลชีพในระบบการเลี้ยงสุกร และสนับสนุนการวางแผนทางควบคุมภายใต้แนวคิด One Health ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อประเมินความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา ไทกิไซคลิน ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างมูลลูกสุกรหย่านม
2. เพื่อตรวจหาและยืนยันการมีอยู่ของยีนดื้อยา ไทกิไซคลิน โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Whole-Genome Sequencing (WGS) ด้วยเทคโนโลยี Illumina และ Nanopore sequencing
3. เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ โดยพิจารณาในดื้อยาปฏิชีวนะ (antimicrobial resistance genes; ARGs) และองค์ประกอบทางพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile genetic elements) ระหว่างไอโซเลต

ความสำคัญของการวิจัย

แบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae สามารถพบได้ทั้งในมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะ *E. coli* ซึ่งนอกจากจะเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมและพาหะสำคัญของยีนดื้อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance genes; ARGs) ยีนดื้อยาเหล่านี้สามารถแพร่กระจายระหว่างแบคทีเรีย รวมถึงถ่ายทอดจากสัตว์สู่มนุษย์ผ่านห่วงโซ่อาหาร สิ่งแวดล้อม และการสัมผัสโดยตรง ส่งผลให้ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะมีความเชื่อมโยงระหว่างสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมภายใต้แนวคิด One Health (Börjesson et al., 2020) ไทกิไซคลินเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม glycycline ที่ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้รักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาหลายขนาน โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) และยังคงเป็นหนึ่งในยาปฏิชีวนะทางเลือกสำคัญสำหรับการรักษาการติดเชื้อที่มีข้อจำกัดด้านทางเลือกของยา (Stein, 2013) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการตรวจพบการดื้อยา ไทกิไซคลิน เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในหลายประเทศ ซึ่งส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการรักษาและก่อให้เกิดข้อกังวลต่อการควบคุมปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะในระดับสากล (Chen, 2020) การค้นพบยีน *tet(X3)* และ *tet(X4)* บนพลาสมิดชนิด conjugative นับเป็นพัฒนาการสำคัญของการศึกษาการดื้อยา ไทกิไซคลิน เนื่องจากยีนดังกล่าวสามารถถ่ายทอดระหว่างแบคทีเรียผ่านกระบวนการ conjugation ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Sun, 2019) นอกจากนี้ ยีน *tet(X4)* ยังมักตรวจพบร่วมกับองค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile genetic elements; MGEs) เช่น IS26 และ ISCR2 ซึ่งมีบทบาทในการเคลื่อนย้ายและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาผ่านกระบวนการ horizontal gene transfer ส่งผลให้การดื้อยา ไทกิไซคลิน สามารถแพร่กระจายระหว่างแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ในปัจจุบัน มีรายงานการตรวจพบ *tet(X4)* ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากสัตว์เศรษฐกิจ สิ่งแวดล้อม และตัวอย่างทางคลินิกในหลายประเทศ (Rueda Furlan, 2023) โดยเฉพาะในสุกรซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีบทบาทสำคัญในระบบการผลิตอาหาร และได้รับการรายงานว่าเป็นแหล่งกักเก็บที่สำคัญของเชื้อ *E. coli* ที่มียีนดื้อยา

การปรากฏของยีน *tet(X4)* ในระบบการผลิตสุรจึงมีนัยสำคัญทางระบาดวิทยา เนื่องจากอาจเอื้อต่อการคงอยู่และการแพร่กระจายของยีนดื้อยาผ่านห่วงโซ่อาหารและสิ่งแวดล้อม

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเกี่ยวกับความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่มียีน *tet(X4)* รวมถึงลักษณะทางพันธุกรรม องค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่ และศักยภาพในการถ่ายทอดยีนดื้อยาดังกล่าวในลูกสุกรหย่านมของประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของยีน *tet(X4)* ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากลูกสุกรหย่านม รวมถึงวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมและการถ่ายทอดยีนดื้อยาที่เกี่ยวข้อง เพื่อสนับสนุนการเฝ้าระวังการดื้อยาปฏิชีวนะและเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการกำหนดมาตรการควบคุมการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในภาคปศุสัตว์และสาธารณสุขภายใต้แนวคิด One Health

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มีขอบเขตในการศึกษาเชื้อ *E. coli* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม glycyclcycline โดยเฉพาะยา ไทกิไซคลิน จากตัวอย่างมูลลูกสุกรหย่านมที่เก็บจากฟาร์มสุกรจำนวน 3 แห่ง ในจังหวัดสระบุรี จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดเพชรบูรณ์ โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมูลด้วยวิธี fecal swab จำนวนทั้งสิ้น 305 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ถูกนำมาเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) และบ่มในเครื่องเขย่า (shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–20 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแยกเชื้อ *E. coli* โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue agar (EMB agar) และคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์สำหรับการศึกษาต่อไป เชื้อที่แยกได้จะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ด้วยวิธี boiling method และยืนยันชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ *uidA* ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. coli*

การตรวจหายีนดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทกิไซคลิน ดำเนินการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน *tet(X1)*, *tet(X2)*, *tet(X3)*, *tet(X4)*, *tet(X5)* และ *tet(X)Uni* นอกจากนี้ จะทำการทดสอบความไวต่อยาโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC) เพื่อประเมินระดับความไวของเชื้อต่อยา ไทกิไซคลิน

เชื้อที่ตรวจพบยีนดื้อยาในกลุ่ม *tet(X)* จะถูกนำมาศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาดด้วยวิธี conjugation assay และวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (whole-genome sequencing; WGS) ด้วยเทคโนโลยี Illumina sequencing และ Oxford Nanopore sequencing เพื่อประกอบจีโนมแบบ hybrid genome assembly

และศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านจุลชีพ องค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่ พลาสมิด และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของยีนดื้อยา

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. เชื้อแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae

หมายถึง กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) พบได้ทั่วไปในลำไส้ของคนและสัตว์ และสามารถจำแนกเบื้องต้นตามความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสได้เป็น lactose fermenter และ non-lactose fermenter โดยเชื้อในวงศ์นี้มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ เนื่องจากเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อและมีแนวโน้มดื้อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม

2. เชื้อ *E. coli*

หมายถึง แบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่เป็น normal flora ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลือดอุ่น โดยส่วนใหญ่ไม่ก่อโรค แต่บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคได้ทั้งในระบบทางเดินอาหารและนอกลำไส้ (extraintestinal pathogenic *E. coli*; ExPEC) และมีบทบาทสำคัญในฐานะแหล่งสะสมและแพร่กระจายของยีนดื้อยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อมและระบบการผลิตสัตว์

3. ยาปฏิชีวนะ ไทกิไซคลิน

หมายถึง ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม ไกลซิลไซคลิน ซึ่งพัฒนามาจาก เตตราไซคลิน โดยมีการดัดแปลงโครงสร้างที่ตำแหน่ง C9 ของวงแหวน D ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น โดยออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic ผ่านการจับกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม และถูกใช้เป็นยาทางเลือกสำหรับการรักษาเชื้อดื้อยาหลายขนาน

4. การดื้อยา ไทกิไซคลิน

หมายถึง ความสามารถของแบคทีเรียในการลดความไวหรือไม่ตอบสนองต่อยา ไทกิไซคลิน ซึ่งอาจแสดงออกในรูปแบบการดื้อเชิงฟีโนไทป์ (phenotypic resistance) หรือการมียีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา โดยมักพบสัมพันธ์กับเชื้อดื้อยาหลายขนาน (MDR) และเชื้อดื้อยาระดับรุนแรง เช่น extensively drug-resistant และ carbapenem-resistant (XDR/CR)

5. ยีน *tet(A)* variant

หมายถึง ยีนในกลุ่ม Tetracycline resistance gene ที่มีการกลายพันธุ์หรือดัดแปลงจาก *tet(A)* ดั้งเดิม ซึ่งส่งผลให้ความสามารถของ efflux pump เพิ่มขึ้นและมีบทบาทต่อการลดความไวต่อไทกิไซคลิน ในแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะใน Enterobacteriaceae

6. ยีน *tet(X4)*

หมายถึง ยีนดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม *tet(X)* ที่เข้ารหัสเอนไซม์ชนิด flavin-dependent monooxygenase ซึ่งสามารถทำลายฤทธิ์ของ ไทเกีไซคลิน ผ่านกระบวนการดัดแปลงโครงสร้างยา และมักพบอยู่บนพลาสมิด ทำให้สามารถแพร่กระจายระหว่างแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว

7. Multidrug-resistant (MDR)

หมายถึง เชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดใน ≥ 3 กลุ่มยาที่แตกต่างกัน

8. Extensively drug-resistant (XDR)

หมายถึง เชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกกลุ่ม เหลือเพียง 1–2 กลุ่มยาที่ยังสามารถใช้รักษาได้

9. Carbapenem-resistant (CR)

หมายถึง เชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยากลุ่มสำคัญที่ใช้รักษาการติดเชื้อรุนแรง

10. แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียว (One Health)

หมายถึง แนวคิดที่อธิบายความเชื่อมโยงระหว่างสุขภาพของคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม โดยเน้นว่าการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะสามารถเกิดขึ้นและส่งผลกระทบต่อระบบได้

11. ความชุกของการดื้อยา ไทเกีไซคลิน

หมายถึง ความชุกของการดื้อยา ไทเกีไซคลิน หมายถึงสัดส่วนของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบว่าดื้อต่อ ไทเกีไซคลิน ในประชากรตัวอย่างหนึ่ง ๆ ซึ่งอาจรายงานเป็นร้อยละหรืออัตราการดื้อยา ข้อมูลความชุกอาจแตกต่างกันตามชนิดเชื้อ แหล่งตัวอย่าง วิธีทดสอบ และบริบททางภูมิศาสตร์

สมมุติฐานของการวิจัย

เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากลูกสุกรหย่านมมีการตรวจพบยีน *tet(X4)* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทเกีไซคลิน และสามารถแพร่กระจายได้ผ่านองค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่และการถ่ายทอดยีนในแนวนอน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae

เชื้อแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ และสามารถดำรงชีวิตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) เชื้อในวงศ์นี้สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และมนุษย์ โดยบางชนิดเป็นเชื้อประจำถิ่น ขณะที่บางชนิดสามารถก่อโรคได้ เชื้อในวงศ์นี้สามารถจำแนกเบื้องต้นได้จากความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส (lactose fermenter) และกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส (non-lactose fermenter) นอกจากนี้ยังมีรายงานการแพร่กระจายของเชื้อและยีนดื้อยาระหว่างสัตว์ สิ่งแวดล้อม และมนุษย์ ซึ่งมีความสำคัญต่อแนวคิด One Health (Su et al., 2023)

2.2 เชื้อ *E. coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สามารถพบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลื้อยคลานและมนุษย์ โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ไม่ก่อโรค อย่างไรก็ตาม มีเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคได้จากการมีปัจจัยก่อโรค (virulence factors) เช่น fimbriae, adhesins และ toxins ซึ่งส่งผลให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะในลูกสุกรแรกเกิดและลูกสุกรหลังหย่านม (Fairbrother & Nadeau, 2019) เชื้อ *E. coli* ก่อโรคในลูกสุกรที่สำคัญ ได้แก่ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) และ Stx2e-producing *E. coli* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) โดย ETEC เป็นสาเหตุสำคัญของ post-weaning diarrhea (PWD) ในลูกสุกร เนื่องจากเชื้อสามารถสร้าง fimbriae เช่น F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 และ F41 เพื่อช่วยในการยึดเกาะเยื่อบุลำไส้ และสร้าง enterotoxins ได้แก่ heat-labile toxin (LT) และ heat-stable toxin (STa และ STb) ส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำ ทำให้ลูกสุกรเกิดอาการท้องเสีย ขาดน้ำ น้ำหนักลด และอาจตายได้ (Nagy & Fekete, 2005) นอกจากนี้ Stx2e-producing *E. coli* มีความสำคัญต่อการเกิด edema disease ในลูกสุกรหลังหย่านม โดยเชื้อจะสร้าง Shiga toxin type 2e (Stx2e) ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อหลอดเลือด เกิดภาวะบวมน้ำ อาการทางระบบประสาท และอาจทำให้ลูกสุกรตายเฉียบพลันได้ (Fairbrother & Nadeau, 2019) สำหรับ enteroaggregative *E. coli* (EAEC) เป็นอีกหนึ่งกลุ่มของ pathogenic *E. coli* ที่สามารถสร้าง enteroaggregative heat-stable toxin 1 (EAST1) ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาการท้องเสีย อย่างไรก็ตาม EAST1 อาจพบได้ใน pathogenic *E. coli* หลายกลุ่ม รวมถึง ETEC และไม่ถือเป็น marker ที่จำเพาะ

ต่อ EAEC เพียงอย่างเดียว (Yamamoto & Echeverria, 1996) เชื้อ pathogenic *E. coli* มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในฟาร์มปศุสัตว์ รวมถึงในมูลสัตว์ น้ำเสีย ดิน และแหล่งน้ำภายในฟาร์ม อีกทั้งยังพบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ ความปลอดภัยทางอาหาร และสาธารณสุขในแนวคิด One Health (Gemedra et al., 2023)

2.3 ปัจจัยก่อโรคของ *E. coli*

เชื้อ pathogenic *E. coli* สามารถก่อโรคในลูกสุกรได้จากการมีปัจจัยก่อโรค (virulence factors) หลายชนิด ได้แก่ ปัจจัยการยึดเกาะ (adhesion factors) สารพิษกลุ่ม enterotoxins และ Shiga toxins ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคท้องเสียและ edema disease ในลูกสุกร โดยปัจจัยก่อโรคเหล่านี้สามารถตรวจจำแนกได้ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ผ่านการตรวจหา virulence genes ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละกลุ่ม (Nagy & Fekete, 2005)

2.3.1 Adhesion factors

Adhesion factors หรือ fimbriae เป็นโครงสร้างบนผิวเซลล์แบคทีเรียที่ช่วยให้เชื้อสามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผิวลำไส้ของลูกสุกรได้ ซึ่งถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการเริ่มต้นการก่อโรค เชื้อ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ในสุกรมักพบ fimbriae หลายชนิด ได้แก่ F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 และ F41 โดย F4 (K88) และ F18 เป็น fimbriae ที่พบได้บ่อยในลูกสุกรหลังหย่านม และมีความสัมพันธ์กับ post-weaning diarrhea ส่วน F5 (K99), F6 (987P) และ F41 มักพบในลูกสุกรแรกเกิด (Fairbrother & Nadeau, 2019)

2.3.2 Enterotoxins

Enterotoxins เป็นสารพิษที่สร้างโดย ETEC ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดอาการท้องเสียในลูกสุกร โดยแบ่งออกเป็น heat-labile toxin (LT) และ heat-stable toxin (ST) ได้แก่ LT-I, LT-II, STa และ STb ในส่วน LT toxin เป็นสารพิษที่ไวต่อความร้อน มีโครงสร้างและกลไกคล้าย cholera toxin โดยจะกระตุ้นการเพิ่มระดับ cyclic AMP (cAMP) ภายในเซลล์เยื่อบุลำไส้ ส่งผลให้มีการหลั่งน้ำออกสู่ลำไส้มากขึ้น ส่วน STa และ STb เป็นสารพิษที่ทนต่อความร้อน โดย STa จะกระตุ้น cyclic GMP (cGMP) ขณะที่ STb ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมดุลของของเหลวในลำไส้ ทำให้เกิดอาการท้องเสียและภาวะขาดน้ำในลูกสุกร (Nagy & Fekete, 2005)

2.3.3 Shiga toxins

Shiga toxins เป็นปัจจัยก่อโรคสำคัญของ Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) โดยมียีนสำคัญ ได้แก่ *stx1*, *stx2* และ *stx2e* ซึ่งทำหน้าที่สร้างสารพิษที่ส่งผลต่อเซลล์เยื่อหลอดเลือดและยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ในสุกร *stx2e* ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับ edema disease โดยเชื้อที่สร้าง Shiga toxin type 2e จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อ endothelial cells ของหลอดเลือด ส่งผลให้เกิดภาวะบวมหน้า ความผิดปกติทางระบบประสาท และอาจทำให้ลูกสุกรตาย

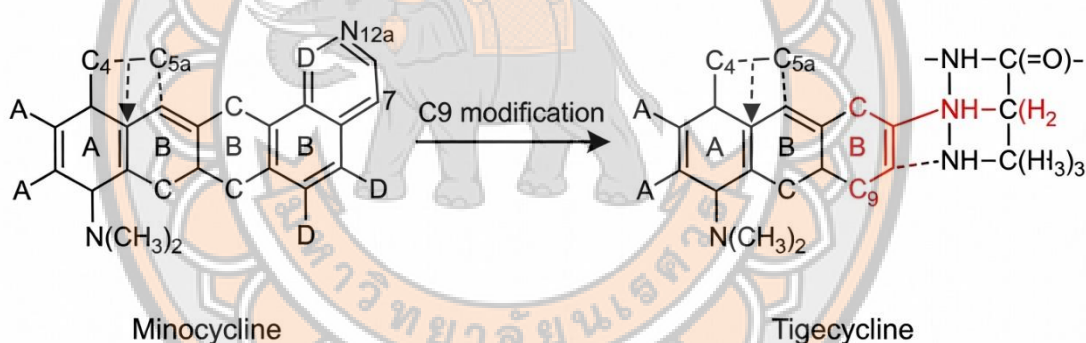
เฉียบพลันได้ นอกจากนี้ เชื่อกันว่ามักพบร่วมกับ fimbriae ชนิด F18 ในลูกสุกรหลังหย่านม ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการยึดเกาะของเชื้อบริเวณเยื่ออุ้งลำไส้ (Fairbrother & Nadeau, 2019)

2.3.4 EAST1 toxin

Enteraggative heat-stable toxin 1 (EAST1) เป็นสารพิษที่เข้ารหัสโดยยีน EAST1 ซึ่งเดิมพบใน enteraggative *E. coli* (EAEC) และมีความเกี่ยวข้องกับอาการท้องเสีย อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันพบว่ายีน EAST1 สามารถตรวจพบได้ใน pathogenic *E. coli* หลายกลุ่ม รวมถึง ETEC จึงไม่ถือเป็น marker ที่จำเพาะต่อ EAEC เพียงอย่างเดียว (Yamamoto & Echeverria, 1996)

2.4 ยากลุ่ม ไทเกีไซคลิน

2.4.1 โครงสร้างทางเคมี (Chemical structure)



ภาพที่ 1 การดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีที่ตำแหน่ง C9 ของวงแหวน D จาก มิโนไซคลิน (ซ้าย) ไปเป็น ไทเกีไซคลิน (ขวา) โดยการเติมหมู่แทนที่ 9-t-butylglycylamido (แสดงด้วยลูกศรสีแดง)

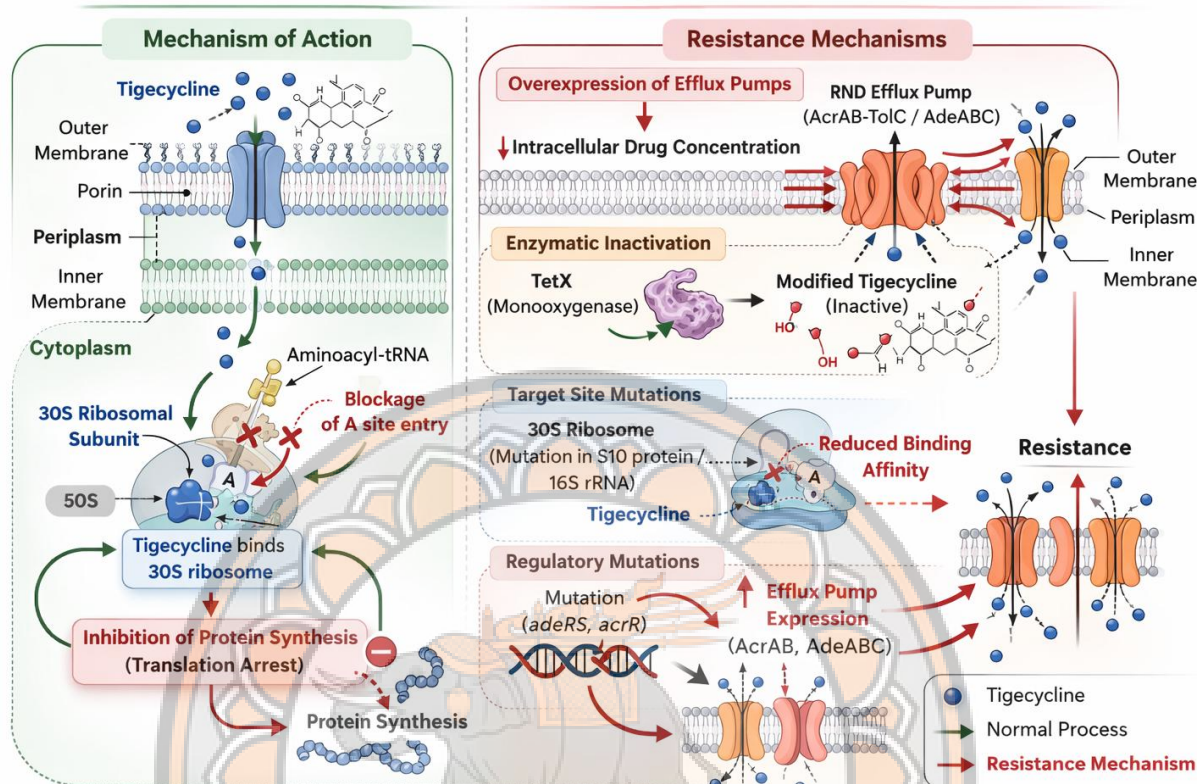
โครงสร้างทางเคมีของ ไทเกีไซคลิน ดังภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่าการเติมหมู่ glycylamido ที่ตำแหน่ง C9 มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มขนาดของโมเลกุล และช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกับไรโบโซม ส่งผลให้ ไทเกีไซคลิน มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและสามารถหลีกเลี่ยงกลไกการดื้อยาแบบดั้งเดิมได้ ไทเกีไซคลิน เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม ไกลซิลไซคลิน ซึ่งได้รับการพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาดื้อยาในกลุ่มเตตราไซคลิน โดย ไทเกีไซคลิน มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นวงแหวนสี่วง (Tetracycline core; A-B-C-D) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของยากลุ่ม เตตราไซคลิน (Greer, 2006) ความแตกต่างสำคัญของ ไทเกีไซคลิน เมื่อเปรียบเทียบกับ มิโนไซคลิน คือการดัดแปลงที่ตำแหน่ง C9 ของวงแหวน D โดยใน มิโนไซคลิน

ตำแหน่งดังกล่าวเป็นหมู่แทนที่ขนาดเล็ก เช่น $-H$ หรือ $-OH$ ขณะที่ ไทกิไซคลิน มีการเติมหมู่ glycydamido ($-NH-CO-CH_2-NH-tBu$) ซึ่งมีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนมากกว่า (Yaghoubi et al., 2022) หมู่แทนที่ขนาดใหญ่ที่ตำแหน่ง C9 นี้ส่งผลให้โครงสร้างโมเลกุลของ ไทกิไซคลิน มีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างจาก เตตราไซคลิน รุ่นดั้งเดิม (Peterson, 2008) โดยเฉพาะการเพิ่ม lipid solubility และการปรับเปลี่ยนลักษณะเชิงโครงสร้างของโมเลกุล การดัดแปลงโครงสร้างดังกล่าวยังส่งผลให้ ไทกิไซคลิน มีความสามารถในการจับกับไรโบโซมสูงขึ้นเมื่อเทียบกับ Tetracycline และ มิโนไซคลิน ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่สัมพันธ์กับประสิทธิภาพของยา การดัดแปลงโครงสร้างดังกล่าวมีบทบาทสำคัญต่อคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของยา และส่งผลต่อกลไกการออกฤทธิ์

2.4.2 กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of Action)

ไทกิไซคลิน เป็นยาปฏิชีวนะประเภท bacteriostatic ที่ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย ผ่านการจับแบบ reversible กับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม โดยเฉพาะบริเวณ helical region (H34) ของ 16S rRNA การจับของยาจะขัดขวางการเข้าสู่ตำแหน่ง A-site ของ aminoacyl-tRNA ส่งผลให้กรดอะมิโนไม่สามารถต่อเป็นสายโพลีเปปไทด์ได้ กระบวนการ elongation ของโปรตีนจึงหยุดลงและยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Yaghoubi et al., 2022) การดัดแปลงโครงสร้างที่ตำแหน่ง C9 ด้วยหมู่ 9-t-butylglycydamido มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการออกฤทธิ์ของยา โดยช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกับไรโบโซม และก่อให้เกิด steric hindrance ซึ่งลดประสิทธิภาพของกลไกการดื้อยาหลักของ เตตราไซคลิน ได้แก่ efflux pumps และ ribosomal protection proteins เช่น Tet(M) ส่งผลให้ ไทกิไซคลิน มีความสามารถในการจับกับไรโบโซมสูงกว่าเมื่อเทียบกับ Tetracyclines แบบดั้งเดิม (Greer, 2006) ในระดับโมเลกุล หมู่ดังกล่าวสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ base stacking กับนิวคลีโอไทด์ C1054, G966 และ G1198 บน 16S rRNA รวมถึงการประสานกับ Mg^{2+} ไอออน ซึ่งช่วยเพิ่มความเสถียรของการจับระหว่างยาและไรโบโซม และส่งผลให้การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Jenner et al., 2013) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ ไทกิไซคลิน จึงถูกพิจารณาเป็นหนึ่งในยาทางเลือกสำคัญสำหรับการรักษาการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อดื้อยาลายขนาน อย่างไรก็ตาม การใช้ยาอย่างแพร่หลายได้นำไปสู่การเกิดกลไกการดื้อยาใหม่ ๆ เช่น การเพิ่มการทำงานของ efflux pumps การกลายพันธุ์ของเป้าหมายไรโบโซม และการเกิดยีนที่สามารถดัดแปลงหรือทำลายฤทธิ์ของยา เช่น *tet(X)* ซึ่งสะท้อนถึงความจำเป็นในการเฝ้าระวังและศึกษากลไกการดื้อยาอย่างต่อเนื่อง (Fan et al., 2024)

Mechanisms of Action and Resistance of Tigecycline in Gram-negative Bacteria



ภาพที่ 2 ภาพรวมกลไกการออกฤทธิ์และกลไกการดื้อยา tigecycline ในแบคทีเรียแกรมลบ

2.4.3 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ (Mechanisms of tigecycline resistance)

ไทเกอไซคลิน เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มไกลซิลไซคลิน ซึ่งได้รับการพัฒนาจากยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราไซคลิน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียที่มีกลไกการดื้อยาแบบดั้งเดิมของเตตราไซคลิน โดยยาออกฤทธิ์ผ่านการจับกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม ส่งผลให้ aminoacyl-tRNA ไม่สามารถเข้าสู่ตำแหน่ง A-site ของไรโบโซมได้ จึงยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 2

อย่างไรก็ตาม การใช้ ไทเกอไซคลิน อย่างต่อเนื่องและแพร่หลายส่งผลให้เกิดการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีกลไกการดื้อยาหลากหลายรูปแบบ โดยกลไกการดื้อยาที่สำคัญในแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วย การเพิ่มการทำงานของระบบขับยาออกจากเซลล์ (efflux pumps) การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของยา การลดการซึมผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ และการดัดแปลงหรือทำลายโครงสร้างของยาโดยเอนไซม์ที่เข้ารหัสจากยีนดื้อยา (Fan et al., 2024) การเพิ่มการแสดงออกของระบบขับยาออกจากเซลล์ เช่น AcrAB-TolC, OqxAB และ AdeABC ส่งผลให้ความเข้มข้นของยา ไทเกอไซคลิน ภายในเซลล์แบคทีเรียลดลง จึงลดประสิทธิภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ การ

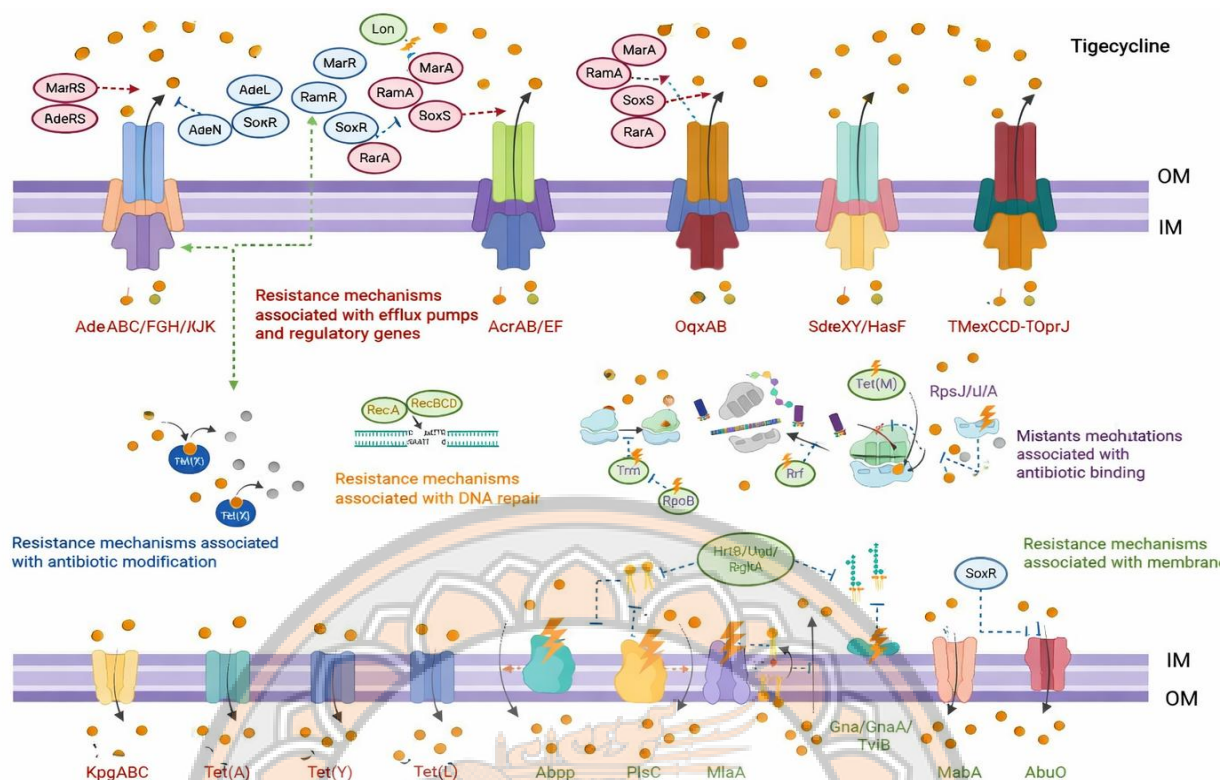
กลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม รวมถึงการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันไรโบโซม (ribosomal protection proteins) อาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการจับของยา แม้ว่ากลไกดังกล่าวจะมีบทบาทต่อการดื้อยา ไทเกีไซคลิน น้อยกว่าที่พบใน Tetracyclines รุ่นดั้งเดิมก็ตาม (Greer, 2006) ปัจจุบัน กลไกการดื้อยาที่มีความสำคัญทางระบาดวิทยาและได้รับการรายงานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง คือการมียีนในกลุ่ม *tet(X)* โดยเฉพาะ *tet(X3)* และ *tet(X4)* เป็นแม่แบบในการสร้างเอนไซม์ flavin-dependent monooxygenase ที่สามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ ไทเกีไซคลิน ส่งผลให้โครงสร้างทางเคมีของยาถูกดัดแปลงและสูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย กลไกดังกล่าวนับเป็นกลไกการดื้อยาที่แตกต่างจากกลไกการดื้อยา Tetracyclines แบบดั้งเดิม เนื่องจากการทำลายฤทธิ์ของยาโดยตรง (enzymatic inactivation) ยีน *tet(X3)* และ *tet(X4)* มักตรวจพบร่วมกับองค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile genetic elements) และพลาสมิดชนิด conjugative ซึ่งเอื้อต่อการถ่ายทอดยีนระหว่างแบคทีเรียผ่านกระบวนการ horizontal gene transfer ส่งผลให้ยีนดื้อยาสามารถแพร่กระจายได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งภายในและระหว่างชนิดของแบคทีเรีย การแพร่กระจายของยีนดังกล่าวได้รับการรายงานในแบคทีเรียจากมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม สะท้อนให้เห็นถึงความเชื่อมโยงของปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะภายใต้แนวคิด One Health

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มีรายงานการตรวจพบการดื้อยา ไทเกีไซคลิน เพิ่มขึ้นในแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสำคัญทางคลินิก ได้แก่ *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* และ *Acinetobacter baumannii* โดยการดื้อยาดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับกลไกหลายประการทั้งการลดการสะสมของยาในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมาย การลดการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ และการทำลายฤทธิ์ของยาโดยเอนไซม์ที่เข้ารหัสจากยีน *tet(X)* (Nasomsong et al., 2025) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของ ไทเกีไซคลิน ในฐานะยาปฏิชีวนะทางเลือกสำคัญสำหรับการรักษาการติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียดื้อยาหลายขนานในอนาคต

ตารางที่ 1 ระบบ efflux pump และยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทกัไซคลิน ในแบคทีเรียแกรมลบ (Wang & Li, 2024)

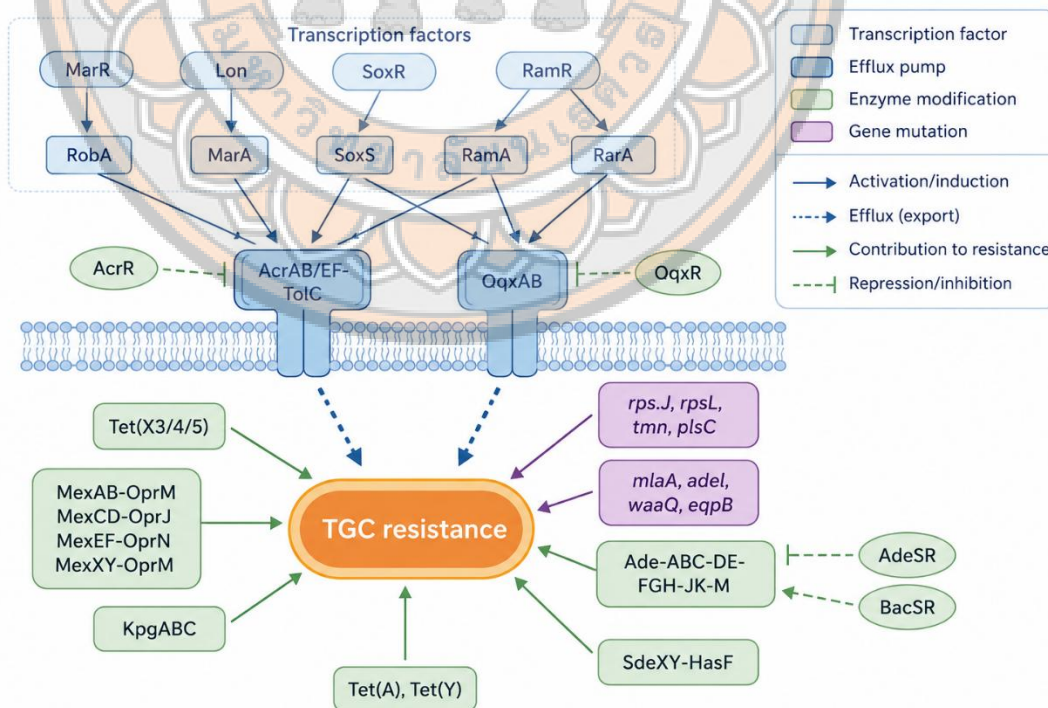
Family	Location	Genes and Gene clusters	Regulatory genes	Related species
RND	Chromosomal	<i>acrAB-EF</i>	<i>ramA (+), ramR (-), soxS (+), soxR (-), rarA (+), acrR (-), marA (+), marR (-)</i>	<i>E. cloacae, E. coli, K. pneumoniae, S. typhimurium, S. enterica, E. aerogenes, E. hormaechei</i>
RND	Chromosomal	<i>oqxAB</i>	<i>soxS (+), rarA (+), ramA (+), marA (+)</i>	<i>E. cloacae, K. pneumoniae, S. enterica</i>
RND	Chromosomal	<i>adeABC</i>	<i>adeRS (+), baeRS (+), soxR (-)</i>	<i>A. baumannii, A. nosocomialis, A. pittii</i>
RND	Chromosomal	<i>adeFGH</i>	<i>adeL (+), soxR (-)</i>	<i>A. baumannii, A. nosocomialis, A. pittii</i>
RND	Chromosomal	<i>adeIJK</i>	<i>adeN (-), soxR (-)</i>	<i>A. baumannii, A. nosocomialis, A. pittii</i>
RND	Chromosomal	<i>sdeXY</i>	NA	<i>S. marcescens</i>
RND	Chromosomal	<i>smeDEF</i>	NA	<i>S. maltophilia</i>
RND	Chromosomal	<i>axyEF</i>	NA	<i>A. xylosoxidans</i>
RND	Plasmidic	<i>tmexCD1-toprJ1</i>	NA	<i>K. pneumoniae, Klebsiella spp.</i>
RND	Plasmidic/chromosomal	<i>tmexCD2-toprJ2 / tmexCD3-toprJ3</i>	NA	<i>R. ornithinolytica, Klebsiella spp.</i>
RND	Plasmidic	<i>tmexCD3-toprJ3</i>	NA	<i>K. aerogenes</i>
RND	Plasmidic	<i>tmexCD4-toprJ4</i>	NA	<i>K. quasipneumoniae, E. roggenkampii</i>
MFS	Plasmidic	<i>tet(A)</i>	NA	<i>K. pneumoniae, A. baumannii, S. enterica</i>
MFS	Plasmidic	<i>tet(Y)</i>	NA	<i>A. baumannii</i>
MFS	Chromosomal	<i>tet(L)</i>	NA	<i>Campylobacter spp.</i>
Novel	Chromosomal	<i>kpgABC</i>	NA	<i>K. pneumoniae</i>

NA, not applicable.



ภาพที่ 3 กลไกการดื้อยา tigecycline ในแบคทีเรียแกรมลบ แสดงการทำงานของ efflux pumps การดัดแปลงยาโดยเอนไซม์ในกลุ่ม *tet(X)* และการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของยา

ที่มา: (Wang & Li, 2024)



ภาพที่ 4 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการลดความไวต่อ tigecycline ในแบคทีเรียแกรมลบ

2.4.4 การขับยาออกจากเซลล์โดย efflux pumps

Efflux pumps เป็นกลไกสำคัญประการหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการลดความไวต่อยา ไทกิไซคลิน ในแบคทีเรียแกรมลบ โดยทำหน้าที่ขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ ส่งผลให้ความเข้มข้นของยาในเซลล์ ลดลงจนไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่ไรโบโซม และอาจทำให้ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของเชื้อเพิ่มสูงขึ้น (Wang et al., 2021) แบคทีเรียแกรมลบ ระบบ efflux pumps ที่มีบทบาทสำคัญส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม resistance-nodulation-division (RND) family ซึ่งมีโครงสร้างแบบ tripartite complex เชื่อมต่อระหว่างเยื่อหุ้มชั้นใน ช่องว่าง periplasm และเยื่อหุ้มชั้นนอก ทำให้สามารถขับยาออกจากเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Du et al., 2018) ภาพที่ 3 แสดงภาพรวมของกลไกการดื้อยา ไทกิไซคลิน ที่เกี่ยวข้องกับ efflux pumps และกลไกอื่น ๆ ในแบคทีเรียแกรมลบ

ในเชื้อ *E. coli* ระบบ efflux pump ที่มีบทบาทสำคัญต่อการลดความไวต่อ ไทกิไซคลิน คือ AcrAB-TolC ซึ่งเป็นระบบขับยาออกจากเซลล์ในกลุ่ม RND family การเพิ่มการแสดงออกของระบบ AcrAB-TolC ส่งผลให้การสะสมของ ไทกิไซคลิน ภายในเซลล์ลดลง และสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับการดื้อยา (Li, Plésiat, & Nikaido, 2015) การควบคุมการแสดงออกของระบบดังกล่าว เกี่ยวข้องกับ transcriptional regulators หลายชนิด ได้แก่ MarA, SoxS และ RobA รวมถึงตัวกดการแสดงออกของยีน เช่น MarR และ AcrR หากเกิดการกลายพันธุ์ที่ทำให้ตัวกดการแสดงออกสูญเสียหน้าที่ อาจส่งผลให้ AcrAB-TolC ถูกกระตุ้นมากขึ้นและทำให้เชื้อลดความไวต่อ ไทกิไซคลิน ได้

กลไกที่มีรายงานใน *E. coli* ได้แก่ การกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation ในยีน *marR* ซึ่งทำให้การยับยั้งการแสดงออกของ *marA* ลดลง ส่งผลให้ระดับ MarA เพิ่มขึ้น และกระตุ้นการแสดงออกของระบบ *acrAB* อย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ Lon protease ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องทางอ้อม เนื่องจากโดยปกติเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ย่อยสลาย MarA เมื่อ Lon สูญเสียหน้าที่ ระดับ MarA ภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระบบ AcrAB-TolC ทำงานมากขึ้นตามไปด้วย กลไกดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การลดความไวต่อ ไทกิไซคลิน ใน *E. coli* ไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน efflux pump โดยตรงเท่านั้น แต่ยังเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ global regulator ด้วย (Hirata et al., 2004)

นอกจาก AcrAB-TolC แล้ว ยังมีรายงานว่า efflux pumps กลุ่มอื่น เช่น Tet(A), Tet(B) และ Tet(Y) ซึ่งเดิมเกี่ยวข้องกับการดื้อยาเตตราไซคลิน แบบดั้งเดิม อาจมีส่วนทำให้เชื้อลดความไวต่อ ไทกิไซคลิน ได้ในบางกรณี โดยเฉพาะเมื่อเกิดการกลายพันธุ์บางตำแหน่งหรือทำงานร่วมกับกลไกการดื้อยาอื่น ๆ (Wang & Li, 2024)

นอกจากนี้ ในช่วงที่ผ่านมา มีรายงานการพบระบบขับยาออกจากเซลล์ที่ถ่ายทอดผ่านพลาสมิด เช่น *tmexCD-toprJ-like* gene clusters ซึ่งสามารถแพร่กระจายระหว่างแบคทีเรียผ่าน

กระบวนการ horizontal gene transfer ได้ จึงมีความสำคัญทางระบาดวิทยา เนื่องจากการทำให้การดื้อยา ไทกิโซคลิน สามารถแพร่กระจายระหว่างเชื้อแบคทีเรียได้โดยไม่จำกัดเฉพาะการเกิดการกลายพันธุ์ภายในสายพันธุ์เดิม (Dong et al., 2022) ภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง transcription factors, efflux pumps, gene mutation และ enzyme modification ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทกิโซคลิน ในแบคทีเรียแกรมลบ

แม้ว่า efflux pumps จะเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อ *E. coli* ลดความไวต่อ ไทกิโซคลิน แต่ปัจจุบันกลไกที่มีความสำคัญเพิ่มขึ้นคือการทำลายฤทธิ์ของยาโดยเอนไซม์ที่เข้ารหัสจากยีนในกลุ่ม *tet(X)* โดยเฉพาะ *tet(X4)* ซึ่งสามารถดัดแปลงโครงสร้างของ ไทกิโซคลิน ผ่านกระบวนการ oxidation ได้โดยตรง และมักสัมพันธ์กับองค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่หรือพลาสมิด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการตรวจพบยีน *tet(X)* โดยเฉพาะ *tet(X4)* ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากฟาร์มสุกรในประเทศไทย



ตารางที่ 2 การกระจายของยีน *tet(X)* ในแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก และตำแหน่งทางพันธุกรรม (Wang & Li, 2024)

Gene	Species	Localization	PMID
<i>tet(X)</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	plasmid/chromosome	15452119 / 22014885
<i>tet(X1)</i>	<i>Bacteroides/Enterococcus spp.</i>	chromosome	11472924 / 29274469 / 22014885
<i>tet(X2)</i>	<i>Bacteroides/Empedobacter stercoris/Acinetobacter pittii</i>	chromosome	11472924 / 32731802 / 37141282
<i>tet(X3)</i>	<i>Acinetobacter species</i>	chromosome/plasmid	33287863 / 36409072 / 32816739 / 35124286 / 34851156 / 34987485 / 36081799
<i>tet(X4)</i>	<i>Escherichia coli / Acinetobacter species / Klebsiella pneumoniae / Klebsiella quasipneumoniae / Citrobacter braakii / Citrobacter freundii / Shewanella xiamenensis / Escherichia fergusonii / Salmonella enterica</i>	plasmid/chromosome	33287863 / 32345737 / 33992939 / 31235960 / 36016796 / 32846111 / 36326874 / 32853333 / 34431695 / 31429665 / 34937176 / 35138117 / 35021125 / 35793774 / 34899627 / 32816739 / 34987485
<i>tet(X5)</i>	<i>Acinetobacter species</i>	plasmid	31611352 / 33373881 / 34801490 / 33347964
<i>tet(X6)</i>	<i>Acinetobacter species / Myroides phaeus / Proteus spp. / Chryseobacterium indologenes / Providencia rettgeri / Ignatzschineria indica / Oblitimonas alkaliphila / Escherichia coli</i>	chromosome/plasmid	34680819 / 33373881 / 35124286 / 34987485 / 35966843 / 32345737 / 34801490 / 33762210 / 34851156 / 36081799 / 32766775 / 33559156 / 34936926 / 32068864

ตารางที่ 2 การกระจายของยีน *tet(X)* ในแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก และตำแหน่งทางพันธุกรรม (ต่อ) (Wang & Li, 2024)

Gene	Species	Localization	PMID
<i>tet(X7)</i>	<i>Escherichia coli</i>	plasmid	33820767
<i>tet(X7-13)</i>	human commensal metagenomes	NA	32415166
<i>tet(X14)</i>	<i>Empedobacter stercoris</i> / <i>Riemerella anatipestifer</i>	chromosome	32731802
<i>tet(X15)</i>	<i>Acinetobacter variabilis</i>	chromosome	34109404 / 34987485
<i>tet(X18-44)</i>	<i>Riemerella anatipestifer</i>	chromosome/plasmid	34098588
<i>tet(X45-47)</i>	<i>Bacteroidaceae</i> / <i>Enterococcaceae</i> / <i>Candidatus Melainabacteria</i>	NA	34935428
unnumbered <i>tet(X)</i> variant	<i>Klebsiella aerogenes</i> / <i>Empedobacter falsenii</i> / <i>Riemerella anatipestifer</i>	plasmid	34346701 / 31778164 / 35944374

2.4.5 การทำลายหรือดัดแปลงยาโดยเอนไซม์

นอกเหนือจากกลไกการขับยาออกจากเซลล์โดย efflux pumps แล้ว กลไกการดื้อยา ไทกิไซคลิน ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน คือการดัดแปลงหรือทำลายยาโดยเอนไซม์ที่สร้างมาจากยีนในกลุ่ม *tet(X)* และตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ *tet(X3)*, *tet(X4)*, *tet(X5)* และ *tet(X6)* ยีนเหล่านี้ผลิตเอนไซม์ชนิด flavin-dependent monooxygenase ซึ่งสามารถดัดแปลงโครงสร้างของ ไทกิไซคลิน ผ่านปฏิกิริยา oxidation ส่งผลให้ยาสูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย (Moore et al., 2005) กลไกดังกล่าวแตกต่างจากการดื้อยาที่เกิดจาก efflux pumps เนื่องจากการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาโดยตรง ไม่ใช่เพียงการลดความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ จากภาพที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Tet(X) สามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ ไทกิไซคลิน จนเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพลดลง ส่งผลให้ความสามารถของยาในการจับกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ยีนในกลุ่ม *tet(X)* สามารถตรวจพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะ *tet(X4)* ซึ่งได้รับการรายงานอย่างแพร่หลายในเชื้อ *Escherichia coli* จากสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภค มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม ยีนดังกล่าวมักพบร่วมกับพลาสมิดและองค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile genetic elements) ที่เอื้อต่อการถ่ายทอดยีนระหว่างแบคทีเรียผ่านกระบวนการ horizontal gene transfer ดังแสดงในตารางที่ 3

การค้นพบ *tet(X3)* และ *tet(X4)* บนพลาสมิดที่สามารถถ่ายทอดได้ในปี ค.ศ. 2019 ถือเป็นจุดเปลี่ยนสำคัญของการศึกษาการดื้อยา ไทกิไซคลิน เนื่องจากแสดงให้เห็นว่าการดื้อยาดังกล่าวไม่ได้จำกัดอยู่เพียงการกลายพันธุ์บนโครโมโซม แต่สามารถแพร่กระจายระหว่างแบคทีเรียต่างชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพผ่านการถ่ายทอดสารพันธุกรรมในแนวนอน (Sun et al., 2019)

ในระดับโมเลกุล เอนไซม์ Tet(X) ใช้ flavin adenine dinucleotide (FAD) เป็นโคแฟกเตอร์ในการเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ ไทกิไซคลิน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยา และลดประสิทธิภาพในการจับกับตำแหน่งเป้าหมายบนไรโบโซม กลไกดังกล่าวสามารถเพิ่มระดับการดื้อยาได้อย่างมีนัยสำคัญ และอาจส่งผลเสริมกับกลไกอื่น เช่น efflux pumps ทำให้เชื้อมีระดับความไวต่อยา ไทกิไซคลิน ลดลงมากยิ่งขึ้น (Moore et al., 2005) จากข้อมูลยีนดื้อยาในกลุ่ม Tetracycline ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทกิไซคลิน (ตารางที่ 1) พบว่า *tet(X4)* เป็นยีนที่มีความสำคัญทั้งในระดับโมเลกุลและระดับระบาดวิทยา เนื่องจากเกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำลายฤทธิ์ของ ไทกิไซคลิน และมักตรวจพบร่วมกับยีนดื้อยาชนิดอื่นบนพลาสมิดหรือองค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่ การแพร่กระจายของ *tet(X4)* ในแบคทีเรียจากมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม สะท้อนให้เห็นถึงความเชื่อมโยงของปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะภายใต้แนวคิด One Health ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการตรวจสอบการพบและการแพร่กระจายของยีน *tet(X4)* ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากลูกสุกรหย่านมในประเทศไทย

ตารางที่ 3 ลักษณะสำคัญของยีนตระกูลเตตราไซคลิน ที่เกี่ยวข้องกับกรดอียาไทไซคลิน (Korczak et al., 2024)

Gene	Mechanism of resistance	Transmission	Coexisting resistance genes	Tigecycline resistance	Reservoir
<i>tet(X1)</i>	Enzymatic degradation of antibiotics	Plasmid-mediated	<i>ermF, aadK</i>	(+)	Humans, animals
<i>tet(X2)</i>	Enzymatic degradation of antibiotics	Plasmid-mediated	<i>ermF, aadK, floR</i>	(+)	Humans, animals
<i>tet(X3)</i>	Enzymatic degradation of antibiotics	Plasmid-mediated	<i>blaOXA-58, blaNDM-1</i>	(+)	Humans, animals, meat samples
<i>tet(X4)</i>	Enzymatic degradation of antibiotics	Plasmid-mediated	<i>floR, mefB, tetA, sul3</i>	(+)	Humans, animals, meat samples
<i>tet(X)</i>	Enzymatic degradation of antibiotics	Plasmid-mediated	<i>blaNDM-1, mcr, cfr</i>	(+)	Animals, humans, environmental samples
<i>tet(M)</i>	Ribosomal protection	Plasmid-mediated	Occurrence only with other tet variants	(+)	Animals, humans, environmental samples
<i>tet(A)</i>	Active efflux pump	Plasmid-mediated	<i>blaKPC-2, mcr</i>	(+)	Animals, humans
<i>tet(B)</i>	Transport protein	Plasmid-mediated	No data	(+)	Animals, humans

2.4.6 การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของยา

การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของยาเป็นอีกหนึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องกับการลดความไวต่อ ไทกิไซคลิน โดยเกิดจากการกลายพันธุ์ขององค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม ซึ่งเป็นตำแหน่งออกฤทธิ์ของยา แม้ว่า ไทกิไซคลิน จะมีความสามารถในการจับกับไรโบโซมสูงกว่ายาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราไซคลินรุ่นดั้งเดิม แต่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตำแหน่งจับยาอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการจับลดลงและทำให้ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เพิ่มสูงขึ้นได้ (Izghirean et al., 2021) ยีนที่ได้รับการรายงานบ่อยที่สุดคือ *rpsJ* ซึ่งเข้ารหัส ribosomal protein S10 การกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณใกล้ตำแหน่งจับของ ไทกิไซคลิน บนหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม ส่งผลให้ความสามารถในการจับของยาลดลงและทำให้เชื้อมีระดับความไวต่อยาลดลง กลไกนี้ได้รับการรายงานในแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด และถือเป็นหนึ่งในกลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทกิไซคลิน นอกเหนือจากการทำงานของ efflux pumps และการทำลายยาโดยเอนไซม์ที่เข้ารหัสจากยีนในกลุ่ม *tet(X)* (Chen et al., 2014)

2.4.7 การลดการซึมผ่านของยาผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

การดื้อ ไทกิไซคลิน อาจเกิดจากการที่ยาเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของ outer membrane permeability และ porins ต่าง ๆ ในแบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปยาในกลุ่มนี้ต้องผ่าน outer membrane เพื่อเข้าสู่ periplasm และต่อไปยังไซโทพลาซึม หากแบคทีเรียมีการลดการแสดงออกของ porins หรือมีการเปลี่ยนองค์ประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอก จะทำให้การเข้าสู่เซลล์ของยาเป็นไปได้ยากขึ้น ส่งผลให้ระดับ ไทกิไซคลิน ภายในเซลล์ต่ำกว่าที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ กลไกนี้มักไม่ทำงานลำพัง แต่พบร่วมกับ efflux pump overexpression อยู่บ่อยครั้ง ทำให้ระดับการดื้อสูงขึ้นแบบเสริมกัน (Li et al., 2015)

ใน Enterobacteriales มีรายงานว่า การลดการแสดงออกของ porins เช่น *OmpF* อาจเกิดร่วมกับการกลายพันธุ์ใน *ramR* ทำให้ไม่เพียงแต่ *AcrAB-TolC* ถูกกระตุ้นมากขึ้น แต่ทางผ่านของยาผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกยังลดลงด้วย ลักษณะดังกล่าวเป็นตัวอย่างของการทำงานร่วมกันระหว่าง reduced influx และ increased efflux ซึ่งทำให้ ไทกิไซคลิน ไม่สามารถสะสมภายในเซลล์ในระดับที่มีประสิทธิภาพได้ (Wang & Li, 2024)

ใน *A. baumannii* มีการระบุยีนที่อาจเกี่ยวข้องกับ outer membrane permeability เช่น *plsC*, *abrp*, *gnaA* และ *abuO* โดยยีนเหล่านี้มีบทบาทเกี่ยวกับโครงสร้างหรือหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ และอาจส่งผลต่อการผ่านของไทกิไซคลินเข้าสู่เซลล์ แม้ว่ากลไกเชิงหน้าที่ของแต่ละยีนยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติม แต่ข้อมูลปัจจุบันสนับสนุนว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอกเป็นหนึ่งในองค์ประกอบสำคัญของการดื้อยาไทกิไซคลินในเชื้อนี้ โดยเฉพาะเมื่อเกิดร่วมกับการเพิ่มการทำงานของ *AdeABC* หรือ efflux systems อื่น ๆ (Li et al., 2015)

2.4.8 กลไกเสริมและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทกิโซคลิน

ใน *A. baumannii* ยังมีรายงานว่ารระบบ DNA repair pathways เช่น *recA* และ *recBCD* อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถของเชื้อในการคงอยู่ภายใต้แรงกดดันจาก ไทกิโซคลิน แม้ระบบเหล่านี้จะไม่ได้ทำหน้าที่ขับยา ทำลายยา หรือเปลี่ยนเป้าหมายโดยตรง แต่การเพิ่มประสิทธิภาพในการซ่อมแซมความเสียหายของเซลล์อาจช่วยให้แบคทีเรียอยู่รอดและสะสมการกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การดื้อยาในระยะต่อมาได้ กลไกนี้สะท้อนว่าการดื้อไทกิโซคลิน ไม่ได้เป็นผลจากเพียงยีนเดียว แต่เป็นผลจากการปรับตัวของเซลล์หลายระบบร่วมกัน (Zhang et al., 2022)

อีกประเด็นหนึ่งคือ heteroresistance ซึ่งหมายถึงภายในประชากรแบคทีเรียเดียวกันมีเพียงบางเซลล์ย่อยที่มีความสามารถในการทนต่อ ไทกิโซคลิน สูงกว่าเซลล์ส่วนใหญ่ เมื่อได้รับแรงกดดันจากยา เซลล์ย่อยเหล่านี้จะถูกคัดเลือกให้เด่นขึ้นและอาจพัฒนาเป็นประชากรดื้อยาอย่างเต็มรูปแบบในเวลาต่อมา ปรากฏการณ์นี้มีความสำคัญทางคลินิก เพราะอาจทำให้ผลการทดสอบความไวต่อยาดูเหมือนเชื้อไวต่อยา แต่ในสภาวะรักษาก็กลับเกิดการล้มเหลวได้ โดยมักเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ regulators ของ efflux pumps หรือการแสดงออกของยีนที่ผันแปรได้ภายในประชากรเดียวกัน (Jo & Ko, 2021)



ตารางที่ 4 ความชุกของการดื้อยา ไทกไซคลิน ในเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับสัตว์และบริบทที่เกี่ยวข้อง

Environment / Sample source	Prevalence	Stain	mechanism	mechanism
-ฟาร์มสุกร	1.55% (4/257)	<i>E. coli</i>	<i>tet</i> (X4)	(Yang et al., 2023)/ ประเทศไทย
-ฟาร์มไก่	0.77% (2/257)			
-ไก่เนื้อ	24.4% (22/90)	<i>E. coli</i>	<i>tet</i> (X4)	(Li et al., 2022) / ประเทศไทย
- ตัวอย่างเนื้อไก่	11% (11/100)			
สิ่งแวดล้อมจากฟาร์มเป็ดและห่าน	0.9% (16/1,716)	<i>E. coli</i>	<i>tet</i> (X4)	(Yu et al., 2021) / ประเทศไทย

2.5 สถานการณ์การตรวจพบยีน *tet(X4)* ในสัตว์และสิ่งแวดล้อม

การดื้อยา ไทกิโซคลิน ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยรวมยังพบในระดับค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในเชื้อดื้อยาหลายขนาน (multidrug-resistant; MDR) และเชื่อดื้อยาในระดับรุนแรง เช่น carbapenem-resistant strains โดยเฉพาะใน *K. pneumoniae* (Kelesidis et al., 2008) ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งสรุปรายงานความชุกของเชื้อที่มียีนดื้อยา ไทกิโซคลิน โดยเฉพาะ *tet(X4)* ในตัวอย่างจากสัตว์และสิ่งแวดล้อม ในระบบการผลิตสัตว์ มีรายงานการตรวจพบ *tet(X4)* ใน *E. coli* จากฟาร์มสุกร ฟาร์มสัตว์ปีก และสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้อง แม้ ไทกิโซคลิน จะไม่ได้ถูกใช้โดยตรงในสัตว์ก็ตาม โดย Yang et al. (2023) รายงานการตรวจพบ *tet(X4)* ใน *E. coli* จากฟาร์มสุกรและฟาร์มสัตว์ปีกในประเทศจีน คิดเป็นร้อยละ 1.55 และ 0.77 ตามลำดับ ขณะที่ Li et al. (2022) พบความชุกของ *tet(X4)* สูงถึงร้อยละ 24.4 ใน cloacal swabs ไก่เนื้อ และร้อยละ 11 ในตัวอย่างเนื้อไก่จากประเทศปากีสถาน นอกจากนี้ Yu et al. (2021) ยังรายงานการตรวจพบ *tet(X4)* ใน *E. coli* จากสิ่งแวดล้อมรอบฟาร์ม เป็ดและห่าน ได้แก่ ดิน น้ำเสีย และฝุ่น คิดเป็นร้อยละ 0.9 ซึ่งสะท้อนบทบาทของสิ่งแวดล้อมในฐานะแหล่งสะสมและแพร่กระจายยีนดื้อยาภายใต้แนวคิด One Health

แม้ว่าความชุกของ *tet(X4)* ในภาคปศุสัตว์จะยังอยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับเชื้อก่อโรคในมนุษย์ แต่การตรวจพบยีนดังกล่าวในแบคทีเรียจากสัตว์และสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญ เนื่องจาก *tet(X4)* เป็นยีนที่สามารถแพร่กระจายผ่านพลาสมิดและ mobile genetic elements ได้ (Xiao et al., 2022) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการพบกลไกดื้อยาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการลดความไวต่อ ไทกิโซคลิน เช่น *tet(A) variant* ซึ่งสะท้อนศักยภาพของการเกิด ไทกิโซคลิน resistance ในระบบการผลิตสัตว์ (J. Wang et al., 2021) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลทางคลินิก พบว่าระดับการดื้อยา ไทกิโซคลิน ในเชื้อก่อโรคจากโรงพยาบาลสูงกว่าอย่างชัดเจน โดยรายงานจากประเทศไทยในปี 2024 ระบุว่า *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อทั้ง carbapenem และ colistin มีอัตราการดื้อ ไทกิโซคลิน สูงถึงร้อยละ 91.7 (Chirabhundhu et al., 2024) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการดื้อยา ไทกิโซคลิน มีความสัมพันธ์กับการเกิด extensively drug-resistant และ carbapenem-resistant strains (XDR/CR) อย่างไรก็ตาม ควรแยกการตีความระหว่าง “การพบยีนดื้อยา” และ “การดื้อยาเชิงคลินิก” ออกจากกันอย่างชัดเจน เนื่องจากการตรวจพบยีนสะท้อนถึงศักยภาพของการดื้อยาและการแพร่กระจายในอนาคตมากกว่าการแสดงการดื้อยาในปัจจุบัน ดังนั้น การเฝ้าระวังยีน *tet(X4)* ในสัตว์ สิ่งแวดล้อม และห่วงโซ่อาหาร จึงมีความสำคัญต่อการควบคุมการแพร่กระจายของการดื้อยา ไทกิโซคลิน ภายใต้แนวคิด One Health

2.6 การถ่ายทอดยีน

ยีน *tet(X4)* เป็นยีนดื้อยา ไทเกีโซคลิน ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีการรายงานการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม โดยยีนดังกล่าวสามารถส่งผลให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC) ของ ไทเกีโซคลิน เพิ่มสูงขึ้น และลดประสิทธิภาพของยาที่ใช้เป็นทางเลือกสำคัญในการรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน (Fan et al., 2024) การแพร่กระจายของ *tet(X4)* มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับองค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่ (mobile genetic elements; MGEs) โดยเฉพาะพลาสมิดในกลุ่ม IncX1, IncHI2 และ IncFII ซึ่งเป็นพลาสมิดที่สามารถถ่ายทอดตัวเองได้ (self-transmissible plasmids) และมีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดยีนดื้อยาระหว่างแบคทีเรียผ่านกระบวนการ conjugation (C. Sun et al., 2019) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการตรวจพบ insertion sequences เช่น ISCR2 และ IS26 อยู่บริเวณใกล้เคียงกับยีน *tet(X4)* โดยองค์ประกอบทางพันธุกรรมเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการจับ การเคลื่อนย้าย และการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนดื้อยา ส่งผลให้ *tet(X4)* สามารถแพร่กระจายระหว่างพลาสมิดหรือระหว่างพลาสมิดกับโครโมโซมของแบคทีเรียได้ผ่านกระบวนการ horizontal gene transfer (Li et al., 2020)

เชื้อ Enterobacteriaceae โดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* มีความสามารถในการแพร่กระจายจากสัตว์สู่คน รวมถึงมีหลายกลไกที่ซับซ้อนช่วยให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่มสำคัญ เช่น ไทเกีโซคลิน ซึ่งเป็นประเด็นสำคัญทางสาธารณสุขที่ควรเฝ้าระวังและควบคุมอย่างเข้มงวดเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในชุมชนและในระบบฟาร์มสัตว์อาหาร

จากการทบทวนวรรณกรรมในบทนี้ แสดงให้เห็นว่า *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญทั้งในด้านสาธารณสุขและระบบปศุสัตว์ โดยเฉพาะในฐานะแหล่งสะสมและแพร่กระจายของยีนดื้อยาปฏิชีวนะ ขณะที่ไทเกีโซคลิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มไกลซิลโซคลิน ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหการดื้อยาในกลุ่มเตตราไซคลินและยังคงเป็นหนึ่งในยาทางเลือกสำคัญสำหรับการรักษาการติดเชื้อจากเชื้อดื้อยาหลายขนาน อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันพบรายงานการเกิดการดื้อยา ไทเกีโซคลิน เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในแบคทีเรียแกรมลบ

กลไกการดื้อยา ไทเกีโซคลิน มีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ ทั้งการเพิ่มการทำงานของ efflux pumps การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของยา การลดการซึมผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการดัดแปลงหรือทำลายยาโดยเอนไซม์ในกลุ่ม *tet(X)* ซึ่งเป็นกลไกที่ได้รับความสนใจอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา เนื่องจากยีนกลุ่มนี้ โดยเฉพาะ *tet(X4)* มักพบอยู่บน plasmids และ mobile genetic elements ทำให้สามารถถ่ายทอดในแนวนอนและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในแบคทีเรียหลายชนิดในบริบทของแนวคิด One Health

แม้ว่าความชุกของการดื้อยา ไทกิโซคลิน โดยรวมยังอยู่ในระดับไม่สูงเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในเชื้อดื้อยาหลายขนาน โดยเฉพาะในเชื้อที่พบในมนุษย์ ขณะเดียวกันมีรายงานการตรวจพบยีนดื้อยาที่เกี่ยวข้อง เช่น *tet(X4)* และ *tet(A)* variant ในตัวอย่างจากสัตว์และสิ่งแวดล้อม ซึ่งสะท้อนถึงศักยภาพของการเกิดและการแพร่กระจายของการดื้อยาในระบบปศุสัตว์

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเกี่ยวกับความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่มีความไวลดลงหรือดื้อต่อ ไทกิโซคลิน รวมถึงการกระจายของยีน *tet(X4)* ในลูกสุกรหย่านมในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีความสำคัญในการประเมินความชุกของเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา ไทกิโซคลิน การตรวจหายีนดื้อยาที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบบ hybrid assembly โดยใช้ระหว่าง Illumina short-read sequencing และ Nanopore long-read sequencing เพื่อให้ได้ข้อมูลจีโนมที่มีทั้งความต่อเนื่องและความแม่นยำสูง ซึ่งจะช่วยสนับสนุนการวิเคราะห์ยีนดื้อยา โครงสร้างพลาสมิด และลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของการดื้อยาไทกิโซคลิน ในบริบทของภาคปศุสัตว์และแนวคิด One Health ได้อย่างครอบคลุม



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (Sample collection)

ในการศึกษานี้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากลูกสุกรหย่านมในฟาร์มสุกรที่ตั้งอยู่ในจังหวัดสระบุรี นครราชสีมา และเพชรบูรณ์ โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมูลด้วยวิธี fecal swab จำนวนทั้งสิ้น 305 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เก็บได้ถูกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) และบ่มเชื้อในเครื่องเขย่า (shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18–20 ชั่วโมง

3.2 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (Isolation of *E. coli*)

ตัวอย่างที่ผ่านการเพาะเลี้ยงจากขั้นตอนที่ 3.1 ถูกนำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue agar (EMB agar) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบบคัดเลือกและจำแนกสำหรับแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะกลุ่ม coliform โคโลนีของเชื้อ *E. coli* จะมีลักษณะจำเพาะคือสีเขียวเมทัลลิก (metallic green sheen) เกิดจากการหมักแลคโตสและการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวจำนวน 3–5 โคโลนี ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18–20 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บเฉพาะส่วนตะกอนเซลล์ เพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี boiling method และการสกัดด้วยชุดสกัดบริสุทธิ์ต่อไป เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนถัดไป

3.3 การสกัด DNA โดยวิธีการ boiling method (DNA extraction)

ใส่น้ำกลั่นบริสุทธิ์ลงในตะกอนเซลล์ (จากขั้นตอนที่ 3.2) 200 μ l ทำการผสมให้เข้าตมที่น้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 13000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บเฉพาะส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของ DNA เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

3.4 ตรวจสอบความจำเพาะเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี PCR

ในการยืนยันความจำเพาะของเชื้อ *E. coli* ทำการตรวจสอบโดยใช้ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเลือกใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *uidA* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้สำหรับการยืนยันชนิดของเชื้อ *E. coli* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ไพรเมอร์ Forward primer : 5'-CTGGTATCAGCGCGAAGTCT-3' และ Reward primer : 5'- AGCGGGTAG ATATCACACTC - 3' (Makhado et al., 2022) จะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ขนาด 556 คู่เบส (bp) โดยกำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเริ่มต้น (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบ ซึ่งประกอบด้วย การแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส การจับของไพรเมอร์ (annealing) ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 55 วินาที และการยืดสายดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดำเนินการยืดสายดีเอ็นเอขั้นสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จะถูกนำมาตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อยืนยันการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงตามที่คาดหวัง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะถูกนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์และยืนยันการมีอยู่ของยีนก่อโรครุนแรง (virulence genes) และยีนดื้อยาต้านจุลชีพ (antimicrobial resistance genes) ของเชื้อ *E. coli* ต่อไป

3.5 การตรวจหายีนก่อโรครุนแรง (Virulence Gene Detection) และการระบุ Virotype ของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี PCR

เชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการยืนยันชนิดด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *uidA* จะถูกนำมาตรวจหายีนก่อโรครุนแรง (virulence genes) และจำแนกกลุ่ม virotype ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ทั้งวิธี multiplex PCR และ singleplex PCR ตามความเหมาะสมของชุดไพรเมอร์ ทั้งนี้ การจัดกลุ่มไพรเมอร์พิจารณาจากขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target amplicon size) และอุณหภูมิการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) ของแต่ละยีน (ดังแสดงในตารางที่ 5)

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จะถูกนำมาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ DNA molecular weight marker เพื่อยืนยันผลการตรวจหายีนความรุนแรง และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการจำแนก virotype ของเชื้อ *E. coli* ที่ศึกษา

3.6 การตรวจสอบยีนดื้อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic resistance genes detection) ด้วยวิธี PCR

การตรวจหายีนดื้อยาปฏิชีวนะดำเนินการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ไทเกทโซคลิน ได้แก่ *tet(X1)*, *tet(X2)*, *tet(X3)*, *tet(X4)*, *tet(X5)* และ *tet(X)Uni* ไพรเมอร์แต่ละชุดได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายเพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองและยืนยันการมีอยู่ของยีนดื้อยาในเชื้อ *E. coli*

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จะถูกนำมาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target amplicon size) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเปรียบเทียบกับ DNA molecular weight marker เพื่อยืนยันผลการตรวจหายีนดื้อยา โดยขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายและอุณหภูมิการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) ของแต่ละยีนแสดงไว้ในตารางที่ 5

3.7 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Minimum Inhibitory Concentration)

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *E. coli* ดำเนินการโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC) ด้วยระบบอัตโนมัติ VITEK® 2 XL (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) โดยใช้การทดสอบชนิด AST-N288 สารต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย amikacin (AMK), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), cefoperazone/sulbactam (SCF), ceftazidime (CAZ), cefuroxime (CXM), ciprofloxacin (CIP), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), levofloxacin (LEV), meropenem (MEM), piperacillin/tazobactam (TZP) และ tigecycline (TGC)

ผลการทดสอบค่า MIC ถูกนำมาตีความตามเกณฑ์มาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline M100-S29 เพื่อจำแนกเชื้อเป็นกลุ่มไวต่อยา (susceptible) กลุ่มกึ่งไวต่อยา (intermediate) และกลุ่มดื้อยา (resistant) ทั้งนี้ ใช้เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นสายพันธุ์ควบคุมคุณภาพ (quality control strain) เพื่อควบคุมความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบ

3.8 การทดสอบการถ่ายทอดยีนดื้อยา *tet(X4)*

การศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยา ไทเกทโซคลิน ดำเนินการด้วยวิธี conjugation assay โดยใช้เชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบยีน *tet(X4)* และมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อยา ไทเกทโซคลิน มากกว่า 2 mg/L เป็นเชื้อตัวให้ (donor strain) และใช้เชื้อ *E. coli* J53 ที่ดื้อต่อ sodium azide เป็นเชื้อตัวรับ (recipient strain)

เชื้อตัวให้และเชื้อผู้รับถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani broth (LB broth) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) อยู่ในช่วง 0.8–1.0 และมีค่าใกล้เคียงกัน ก่อนนำมาผสมในอัตราส่วนเชื้อผู้ให้ต่อเชื้อผู้รับเท่ากับ 1:2 ส่วนผสมของเชื้อถูกนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 ×g เป็นเวลา 5 นาที และนำตะกอนเซลล์มาละลายในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มแบบไม่เขย่า (static incubation) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการถ่ายทอดยีนผ่านกระบวนการ conjugation

ภายหลังการบ่ม ส่วนผสมของเชื้อถูกนำไปเพาะบนอาหาร MacConkey agar ที่เติม ไทกิลิซีน ความเข้มข้น 2 mg/L และ sodium azide ความเข้มข้น 100 mg/L เพื่อคัดเลือกเชื้อถ่ายทอดยีน (transconjugants) ที่ได้รับยีนดื้อยาจากเชื้อผู้ให้ จากนั้นทำการตรวจยืนยันการถ่ายทอดยีน *tet*(X4) ในเชื้อ transconjugants ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ตามวิธีการที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.6

3.9 การศึกษา Whole-genome sequencing ของเชื้อ *E. coli* โดยเทคนิค Illumina และ Nanopore sequencing

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ *E. coli* ดำเนินการโดยสกัดดีเอ็นเอจีโนม (genomic DNA) ด้วยชุดสกัด NucleoSpin® Microbial DNA Kit (MACHERY-NAGEL, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen, USA) และ NanoDrop spectrophotometer

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ short-read sequencing ได้ดำเนินการ sequencing ด้วยเทคโนโลยี Illumina NovaSeq PE150 platform (Novogene, China) ในรูปแบบ paired-end sequencing การหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ long-read sequencing ได้เตรียม library จากดีเอ็นเอจีโนม (genomic DNA) ความเข้มข้น 400 ng ต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้ชุด Ligation Sequencing gDNA–Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24; Oxford Nanopore Technologies, UK) จากนั้นนำ library ที่ได้ไปหยอดลงบน R10.4.1 flow cells และทำการ sequencing ด้วยเครื่อง MinION Mk1B ภายใต้การตั้งค่ามาตรฐานของผู้ผลิต โดยใช้โปรแกรม MinKNOW สำหรับควบคุมการทำงานของเครื่อง การเก็บข้อมูลแบบ real-time และการทำ basecalling

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดิบ (raw reads) ที่ได้จากเทคโนโลยี Illumina และ Oxford Nanopore ถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพและวิเคราะห์ร่วมกันด้วยวิธี hybrid genome assembly เพื่อสร้างจีโนมสมบูรณ์ของเชื้อ *E. coli* จากนั้นจึงนำจีโนมที่ได้ไปวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านจุลชีพ ยีนก่อความรุนแรง พลาสมิด องค์ประกอบพันธุกรรมเคลื่อนที่ และ

บริบททางพันธุกรรม (genetic context) ของยีน *tet(X4)* รวมถึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อด้วยวิธี phylogenomic analysis

3.10 วิธีการคำนวณความชุกของเชื้อ *E. coli* ยีนดื้อยาและยีนก่อโรค

คำนวณหาค่าความชุกของเชื้อ *E.coli* ความชุกยีนดื้อยากลุ่มและ ไทกิไซคลิน ที่พบโดยใช้สถิติเปอร์เซ็นต์ร้อยละ

$$\text{ความชุกที่พบเชื้อ } E.coli = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่ตรวจพบ}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ความชุกยีนดื้อยาและยีนก่อโรค} = \frac{\text{จำนวนยีนที่ตรวจพบ}}{\text{จำนวนตัวอย่างเชื้อ } E.coli} \times 100$$

3.11 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics)

การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ดำเนินการจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมที่ได้จากเทคโนโลยี Illumina short-read sequencing และ Oxford Nanopore Technologies (ONT) long-read sequencing โดยข้อมูล Illumina short reads ถูกตรวจสอบคุณภาพด้วยโปรแกรม FastQC version 0.11.9 และตัด adapter รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพต่ำด้วยโปรแกรม Trimmomatic version 0.39

สำหรับข้อมูล ONT long reads ได้ทำการตัด adapter โดย Porechop version 0.2.4 และคัดกรองคุณภาพของข้อมูลด้วยโปรแกรม Filtlong version 0.2.1 โดยเลือก reads ที่มีความยาวมากกว่า 1,000 คู่เบส และมีค่า quality score (Q score) มากกว่า 9 จากนั้นประเมินคุณภาพของข้อมูลด้วยโปรแกรม NanoPlot version 1.38.0

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการคัดกรองคุณภาพแล้วถูกนำมาประกอบจีโนมแบบ hybrid genome assembly โดย Unicycler version 0.4.8 ซึ่งใช้ข้อมูลจากทั้ง Illumina short reads และ ONT long reads ร่วมกัน เพื่อสร้างจีโนมที่มีความสมบูรณ์และความถูกต้องสูง จากนั้นประเมินคุณภาพของจีโนมที่ประกอบได้ด้วยโปรแกรม QUAST version 5.0.2

การกำหนดตำแหน่งและหน้าที่ของยีน (genome annotation) ดำเนินการด้วย NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) และทำการจำแนกชนิดสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี ribosomal multilocus sequence typing (rMLST) ร่วมกับฐานข้อมูล PubMLST Species ID การวิเคราะห์ยีนดื้อยาต้านจุลชีพ พลาสมิด และยีนก่อความรุนแรง ดำเนินการโดยใช้เครื่องมือจาก Center for Genomic Epidemiology (CGE) โดยตรวจหายีนดื้อยาด้วยโปรแกรม ResFinder version 4.6.0 ตรวจหาพลาสมิดด้วยโปรแกรม PlasmidFinder version 2.1 และตรวจหายีนก่อโรครุนแรงด้วยโปรแกรม VirulenceFinder version 2.0

การเปรียบเทียบจีโนมและพลาสมิดดำเนินการด้วยโปรแกรม BLAST Ring Image Generator (BRIG) เพื่อสร้างแผนที่จีโนมแบบวงกลม (comparative circular genome map) และโปรแกรม Easyfig สำหรับเปรียบเทียบโครงสร้างเชิงเส้นของจีโนมและพลาสมิด รวมถึงการวิเคราะห์บริบททางพันธุกรรม (genetic context) ของยีน *tet(X4)* การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการระดับจีโนม (phylogenomic analysis) ดำเนินการโดยรวบรวมข้อมูลจีโนมของเชื้อ *tet(X4)*-positive *Escherichia coli* จำนวน 103 จีโนม จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) Pathogen Detection database ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2568 โดยใช้เงื่อนไขการค้นหา ได้แก่ “AMR_genotypes: tet(X4)”, “Organism group: *E. coli* and *Shigella*” และ “Location: Thailand”

จากนั้นทำการวิเคราะห์ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ด้วยโปรแกรม Snippy เพื่อสร้าง core genome alignment และกำจัดบริเวณที่เกิด recombination ด้วยโปรแกรม Gubbins ก่อนนำข้อมูล recombination-free core SNP alignment ไปสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum-likelihood โดยใช้โปรแกรม RAxML version 8.2.12 ภายใต้ General Time Reversible (GTR) nucleotide substitution model และแสดงผลด้วยโปรแกรม Interactive Tree Of Life (iTOL)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ถูกนำไปในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ BioProject accession number PRJNA1276700

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทป์ (primer) ที่ใช้ในการระบุลักษณะทาง virotype ของเชื้อ *E.coli*

Primer name	Sequence (5' -3')	Target gene	Size (bp)	Reference
<i>LT-I</i> F	TAGAGACCGGTATTACAGAAATCTTGA	<i>LT-I</i>	282	(Rebelo et al., 2018)
<i>LT-I</i> R	TCATCCCAGAAATCTGTATATATGTC			
<i>LT-II</i> F	AGATATAATGATGATATGTATC	<i>LT-II</i>	300	(Rebelo et al., 2018)
<i>LT-II</i> R	TAACCCCTCGAAATAAATCTC			
<i>STa</i> F	GGGTTGGCAATTTTATTTCTGTA	<i>STa</i>	183	(Rebelo et al., 2018)
<i>STa</i> R	ATTACAAAGTTCAGCAGTA			
<i>STb</i> F	ATGTAATACTACCAACGGGTGAT	<i>STb</i>	360	(Rebelo et al., 2018)
<i>STb</i> R	TATTTGGCGAAAGCATGCTCC			
<i>EAST1</i> F	ATGCCATCAACACAGTATATC	<i>EAST1</i>	117	(Rebelo et al., 2018)
<i>EAST1</i> R	TCAGGTCGCGAACGG			
<i>K88</i> F	GATGAAAAAGACTCTGATTGCA	<i>K88</i>	841	(Rebelo et al., 2018)
<i>K88</i> R	GATTGGTTCAGGGAGCGCTACG			
<i>K99</i> F	CTAGAAAAAAACACTGCTAGCTATT	<i>K99</i>	543	(Rebelo et al., 2018)
<i>K99</i> R	CATATAAGTGACTAAGAAAGGATGC			
<i>987P</i> F	GTTACTGCCAGTCTATGCCAAGTG	<i>987P</i>	463	(Rebelo et al., 2018)
<i>987P</i> R	TCGGTGTAACCTGCTGAACGAATAG			

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทป์ (primer) ที่ใช้ในการระบุลักษณะทาง virotype ของเชื้อ *E.coli* (ต่อ)

Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Size (bp)	Reference
<i>F41</i> F	GATGAAAAAGACTCTGATTGCA	<i>F41</i>	682	(Rebelo et al., 2018)
<i>F41</i> R	TCTGAGGTCATCCCAATTGTGG			
<i>F18</i> F	ATGAAAAGACTAGTGTTTATTTCTT	<i>F18</i>	520	(Rebelo et al., 2018)
<i>F18</i> R	TTACTTGTAAGTAACCGCGTAAGCC			
<i>Stx1</i> F	ATTCGCTGAATGTCATTCGCT	<i>Stx1</i>	664	(Rebelo et al., 2018)
<i>Stx1</i> R	ACGCTTCCCAGAAATTGCATTA			
<i>Stx2</i> F	GAATGAAGAAGATGTTTATAGCGG	<i>Stx2</i>	281	(Rebelo et al., 2018)
<i>Stx2</i> R	GGTTATGCCTCATTATTAA			
<i>Stx2e</i> F	GAATGAAGAAGATGTTTATAGC	<i>Stx2e</i>	454	(Rebelo et al., 2018)
<i>Stx2e</i> R	TTTTATGGAACGTAGGTATTACC			

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทป์ (primer) ที่ใช้ในการตรวจหาชนิดของยาในกลุ่ม ไทกิลิไซด์

Primers	Primer sequences	Target gene	Size (bp)	Reference
<i>tet</i> (X1)-F	5'-CGAAAAATGTTGCTTGGCAGCTT-3'	<i>tet</i> (X1)	486	(Ji et al., 2020)
<i>tet</i> (X1)-R	5'-AGTTGTTGAACGAATTAACTCC-3'			
<i>tet</i> (X2)-F	5'-CGGGATGTCCAAGGTAAGAAAA-3'	<i>tet</i> (X2)	343	(Ji et al., 2020)
<i>tet</i> (X2)-R	5'-TGACAAACGTCGTATGAATCAA-3'			
<i>tet</i> (X3)-F	5'-GACACTTGATCTGCACAGGGATT-3'	<i>tet</i> (X3)	685	(Ji et al., 2020)
<i>tet</i> (X3)-R	5'-CCCTACAAAAAGATGATGTCAAAC-3'			
<i>tet</i> (X4)-F	5'-CTGATTTCGTGTGACATCATCTTTTG-3'	<i>tet</i> (X4)	204	(Ji et al., 2020)
<i>tet</i> (X4)-R	5'-GTTAAATTTCCCATTTGGTCAGATT-3'			
<i>tet</i> (X5)-F	5'-GGTATCAACATTTCAATGCTTG-3'	<i>tet</i> (X5)	265	(Ji et al., 2020)
<i>tet</i> (X5)-R	5'-CGATTTCGTCCTGCGTATCTTTTG-3'			
<i>tet</i> (X)Uni-F	5'- TTCAGGGTCAGGAAGCAATGAAAA-3'	<i>tet</i> (X)Uni	780	(Makhado et al., 2022)
<i>tet</i> (X)Uni-R	5'- TTTACGCCTTGTCTCTGCAAAAGG-3'			

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ความชุกและการยืนยันเชื้อ *E.coli*

จากตัวอย่างมูลลูกสุกรทั้งหมด 305 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อ *E. coli* ได้จำนวน 260 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 85.2 (ดังตารางแสดงผลที่ 7) โดยผลการยืนยันความจำเพาะด้วยวิธี PCR แสดงให้เห็นว่าไอโซเลตทั้งหมดเป็นเชื้อ *E.coli* อย่างแท้จริง ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงการกระจายของเชื้อในลูกสุกรหย่านมในระดับสูง

ตารางที่ 7 ความชุก และยีนก่อโรครุนแรงของเชื้อ *E.coli*

จำนวนตัวอย่าง	305 ตัวอย่าง	ร้อยละ
<i>Escherichia coli</i>	260 ตัวอย่าง	85.2
Fimbriae	K88	40
	K99	1
	987P	0
	F41	2
	F18	0
	LT-I	0
	LT-II	0
Enterotoxins	STa	2
	STb	6
	EAST1	81
Shiga toxins	Stx1	3
	Stx2	1
	Stx2e	1

4.2 ยีนความรุนแรง (Virulence Gene) ของเชื้อ *E.coli*

จากตัวอย่างทั้งหมด 305 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อ *E.coli* ได้จำนวน 260 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 85.2 จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้ไปตรวจหายีนความรุนแรง (virulence genes) ของเชื้อ *E.*

coli โดยพบยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยก่อโรคหลายกลุ่ม ได้แก่ fimbriae, shiga toxins และ enterotoxins ดังแสดงในตารางที่ 7 ในกลุ่ม fimbriae พบว่ายีน K88 เป็นยีนที่ตรวจพบมากที่สุด จำนวน 40 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 15.4 รองลงมาคือยีน F41 จำนวน 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 0.8 และยีน K99 จำนวน 1 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 0.4 ขณะที่ไม่พบยีน 987P และ F18 กลุ่ม enterotoxins พบว่ายีน EAST1 มีความชุกสูงที่สุด จำนวน 81 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 31.1 รองลงมาคือยีน STb จำนวน 6 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 2.4 และยีน STa จำนวน 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 0.8 โดยไม่พบยีน LT-I และ LT-II ในการศึกษาครั้งนี้ ในกลุ่ม shiga toxins พบยีน Stx1 จำนวน 3 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 1.2 ขณะที่ยีน Stx2 และ Stx2e ตรวจพบอย่างละ 1 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 0.4 นอกจากนี้ยังพบการตรวจพบยีนความรุนแรงมากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกันในบางไอโซเลท ได้แก่ การพบยีน STa ร่วมกับ EAST1 และยีน STb ร่วมกับ EAST1 ซึ่งอาจสะท้อนถึงศักยภาพของเชื้อบางสายพันธุ์ในการก่อโรคที่มีความซับซ้อนมากขึ้น

ตารางที่ 8 ความชุกยีนดื้อปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli*

<i>Escherichia coli</i>	260 ตัวอย่าง	ร้อยละ
	<i>tet(X)Uni</i>	4 ตัวอย่าง 1.5
	<i>tet(X1)</i>	0 ตัวอย่าง 0
Tigecycline	<i>tet(X2)</i>	0 ตัวอย่าง 0
	<i>tet(X3)</i>	0 ตัวอย่าง 0
	<i>tet(X4)</i>	4 ตัวอย่าง 1.5
	<i>tet(X5)</i>	0 ตัวอย่าง 0

4.3 ความชุกการพบยีนดื้อยาในกลุ่ม และ ไทกิไซคลิน ของเชื้อ *E. coli*

จากการตรวจคัดกรองยีนในกลุ่ม *tet(X)* ด้วยไพรเมอร์ *tet(X)Uni* ในเชื้อ *E. coli* จำนวน 260 ไอโซเลท พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 4 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 1.5 ของเชื้อทั้งหมดที่ศึกษา (ตารางที่ 8) เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยไพรเมอร์ *tet(X)Uni* มาตรวจยืนยันด้วยไพรเมอร์จำเพาะสำหรับยีน *tet(X1)*, *tet(X2)*, *tet(X3)*, *tet(X4)* และ *tet(X5)* พบว่าตัวอย่างทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ C2, No.25, OS57 และ T8 ให้ผลบวกต่อยีน *tet(X4)* ขณะที่ไม่พบยีน *tet(X1)*, *tet(X2)*, *tet(X3)* และ *tet(X5)* ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบยีนในกลุ่ม *tet(X)* ทั้งหมดเป็นยีน *tet(X4)* โดยมีความชุกเท่ากับร้อยละ 1.5 ของเชื้อที่ทำการศึกษา จากนั้นเชื้อที่ตรวจพบยีน

tet(X4) ทั้ง 4 ไอโซเลท ถูกนำไปทดสอบความไวต่อยา ไทเกี๊ยคลีน โดยการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ในขั้นตอนต่อไป

เชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบยีน *tet(X4)* ทั้ง 4 ไอโซเลท ถูกนำไปทดสอบความไวต่อยา ไทเกี๊ยคลีน โดยการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เพื่อประเมินลักษณะการดื้อยาในระดับฟีโนไทป์ต่อไป



ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบค่า MIC เชื้อ *E. coli*

Sample ID	MICs of antimicrobials (mg/L)											
	AMK	CAZ	CIP	IPM	SCF	TZP	ETP	MEM	TGC	LEV	AMC	CXM
C2	≤2/S	≤1/S	>4/R	≤0.25/S	≤8/4/S	≤4/4/S	≤0.5/S	≤0.25/S	≤0.5/S	>8/R	8/4/S	≤1/S
No.25	≤2/S	≤1/S	≤0.25/S	≤0.25/S	≤8/4/S	≤4/4/S	≤0.5/S	≤0.25/S	1/S	1/I	4/2/S	≤1/S
O557	≤2/S	≤1/S	≤0.25/S	≤0.25/S	≤8/4/S	≤4/4/S	≤0.5/S	≤0.25/S	≤0.5/S	1/I	4/2/S	≤1/S
T8	≤2/S	≤1/S	1/R	≤0.25/S	16/8/S	≤4/4/S	≤0.5/S	≤0.25/S	4/I	1/I	16/8/I	>64/R

Amikacin (AMK), Ceftazidime (CAZ), Ciprofloxacin (CIP), Imipenem (IPM), Ceftazone/sulbactam (SCF), Piperacillin/tazobactam (TZP), Ertapenem

(ETP), Meropenem (MEM), Tigecycline (TGC), Levofloxacin (LEV), Amoxicillin/clavulanic acid (AMC), Cefuroxime (CXM)

S : Susceptible, I : Intermediate, R : Resistant

4.4 ผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดต่อยา ไทกิไซคลิน

ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา ไทกิไซคลิน (MIC) ในเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบยีน *tet(X4)* จำนวน 4 ไอโซเลท โดยใช้ระบบอัตโนมัติ VITEK® 2 XL (bioMérieux, France) แสดงดังตารางที่ 9 ผลการศึกษาพบว่าไอโซเลท T8 มีค่า MIC ของ ไทกิไซคลิน เท่ากับ 4 mg/L และถูกจัดอยู่ในกลุ่ม intermediate ตามเกณฑ์ที่ใช้ในการแปลผล ขณะที่ไอโซเลท C2, No.25 และ OS57 มีค่า MIC เท่ากับ ≤ 0.5 , 1 และ ≤ 0.5 mg/L ตามลำดับ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไวต่อยา (susceptible)

เนื่องจากไอโซเลท T8 แสดงค่าความไวต่อยา ไทกิไซคลิน ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่น จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยวิธี conjugation assay ต่อไป



ภาพที่ 5 การยืนยันผลการถ่ายทอดยีนดื้อยาด้วยเทคนิค PCR จากการทดสอบคอนจูเกชัน (Conjugation assay) ระหว่างเชื้อ *E. coli* ไอโซเลทที่ดื้อยา (Donor) และ *E. coli* J53 (Recipient)

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดลองการถ่ายทอดยีน *tet(X4)* ไปยัง *E.coli* J53 โดยวิธีการ conjugation

รหัสตัวอย่าง	ผลการทำ PCR detection	ผลการทำ PCR detection
	Primer; <i>tet(X4)</i>	Primer; <i>tet(X)Uni</i>
T8+J53	Positive	Positive

4.5 ผลการทดสอบการถ่ายยีนดื้อยาปฏิชีวนะ ไทกิไซคลิน โดยวิธีการ conjugation assay

ผลการศึกษาการถ่ายยีนดื้อยา ไทกิไซคลิน ด้วยวิธี conjugation assay โดยใช้เชื้อ *Escherichia coli* ไอโซเลต T8 เป็น donor strain และ *E. coli* J53 เป็น recipient strain แสดงดังตารางที่ 10 ผลการตรวจยืนยันด้วยเทคนิค PCR พบว่าเชื้อ transconjugant (T8+J53) ให้ผลบวกต่อยีน *tet(X4)* และ *tet(X)Uni* (ตารางที่ 10 และภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่ายีน *tet(X4)* สามารถถ่ายทอดจากเชื้อผู้ให้ (donor) ไปยังเชื้อผู้รับ (recipient) ได้ภายใต้สภาวะการทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

4.6 การศึกษา Whole-genome sequencing ของเชื้อ *E. coli* โดยเทคนิค Illumina และ Nanopore sequencing

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบยีน *tet(X4)* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ C2, NO25, OS57 และ T8 (ดังแสดงในตารางที่ 11) พบว่าเชื้อทั้งหมดจัดอยู่ใน sequence type (ST) ที่แตกต่างกัน ได้แก่ rST-153719, rST-59143, rST-45855 และ rST-86073 ตามลำดับ ซึ่งสะท้อนถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่ศึกษา (ดังตารางแสดงผลที่ 11)

ผลการวิเคราะห์ยีนดื้อยาพบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตมียีนดื้อยาหลายกลุ่มร่วมกัน ครอบคลุมหลาย antimicrobial classes ได้แก่ aminoglycoside, beta-lactam, sulfonamide, phenicol, macrolide, Tetracycline และ quinolone ซึ่งบ่งชี้ลักษณะการดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance; MDR) ไอโซเลต C2 และ NO25 มีรูปแบบการดื้อยาที่ค่อนข้างจำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น อย่างไรก็ตามยังตรวจพบยีนดื้อยาที่สำคัญ ได้แก่ *blaTEM-1B*, *tet(X4)*, *floR* และ *qnrS1* ในไอโซเลต C2 ขณะที่ไอโซเลต NO25 ตรวจพบ *blaTEM-1B*, *tet(A)*, *tet(X4)* และ *qnrS1* รวมถึงยีนดื้อยาในกลุ่ม aminoglycoside-modifying enzymes ได้แก่ *aph(6)-Id* และ *aph(3'')-Ib* ไอโซเลต T8 ตรวจพบ extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes ได้แก่ *blaCTX-M-14* และ *blaTEM-215* ร่วมกับ *tet(X4)* และ *qnrS1* ซึ่งแสดงถึงการดื้อยาต่อสารต้านจุลชีพหลายกลุ่มที่มีความสำคัญทางคลินิก ส่วนไอโซเลต OS57 ตรวจพบยีนดื้อยา Tetracycline หลายชนิด ได้แก่ *tet(A)*, *tet(M)* และ *tet(X4)* ร่วมกับยีนดื้อยา macrolide คือ *mph(A)* ซึ่งสะท้อนถึงลักษณะการดื้อยาหลายขนานอย่างเด่นชัด

การวิเคราะห์ปัจจัยก่อความรุนแรง (virulence factors) พบว่าไอโซเลต C2 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ (adhesion) หลายชนิด ได้แก่ *csgA*, *fdeC*, *lpfA*, *traJ* และ *traT* รวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการจับธาตุเหล็ก (iron acquisition) ได้แก่ *fyuA*, *irp2* และ *sitA* ตลอดจนยีนที่เกี่ยวข้องกับการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน (*iss*) และการสร้างแคปซูล (*kpsE* และ *kpsMIII_K5*) ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงศักยภาพในการก่อโรคแบบ extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC)

ไอโซเลต OS57 ตรวจพบ adhesins หลายชนิด ได้แก่ *csgA*, *fdeC*, *fimH*, *traT* และ *usp* ร่วมกับ effector genes ได้แก่ *hlyE* และ *espY2* รวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการจับธาตุเหล็ก ได้แก่ *chuA* และ *eilA* ตลอดจนยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านการถูกทำลายโดย phagocytosis ได้แก่ *ompT* และ *traT* ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับศักยภาพในการรุกรานและก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหาร

ไอโซเลต NO25 และ T8 แม้ตรวจพบยีนก่อโรคในจำนวนที่น้อยกว่า และไม่พบ capsule-associated genes หรือระบบจับธาตุเหล็กหลัก แต่ยังตรวจพบ adhesins ได้แก่ *fimH*, *csgA* และ *fdeC* รวมถึง toxin genes เช่น *hlyE* และ *hha* ใน NO25 ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์

นอกจากนี้ เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตยังตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้าง lipopolysaccharide (LPS) และ outer membrane ได้แก่ *gad* และ *yehA-D* รวมถึงยีน *aslA* และ *terC* ซึ่งอาจมีบทบาทในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อม ความสามารถในการอยู่รอด และกลไกการดื้อยา (ดังแสดงในภาพที่ 6 และ 7)

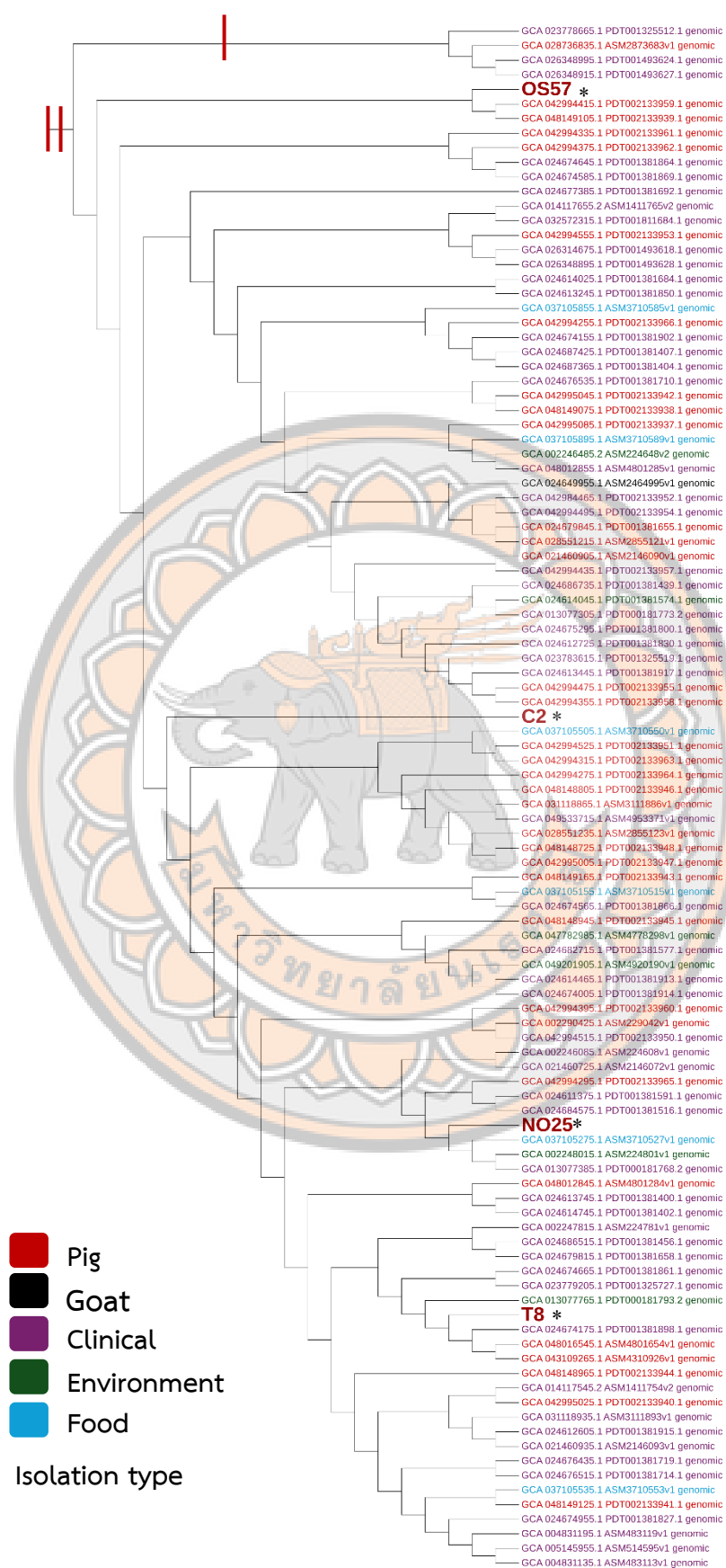
ผลการวิเคราะห์ phylogenomic analysis ของจีโนม *tet(X4)*-positive *E. coli* จำนวน 103 จีโนมจากประเทศไทย พบว่าเชื้อสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 lineages ได้แก่ lineage I และ lineage II โดยแต่ละ lineage ประกอบด้วยเชื้อที่มาจากหลายแหล่งตัวอย่าง ทั้งสุกร แพะ ตัวอย่างทางคลินิก สิ่งแวดล้อม และอาหาร สะท้อนถึงการแพร่กระจายของเชื้อและยีนดื้อยาในลักษณะ One Health โดยไอโซเลตจากสุกรสุกรหย่านมทั้ง 4 ไอโซเลตในงานวิจัยนี้จัดอยู่ใน lineage II (ดังแสดงในภาพที่ 6)

การวิเคราะห์พลาสมิดที่มียีน *tet(X4)* พบว่า NO25 และ T8 เป็นพลาสมิดชนิด IncN ขณะที่ OS57 และ C2 เป็นพลาสมิดชนิด IncR โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ reference plasmid PV068678.1 พบว่าพลาสมิดทั้ง 4 ไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกันสูง และมียีนดื้อยารวมถึง mobile genetic elements ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงแหล่งกำเนิดทางวิวัฒนาการร่วมกันและศักยภาพในการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในประเทศไทย

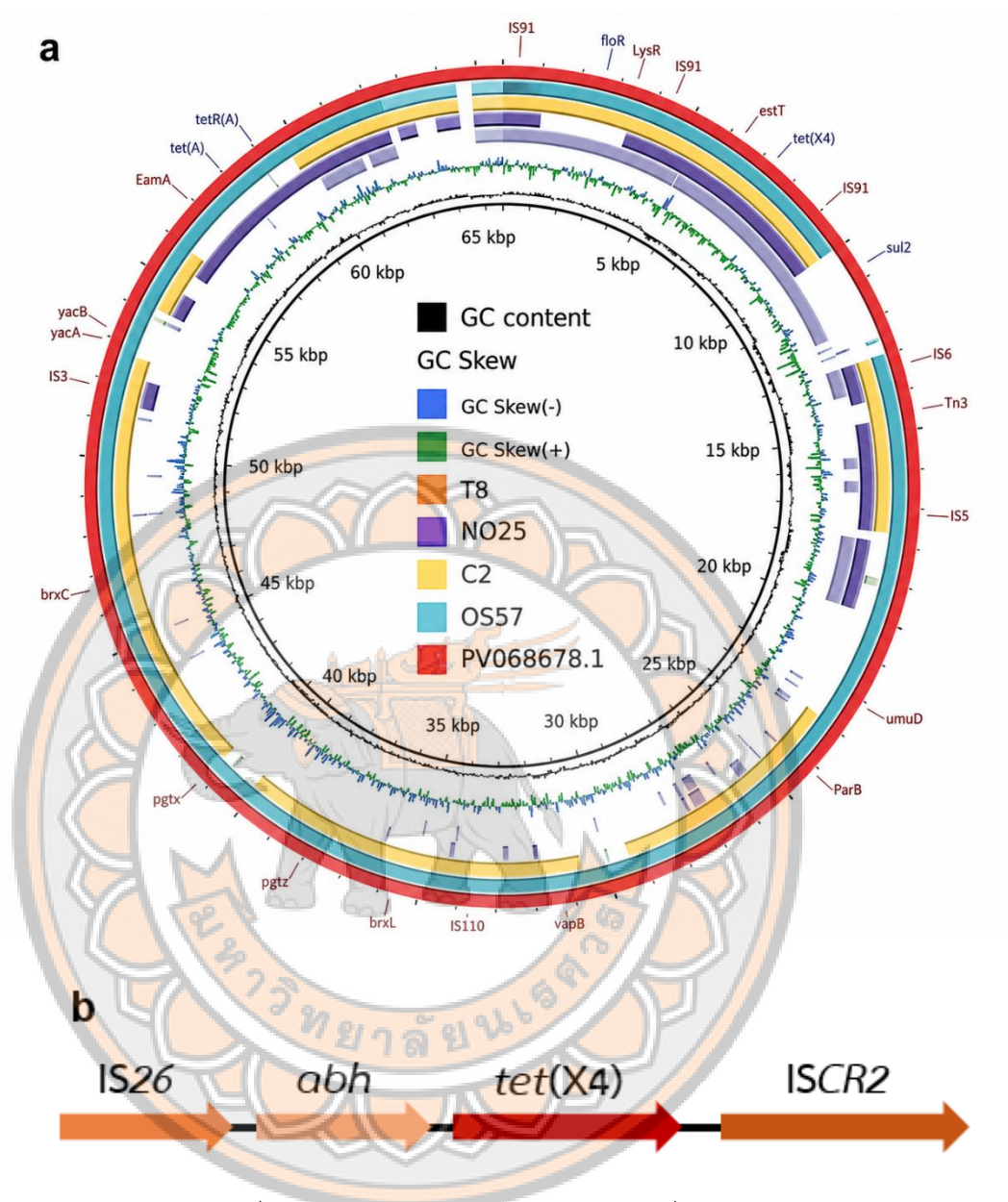
นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตมี genetic context ของยีน *tet(X4)* ในรูปแบบเดียวกัน คือ IS26-*tet(X4)*-ISCR2 ซึ่งเป็น mobile genetic element ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนย้ายและการแพร่กระจายของยีนดื้อยา (ดังแสดงในภาพที่ 7)

ตารางที่ 11 แสดงผลการศึกษาลักษณะทางจีโนมของเชื้อ *E.coli* ที่มียีน *tet(X4)*

Strain	Genome(bp)	MLST	Plasmid	Antimicrobial resistance genes							
				Aminoglycoside	b-lactam	Sulfonamide	Phenicol	Macrolide	Tetracycline	Quinolone	Virulence genes
C2	5012876	rST-153719	IncR	-	<i>bla_{TEM-1B}</i>	-	<i>floR</i>	-	<i>tet(X4)</i>	<i>qnrS1</i>	<i>AslA</i> , <i>anr</i> , <i>csgA</i> , <i>fdeC</i> , <i>fyuA</i> , <i>gad</i> , <i>irp2</i> , <i>iss</i> , <i>kpsE</i> , <i>kpsMII_K5</i> , <i>lpfA</i> , <i>nlpl</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traJ</i> , <i>traT</i>
NO25	4568052	rST-59143	IncN	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i>	<i>bla_{TEM-1B}</i>	-	-	-	<i>tet(A)</i> , <i>tet(X4)</i>	<i>qnrS1</i>	<i>AslA</i> , <i>csgA</i> , <i>fimH</i> , <i>gad</i> , <i>hha</i> , <i>hlyE</i> , <i>nlpl</i> , <i>terC</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i>
OS57	4790268	rST-45855	<i>IncR IncY</i>	-	<i>bla_{TEM-1B}</i>	-	<i>floR</i>	-	<i>tet(A)</i> , <i>tet(X4)</i>	<i>qnrS1</i>	<i>AslA</i> , <i>air</i> , <i>chuA</i> , <i>csgA</i> , <i>eilA</i> ,
			<i>IncN</i>	-	<i>bla_{TEM-1B}</i>	-	-	<i>mph(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>qnrS1</i>	<i>espY2:000868321</i> , <i>fdeC</i> , <i>fimH</i> , <i>gad</i> ,
				<i>aadA22</i>	<i>bla_{TEM-1B}</i>	-	-	-	<i>tet(M)</i>		<i>hlyE</i> , <i>nlpl</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i> , <i>usp</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i>
T8	4471630	rST-86073	<i>IncN</i>	-	<i>bla_{TEM-215}</i>	<i>sul2</i>	<i>floR</i>	-	<i>tet(X4)</i>		<i>AslA</i> , <i>csgA</i> , <i>fdeC</i> , <i>fimH</i> , <i>gad</i> , <i>hlyE</i> ,
			<i>IncR</i>	-	<i>bla_{CTX-M14}</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i>	-	-	-	<i>tet(M)</i> , <i>tet(A)</i>	<i>qnrS1</i>	<i>nlpl</i> , <i>terC</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i>



ภาพที่ 6 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการระดับจีโนม (phylogenomic analysis)



ภาพที่ 7 การวิเคราะห์เปรียบเทียบพลาสมิดที่มียีน *tet(X4)*

บทที่ 5

บทสรุป

การศึกษาค้นคว้าพบความชุกของเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างมูลสุกรหย่านมสูงถึงร้อยละ 85.2 ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าลูกสุกรหย่านมอาจเป็นแหล่งกักเก็บสำคัญของเชื้อในระบบการเลี้ยงสุกร โดยเฉพาะในช่วงที่สัตว์เผชิญกับความเครียดจากการหย่านมและการเปลี่ยนแปลงของระบบทางเดินอาหาร ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า *E. coli* สามารถพบได้ในความชุกสูงในฟาร์มสุกร และอาจมีบทบาททั้งในด้านการก่อโรคและการแพร่กระจายเชื้อสู่สิ่งแวดล้อม (He et al., 2020) สำหรับยีนความรุนแรง (virulence gene) พบว่ายีน EAST1 มีความชุกสูงที่สุด รองลงมาคือ K88 และยีนในกลุ่ม enterotoxins อื่น ๆ ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อบางส่วนมีศักยภาพในการก่อโรคท้องเสียในลูกสุกร โดยเฉพาะในช่วงหลังหย่านมที่สัตว์มีความไวต่อการติดเชื้อสูง นอกจากนี้ การพบยีนความรุนแรงหลายชนิดร่วมกันในบางไอโซเลตยังสะท้อนถึงความซับซ้อนของเชื้อในฟาร์ม และอาจเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะ การสร้างสารพิษ และการก่อโรคในโฮสต์ (He et al., 2019) ในด้านยีนดื้อยา ไทกิไซคลิน พบว่า *tet(X4)* เป็นยีนที่ตรวจพบมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน (Wang et al., 2022) ที่พบการแพร่กระจายของยีนดังกล่าวใน *E. coli* จากฟาร์มสุกร ยีน *tet(X4)* มีความสำคัญทางระบาดวิทยา เนื่องจากมักพบอยู่บน plasmids และสามารถถ่ายทอดผ่าน horizontal gene transfer ได้ รวมถึงเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม last-resort antibiotics ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ยังคงมีความไวต่อ ไทกิไซคลิน และมีเพียงบางไอโซเลตที่อยู่ในระดับ intermediate ซึ่งสะท้อนว่าการมียีนดื้อยาในระดับพันธุกรรมอาจยังไม่สัมพันธ์กับการดื้อยาในระดับฟีโนไทป์อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม การตรวจพบการดื้อยาร่วมในกลุ่ม fluoroquinolone และ cephalosporin บ่งชี้ถึงลักษณะ multidrug resistance (MDR) ของเชื้อ ซึ่งอาจสัมพันธ์กับแรงกดดันจากการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มอย่างต่อเนื่อง (C. Sun et al., 2019) การทดลอง conjugation ยืนยันว่าทั้งยีน *tet(X4)* สามารถถ่ายทอดไปยังเชื้อตัวรับได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ระบุว่ายีนดังกล่าวมีศักยภาพในการแพร่กระจายผ่านการถ่ายทอดยีนในแนวนอน ดังนั้น การดื้อยา ไทกิไซคลิน จึงอาจไม่จำกัดอยู่เฉพาะไอโซเลตเดิม แต่สามารถแพร่กระจายไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นในสิ่งแวดล้อมฟาร์มได้ (Wang et al., 2022) การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดพบว่าไอโซเลตที่มียีน *tet(X4)* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและอยู่ใน sequence type ที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการกระจายของยีนดื้อยาไม่ได้จำกัดอยู่ในสายพันธุ์เดียว นอกจากนี้ การพบยีนดื้อยาหลายกลุ่มร่วมกับยีนความรุนแรงยังสะท้อนถึงศักยภาพของเชื้อในการดื้อยา การปรับตัว และการก่อโรคได้พร้อมกัน ซึ่งเพิ่มความสำคัญของการเฝ้าระวังเชิง

จีโนมในระบบปศุสัตว์ (Lugsomya, 2017) ลูกสุกรหย่านมอาจเป็นแหล่งกักเก็บสำคัญของ *E. coli* ที่มี ยีนดื้อยา ไทกิโซคลิน โดยเฉพาะ *tet(X4)* แม้เชื้อส่วนใหญ่ยังไม่แสดงการดื้อยาในระดับฟีนোটีปอย่าง ชัดเจน แต่การมีอยู่ของยีนดื้อยาและความสามารถในการถ่ายทอดยีนดังกล่าวสะท้อนถึงความเสี่ยงใน การแพร่กระจายของการดื้อยาในอนาคต ดังนั้น การเฝ้าระวังและการจัดการการใช้ยาปฏิชีวนะใน ฟาร์มภายใต้แนวคิด One Health จึงมีความสำคัญต่อการลดความเสี่ยงต่อสุขภาพสัตว์ มนุษย์ และ สิ่งแวดล้อม





บรรณานุกรม

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บรรณานุกรม

- Bello, A., & Dingle, T. C. (2018). What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Newsletter*, 40(20), 165-174.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2018.10.001>
- Börjesson, S., Greko, C., Myrenås, M., Landén, A., Nilsson, O., & Pedersen, K. (2020). A link between the newly described colistin resistance gene mcr-9 and clinical Enterobacteriaceae isolates carrying blaSHV-12 from horses in Sweden. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 285-289.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.007>
- Chen, Q., Li, X., Zhou, H., Jiang, Y., Chen, Y., Hua, X., & Yu, Y. (2014). Decreased susceptibility to Tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in trm encoding SAM-dependent methyltransferase. *J Antimicrob Chemother*, 69(1), 72-76. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt319>
- Chirabhundhu, N., Luk-In, S., Phuadraksa, T., Wichit, S., Chatsuwan, T., Wannigama, D. L., & Yainoy, S. (2024). Occurrence and mechanisms of Tigecycline resistance in carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Thailand. *Scientific Reports*, 14(1), 5215. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55705-2>
- Dong, N., Zeng, Y., Wang, Y., Liu, C., Lu, J., Cai, C., Liu, X., Chen, Y., Wu, Y., Fang, Y., Fu, Y., Hu, Y., Zhou, H., Cai, J., Hu, F., Wang, S., Wang, Y., Wu, Y., Chen, G., Shen, Z., Chen, S., & Zhang, R. (2022). Distribution and spread of the mobilised RND efflux pump gene cluster tmexCD-toprJ in clinical Gram-negative bacteria: a molecular epidemiological study. *Lancet Microbe*, 3(11), e846-e856.
[https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(22\)00221-x](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(22)00221-x)
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523-539. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>
- Fairbrother, J., & Nadeau, É. (2019). Colibacillosis. In (pp. 807-834).
<https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch52>

- Fan, X. Y., Jiang, Y., Wu, H., Liu, J., Gu, Q. Y., Wang, Z. Y., Sun, L., Jiao, X., Li, Q., & Wang, J. (2024). Distribution and spread of Tigecycline resistance gene tet(X4) in *Escherichia coli* from different sources. *Front Cell Infect Microbiol*, 14, 1399732. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1399732>
- Gemeda, B. A., Wieland, B., Alemayehu, G., Knight-Jones, T. J. D., Wodajo, H. D., Tefera, M., Kumbe, A., Olani, A., Abera, S., & Amenu, K. (2023). Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolates from Livestock and the Environment in Extensive Smallholder Livestock Production Systems in Ethiopia. *Antibiotics (Basel)*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050941>
- Greer, N. D. (2006). Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylcycline class of antibiotics. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 19(2), 155-161. <https://doi.org/10.1080/08998280.2006.11928154>
- He, T., Wang, R., Liu, D., Walsh, T. R., Zhang, R., Lv, Y., Ke, Y., Ji, Q., Wei, R., Liu, Z., Shen, Y., Wang, G., Sun, L., Lei, L., Lv, Z., Li, Y., Pang, M., Wang, L., Sun, Q., Fu, Y., Song, H., Hao, Y., Shen, Z., Wang, S., Chen, G., Wu, C., Shen, J., & Wang, Y. (2019). Emergence of plasmid-mediated high-level Tigecycline resistance genes in animals and humans. *Nat Microbiol*, 4(9), 1450-1456. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0445-2>
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., & Alvarez, P. (2020a). Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *npj Clean Water*, 3. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0>
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., & Alvarez, P. J. J. (2020b). Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *npj Clean Water*, 3(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0>
- Hirata, T., Saito, A., Nishino, K., Tamura, N., & Yamaguchi, A. (2004). Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escherichia coli* to Tigecycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother*, 48(6), 2179-2184. <https://doi.org/10.1128/aac.48.6.2179-2184.2004>
- Izghirean, N., Waidacher, C., Kittinger, C., Chyba, M., Koraimann, G., Pertschy, B., & Zarfel, G. (2021). Effects of Ribosomal Protein S10 Flexible Loop Mutations on

- Tetracycline and Tigecycline Susceptibility of *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 12, 663835. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663835>
- Jenner, L., Starosta, A. L., Terry, D. S., Mikolajka, A., Filonava, L., Yusupov, M., Blanchard, S. C., Wilson, D. N., & Yusupova, G. (2013). Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic Tigecycline during protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(10), 3812-3816. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216691110>
- Ji, K., Xu, Y., Sun, J., Huang, M., Jia, X., Jiang, C., & Feng, Y. (2020). Harnessing efficient multiplex PCR methods to detect the expanding Tet(X) family of Tigecycline resistance genes. *Virulence*, 11(1), 49-56. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1706913>
- Jo, J., & Ko, K. S. (2021). Tigecycline Heteroresistance and Resistance Mechanism in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microbiol Spectr*, 9(2), e0101021. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01010-21>
- Kelesidis, T., Karageorgopoulos, D. E., Kelesidis, I., & Falagas, M. E. (2008). Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother*, 62(5), 895-904. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn311>
- Korczak, L., Majewski, P., Iwaniuk, D., Sacha, P., Matulewicz, M., Wieczorek, P., Majewska, P., Wieczorek, A., Radziwon, P., & Tryniszewska, E. (2024). Molecular mechanisms of Tigecycline -resistance among Enterobacterales. *Front Cell Infect Microbiol*, 14, 1289396. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1289396>
- Li, Liu, L., Ji, J., Chen, Q., Hua, X., Jiang, Y., Feng, Y., & Yu, Y. (2015). Tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii* mediated by frameshift mutation in *plsC*, encoding 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34(3), 625-631. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2272-y>
- Li, Lu, X., Munir, A., Abdullah, S., Liu, Y., Xiao, X., Wang, Z., & Mohsin, M. (2022). Widespread prevalence and molecular epidemiology of tet(X4) and mcr-1 harboring *Escherichia coli* isolated from chickens in Pakistan. *Sci Total Environ*, 806(Pt 2), 150689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150689>

- Li, Y., Dai, X., Zeng, J., Gao, Y., Zhang, Z., & Zhang, L. (2020). Characterization of the global distribution and diversified plasmid reservoirs of the colistin resistance gene *mcr-9*. *Sci Rep*, 10(1), 8113. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65106-w>
- Lugsomya, K. (2017). Monitoring of antibiogram and resistance gene profiles among *Escherichia coli* in pig production system. <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/1040/>
- Makhado, U. G., Foka, F. E. T., Tchatchouang, C.-D. K., Ateba, C. N., & Manganyi, M. C. (2022). Detection of virulence gene of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains from animals with diarrhoea and water samples in the North-West Province, South Africa. *Gene Reports*, 27, 101617. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101617>
- Moore, I. F., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2005). Tigecycline Is Modified by the Flavin-Dependent Monooxygenase TetX. *Biochemistry*, 44(35), 11829-11835. <https://doi.org/10.1021/bi0506066>
- Nagy, B., & Fekete, P. Z. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol*, 295(6-7), 443-454. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.003>
- Nasomsong, W., Wanloptaree, P., & Vasikasin, V. (2025). Efficacy of high-dose Tigecycline -containing regimens for the combination treatment of carbapenem-resistant Enterobacterales bacteraemia. *JAC Antimicrob Resist*, 7(5), dlaf162. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaf162>
- Nguyet, L. T. Y., Keeratikunakorn, K., Kaeoket, K., & Ngamwongsatit, N. (2022). Antibiotic resistant *Escherichia coli* from diarrheic piglets from pig farms in Thailand that harbor colistin-resistant *mcr* genes. *Scientific Reports*, 12(1), 9083. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13192-3>
- Peterson, L. R. (2008). A review of Tigecycline --the first glycylcycline. *Int J Antimicrob Agents*, 32 Suppl 4, S215-222. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(09\)70005-6](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(09)70005-6)
- Prapasarakul, N., Tummaruk, P., Niyomtum, W., Tripipat, T., & Serichantalergs, O. (2010). Virulence genes and antimicrobial susceptibilities of hemolytic and nonhemolytic *Escherichia coli* isolated from post-weaning piglets in central

- Thailand. *J Vet Med Sci*, 72(12), 1603-1608. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0124>
- Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., & Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Euro Surveill*, 23(6). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.Es.2018.23.6.17-00672>
- Su, Y., Xin, L., Zhang, F., Peng, C., Li, Z., Liu, C., & Wang, F. (2023). Drug resistance analysis of three types of avian-origin carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Shandong Province, China. *Poultry Science*, 102(3), 102483. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102483>
- Sun, Chen, C., Cui, C. Y., Zhang, Y., Liu, X., Cui, Z. H., Ma, X. Y., Feng, Y., Fang, L. X., Lian, X. L., Zhang, R. M., Tang, Y. Z., Zhang, K. X., Liu, H. M., Zhuang, Z. H., Zhou, S. D., Lv, J. N., Du, H., Huang, B., Yu, F. Y., Mathema, B., Kreiswirth, B. N., Liao, X. P., Chen, L., & Liu, Y. H. (2019). Plasmid-encoded tet(X) genes that confer high-level Tigecycline resistance in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol*, 4(9), 1457-1464. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0496-4>
- Sun, C., Cui, M., Zhang, S., Wang, H., Song, L., Zhang, C., Zhao, Q., Liu, D., Wang, Y., Shen, J., Xu, S., & Wu, C. (2019). Plasmid-mediated Tigecycline -resistant gene tet(X4) in *Escherichia coli* from food-producing animals, China, 2008-2018. *Emerg Microbes Infect*, 8(1), 1524-1527. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1678367>
- Wang, Wu, H., Mei, C. Y., Wang, Y., Wang, Z. Y., Lu, M. J., Pan, Z. M., & Jiao, X. (2021). Multiple Mechanisms of Tigecycline Resistance in Enterobacteriaceae from a Pig Farm, China. *Microbiol Spectr*, 9(2), e0041621. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00416-21>
- Wang, J., Lu, M.-J., Wang, Z.-Y., Jiang, Y., Wu, H., Pan, Z.-M., & Jiao, X. (2022). tigecycline -resistant *Escherichia coli* ST761 carrying tet(X4) in a pig farm, China [Original

- Research]. *Frontiers in Microbiology*, Volume 13 - 2022.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.967313>
- Wang, J., Wu, H., Mei, C.-Y., Wang, Y., Wang, Z.-Y., Lu, M.-J., Pan, Z.-M., & Jiao, X. (2021). Multiple Mechanisms of Tigecycline Resistance in *Enterobacteriaceae* from a Pig Farm, China. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e00416-00421.
<https://doi.org/doi:10.1128/Spectrum.00416-21>
- Wang, Z., & Li, H. (2024). The Tigecycline resistance mechanisms in Gram-negative bacilli. *Front Cell Infect Microbiol*, 14, 1471469.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1471469>
- World Health Organization & UN Interagency Coordinating Group on AMR. (2019). *Thailand One Health Dashboard on Antimicrobial Resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>
- Xiao, X., Liu, Z., Chen, X., Peng, K., Li, R., Liu, Y., & Wang, Z. (2022). Persistence of plasmid and tet(X4) in an *Escherichia coli* isolate coharboring bla (NDM-5) and mcr-1 after acquiring an IncFII tet(X4)-positive plasmid. *Front Microbiol*, 13, 1010387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1010387>
- Yaghoubi, S., Zekiy, A. O., Krutova, M., Gholami, M., Kouhsari, E., Sholeh, M., Ghafouri, Z., & Maleki, F. (2022). Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 41(7), 1003-1022. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04121-1>
- Yamamoto, T., & Echeverria, P. (1996). Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun*, 64(4), 1441-1445.
<https://doi.org/10.1128/iai.64.4.1441-1445.1996>
- Yang, J., Xiao, G., Xiao, N., Jiang, Z., Jiang, C., Li, Y., Chen, W., Lin, H., Sun, Z., & Li, J. (2023). Characteristics of tet(X4)-Producing *Escherichia coli* in Chicken and Pig Farms in Hunan Province, China. *Antibiotics*, 12(1), 147.
<https://www.mdpi.com/2079-6382/12/1/147>

- Yu, Y., Cui, C.-Y., Kuang, X., Chen, C., Wang, M.-G., Liao, X.-P., Sun, J., & Liu, Y.-H. (2021). Prevalence of tet(X4) in Escherichia coli From Duck Farms in Southeast China [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, Volume 12 - 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.716393>
- Zhang, J., Xie, J., Li, H., Wang, Z., Yin, Y., Wang, S., Chen, H., Wang, Q., & Wang, H. (2022). Genomic and Phenotypic Evolution of Tigecycline -Resistant *Acinetobacter baumannii* in Critically Ill Patients. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e01593-01521. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01593-21>





ภาคผนวก



MICROBIAL DRUG RESISTANCE
Volume 00, Number 00, 2026
© Mary Ann Liebert (NY), LLC
DOI: 10.1177/10766294251412009

Genetic Characterization of *tet(X4)*-Positive Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Weaning Pigs in Thailand

Phatthira Ainmani,¹ Wilasinee Inyawilert,¹ Pannika R. Niumsup,² Anurak Khieokhajonkhet,¹ and Niran Aeksiri¹

Tigecycline, a last-resort antibiotic against multidrug-resistant bacteria, has recently faced emerging resistance mediated by *tet(X)* genes. Livestock, particularly swine, are considered potential reservoirs for these resistance determinants. This study investigated the prevalence and molecular characteristics of tigecycline-resistant *Escherichia coli* in healthy weaning pigs in Thailand. Fecal samples were collected from healthy weaning pigs in 2024. Detection of *tet(X)* genes was performed using PCR. Among the 305 fecal samples, four were positive for the *tet(X4)* gene. A total of four *tet(X)*-positive *E. coli* isolates exhibited low-level resistance to tigecycline (minimum inhibitory concentration: 0.5–4 mg/L). Whole-genome sequencing analysis identified the *tet(X4)*-positive isolates as belonging to sequence types (STs) rST-153719, rST-59143, rST-45855, and rST-36073. Multiple antimicrobial resistance genes coexisting with *tet(X4)* were detected, including *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *bla_{TEM-1B}*, *bla_{TEM-215}*, *sul2*, *floR*, *tet(A)*, and *qnrS1*. Plasmids carrying *tet(X4)* in the *E. coli* isolates were identified as IncN (in strains NO25 and T8) and IncR (in strains C2 and OS57). This study reports the first detection of tigecycline-resistant *E. coli* from weaning pigs in Thailand, raising significant concerns for both food animal production and public health.

Keywords: *Escherichia coli*, tigecycline, resistance, *tet(X4)*, swine, weaning

Introduction

Tigecycline, a third-generation tetracyclines, is one of the most important last-resort antibiotics for the treatment of severe infections from extensively drug-resistant bacteria such as carbapenem- and colistin-resistant bacteria. In 2005, it was approved to treat severe infection in human.¹ Interestingly, clinical tigecycline resistance has been reported since 2007.² Nowadays, tigecycline is not approved for use in animals or livestock. But, tigecycline-resistant *E. coli* was detected from food animals and products.^{3–5} The emergence of tigecycline resistance in animals may be associated with the long-term exposure to and extensive use of tetracyclines and phenicols, such as oxytetracycline, doxycycline, and chloramphenicol, in veterinary medicine, particularly in swine farms worldwide.^{6–8}

The two main mechanisms of tigecycline resistance were identified in *Enterobacteriales* from animals and humans, namely enzymatic inactivation and efflux from the cell. The plasmid mostly encodes the RND-type efflux pump gene cluster, *mexCD-toprJ*, and the tigecycline-inactivating enzyme-encoding *tet(X)* gene.⁹ The *tet(X)* gene encoding a flavin-dependent monooxygenase that hydroxylates and inactivates

a broad range of tetracyclines, including tigecycline and newer FDA-approved derivatives such as eravacycline and omadacycline.^{10,11} The first identification of *tet(X3)* and *tet(X4)* from animals and human was reported from China in 2019 with high-level tigecycline resistance.⁶ Currently, tigecycline resistance, particularly *tet(X4)*, is predominantly detected in food-producing animals such as cattle, poultry, and pigs, as well as in food products, wild animals, humans, and manure across more than 20 countries worldwide.¹² The spread of *tet(X4)* among *E. coli* populations is strongly influenced by its association with the mobile element ISCR2 and various broad-host-range plasmid types, including IncQ, IncX1, IncFIB, and IncHI1.^{6,13,14} These genetic elements facilitate the horizontal transfer of the gene. Notably, ISCR2 frequently co-transfers *tet(X4)* alongside the adjacent *catD* gene, which provides chloramphenicol resistance, forming a structurally conserved unit referred to as ISCR2-*tet(X4)*-*catD*.¹⁴

The emergence of the tigecycline-resistance gene *tet(X4)* in *E. coli* is a serious global public health concern. The *tet(X4)* gene is also associated with diverse mobile genetic elements and has been identified in isolates from animals and food sources. Consequently, there is an urgent need to study and

¹Department of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture, Natural Resources, and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand.

²Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand.

monitor the prevalence of *tet(X)* genes in animal-derived pathogens. This study aims to investigate the prevalence and characterize *tet(X4)* in *E. coli* isolated from healthy weaning pigs in Thailand, providing insights into the dissemination of *tet(X4)* within swine populations.

Materials and Method

Sample collection and bacterial isolates

All 305 non-duplicate samples of rectal swabs from healthy weaning pigs were collected from pig farms in Nakhon Ratchasima ($n = 1$ farms, 60 samples), Phetchabun ($n = 2$ farms, 185 samples), and Saraburi ($n = 1$ farms, 60 samples), Thailand, in 2024. On each farm, 10–15 healthy weaning pigs (aged 6–8 weeks) were randomly selected from different pens to minimize sampling bias. Sampling followed a stratified random design based on farm size and production type, with one pooled sample per pig collected aseptically using sterile swabs. The animal study protocol was reviewed and approved by the Center for Animal Research, Naresuan University (protocol number: NU-AG671006). Rectal swab samples were incubated in LB broth at 37°C for 18–20 hours and then cultured on the EMB agar with and without 2 mg/L tigecycline. *E. coli* isolates were selected and identified. The presence of *tet(X)* genes was detected by PCR using primers *tet(X)*-uni F: TTCAGGTCAGGAAGCAATGAAAA and *tet(X)*-uni R: TTTACGCCTTGCTCTGCAAAAGG.¹⁵ The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 96°C for 3 minutes, followed by 30 cycles of 96°C for 30 seconds, 52°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. Products of approximately 800 bp were subjected to Sanger sequencing.

Antimicrobial susceptibility testing

The microbiological identification and the antimicrobial susceptibility testing of tigecycline were determined using the Vitek 2 XL system (Card N288) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The minimum inhibitory concentrations (MICs) for the following antimicrobials were recorded: amikacin (AMK), ceftazidime (CAZ), ciprofloxacin (CIP), imipenem (IPM), cefoperazone/sulbactam (SCF), piperacillin/tazobactam (TZP), ertapenem (ETP), meropenem (MEM), tigecycline (TGC), levofloxacin (LEV), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), and cefuroxime (CXM). *E. coli* ATCC 25922 was used as a reference for quality control in the susceptibility assays. The Clinical and Laboratory Standards Institute document (CLSI M100-S29) was used as the reference for interpreting susceptibility results.¹⁶

Conjugation experiments

The conjugation assays were performed to study the transferability of the *tet(X4)* gene between isolates. We studied only T8 that MIC was more than 2 mg/L. The experiment was investigated using *E. coli* J53 (sodium azide resistant) as the recipient strain. Transconjugants were studied based on MacConkey agar containing 2 mg/L tigecycline and 100 mg/L sodium azide. For the subsequent confirmation of *tet(X4)* in the transconjugants, PCR was performed to confirm the result.

Whole-genome sequencing

Genomic DNA was extracted using the NucleoSpin® Microbial DNA kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) following the manufacturer's protocol and quantified on a Qubit® 4.0 Fluorometer (Invitrogen, USA) and nanodrop. The gDNA was sequenced on the Illumina NovaSeq PE150 platform by Novogene (China) with paired-end sequencing. For long-read sequencing, the library was prepared from 400 ng per sample using the Ligation sequencing gDNA Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24 kit, Oxford Nanopore Technologies, UK). The library was loaded into the R10.4.1 flow cells and sequenced using MinION Mk1B with the default setting. The MinKNOW software manages the nanopore sequencing device, enabling real-time data acquisition and basecalling.

Bioinformatics analysis

Illumina reads were quality checked using FastQC v0.11.9¹⁷ and trimmed using Trimmomatic v0.39.¹⁸ Quality and adapter trimming of long reads raw data was performed using Porechop v0.2.4 (<https://github.com/rrwick/Porechop>) and Filtlong v0.2.1 (<https://github.com/rrwick/Filtlong>) with only reads longer than 1,000 base pairs and a quality score (Q) greater than 9. The quality of the resulting reads was assessed using NanoPlot v1.38.0.¹⁹ Hybrid genome assemblies for isolates were generated by combining ONT long reads and Illumina short reads using Unicycler v0.4.8.²⁰ The quality of the assembled genome sequences was evaluated using QUAST v5.0.2.²¹ The genomes were annotated using the NCBI's Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/). For sequence typing and accurate strain grouping, rMLST (Ribosomal MultiLocus Sequence Typing) and PubMLST Species ID were employed. Whole-genome sequencing (WGS) data were analyzed using online tools available from the Center for Genomic Epidemiology

TABLE 1. MICs AND RESISTANCE RATE OF ISOLATES AGAINST DIFFERENT ANTIMICROBIALS

Sample ID	MICs of antimicrobials (mg/L)											
	AMK	CAZ	CIP	IPM	SCF	TZP	ETP	MEM	TGC	LEV	AMC	CXM
C2	≤2/S	≤1/S	>4/R	≤0.25/S	≤8/4/S	≤4/4/S	≤0.5/S	≤0.25/S	≤0.5/S	>8/R	8/4/S	≤1/S
NO25	≤2/S	≤1/S	≤0.25/S	≤0.25/S	≤8/4/S	≤4/4/S	≤0.5/S	≤0.25/S	1/S	1/I	4/2/S	≤1/S
OS57	≤2/S	≤1/S	≤0.25/S	≤0.25/S	≤8/4/S	≤4/4/S	≤0.5/S	≤0.25/S	≤0.5/S	1/I	4/2/S	≤1/S
T8	≤2/S	≤1/S	1/R	≤0.25/S	16/8/S	≤4/4/S	≤0.5/S	≤0.25/S	4/I	1/I	16/8/I	>64/R

AMK, amikacin; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; IPM, imipenem; SCF, cefoperazone/sulbactam; TZP, piperacillin/tazobactam; ETP, ertapenem; MEM, meropenem; TGC, tigecycline; LEV, levofloxacin; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; CXM, cefuroxime; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

TET(X4)-POSITIVE *E. COLI* FROM WEANING PIGS

3

(<http://www.genomicpidemiology.org/services/>). Plasmid sequences were identified using PlasmidFinder 2.1,²² while antimicrobial resistance genes (ARGs) were detected using ResFinder 4.6.0.²³ Virulence genes were analyzed with VirulenceFinder 2.0.²⁴ Circular and linear comparative genome maps of multiple chromosomes and plasmids were represented by BLAST Ring Image Generator (BRIG)²⁵ and Easyfig,²⁶ respectively. A total of 103 *tet*(X4)-positive *E. coli* genomes isolated in Thailand were retrieved from the NCBI Pathogen Detection database in May 2025 using the search criteria: 'AMR_genotypes: *tet*(X4)', 'Organism group: *E. coli* and *Shigella*', and 'Location: Thailand'. These genomes were used to investigate the evolutionary relationships through phylogenomic analysis. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified using Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>, accessed on June 2025) to generate a core genome alignment. Recombination regions were detected and removed using Gubbins,²⁷ which employs an iterative algorithm to identify loci with elevated densities of base substitutions, thereby allowing accurate calculation of pairwise SNP differences. The resulting recombination-free core SNP alignment was used to construct a maximum-likelihood phylogenetic tree with RAxML v8.2.12,²⁸ applying the GTR nucleotide substitution model. Visualization, annotation, and management of the phylogenetic trees were conducted using the Interactive Tree Of Life (iTOL) tool.²⁹

The whole genome sequences were deposited in the GenBank under the BioProject number PRJNA1276700.

Result

Bacterial isolation, *tet*(X) gene detection, and antimicrobial susceptibility test

A total of 260 *E. coli* were obtained from 305 non-duplicate samples of rectal swabs from healthy weaning pigs. Among them, four strains were positive to *tet*(X4) designed as strains C2, NO25, OS57, and T8. All *tet*(X4)-positive isolates exhibited low-level resistance to tigecycline (MIC 0.5–4 mg/L) (Table 1). These *tet*(X4)-positive isolates were also resistant to ciprofloxacin, levofloxacin, and cefuroxime but susceptible to AMK, IMP, SCF, TZP, ETP, MEM, and AMC acid. The conjugation experiments showed that T8 could be conjugated into *E. coli* J53 (sodium azide resistant) isolates *in vitro*.

Genetic diversity of *tet*(X4)-positive strains

WGS analysis revealed that all *tet*(X4)-positive strains C2, NO25, OS57, and T8 belonged to distinct sequence types (STs): rST-153719, rST-59143, rST-45855, and rST-86073, respectively (Table 2). These strains harbored a variety of ARGs conferring resistance to multiple antibiotic classes, including aminoglycoside, β -lactam, sulfonamide, phenicol, macrolide, tetracycline, and quinolone. C2 and NO25 have relatively narrower resistance profiles but still carry significant resistance genes, including *bla*_{TEM-1B} (β -lactam), *tet*(X4) (tigecycline), *floR* (phenicol), and *qnrS1* (quinolone) in C2, and *bla*_{TEM-1B}, *tet*(A), *tet*(X4), and *qnrS1* in NO25, with additional aminoglycoside-modifying enzymes *aph*(6)-Ia and *aph*(3'')-Ib detected in

TABLE 2. GENOMIC CHARACTERIZATION OF *Tet*(X4)-BEARING *E. COLI* ISOLATES

Strain	Genome (bp)	MLST	Plasmid	Antimicrobial resistance genes					Quinolone	Virulence genes
				Aminoglycoside	β -lactam	Sulfonamide	Phenicol	Macrolide	Tetracycline	
C2	5012876	rST-153719	IncR	—	<i>bla</i> _{TEM-1B} in	—	<i>floR</i>	—	<i>tet</i> (X4)	<i>AclA</i> , <i>acr</i> , <i>argA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliD</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliH</i> , <i>fliI</i> , <i>fliJ</i> , <i>fliK</i> , <i>fliL</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>fliS</i> , <i>fliT</i> , <i>fliU</i> , <i>fliV</i> , <i>fliW</i> , <i>fliX</i> , <i>fliY</i> , <i>fliZ</i> , <i>fliAA</i> , <i>fliAB</i> , <i>fliAC</i> , <i>fliAD</i> , <i>fliAE</i> , <i>fliAF</i> , <i>fliAG</i> , <i>fliAH</i> , <i>fliAI</i> , <i>fliAJ</i> , <i>fliAK</i> , <i>fliAL</i> , <i>fliAM</i> , <i>fliAN</i> , <i>fliAO</i> , <i>fliAP</i> , <i>fliAQ</i> , <i>fliAR</i> , <i>fliAS</i> , <i>fliAT</i> , <i>fliAU</i> , <i>fliAV</i> , <i>fliAW</i> , <i>fliAX</i> , <i>fliAY</i> , <i>fliAZ</i> , <i>fliBA</i> , <i>fliBB</i> , <i>fliBC</i> , <i>fliBD</i> , <i>fliBE</i> , <i>fliBF</i> , <i>fliBG</i> , <i>fliBH</i> , <i>fliBI</i> , <i>fliBJ</i> , <i>fliBK</i> , <i>fliBL</i> , <i>fliBM</i> , <i>fliBN</i> , <i>fliBO</i> , <i>fliBP</i> , <i>fliBQ</i> , <i>fliBR</i> , <i>fliBS</i> , <i>fliBT</i> , <i>fliBU</i> , <i>fliBV</i> , <i>fliBW</i> , <i>fliBX</i> , <i>fliBY</i> , <i>fliBZ</i> , <i>fliCA</i> , <i>fliCB</i> , <i>fliCC</i> , <i>fliCD</i> , <i>fliCE</i> , <i>fliCF</i> , <i>fliCG</i> , <i>fliCH</i> , <i>fliCI</i> , <i>fliCJ</i> , <i>fliCK</i> , <i>fliCL</i> , <i>fliCM</i> , <i>fliCN</i> , <i>fliCO</i> , <i>fliCP</i> , <i>fliCQ</i> , <i>fliCR</i> , <i>fliCS</i> , <i>fliCT</i> , <i>fliCU</i> , <i>fliCV</i> , <i>fliCW</i> , <i>fliCX</i> , <i>fliCY</i> , <i>fliCZ</i> , <i>fliDA</i> , <i>fliDB</i> , <i>fliDC</i> , <i>fliDD</i> , <i>fliDE</i> , <i>fliDF</i> , <i>fliDG</i> , <i>fliDH</i> , <i>fliDI</i> , <i>fliDJ</i> , <i>fliDK</i> , <i>fliDL</i> , <i>fliDM</i> , <i>fliDN</i> , <i>fliDO</i> , <i>fliDP</i> , <i>fliDQ</i> , <i>fliDR</i> , <i>fliDS</i> , <i>fliDT</i> , <i>fliDU</i> , <i>fliDV</i> , <i>fliDW</i> , <i>fliDX</i> , <i>fliDY</i> , <i>fliDZ</i> , <i>fliEA</i> , <i>fliEB</i> , <i>fliEC</i> , <i>fliED</i> , <i>fliEE</i> , <i>fliEF</i> , <i>fliEG</i> , <i>fliEH</i> , <i>fliEI</i> , <i>fliEJ</i> , <i>fliEK</i> , <i>fliEL</i> , <i>fliEM</i> , <i>fliEN</i> , <i>fliEO</i> , <i>fliEP</i> , <i>fliEQ</i> , <i>fliER</i> , <i>fliES</i> , <i>fliET</i> , <i>fliEU</i> , <i>fliEV</i> , <i>fliEW</i> , <i>fliEX</i> , <i>fliEY</i> , <i>fliEZ</i> , <i>fliFA</i> , <i>fliFB</i> , <i>fliFC</i> , <i>fliFD</i> , <i>fliFE</i> , <i>fliFF</i> , <i>fliFG</i> , <i>fliFH</i> , <i>fliFI</i> , <i>fliFJ</i> , <i>fliFK</i> , <i>fliFL</i> , <i>fliFM</i> , <i>fliFN</i> , <i>fliFO</i> , <i>fliFP</i> , <i>fliFQ</i> , <i>fliFR</i> , <i>fliFS</i> , <i>fliFT</i> , <i>fliFU</i> , <i>fliFV</i> , <i>fliFW</i> , <i>fliFX</i> , <i>fliFY</i> , <i>fliFZ</i> , <i>fliGA</i> , <i>fliGB</i> , <i>fliGC</i> , <i>fliGD</i> , <i>fliGE</i> , <i>fliGF</i> , <i>fliGG</i> , <i>fliGH</i> , <i>fliGI</i> , <i>fliGJ</i> , <i>fliGK</i> , <i>fliGL</i> , <i>fliGM</i> , <i>fliGN</i> , <i>fliGO</i> , <i>fliGP</i> , <i>fliGQ</i> , <i>fliGR</i> , <i>fliGS</i> , <i>fliGT</i> , <i>fliGU</i> , <i>fliGV</i> , <i>fliGW</i> , <i>fliGX</i> , <i>fliGY</i> , <i>fliGZ</i> , <i>fliHA</i> , <i>fliHB</i> , <i>fliHC</i> , <i>fliHD</i> , <i>fliHE</i> , <i>fliHF</i> , <i>fliHG</i> , <i>fliHH</i> , <i>fliHI</i> , <i>fliHJ</i> , <i>fliHK</i> , <i>fliHL</i> , <i>fliHM</i> , <i>fliHN</i> , <i>fliHO</i> , <i>fliHP</i> , <i>fliHQ</i> , <i>fliHR</i> , <i>fliHS</i> , <i>fliHT</i> , <i>fliHU</i> , <i>fliHV</i> , <i>fliHW</i> , <i>fliHX</i> , <i>fliHY</i> , <i>fliHZ</i> , <i>fliIA</i> , <i>fliIB</i> , <i>fliIC</i> , <i>fliID</i> , <i>fliIE</i> , <i>fliIF</i> , <i>fliIG</i> , <i>fliIH</i> , <i>fliII</i> , <i>fliIM</i> , <i>fliIN</i> , <i>fliIO</i> , <i>fliIP</i> , <i>fliIQ</i> , <i>fliIR</i> , <i>fliIS</i> , <i>fliIT</i> , <i>fliIU</i> , <i>fliIV</i> , <i>fliIW</i> , <i>fliIX</i> , <i>fliIY</i> , <i>fliIZ</i> , <i>fliJA</i> , <i>fliJB</i> , <i>fliJC</i> , <i>fliJD</i> , <i>fliJE</i> , <i>fliJF</i> , <i>fliJG</i> , <i>fliJH</i> , <i>fliJI</i> , <i>fliJJ</i> , <i>fliJK</i> , <i>fliJL</i> , <i>fliJM</i> , <i>fliJN</i> , <i>fliJO</i> , <i>fliJP</i> , <i>fliJQ</i> , <i>fliJR</i> , <i>fliJS</i> , <i>fliJT</i> , <i>fliJU</i> , <i>fliJV</i> , <i>fliJW</i> , <i>fliJX</i> , <i>fliJY</i> , <i>fliJZ</i> , <i>fliKA</i> , <i>fliKB</i> , <i>fliKC</i> , <i>fliKD</i> , <i>fliKE</i> , <i>fliKF</i> , <i>fliKG</i> , <i>fliKH</i> , <i>fliKI</i> , <i>fliKJ</i> , <i>fliKK</i> , <i>fliKL</i> , <i>fliKM</i> , <i>fliKN</i> , <i>fliKO</i> , <i>fliKP</i> , <i>fliKQ</i> , <i>fliKR</i> , <i>fliKS</i> , <i>fliKT</i> , <i>fliKU</i> , <i>fliKV</i> , <i>fliKW</i> , <i>fliKX</i> , <i>fliKY</i> , <i>fliKZ</i> , <i>fliLA</i> , <i>fliLB</i> , <i>fliLC</i> , <i>fliLD</i> , <i>fliLE</i> , <i>fliLF</i> , <i>fliLG</i> , <i>fliLH</i> , <i>fliLI</i> , <i>fliLJ</i> , <i>fliLK</i> , <i>fliLL</i> , <i>fliLM</i> , <i>fliLN</i> , <i>fliLO</i> , <i>fliLP</i> , <i>fliLQ</i> , <i>fliLR</i> , <i>fliLS</i> , <i>fliLT</i> , <i>fliLU</i> , <i>fliLV</i> , <i>fliLW</i> , <i>fliLX</i> , <i>fliLY</i> , <i>fliLZ</i> , <i>fliMA</i> , <i>fliMB</i> , <i>fliMC</i> , <i>fliMD</i> , <i>fliME</i> , <i>fliMF</i> , <i>fliMG</i> , <i>fliMH</i> , <i>fliMI</i> , <i>fliMJ</i> , <i>fliMK</i> , <i>fliML</i> , <i>fliMN</i> , <i>fliMO</i> , <i>fliMP</i> , <i>fliMQ</i> , <i>fliMR</i> , <i>fliMS</i> , <i>fliMT</i> , <i>fliMU</i> , <i>fliMV</i> , <i>fliMW</i> , <i>fliMX</i> , <i>fliMY</i> , <i>fliMZ</i> , <i>fliNA</i> , <i>fliNB</i> , <i>fliNC</i> , <i>fliND</i> , <i>fliNE</i> , <i>fliNF</i> , <i>fliNG</i> , <i>fliNH</i> , <i>fliNI</i> , <i>fliNJ</i> , <i>fliNK</i> , <i>fliNL</i> , <i>fliNM</i> , <i>fliNO</i> , <i>fliNP</i> , <i>fliNQ</i> , <i>fliNR</i> , <i>fliNS</i> , <i>fliNT</i> , <i>fliNU</i> , <i>fliNV</i> , <i>fliNW</i> , <i>fliNX</i> , <i>fliNY</i> , <i>fliNZ</i> , <i>fliOA</i> , <i>fliOB</i> , <i>fliOC</i> , <i>fliOD</i> , <i>fliOE</i> , <i>fliOF</i> , <i>fliOG</i> , <i>fliOH</i> , <i>fliOI</i> , <i>fliOJ</i> , <i>fliOK</i> , <i>fliOL</i> , <i>fliOM</i> , <i>fliON</i> , <i>fliOO</i> , <i>fliOP</i> , <i>fliOQ</i> , <i>fliOR</i> , <i>fliOS</i> , <i>fliOT</i> , <i>fliOU</i> , <i>fliOV</i> , <i>fliOW</i> , <i>fliOX</i> , <i>fliOY</i> , <i>fliOZ</i> , <i>fliPA</i> , <i>fliPB</i> , <i>fliPC</i> , <i>fliPD</i> , <i>fliPE</i> , <i>fliPF</i> , <i>fliPG</i> , <i>fliPH</i> , <i>fliPI</i> , <i>fliPJ</i> , <i>fliPK</i> , <i>fliPL</i> , <i>fliPM</i> , <i>fliPN</i> , <i>fliPO</i> , <i>fliPP</i> , <i>fliPQ</i> , <i>fliPR</i> , <i>fliPS</i> , <i>fliPT</i> , <i>fliPU</i> , <i>fliPV</i> , <i>fliPW</i> , <i>fliPX</i> , <i>fliPY</i> , <i>fliPZ</i> , <i>fliQA</i> , <i>fliQB</i> , <i>fliQC</i> , <i>fliQD</i> , <i>fliQE</i> , <i>fliQF</i> , <i>fliQG</i> , <i>fliQH</i> , <i>fliQI</i> , <i>fliQJ</i> , <i>fliQK</i> , <i>fliQL</i> , <i>fliQM</i> , <i>fliQN</i> , <i>fliQO</i> , <i>fliQP</i> , <i>fliQQ</i> , <i>fliQR</i> , <i>fliQS</i> , <i>fliQT</i> , <i>fliQU</i> , <i>fliQV</i> , <i>fliQW</i> , <i>fliQX</i> , <i>fliQY</i> , <i>fliQZ</i> , <i>fliRA</i> , <i>fliRB</i> , <i>fliRC</i> , <i>fliRD</i> , <i>fliRE</i> , <i>fliRF</i> , <i>fliRG</i> , <i>fliRH</i> , <i>fliRI</i> , <i>fliRJ</i> , <i>fliRK</i> , <i>fliRL</i> , <i>fliRM</i> , <i>fliRN</i> , <i>fliRO</i> , <i>fliRP</i> , <i>fliRQ</i> , <i>fliRR</i> , <i>fliRS</i> , <i>fliRT</i> , <i>fliRU</i> , <i>fliRV</i> , <i>fliRW</i> , <i>fliRX</i> , <i>fliRY</i> , <i>fliRZ</i> , <i>fliSA</i> , <i>fliSB</i> , <i>fliSC</i> , <i>fliSD</i> , <i>fliSE</i> , <i>fliSF</i> , <i>fliSG</i> , <i>fliSH</i> , <i>fliSI</i> , <i>fliSJ</i> , <i>fliSK</i> , <i>fliSL</i> , <i>fliSM</i> , <i>fliSN</i> , <i>fliSO</i> , <i>fliSP</i> , <i>fliSQ</i> , <i>fliSR</i> , <i>fliSS</i> , <i>fliST</i> , <i>fliSU</i> , <i>fliSV</i> , <i>fliSW</i> , <i>fliSX</i> , <i>fliSY</i> , <i>fliSZ</i> , <i>fliTA</i> , <i>fliTB</i> , <i>fliTC</i> , <i>fliTD</i> , <i>fliTE</i> , <i>fliTF</i> , <i>fliTG</i> , <i>fliTH</i> , <i>fliTI</i> , <i>fliTJ</i> , <i>fliTK</i> , <i>fliTL</i> , <i>fliTM</i> , <i>fliTN</i> , <i>fliTO</i> , <i>fliTP</i> , <i>fliTQ</i> , <i>fliTR</i> , <i>fliTS</i> , <i>fliTT</i> , <i>fliTU</i> , <i>fliTV</i> , <i>fliTW</i> , <i>fliTX</i> , <i>fliTY</i> , <i>fliTZ</i> , <i>fliUA</i> , <i>fliUB</i> , <i>fliUC</i> , <i>fliUD</i> , <i>fliUE</i> , <i>fliUF</i> , <i>fliUG</i> , <i>fliUH</i> , <i>fliUI</i> , <i>fliUJ</i> , <i>fliUK</i> , <i>fliUL</i> , <i>fliUM</i> , <i>fliUN</i> , <i>fliUO</i> , <i>fliUP</i> , <i>fliUQ</i> , <i>fliUR</i> , <i>fliUS</i> , <i>fliUT</i> , <i>fliUU</i> , <i>fliUV</i> , <i>fliUW</i> , <i>fliUX</i> , <i>fliUY</i> , <i>fliUZ</i> , <i>fliVA</i> , <i>fliVB</i> , <i>fliVC</i> , <i>fliVD</i> , <i>fliVE</i> , <i>fliVF</i> , <i>fliVG</i> , <i>fliVH</i> , <i>fliVI</i> , <i>fliVJ</i> , <i>fliVK</i> , <i>fliVL</i> , <i>fliVM</i> , <i>fliVN</i> , <i>fliVO</i> , <i>fliVP</i> , <i>fliVQ</i> , <i>fliVR</i> , <i>fliVS</i> , <i>fliVT</i> , <i>fliVU</i> , <i>fliVV</i> , <i>fliVW</i> , <i>fliVX</i> , <i>fliVY</i> , <i>fliVZ</i> , <i>fliWA</i> , <i>fliWB</i> , <i>fliWC</i> , <i>fliWD</i> , <i>fliWE</i> , <i>fliWF</i> , <i>fliWG</i> , <i>fliWH</i> , <i>fliWI</i> , <i>fliWJ</i> , <i>fliWK</i> , <i>fliWL</i> , <i>fliWM</i> , <i>fliWN</i> , <i>fliWO</i> , <i>fliWP</i> , <i>fliWQ</i> , <i>fliWR</i> , <i>fliWS</i> , <i>fliWT</i> , <i>fliWU</i> , <i>fliWV</i> , <i>fliWW</i> , <i>fliWX</i> , <i>fliWY</i> , <i>fliWZ</i> , <i>fliXA</i> , <i>fliXB</i> , <i>fliXC</i> , <i>fliXD</i> , <i>fliXE</i> , <i>fliXF</i> , <i>fliXG</i> , <i>fliXH</i> , <i>fliXI</i> , <i>fliXJ</i> , <i>fliXK</i> , <i>fliXL</i> , <i>fliXM</i> , <i>fliXN</i> , <i>fliXO</i> , <i>fliXP</i> , <i>fliXQ</i> , <i>fliXR</i> , <i>fliXS</i> , <i>fliXT</i> , <i>fliXU</i> , <i>fliXV</i> , <i>fliXW</i> , <i>fliXX</i> , <i>fliXY</i> , <i>fliXZ</i> , <i>fliYA</i> , <i>fliYB</i> , <i>fliYC</i> , <i>fliYD</i> , <i>fliYE</i> , <i>fliYF</i> , <i>fliYG</i> , <i>fliYH</i> , <i>fliYI</i> , <i>fliYJ</i> , <i>fliYK</i> , <i>fliYL</i> , <i>fliYM</i> , <i>fliYN</i> , <i>fliYO</i> , <i>fliYP</i> , <i>fliYQ</i> , <i>fliYR</i> , <i>fliYS</i> , <i>fliYT</i> , <i>fliYU</i> , <i>fliYV</i> , <i>fliYW</i> , <i>fliYX</i> , <i>fliYY</i> , <i>fliYZ</i> , <i>fliZA</i> , <i>fliZB</i> , <i>fliZC</i> , <i>fliZD</i> , <i>fliZE</i> , <i>fliZF</i> , <i>fliZG</i> , <i>fliZH</i> , <i>fliZI</i> , <i>fliZJ</i> , <i>fliZK</i> , <i>fliZL</i> , <i>fliZM</i> , <i>fliZN</i> , <i>fliZO</i> , <i>fliZP</i> , <i>fliZQ</i> , <i>fliZR</i> , <i>fliZS</i> , <i>fliZT</i> , <i>fliZU</i> , <i>fliZV</i> , <i>fliZW</i> , <i>fliZX</i> , <i>fliZY</i> , <i>fliZZ</i>
NO25	4568052	rST-59143	IncN	<i>aph</i> (6)-Ia, <i>aph</i> (3'')-Ib	<i>bla</i> _{TEM-1B} in	—	—	—	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (X4)	<i>AclA</i> , <i>acr</i> , <i>argA</i> , <i>fliC</i> , <i>fliD</i> , <i>fliE</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliH</i> , <i>fliI</i> , <i>fliJ</i> , <i>fliK</i> , <i>fliL</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliO</i> , <i>fliP</i> , <i>fliQ</i> , <i>fliR</i> , <i>fliS</i> , <i>fliT</i> , <i>fliU</i> , <i>fliV</i> , <i>fliW</i> , <i>fliX</i> , <i>fliY</i> , <i>fliZ</i> , <i>fliAA</i> , <i>fliAB</i> , <i>fliAC</i> , <i>fliAD</i> , <i>fliAE</i> , <i>fliAF</i> , <i>fliAG</i> , <i>fliAH</i> , <i>fliAI</i> , <i>fliAJ</i> , <i>fliAK</i> , <i>fliAL</i> , <i>fliAM</i> , <i>fliAN</i> , <i>fliAO</i> , <i>fliAP</i> , <i>fliAQ</i> , <i>fliAR</i> , <i>fliAS</i> , <i>fliAT</i> , <i>fliAU</i> , <i>fliAV</i> , <i>fliAW</i> , <i>fliAX</i> , <i>fliAY</i> , <i>fliAZ</i> , <i>fliBA</i> , <i>fliBB</i> , <i>fliBC</i> , <i>fliBD</i> , <i>fliBE</i> , <i>fliBF</i> , <i>fliBG</i> , <i>fliBH</i> , <i>fliBI</i> , <i>fliBJ</i> , <i>fliBK</i> , <i>fliBL</i> , <i>fliBM</i> , <i>fliBN</i> , <i>fliBO</i> , <i>fliBP</i> , <i>fliBQ</i> , <i>fliBR</i> , <i>fliBS</i> , <i>fliBT</i> , <i>fliBU</i> , <i>fliBV</i> , <i>fliBW</i> , <i>fliBX</i> , <i>fliBY</i> , <i>fliBZ</i> , <i>fliCA</i> , <i>fliCB</i> , <i>fliCC</i> , <i>fliCD</i> , <i>fliCE</i> , <i>fliCF</i> , <i>fliCG</i> , <i>fliCH</i> , <i>fliCI</i> , <i>fliCJ</i> , <i>fliCK</i> , <i>fliCL</i> , <i>fliCM</i> , <i>fliCN</i> , <i>fliCO</i> , <i>fliCP</i> , <i>fliCQ</i> , <i>fliCR</i> , <i>fliCS</i> , <i>fliCT</i> , <i>fliCU</i> , <i>fliCV</i> , <i>fliCW</i> , <i>fliCX</i> , <i>fliCY</i> , <i>fliCZ</i> , <i>fliDA</i> , <i>fliDB</i> , <i>fliDC</i> , <i>fliDD</i> , <i>fliDE</i> , <i>fliDF</i> , <i>fliDG</i> , <i>fliDH</i> , <i>fliDI</i> , <i>fliDJ</i> , <i>fliDK</i> , <i>fliDL</i> , <i>fliDM</i> , <i>fliDN</i> , <i>fliDO</i> , <i>fliDP</i> , <i>fliDQ</i> , <i>fliDR</i> , <i>fliDS</i> , <i>fliDT</i> , <i>fliDU</i> , <i>fliDV</i> , <i>fliDW</i> , <i>fliDX</i> , <i>fliDY</i> , <i>fliDZ</i> , <i>fliEA</i> , <i>fliEB</i> , <i>fliEC</i> , <i>fliED</i> , <i>fliEE</i> , <i>fliEF</i> , <i>fliEG</i> , <i>fliEH</i> , <i>fliEI</i> , <i>fliEJ</i> , <i>fliEK</i> , <i>fliEL</i> , <i>fliEM</i> , <i>fliEN</i> , <i>fliEO</i> , <i>fliEP</i> , <i>fliEQ</i> , <i>fliER</i> , <i>fliES</i> , <i>fliET</i> , <i>fliEU</i> , <i>fliEV</i> , <i>fliEW</i> , <i>fliEX</i> , <i>fliEY</i> , <i>fliEZ</i> , <i>fliFA</i> , <i>fliFB</i> , <i>fliFC</i> , <i>fliFD</i> , <i>fliFE</i> , <i>fliFF</i> , <i>fliFG</i> , <i>fliFH</i> , <i>fliFI</i> , <i>fliFJ</i> , <i>fliFK</i> , <i>fliFL</i> , <i>fliFM</i> , <i>fliFN</i> , <i>fliFO</i> , <i>fliFP</i> , <i>fliFQ</i> , <i>fliFR</i> , <i>fliFS</i> , <i>fliFT</i> , <i>fliFU</i> , <i>fliFV</i> , <i>fliFW</i> , <i>fliFX</i> , <i>fliFY</i> , <i>fliFZ</i> , <i>fliGA</i> , <i>fliGB</i> , <i>fliGC</i> , <i>fliGD</i> , <i>fliGE</i> , <i>fliGF</i> , <i>fliGG</i> , <i>fliGH</i> , <i>fliGI</i> , <i>fliGJ</i> , <i>fliGK</i> , <i>fliGL</i> , <i>fliGM</i> , <i>fliGN</i> , <i>fliGO</i> , <i>fliGP</i> , <i>fliGQ</i> , <i>fliGR</i> , <i>fliGS</i> , <i>fliGT</i> , <i>fliGU</i> , <i>fliGV</i> , <i>fliGW</i> , <i>fliGX</i> , <i>fliGY</i> , <i>fliGZ</i> , <i>fliHA</i> , <i>fliHB</i> , <i>fliHC</i> , <i>fliHD</i> , <i>fliHE</i> , <i>fliHF</i> , <i>fliHG</i> , <i>fliHH</i> , <i>fliHI</i> , <i>fliHJ</i> , <i>fliHK</i> , <i>fliHL</i> , <i>fliHM</i> , <i>fliHN</i> , <i>fliHO</i> , <i>fliHP</i> , <i>fliHQ</i> , <i>fliHR</i> , <i>fliHS</i> , <i>fliHT</i> , <i>fliHU</i> , <i>fliHV</i> , <i>fliHW</i> , <i>fliHX</i> , <i>fliHY</i> , <i>fliHZ</i> , <i>fliIA</i> , <i>fliIB</i> , <i>fliIC</i> , <i>fliID</i> , <i>fliIE</i> , <i>fliIF</i> , <i>fliIG</i> , <i>fliIH</i> , <i>fliII</i> , <i>fliIM</i> , <i>fliIN</i> , <i>fliIO</i> , <i>fliIP</i> , <i>fliIQ</i> , <i>fliIR</i> , <i>fliIS</i> , <i>fliIT</i> , <i>fliIU</i> , <i>fliIV</i> , <i>fliIW</i> , <i>fliIX</i> , <i>fliIY</i> , <i>fliIZ</i> , <i>fliJA</i> , <i>fliJB</i> , <i>fliJC</i> , <i>fliJD</i> , <i>fliJE</i> , <i>fliJF</i> , <i>fliJG</i> , <i>fliJH</i> , <i>fliJI</i> , <i>fliJJ</i> , <i>fliJK</i> , <i>fliJL</i> , <i>fliJM</i> , <i>fliJN</i> , <i>fliJO</i> , <i>fliJP</i> , <i>fliJQ</i> , <i>fliJR</i> , <i>fliJS</i> , <i>fliJT</i> , <i>fliJU</i> , <i>fliJV</i> , <i>fliJW</i> , <i>fliJX</i> , <i>fliJY</i> , <i>fliJZ</i> , <i>fliKA</i> , <i>fliKB</i> , <i>fliKC</i> , <i>fliKD</i> , <i>fliKE</i> , <i>fliKF</i> , <i>fliKG</i> , <i>fliKH</i> , <i>fliKI</i> , <i>fliKJ</i> , <i>fliKK</i> , <i>fliKL</i> , <i>fliKM</i> , <i>fliKN</i> , <i>fliKO</i> , <i>fliKP</i> , <i>fliKQ</i> , <i>fliKR</i> , <i>fliKS</i> , <i>fliKT</i> , <i>fliKU</i> , <i>fliKV</i> , <i>fliKW</i> , <i>fliKX</i> , <i>fliKY</i> , <i>fliKZ</i> , <i>fliLA</i> , <i>fliLB</i> , <i>fliLC</i> , <i>fliLD</i> , <i>fliLE</i> , <i>fliLF</i> , <i>fliLG</i> , <i>fliLH</i> , <i>fliLI</i> , <i>fliLJ</i> , <i>fliLK</i> , <i>fliLL</i> , <i>fliLM</i> , <i>fliLN</i> , <i>fliLO</i> , <i>fliLP</i> , <i>fliLQ</i> , <i>fliLR</i> , <i>fliLS</i> , <i>fliLT</i> , <i>fliLU</i> , <i>fliLV</i> , <i>fliLW</i> , <i>fliLX</i> , <i>fliLY</i> , <i>fliLZ</i> , <i>fliMA</i> , <i>fliMB</i> , <i>fliMC</i> , <i>fliMD</i> , <i>fliME</i> , <i>fliMF</i> , <i>fliMG</i> , <i>fliMH</i> , <i>fliMI</i> , <i>fliMJ</i> , <i>fliMK</i> , <i>fliML</i> , <i>fliMN</i> , <i>fliMO</i> , <i>fliMP</i> , <i>fliMQ</i> , <i>fliMR</i> , <i>fliMS</i> , <i>fliMT</i> , <i>fliMU</i> , <i>fliMV</i> , <i>fliMW</i> , <i>fliMX</i> , <i>fliMY</i> , <i>fliMZ</i> , <i>fliNA</i> , <i>fliNB</i> , <i>fliNC</i> , <i>fliND</i> , <i>fliNE</i> , <i>fliNF</i> , <i>fliNG</i> , <i>fliNH</i> , <i>fliNI</i> , <i>fliNJ</i> , <i>fliNK</i> , <i>fliNL</i> , <i>fliNM</i> , <i>fliNO</i> , <i>fliNP</i> , <i>fliNQ</i> , <i>fliNR</i> , <i>fliNS</i> , <i>fliNT</i> , <i>fliNU</i> , <i>fliNV</i> , <i>fliNW</i> , <i>fliNX</i> , <i>fliNY</i> , <i>fliNZ</i> , <i>fliOA</i> , <i>fliOB</i> , <i>fliOC</i> , <i>fliOD</i> , <i>fliOE</i> , <i>fliOF</i> , <i>fliOG</i> , <i>fliOH</i> , <i>fliOI</i> , <i>fliOJ</i> , <i>fliOK</i> , <i>fliOL</i> , <i>fliOM</i> , <i>fliON</i> , <i>fliOO</i> , <i>fliOP</i> , <i>fliOQ</i> , <i>fliOR</i> , <i>fliOS</i> , <i>fliOT</i> , <i>fliOU</i> , <i>fliOV</i> , <i>fliOW</i> , <i>fliOX</i> , <i>fliOY</i> , <i>fliOZ</i> , <i>fliPA</i> , <i>fliPB</i> , <i>fliPC</i> , <i>fliPD</i> , <i>fliPE</i> , <i>fliPF</i> , <i>fliPG</i> , <i>fliPH</i> , <i>fliPI</i> , <i>fliPJ</i> , <i>fliPK</i> , <i>fliPL</i> , <i>fliPM</i> , <i>fliPN</i> , <i>fliPO</i> , <i>fliPP</i> , <i>fliPQ</i> , <i>fliPR</i> , <i>fliPS</i> , <i>fliPT</i> , <i>fliPU</i> , <i>fliPV</i> , <i>fliPW</i> , <i>fliPX</i> , <i>fliPY</i> , <i>fliPZ</i> , <i>fliQA</i> , <i>fliQB</i> , <i>fliQC</i> , <i>fliQD</i> , <i>fliQE</i> , <i>fliQF</i> , <i>fliQG</i> , <i>fliQH</i> , <i>fliQI</i> , <i>fliQJ</i> , <i>fliQK</i> , <i>fliQL</i> , <i>fliQM</i> , <i>fliQN</i> , <i>fliQO</i> , <i>fliQP</i> , <i>fliQQ</i> , <i>fliQR</i> , <i>fliQS</i> , <i>fliQT</i> , <i>fliQU</i> , <i>fliQV</i> , <i>fliQW</i> , <i>fliQX</i> , <i>fliQY</i> , <i>fliQZ</i> , <i>fliRA</i> , <i>fliRB</i> , <i>fliRC</i> , <i>fliRD</i> , <i>fliRE</i> , <i>fliRF</i> , <i>fliRG</i> , <i>fliRH</i> , <i>fliRI</i> , <i>fliRJ</i> , <i>fliRK</i> , <i>fliRL</i> , <i>fliRM</i> , <i>fliRN</i> , <i>fliRO</i> , <i>fliRP</i> , <i>fliRQ</i> , <i>fliRR</i> , <i>fliRS</i> , <i>fliRT</i> , <i>fliRU</i> , <i>fliRV</i> , <i>fliRW</i> , <i>fliRX</i> , <i>fliRY</i> , <i>fliRZ</i> , <i>fliSA</i> , <i>fliSB</i> , <i>fliSC</i> , <i>fliSD</i> , <i>fliSE</i> , <i>fliSF</i> , <i>fliSG</i> , <i>fliSH</i> , <i>fliSI</i> , <i>fliSJ</i> , <i>fliSK</i> , <i>fliSL</i> , <i>fliSM</i> , <i>fliSN</i> , <i>fliSO</i> , <i>fliSP</i> , <i>fliSQ</i> , <i>fliSR</i> , <i>fliSS</i> , <i>fliST</i> , <i>fliSU</i> , <i>fliSV</i> , <i>fliSW</i> , <i>fliSX</i> , <i>fliSY</i> , <i>fliSZ</i> , <i>fliTA</i> , <i>fliTB</i> , <i>fliTC</i> , <i>fliTD</i> , <i>fliTE</i> , <i>fliTF</i> , <i>fliTG</i> , <i>fliTH</i> , <i>fliTI</i> , <i>fliTJ</i> , <i>fliTK</i> , <i>fliTL</i> , <i>fliTM</i> , <i>fliTN</i> , <i>fliTO</i> , <i>fliTP</i> , <i>fliTQ</i> , <i>fliTR</i> , <i>fliTS</i> , <i>fliTT</i> , <i>fliTU</i> , <i>fliTV</i> , <i>fliTW</i> , <i>fliTX</i> , <i>fliTY</i> , <i>fliTZ</i> , <i>fliUA</i> , <i>fliUB</i> , <i>fliUC</i> , <i>fliUD</i> , <i>fliUE</i> , <i>fliUF</i> , <i>fliUG</i> , <i>fliUH</i> , <i>fliUI</i> , <i>fliUJ</i> , <i>fliUK</i> , <i>fliUL</i> , <i>fliUM</i> , <i>fliUN</i> , <i>fliUO</i> , <i>fliUP</i> , <i>fliUQ</i> , <i>fliUR</i> , <i>fliUS</i> , <i>fliUT</i> , <i>fliUU</i> , <i>fliUV</i> , <i>fliUW</i> , <i>fliUX</i> , <i>fliUY</i> , <i>fliUZ</i> , <i>fliVA</i> , <i>fliVB</i> , <i>fliVC</i> , <i>fliVD</i> , <i>fliVE</i> , <i>fliVF</i> , <i>fliVG</i>

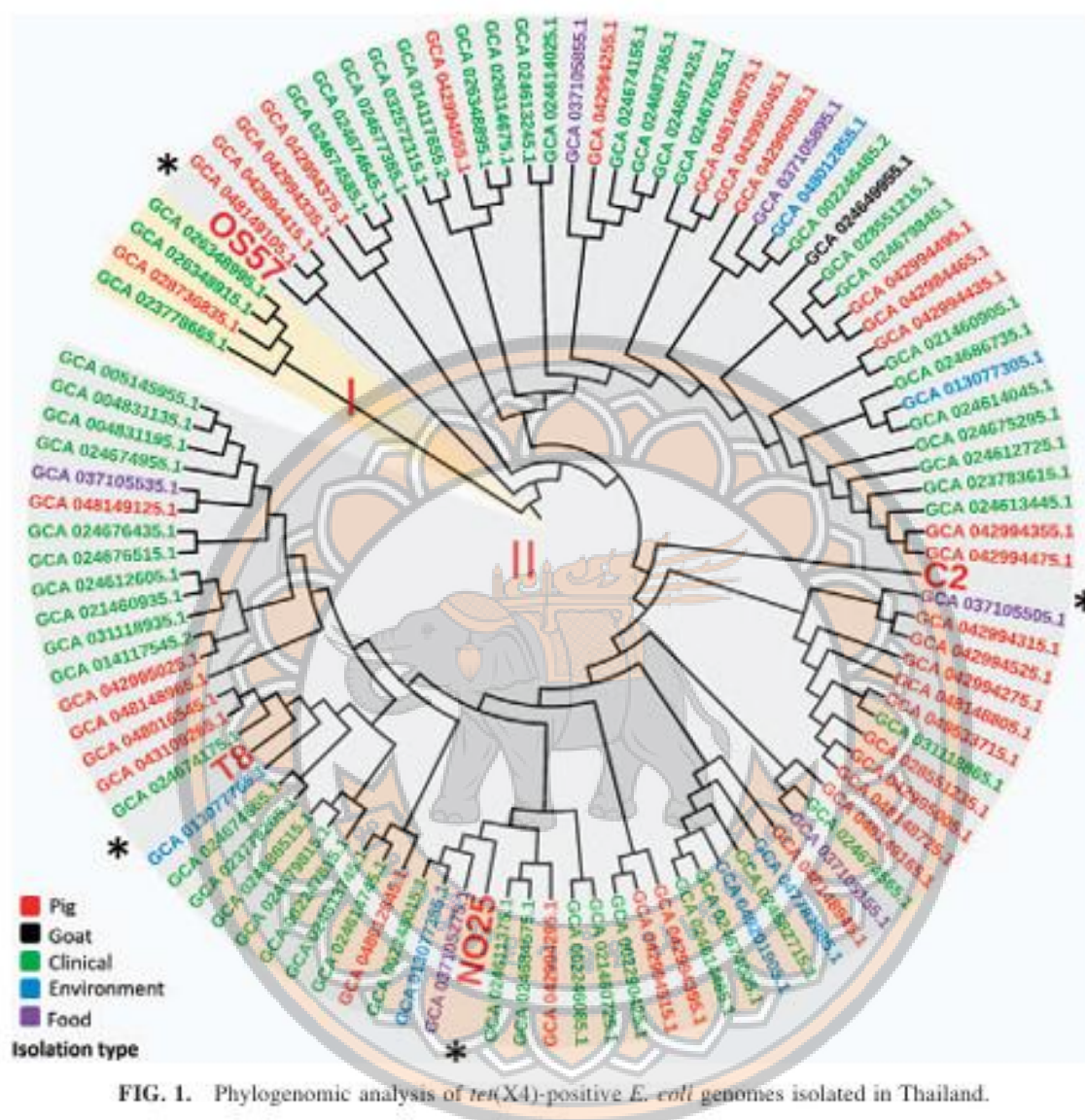


FIG. 1. Phylogenomic analysis of *tet(X4)*-positive *E. coli* genomes isolated in Thailand.

NO25. Strain T8 is of particular concern due to the presence of ESBL genes (*bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{TEM-215}) in combination with *tet(X4)* and *qnrS1*, representing resistance to last-line antibiotics across major classes. OS57 harbors the widest range of tetracycline resistance genes [*tet(A)*, *tet(M)*, and *tet(X4)*] and macrolide resistance [*mph(A)*], emphasizing its multidrug resistance (MDR) profile.

Genetic characterization of *tet(X4)*-carrying plasmids

In Table 2, C2 has the broadest set of virulence factors, including multiple adhesins (*csgA*, *fdeC*, *lpfA*, *traJ*, and *traT*), strong iron acquisition genes (*fyuA*, *irp2*, and *sitA*), the immune evasion gene *iss*, and capsule-associated genes (*kpsE* and *kpsMII_K5*), which together may indicate a higher pathogenic potential and likely association with extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) traits. OS57 carries a diverse combination of adhesins (*csgA*, *fdeC*, *fimH*, *traT*, and *usp*),

effectors (*hlyE* and *espY2*), and iron uptake genes (*chuaA* and *eilA*), along with capsule/antiphagocytic factors (*ompT* and *traT*), suggesting strong invasive capacity or potential extraintestinal virulence. NO25 and T8 are comparatively less virulent, lacking capsule genes and major iron acquisition systems. However, both still possess adhesins (*fimH*, *csgA*, and *fdeC*) and toxins such as *hlyE* (and *hha* in NO25), indicating possible cytotoxic activity and intestinal pathogenic potential. All strains share conserved LPS/outer membrane-related genes (*gad*, *yehA*, *yehB*, *yehC*, and *yehD*) and unclassified virulence-associated genes such as *AslA* and *terC*, which may contribute to environmental stress survival or resistance mechanisms.

Phylogenetic tree of *tet(X4)*-positive *E. coli* isolates

Phylogenomic analysis was conducted on 103 *tet(X4)*-positive *E. coli* genomes isolated in Thailand (Supplementary Table S2). Phylogenomic results indicated that *tet(X4)*-

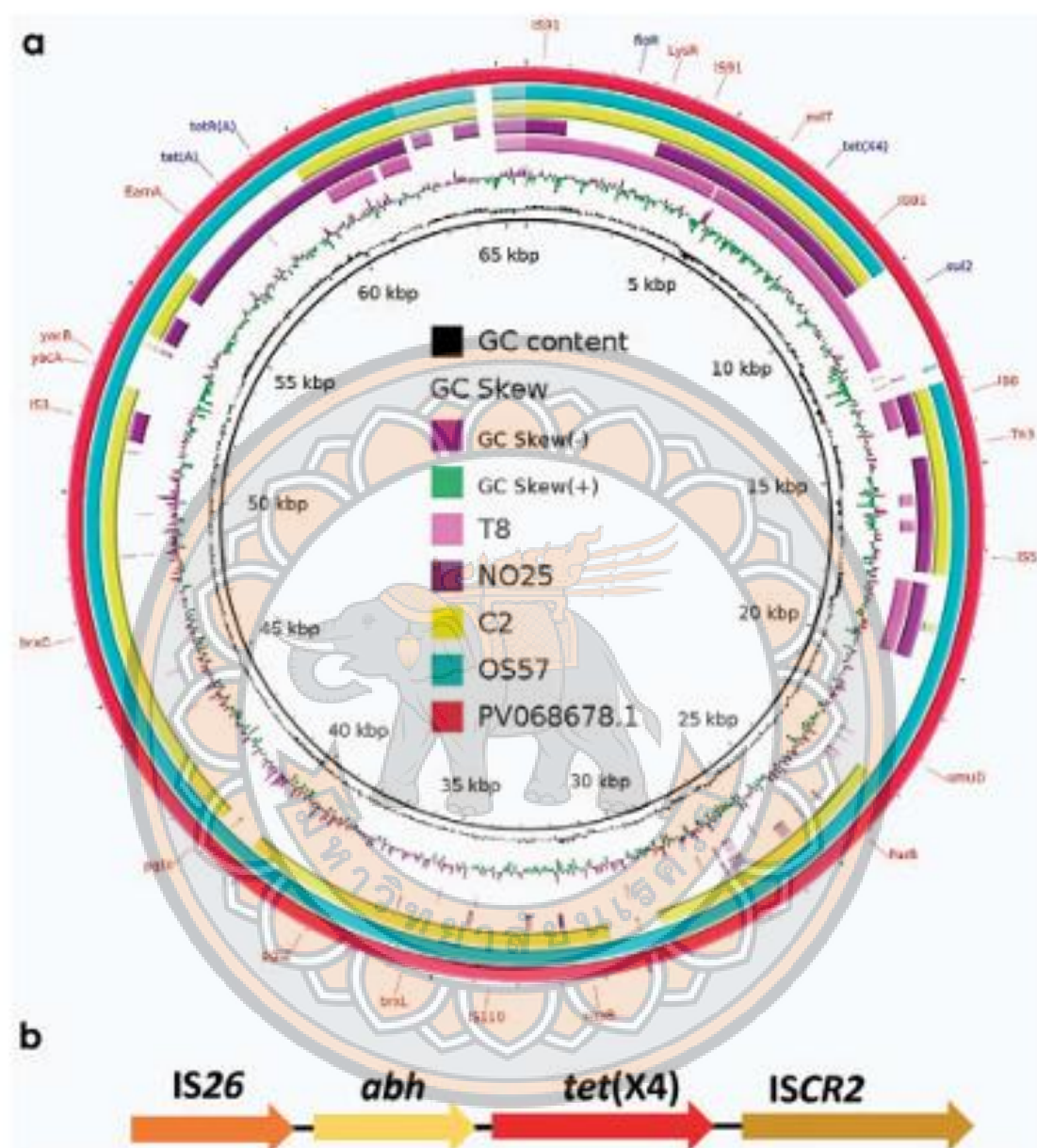


FIG. 2. Comparative analysis of the *tet(X4)*-carrying plasmids. (a) Circular plasmid map aligned against reference plasmid PV065678.1. (b) Schematic representation of *tet(X4)*-associated transposon units.

producing *E. coli* isolates evolved into lineages I and II (Fig. 1). All these two lineages were mixed clusters, which were composed of isolates from different sources, including pigs, goats, clinical samples, environment, and food. Four isolates from weaning pigs belonged to the lineages II.

All plasmids (T8, NO25, C2, and OS57) showed substantial alignment to the reference plasmid PV065678.1, indicating high similarity. The figure was annotated in blue (AMR genes) and red (mobile elements or other important genes). The high degree of similarity and shared resistance genes indicate a common evolutionary origin, with potential for widespread AMR gene dissemination in Thailand.

Genetic environment of *tet(X4)*-producing *E. coli*

As shown in Table 1, plasmids NO25 and T8 were identified as IncN type, while OS57 and C2 belonged to the IncR type. A comparative plasmid map harboring *tet(X4)* was shown in Figure 2 with another published plasmid, PV065678.1. Previous research has classified *tet(X4)* transposon units into four forms (I, II, III, and IV), namely *IS26-tet(X4)-ISCR2*, *ΔIS1R-tet(X4)-ISCR2*, *ISCR2-tet(X4)-ISCR2*, and *ISCR2-tet(X4)-ΔISCR2*.¹² The transposable element *ISCR2* is most frequently found in association with the *tet(X4)* gene. All four *tet(X4)*-producing *E. coli* isolates (NO25, T8, OS57, and C2) were

found to share the same genetic context, carrying the IS26-*tet(X4)*-ISCR2 element.

Discussion

Tigecycline is regarded as a last-resort antibiotic for the treatment of severe infections caused by MDR Gram-negative bacteria. However, the emergence of tigecycline-resistant bacteria, particularly those harboring *tet(X4)*, poses a serious threat to both human and animal health. *E. coli* is considered the primary reservoir of *tet(X4)*, although recent reports have identified the gene in other species such as *Citrobacter freundii*⁴ and *Klebsiella pneumoniae*.³⁰ The various sources were detected, including clinical, environment, animals, and food products,^{31–35} highlighting its broad ecological distribution.

Globally, the prevalence of *tet(X4)*-carrying *E. coli* varies among regions. In China, large-scale surveillance has revealed that *tet(X4)* is highly prevalent in pigs, poultry, and their associated environments, with detection rates ranging from 5% to 30% depending on farm type and region.^{3,7} Similar findings have been reported in Vietnam, Pakistan, and Turkey, where *tet(X4)* has been detected in both animal and food sources.^{12,34,36} In Europe, sporadic cases of *tet(X4)*-positive *E. coli* have been identified in imported meat products and animal feces, suggesting transboundary dissemination through the food trade. In contrast, reports from North America remain limited, possibly due to differences in antimicrobial usage patterns and surveillance intensity.¹²

Molecular epidemiology studies indicate that *tet(X4)*-positive *E. coli* isolates are genetically diverse, belonging to multiple STs such as ST10, ST48, ST155, ST746, ST206, and ST2179.^{5,34} These STs are commonly associated with commensal lineages found in livestock and human gut microbiota, indicating their potential to act as reservoirs for resistance gene exchange. In the present study, the four *tet(X4)*-carrying isolates belonged to distinct ribosomal STs (rST-153719, rST-59143, rST-45855, and rST-86073), suggesting independent acquisition events rather than clonal spread within farms.

Plasmid analysis revealed that *tet(X4)* is frequently located on conjugative plasmids of diverse incompatibility groups, most notably IncX1, IncFIA/B, IncHI1A/B, IncQ4, IncN, and IncR.^{5,14} These broad-host-range plasmids are known to mediate horizontal gene transfer across different bacterial species and ecological niches. In this study, the *tet(X4)* gene was carried on IncN and IncR plasmids, which have also been reported in clinical *E. coli* and *Klebsiella* isolates in China and Southeast Asia, implying potential interspecies and inter-host transmission routes.

The *tet(X4)* gene is commonly associated with insertion sequences and transposons that facilitate its mobilization. Four major transposon architectures have been described: type I [IS26-*tet(X4)*-ISCR2], type II [Δ IS1R-*tet(X4)*-ISCR2], type III [ISCR2-*tet(X4)*-ISCR2], and type IV [ISCR2-*tet(X4)*- Δ ISCR2].^{13,14,37} Among these, ISCR2 is most frequently implicated, promoting the co-transfer of *tet(X4)* alongside neighboring resistance genes such as *catD* (chloramphenicol resistance). This genetic context contributes to the persistence and rapid dissemination of *tet(X4)* within bacterial populations.

Phylogenomic comparisons further support that *tet(X4)*-positive *E. coli* strains from different sources cluster into multiple lineages, often intermixed between human, animal, and environmental isolates.^{37,38} Such findings indicate that the spread of *tet(X4)* is primarily driven by plasmid-mediated horizontal

transfer rather than clonal expansion. The presence of identical plasmid backbones in isolates from diverse sources suggests ongoing interspecies and inter-regional transmission events, potentially facilitated by trade in live animals and food products.

Overall, the detection of *tet(X4)*-positive *E. coli* in healthy weaning pigs in Thailand represents an early warning signal of emerging tigecycline resistance in Southeast Asia. These findings underscore the need for coordinated surveillance integrating the One Health framework to monitor *tet(X)*-mediated resistance in humans, animals, and the environment. Strengthening antimicrobial stewardship and implementing genomic surveillance at the animal–human–environment interface will be essential to prevent the further spread of *tet(X4)* and safeguard the efficacy of last-resort antibiotics such as tigecycline.

Authors' Contributions

P.A. and N.A. designed and supervised the study. P.A., W.L., P.R.N., A.K., and N.A. contributed to data generation, analysis, figure preparation, and article drafting. All authors reviewed and approved the final article.

Author Disclosure Statement

The authors declare no competing financial interests.

Funding Information

This study was supported by Naresuan University (NU), and National Science, Research and Innovation Fund (NSRF) Grant NO. R2568B053.

Supplementary Material

Supplementary Table S1
Supplementary Table S2

References

- Rose WE, Rybak MJ. Tigecycline: First of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 2006;26(8):1099–1110.
- Sun Y, Cai Y, Li X, et al. The emergence of clinical resistance to tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41(2):110–116.
- Sun C, Cui M, Zhang S, et al. Genomic epidemiology of animal-derived tigecycline-resistant *Escherichia coli* across China reveals recent endemic plasmid-encoded *tet(X4)* gene. *Commun Biol* 2020;3(1):412.
- Li R, Li Y, Peng K, et al. Comprehensive genomic investigation of tigecycline resistance gene *tet(X4)*-bearing strains expanding among different settings. *Microbiol Spectr* 2021; 9(3):e01633-21.
- Li Y, Li Y, Bu K, et al. Antimicrobial resistance and genomic epidemiology of *tet(X4)*-bearing bacteria of pork origin in Jiangsu, China. *Genes (Basel)* 2022;14(1):36.
- He T, Wang R, Liu D, et al. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. *Nat Microbiol* 2019;4(9):1450–1456; doi: 10.1038/s41564-019-0445-2
- Fu Y, Chen Y, Liu D, et al. Abundance of tigecycline resistance genes and association with antibiotic residues in Chinese livestock farms. *J Hazard Mater* 2021;409:124921.
- Nasraddin NA, Haeili M, Karimzadeh S, et al. Tetracycline and chloramphenicol exposure induce decreased susceptibility to tigecycline and genetic alterations in AcrAB-TolC efflux

- pump regulators in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One* 2025;20(1):e0315847.
9. Zhang S, Wen J, Wang Y, et al. Dissemination and prevalence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance gene tet (X4). *Front Microbiol* 2022;13:969769.
 10. Cui Z-H, Zheng Z-J, Tang T, et al. Rapid detection of high-level tigecycline resistance in Tet (X)-producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter* spp. based on MALDI-TOF MS. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:583341.
 11. Kumar H, Williford EE, Blake KS, et al. Structure of anhydrotetracycline-bound Tet (X6) reveals the mechanism for inhibition of type 1 tetracycline dehydratases. *Commun Biol* 2023;6(1):423.
 12. Zhang Z, Zhan Z, Shi C. International spread of Tet (X4)-producing *Escherichia coli* isolates. *Foods* 2022;11(14):2010.
 13. Fang LX, Chen C, Cui CY, et al. Emerging high-level tigecycline resistance: Novel tetracycline dehydratases spread via the mobile Tet (X). *Bioessays* 2020;42(8):e2000014.
 14. Liu D, Wang T, Shao D, et al. Structural diversity of the ISCR2-mediated rolling-cycle transferable unit carrying tet (X4). *Sci Total Environ* 2022;826:154010.
 15. Hsieh Y-C, Wu J-W, Chen Y-Y, et al. An outbreak of tet (X6)-carrying tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with a new capsular type at a Hospital in Taiwan. *Antibiotics (Basel)* 2021;10(10):1239.
 16. Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, et al. Overview of Changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, 31st Edition. *J Clin Microbiol* 2021;59(12):e0021321; doi: 10.1128/jcm.00213-21
 17. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. *Babraham Bioinformatics*; 2010.
 18. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30(15):2114–2120; doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
 19. De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, et al. NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics* 2018;34(15):2666–2669.
 20. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 2017;13(6):e1005593.
 21. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, et al. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;29(8):1072–1075.
 22. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(7):3895–3903.
 23. Bortoloti V, Kaas RS, Ruppe E, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2020;75(12):3491–3500.
 24. Malberg Tetzschner AM, Johnson JR, Johnston BD, et al. In silico genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol* 2020;58(10):e01269–e01220.
 25. Alikhan N-F, Petty NK, Ben Zakour NL, et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 2011;12:402–410.
 26. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: A genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 2011;27(7):1009–1010; doi: 10.1093/bioinformatics/btr039
 27. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res* 2015;43(3):e15; doi: 10.1093/nar/gku1196
 28. Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 2014;30(9):1312–1313; doi: 10.1093/bioinformatics/btu033
 29. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res* 2024;52(W1):W78–W82; doi: 10.1093/nar/gkac268
 30. Yue C, Gao X, Lu L, et al. First detection of tet (X4)-positive Enterobacterales in retail vegetables and clonal spread of *Escherichia coli* ST195 producing Tet (X4) in animals, foods, and humans across China and Thailand. *Int J Food Microbiol* 2023;391–393:110145.
 31. Chen T, Zhao M, Tang X, et al. Serious risk of tigecycline resistance in *Escherichia coli* isolated from swine manure. *Microb Ecol* 2022;86(2):947–958.
 32. Feng J, Su M, Li K, et al. Extensive spread of tet (X4) in multidrug-resistant *Escherichia coli* of animal origin in western China. *Vet Microbiol* 2022;269:109420.
 33. Li Y, Peng K, Yin Y, et al. Occurrence and molecular characterization of abundant tet (X) variants among diverse bacterial species of chicken origin in Jiangsu, China. *Front Microbiol* 2021;12:751006.
 34. Mohsin M, Hassan B, Martins WM, et al. Emergence of plasmid-mediated tigecycline resistance tet (X4) gene in *Escherichia coli* isolated from poultry, food and the environment in South Asia. *Sci Total Environ* 2021;787:147613.
 35. Ma L, Xie M, Yang Y, et al. Prevalence and genomic characterization of clinical *Escherichia coli* strains that harbor the plasmid-borne tet(X4) gene in China. *Microbiol Res* 2024;285:127730; doi: 10.1016/j.micres.2024.127730
 36. Kurekci C, Lu X, Sahin S, et al. Detection and whole-genome analysis of tigecycline resistant *Escherichia coli* in poultry and meat samples in Türkiye. *Poult Sci* 2025;104(2):104707; doi: 10.1016/j.psj.2024.104707
 37. Sun H, Zhu W, Fu Y, et al. Co-occurrence of plasmid-mediated resistance genes tet (X4) and blaNDM-5 in a multidrug-resistant *Escherichia coli* isolate recovered from chicken in China. *J Glob Antimicrob Resist* 2021;24:415–417.
 38. Cui C-Y, Li X-J, Chen C, et al. Comprehensive analysis of plasmid-mediated tet(X4)-positive *Escherichia coli* isolates from clinical settings revealed a high correlation with animals and environments-derived strains. *Sci Total Environ* 2022;806(Pt 2):150687; doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150687

Address correspondence to:

Niran Aeksiri
Department of Agricultural Sciences
Faculty of Agriculture
Natural Resources, and Environment
Naresuan University
Phitsanulok
Thailand

E-mail: nirana@nu.ac.th