ผลของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งแบคทีเรีย Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)
Effect of Bacteriophage on the inhibition of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)

ณัฐธิดา สังวาลย์วงษ์[1]
รศ.ดร.วิริยา ลุ้งใหญ่[2]
Email: agrwyl@ku.ac.th
ผศ.ดร.พงศ์ธร คงมั่น[3]
Email: fagrptk@ku.ac.th
[1]นิสิตระดับปริญญาโท สาขาโภชนศาสตร์สัตว์อุตสาหกรรม คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Email: natthida.sang@ku.th
[2,3]อาจารย์ สาขาโภชนศาสตร์สัตว์อุตสาหกรรม คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้ง *E. coli* ก่อโรคในสัตว์ ซึ่งถูกจำแนกเป็น Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) จำนวน 5 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค Real time PCR ตรวจหายีน F18 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Agar disk diffusion พบว่า ETEC ทั้ง 5 ไอโซเลท ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอะม็อกซีซิลลิน และดื้อยาปฏิชีวนะโคลิสติน 1 ไอโซเลท แบคเทอริโอเฟจที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี Spot test และ Plaque assay ความเข้มข้น $1x10^4$-$1x10^5$ PFU/mL พบว่าแบคเทอริโอเฟจมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ ETEC จากผลการทดสอบข้างต้นแสดงถึงคุณสมบัติของไลติกเฟจนั้นมีความจำเพาะต่อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรค

คำสำคัญ: แบคเทอริโอเฟจ, Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), ยาปฏิชีวนะ

Abstract

This study was performed to investigate the efficacy of *E. coli* targeting bacteriophage to inhibit an animal pathogenic *E. coli* strain. The 5 isolated *E. coli* were isolated and identified (F18 gene) enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) by Real-time PCR technique. Determination of amoxicillin and colistin resistance was tested by Agar disk diffusion assay, five isolates were resistant to amoxicillin and 1 isolate to colistin. Bacteriophage titers observed between $1x10^4$-$1x10^5$ PFU/mL showed high efficacy of bacteriophage for inhibiting growth of ETEC by Spot test and plaque assay methods. These results indicated a great potential lytic *E. coli* specific bacteriophage on growth of pathogenic *E. coli*.

Keywords: Bacteriophage, Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Antibiotic

บทนำ

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน Phylum Proteobacteria Family Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นรูปแท่ง เคลื่อนที่โดยอาศัย Flagella ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ได้สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนที่ระดับ pH 4–10 โดยบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของ *E. coli* มีแคปซูลห่อหุ้มเซลล์ทำให้ทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดี *E. coli* ที่ก่อโรคในสัตว์คือ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC, ETEC, EHEC, EAEC เป็นต้น) สายพันธุ์ *E. coli* ที่ทำให้ลูกสุกรเกิดอาการท้องเสีย โดยส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ ETEC ซึ่งจะมีการผลิตสารที่ช่วยในยึดเกาะของเชื้อบริเวณลำไส้ และผลิตสารพิษ enterotoxins ที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วง (Fairbrother et al., 2005) *E. coli* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้บ่อยในสุกร พบมากในทางเดินอาหารของสุกร พบการติดเชื้อได้ในทุกช่วงอายุโดยเฉพาะลูกสุกร (Kamada et al., 2012) ซึ่งมีปัจจัยมาจากการเปลี่ยนอาหารจากนมแม่เป็นอาหารเลียราง การเกิดความเครียดจากการถูกแยกออกจากแม่สุกร รวมถึงการจัดการภายในคอกเลี้ยง การปนเปื้อนในอาหาร และการที่สัตว์หายใจเอาเชื้อเข้าไป การติดเชื้อ *E. coli* นั้นจะส่งผลให้เนื้อเยื่อทางเดินอาหารและลำไส้ของลูกสุกรถูกทำลาย ส่งผลต่อการย่อยและการดูดซึมสารอาหาร ซึ่งเป็นปัญหาที่พบมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้การเลี้ยงสัตว์ในอดีตมีการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดอัตราการตายเพื่อเพิ่มผลผลิตรวมไปถึงการใช้ยาเพื่อควบคุมโรคของสัตว์ นำไปสู่การเจริญเติบโตของตัวสัตว์ที่ดีขึ้น (Midilli and Çakır, 2008) อีกทั้งระยะการเลี้ยงสุกรที่เป็นจุดวิกฤติ และต้องการการดูแลจัดการอย่างดี คือช่วงระยะสุกรหย่านม พบว่าลูกสุกรมีการเจริญเติบโตที่ต่ำลงและเกิดโรคท้องเสีย (Diao et al. 2014) สาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงอาหารของลูกสุกรจากนมแม่มาเป็นอาหาร และความเครียด (Lallès et al. 2004) จึงทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต ป้องกันและใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อ อย่างไรก็ตามผลกระทบที่ตามมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะคือการดื้อยาของจุลินทรีย์ และก่อให้เกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภค ทำให้สหภาพยุโรปและรัฐบาลหลายประเทศมีนโยบายในการงดใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ (Huges and Heritage 2004)

ปัจจุบันจึงมีการเลือกใช้สารต้านจุลินทรีย์ (Antibacterial agents) ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อส่งเสริมให้สุกรมีสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารที่ดีขึ้น และไม่ส่งผลกระทบกับสมรรถภาพการผลิต เนื่องจากสารบางชนิดมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะ แต่ไม่เกิดการตกค้างหรือมีการดื้อยาของแบคทีเรียเกิดขึ้น (Bowring et al., 2006) ตัวอย่างสารต้านจุลินทรีย์ เช่น แบคเทอรีโอเฟจ (Bacteriophage) คือ ไวรัสที่สามารถเข้าทำลายและเลือกฆ่าแบคทีเรียเท่านั้น (Satyabrat et al., 2021) ซึ่งสามารถพบได้หลากหลายในธรรมชาติ เช่น ในน้ำเกลือ แหล่งน้ำ ในดิน หรือแม้แต่ในลำไส้ของสัตว์ (Clokie et al., 2011) โดยแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ (Host) และไม่ทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Gu et al., 2012) ในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรมีการนำแบคเทอริโอเฟจมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากติดเชื้อจากแบคทีเรีย (Stephen et al., 2011) นิยมใช้แบคเทอริโอเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบ Lytic pathway เนื่องจากเป็นแบคเทอริโอเฟจที่ทำให้เซลล์โฮสต์แตก (lysis) โดยการทำลาย peptidoglycan ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถทนต่อแรงดันภายในเซลล์ได้ ทำให้เซลล์แตกในที่สุด (Oliveira et al., 2013)

จากเหตุผลข้างต้นทำให้งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการใช้ แบคเทอริโอเฟจ และยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ก่อโรค เพื่อนำไปสู่การพัฒนาสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสุกรที่มีคุณภาพและผลิตภัณฑ์จากผลผลิตที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการต้านทานยาปฏิชีวนะของ *E. coli*
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจ ต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*

ขอบเขตการวิจัย

1. ทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ ของ *E. coli* 10^8 cfu/mL จำนวน 5 ตัวอย่าง (*E. coli* no.1-5) โดยกำหนดชนิดของยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ทดสอบ คือ ยาปฏิชีวนะ Amoxicillin และ Colistin
2. ทดสอบผลของแบคเทอริโอเฟจที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 1×10^4, 2×10^4, 3×10^4, 4×10^4, 5×10^4 และ 1×10^5 PFU/mL ต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli*

ตัวอย่าง *E. coli* ที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเบื้องต้น โดยนำเชื้อที่ได้รับเลี้ยงลงในอาหาร Luria Bertani Broth (LB broth) นำเข้าตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงในหลอดที่เลี้ยงเชื้อ *E. coli* แล้วนำมา Cross streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MacConkey agar จากนั้นนำเข้าบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว เมื่อครบเวลาจะพบโคโลนีที่มีลักษณะกลม ขอบเรียบ และมีโคโลนีสีชมพู (William et al., 1980) และตรวจสอบยืนยัน *E. coli* โดยการตรวจจับยีน 18F F5'TGGCACTGTAGGAGATACCATTCAGC3' และ F18 R5'GGTTTGACCACCTTTCAGTTGAGCAG3' (Zhang et al., 2007) ด้วยเทคนิค Real-time PCR

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี Agar disc diffusion เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ 2% LB broth agar และ 0.2% LB broth agar หลอดละ 4 มิลลิลิตร ที่ใช้สำหรับเททับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการอุ่นใน water bath ตลอดเพื่อป้องกันการแข็งตัวของอาหาร นำ 0.2% LB broth agar 4 มิลลิลิตร ผสมกับ *E. coli* 10^8 cfu/mL ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงให้เข้ากัน นำเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ให้กระจายสม่ำเสมอทั่วกันทั้งเพลท จากนั้นใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบแผ่นยาปฏิชีวนะ (Oxoid, England) วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ คือ Amoxicillin และ Colistin จากนั้นนำเข้าบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการอ่านผลการทดสอบโดยวัดขนาดอ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดของโซนใส (inhibition zone) นำไปเปรียบเทียบมาตรฐานของ CLSI (2014)

การทดลองที่ 2 การทดสอบผลของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*

ตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจที่ใช้ในการทดสอบในงานวิจัยครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท พาทเวย์ อินเตอร์มีเดียตส์ (ประเทศไทย) จำกัด ทำการคัดเลือก *E. coli* จากการทดลองที่ 1 จำนวน 1 ตัวอย่าง นำมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth นำเข้าบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเจือจางตัวอย่าง *E. coli* ให้มีความเข้มข้น 10^8 cfu/mL แล้วจึงนำมาใช้ทำการทดสอบคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้ง *E. coli* โดยวิธี Plaque assay การนับจำนวน plaque เพื่อคำนวนปริมาณของแบคเทอริ-โอเฟจ ในหน่วย PFU/ml โดยการนำตัวอย่างของแบคเทอริโอเฟจที่มีระดับความเข้มข้น 1×10^4, 2×10^4, 3×10^4, 4×10^4, 5×10^4 และ 1×10^5 PFU/mL มาทำการละลายในสารละลายบัพเฟอร์ แล้วนำแบคเทอริโอเฟจแต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ *E. coli* 10^8 cfu/mL ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.2% LB broth agar ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นำไปเทลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% LB broth agar หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้วุ้นกระจายทั่วทั้งจาน วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนให้วุ้นแข็งตัว แล้วจึงนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะพบจุดใส (plaque) ขึ้นบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการนับจำนวนจุดใสที่เกิดขึ้นเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ

การทดสอบคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจในการยับยั้ง *E. coli* ด้วยวิธี Spot test เพื่อดูบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) โดยการนำ *E. coli* 10^8 cfu/mL ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.2% LB broth agar ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วนำไปเทลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% LB broth agar ทิ้งไว้ให้แข็งตัว ทำการแบ่งช่องเพื่อทำการหยดตัวอย่างของ แบคเทอริโอเฟจแต่ละระดับความเข้มข้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในแต่ละช่อง จากนั้นนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหากพบการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) แสดงถึงความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้ง *E. coli*

ผลการวิจัย

การทดสอบพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเบื้องต้น ของ *E. coli* จำนวน 5 ตัวอย่าง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MacConkey agar พบว่าเกิดโคโลนีที่มีลักษณะกลม ขอบเรียบ และมีโคโลนีสีชมพู ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของ *E. coli* และจากการตรวจสอบยืนยัน *E. coli* ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่า *E. coli* ทั้ง 5 ตัวอย่าง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก เนื่องจากสามารถตรวจจับยีน F18 (ETEC) ได้

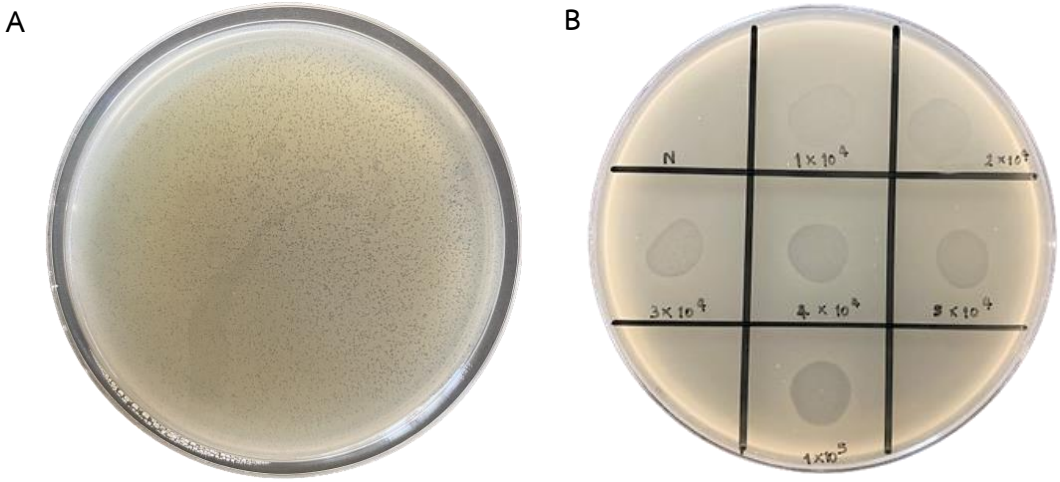
การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* ทั้ง 5 ตัวอย่าง (*E. coli* no.1-5) ด้วยวิธี agar disc diffusion ผลการทดสอบพบว่า *E. coli* ทั้ง 5 ตัวอย่าง ดื้อต่อยา Amoxicillin เนื่องจากไม่เกิดบริเวณการยับยั้งต่อแผ่นยา Amoxicillin และผลการวิเคราะห์ความดื้อต่อยา Colistin พบว่า *E. coli* no.2 มีความไวต่อยา Colistin น้อยที่สุด เนื่องจากมีบริเวณการยับยั้งที่วัดได้เท่ากับ 11.5 มิลลิเมตร ในขณะที่ตัวอย่างอื่น มีบริเวณการยับยั้งที่วัดได้อยู่ระหว่าง 15.5-18.5 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับเชื้อควบคุม *E. coli* ATCC29522 (สายพันธุ์ปกติ) และ *E. coli* R (สายพันธุ์ดื้อยา) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli*

Bacterial strains	Inhibition zone of antibiotics (mm)		
	Amoxicillin (20 μg/disc)	Colistin (20 μg/disc)	Tetracycline (30 μg/disc)
Escherichia coli no.1	-*	15.5	9 (R)*
Escherichia coli no.2	-	11.5	ND*
Escherichia coli no.3	-	18.5	ND
Escherichia coli no.4	-	15.0	8.5 (R)
Escherichia coli no.5	-	18.0	ND
Escherichia coli R	-	15.5	7 (R)
Escherichia coli ATCC29522	19.5	17.0	22

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่เกิดการยับยั้ง
ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์
R หมายถึง ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* โดยวิธี Plaque assay ผลการทดสอบพบว่า การทดสอบแบคเทอริโอเฟจที่ระดับความเข้มข้น 1×10^4, 2×10^4, 3×10^4, 4×10^4, 5×10^4 และ 1×10^5 PFU/mL ต่อ *E. coli* นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* เนื่องจากพบจุดใส (plaque) ขึ้นกระจายบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1A) อีกทั้งการทดสอบคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่ระดับความเข้มข้น 1×10^4, 2×10^4, 3×10^4, 4×10^4, 5×10^4 และ 1×10^5 PFU/mL ต่อการเจริญของ *E. coli* ด้วยวิธี Spot test ให้ผลการทดสอบเป็นบวก เนื่องจากปรากฏบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1B)



ภาพที่ 1 การทดสอบ Plaque assay ที่ให้ผลเป็นบวก (A) และ การเกิด inhibition zone บริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ทำการทดสอบโดยวิธี Spot test (B)

อภิปรายผลการวิจัย

จากการทำการวิจัยพบว่า *E. coli* (ETEC) มีการดื้อยาปฏิชีวนะ Amoxicillin และ *E. coli* (ETEC) บางสายพันธุ์นั้นเริ่มดื้อต่อยาปฏิชีนะ Colistin แสดงให้เห็นว่าการใช้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* (ETEC) ได้ และมีแนวโน้มที่เชื้อจะดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นเพิ่มขึ้น ดังรายงานของ Thomas et al., 2015 นอกจากนี้ในการทดสอบแบคเทอริโอเฟจต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* (ETEC) พบว่าแบคเทอริโอเฟจมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* (ETEC) ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Litt et al., 2018 และ Cha et al., 2012 ด้วยผลการทดลองในงานวิจัยในครั้งนี้ สามารถแสดงให้เห็นเบื้องต้นว่าการเลือกใช้แบคเทอริโอเฟจ เป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการตกค้างและการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐาน ซึ่งสามารถนำผลการทดลองที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่น และสามารถนำไปปรับใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรให้มีคุณภาพและปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก บริษัท พาทเวย์ อินเตอร์มีเดียตส์ (ประเทศไทย) จำกัด และขอบคุณภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน ที่สนับสนุนสถานที่ ห้องปฏิบัติการในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Bowring F. J., P. J. Yeadon, R. G. Stainer and D. E. Catcheside. (2006) Chromosome pairing and meiotic recombination in Neurospora crassa spo11 mutants. **Curr Genet**, 50: 115-23.

Cha, S.B., A.N.Yoo, W.J.Lee, M.K.Shin, M.H.Jung, S.W.Shin, Y.W.Cho and H.S.Yoo. (2012) Effect of bacteriophage in enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) infected pigs, **J Vet Med Sci**, 74: 1037-9.

Clokie, M. R., A. D. Millard, A. V. Letarov, and S. Heaphy. (2011) Phages in nature. **Bacteriophage**, 1: 31-45.

Fairbrother, J. M., E. Nadeau, and C. L. Gyles. (2005) Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews** , 6: 17-39.

Gu, J., X. Liu, Y. Li, W. Han, L. Lei, Y. Yang, H. Zhao, Y. Gao, J. Song, R. Lu, C. Sun, and X. Feng. (2012) A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. **PLOS ONE**, 7: e31698.

H. Diao, P. Zheng, B. Yu, J. He, X.B. Mao, J. Yu, D.W. Chen. (2014) Effects of dietary supplementation with benzoic acid on intestinal morphological structure and microflora in weaned piglets. **Livestock Science**, P.249–256

Hughes P., Heritage J. (2004) Antibiotic growth-promotors in food animals. **FAO Animal Production and Health**, No.160 pp.152.

Jean-Paul LALLÈS, Gaëlle BOUDRY, Christine FAVIER, Nathalie LE FLOC'H, Isabelle LURON, Lucile MONTAGNE, Isabelle P. OSWALD, Sandrine PIÉ, Christelle PIEL and Bernard SÈVE. (2004) Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. **Anim. Res**, P. 301–316

Kamada N, Kim YG, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, Nunez G. (2012) Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. **Science**, 336: 1325-1329

Litt, P. K., J. Saha, and D. Jaroni. 2018. Characterization of Bacteriophages Targeting Non-O157 Shiga Toxigenic Escherichia coli, **Journal of Food Protection**, Vol. 81, Pages 785–794

M. Midilli, M. Alp, N. Kocabağlı, Ö.H. Muğlalı, N. Turan, H. Yılmaz , and S. Çakır. (2008) Effects of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth performance and serum IgG concentration of broilers. **South African Journal of Animal Science**, 38(1)

Oliveira, Luís D. R. Melo, Sílvio B. Santos, Franklin L. Nóbrega, Eugénio C. Ferreira, Nuno Cerca, Joana Azeredo, Leon D. Kluskens. (2013) Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins. **Journal of Virology**, P. 4558 – 4570

Rosine Manishimwe, Paola M. Moncada, Marie Bugare, H. Morgan Scott, Guy H. Loneragan. (2021) Antibiotic resistance among Escherichia coli and Salmonella isolated from dairy cattle feces in Texas. **PLOS ONE**, 16: e0242390

Satyabrat Dutta DR., Dr. Richa Sarkar, Dr. Kaushik Poran Bordoloi, Dr. Champak Deka and Dr. Palash Jyoti Sonowal. (2021) Bacteriophage therapy to combat antibiotic resistance: A brief review. **The Pharma Innovation Journal**, 10(5): 389-394

Stephen T. Abedon, Sarah J. Kuhl, Bob G. Blasdell and Elizabeth Martin Kutter. (2011) Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**, 1:2, 66-85

Thomas V., Anno de Jong, Hilde Moyaert, Shabbir Simjee, Farid El Garcha, Ian Morrisseyg, Hervé Marion, Michel Valléa. (2015) Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 46(2015): 13–20

Weiping Zhang, Mojun Zhao, Laura Ruesch, Abi Omot and David Francis. (2007) Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, V.123, Pages 145-152

William J. Martin, Terrance O. Kurtz, Drew J. Winston, Janet A. Hindler, Lowell S. Young and William L. Hewttt. (1980) Comparative In Vitro Activity of Moxalactam, Cefotaxime, Cefoperazone, Piperacillin, and Aminoglycosides Against Gram-Negative Bacilli. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, P. 645-648