บทที่1

บทนำ

ปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพนแบคทีเรียหลายชนิดกำลังเป็นภัยคุกคามที่แพร่กระจายไปทั่วโลก ไม่เพียงส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ติดเชื้อโดยตรง ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสเสียชีวิตสูงกว่าผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ดื้อยา ยังส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศโดยรวม เพราะผู้ป่วยต้องพักฟื้นในโรงพยาบนานกว่าปกติ ทำให้งบประมาณค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงขึ้น (Helms *et al.*, 2002) ปัจจุบันมีแบคทีเรียหลายชนิดที่ดื้อยาต้านจุลชีพเพิ่มมากขึ้น เช่น Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เชื้อ *Staphylococcus* spp ที่ลดความไวต่อยา vancomycin (VISA) เชื้อ *Enterococcus* spp ที่ดื้อต่อยา vancomycin หรือ vancomycin-resistant *enterococci* (VRE) เชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multiple drug resistance : MDR) พร้อมกัน เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อดื้อยาในแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae เช่น *E. coli, Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. และ *Salmonella enterica* (Aarestrup *et al.*, 1998; Ajiboye *et al.*, 2009; Brinas *et al.*, 2002; "The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP)," 1998; Davies *et al.*, 2010; Freeman *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Martinez-Martinez *et al.*, 1997; "Outbreak of multidrug-resistant Salmonella newport--United States, January-April 2002," 2002)

การดื้อยาต้านจุลชีพในแบคทีเรียเกิดขึ้นจากปัจจัยหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น การใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่ระมัดระวังรอบคอบในมนุษย์ การใช้ยาต้านจุลชีพเกินความจำเป็นและไม่ตรงต่อโรคติดเชื้อ การได้รับยาไม่ครบจำนวน (dose) ส่งผลให้การรักษาไม่ได้ผล นอกจากนี้การใช้ยาต้านจุลชีพในปศุสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นการใช้เพื่อการรักษาโรค การป้องกันโรค หรือใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต (growth promoter) ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียในสัตว์ดื้อยาและแพร่กระจายยีนที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพไปสู่สิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ และอาจจะเป็นแหล่งของยีนดื้อยาสำคัญที่แพร่กระจายไปยังแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ (Aarestrup, 2005; Aarestrup *et al.*, 2000; Chuanchuen *et al.*, 2009)

ในแบคทีเรียที่ดื้อยาต้านจุลชีพในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยเฉพาะเชื้อ *S. enterica* กำลังเป็นปัญหาที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากโรคติดเชื้อ *S. enterica* มีแนมโน้มสูงขึ้นทั้งในด้านอุบัติการณ์ ความรุนแรงของโรค และยังพบอัตตราการดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นด้วย (Aarestrup *et al.*, 2003; Lertworapreecha *et al.*, 2013; Lynne *et al.*, 2009; Molbak *et al.*, 2002) เชื้อ *S. enterica* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. enterica* เรียกว่า Salmonellosis สามารถแบ่งการติดเชื้อออกได้เป็น 2 แบบตามกลุ่มของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค คือ

1. Enteric fever หรือ Typhoid fever เป็นโรคที่รุนแรงเกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ (serovars) Typhi, Paratyphi A, B และ C โดยเชื้อในกลุ่มนี้จะมีมนุษย์เป็นโฮสต์เท่านั้น และไม่พบการติดเชื้อในสัตว์

2. Non-typhoidal *Salmonellosis* เกิดจากการติดเชื้อ *S. enterica* ซีโรวาร์อื่น ๆ นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาในข้างต้น เรียกว่า Non-typhoidal *Salmonella* เชื้อในกลุ่มนี้จะเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่มีอาหารเป็นสื่อ (food-borne disease)

การดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *S. enterica* ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้นักวิจัยให้ความสำคัญศึกษาเพื่อทำความเข้าใจในกลไกการก่อโรค และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านจุลชีพ ระบาดวิทยา การ

แพร่กระจาย รวมทั้งลักษณะของยีนที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพ เนื่องจากพบว่ายีนดื้อยาหลายชนิดจะอยู่บนพลาสมิดสามารถถ่ายทอดไปยังเชื้อในกลุ่มเดียวกัน หรือระหว่างสปีชีส์ได้ จึงทำให้การแพร่กระจายยีนที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและกว้างขวาง ยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactam เช่น penicillin, ampicillin, monobactam, cephalosporin เป็นยาต้านจุลชีพกลุ่มใหญ่ที่ใช้ทางคลินิกเพื่อการรักษาการติดเชื้อรวมทั้งการติดเชื้อ *S. enterica* และเป็นยาที่ใช้ทางสัตวแพทย์อย่างกว้างขวาง ปัจจุบันพบเชื้อ *S. enterica* ดื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่มนี้เพิ่มสูงขึ้น กลไกลการดื้อยาหลักที่พบใน *S. enterica* คือ การสร้างเอนไซม์ β-lactamase ออกมาทำลายยาในกลุ่มดังกล่าว (Li *et al.*, 2007) แม้ว่าส่วนใหญ่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. enterica* สามารถหายจากโรคได้เอง แต่หากการติดเชื้อเกิดขึ้นในเด็กเล็ก ผู้สูงอายุ หรือในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised host) จะมีโอกาสเกิดโรคที่รุนแรง ประกอบกับการที่เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพอาจเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้

ปัจจุบันมีการพัฒนายาต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อทดแทนยารุ่นเก่า เช่นยากลุ่ม cephalosporin ในรุ่นที่ 3 (3^{th} generation cephalosporin) ซึ่งเป็น oxymino β-alctam group ได้แก่ cefotaxime, cefpodoxime, ceftriaxone, และ cefixime มาใช้รักษาการติดเชื้อดังกล่าว แต่สิ่งที่น่าเป็นกังวลมากขึ้น คือ ภายหลังจากการเริ่มใช้ยากลุ่ม oxymino group เพียงประมาณ 2 ปี ก็พบว่าแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae รวมทั้ง *S. enterica* เริ่มดื้อต่อยาดังกล่าว (Knothe *et al.*, 1983) และการดื้อยากลุ่ม 3^{th} generation cephalosporin เกิดจากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ชนิดใหม่เรียกว่า extended spectrum β-lactamase หรือ ESBL เชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL จะดื้อต่อยากลุ่ม β-lactam เกือบทุกชนิด เป็นปัญหาทางการรักษาอย่างมาก นอกจากนี้เชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL ยังตรวจพบได้ยากโดยวิธีการทางห้องปฏิบัติการทั่วไป ทำให้การรายงานผลผิดพลาดและนำไปสู่การรักษาที่ล้มเหลวได้ (Bradford, 2001)

ข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ *S. enterica* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL โดยเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากสัตว์ที่เลี้ยงไว้เป็นอาหารในประเทศไทยมีน้อยมาก และลักษณะทางอณูชีวโมเลกุลและชนิดของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ผลการศึกษาความชุกและการดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *S. enterica* จากตัวอย่างเนื้อหมูและเนื้อไก่ที่แยกจากจังหวัดพัทลุง ในเบื้องต้นของคณะผู้วิจัย (Lertworapreecha *et al.*, 2013 พบว่าเชื้อที่แยกได้ดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด เชื้อบางไอโซเลทจัดเป็นกลุ่มที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (MDR) และเชื้อบางไอโซเลทมีความไวต่อยา cephalothin ลดลงและเมื่อทำการตรวจคัดกรองยีนที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพก็พบว่าเชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จำนวนมากมียีน bla_{TEM} ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่ม β-lactam ข้อมูลเบื้องต้นทำให้เป็นที่สนใจว่าเชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จะมียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยหรือไม่ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาในระดับของลักษณะปรากฏ (phenotype) และในระดับอณูชีวโมเลกุลของเชื้อ *S. enterica* ที่มียีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL และจำแนกลักษณะทางอณูชีวโมเลกุลของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 จุลชีววิทยาของเชื้อ *Salmonella enterica*

แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เชื้อ *Salmonella* มีอยู่เพียง 2 สปีชีส์ คือ *S. enterica* และ *S. bongori* โดย *S. enterica* ยังแบ่งออกได้เป็น 6 สับสปีชีส์ ได้แก่

subspecies I : *Salmonella enterica* subsp. *enterica*
subspecies II : *Salmonella enterica* subsp. *salamae*
subspecies IIIa : *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*
subspecies IIIb : *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*
subspecies IV : *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*
subspecies VI : *Salmonella enterica* subsp. *Indica*

แบคทีเรียกลุ่มนี้ยังสามารถแบ่งออกได้มากกว่า 2,000 ซีโรวาร์ ตามคุณสมบัติที่แตกต่างกันของแอนติเจนของผนังเซลล์ (O: antigen) และแอนติเจนของ flagella (H: antigen) เฉพาะในสับสปีชีส์ที่ 1 คือ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* เท่านั้นที่จะมีการตั้งชื่อของซีโรวาร์ เช่น ซีโรวาร์ Typhimurium, Enteritidis (Brenner *et al.*, 2000) เชื้อ *Salmonella* spp สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น นก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง รวมทั้ง *Salmonella* spp บางซีโรวาร์พบก่อโรคในมนุษย์เท่านั้น ในขณะที่บางซีโรวาร์จะพบได้ในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงที่ใช้เป็นอาหาร เช่น ไก่ สุกร และโค โดยสัตว์ดังกล่าวนี้เป็นรังโรค (reservoir) กักเก็บเชื้อไว้ในลำไส้ และเชื้อจะถูกขับถ่ายปนออกมากับมูลของสัตว์ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ระหว่างกระบวนการฆ่าและชำแหละเนื้อสัตว์ เป็นผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ *S. enterica* ในโซ่อาหารได้ง่าย

2.2 ระบาดวิทยาของ *Salmonella enterica*

โรคอุจาระร่วงที่มีสาเหตุจากอาหารและน้ำเป็นสื่อ (food and water-borne disease) ที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. enterica* เป็นปัญหาสาธารณะสุขสำคัญทั้งในประเทศพัฒนาแล้วและประเทศกำลังพัฒนา อาการที่เกิดจากการติดเชื้อจะมีระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนกระทั่งเป็นเหตุให้ผู้ติดเชื้อเสียชีวิตได้ สิ่งที่น่าเป็นห่วงมากขึ้น คือ รายงานทางระบาดวิทยาในหลายประเทศพบว่าการติดเชื้อ *S. enterica* ซีโรวาร์ต่าง ๆ เพิ่มสูงขึ้น ประมาณการในแต่ละปีจะมีผู้ติดเชื้อ *S. enterica* ทั่วโลกประมาณ 93.8 ล้านคน และในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิตประมาณ 155,000 คน (Hendriksen *et al.*, 2011; Majowicz *et al.*, 2010) นอกจากอุบัติการของโรคที่สูงขึ้น ยังพบการติดเชื้อที่มีความรุนแรงรวมทั้งการดื้อต่อยาต้านจุลชีพเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Aarestrup *et al*., 2003; Chuanchuen *et al.*, 2008; Lertworapreecha *et al*., 2013; Lunguya *et al.*, 2013; Wybot *et al.*, 2004)

สาเหตุสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้พบแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวาง คือ สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้หลายชนิด ทำให้ *S. enterica* ถูกขับออกมาปนเปื้อนกับมูลสัตว์ลงสู่สิ่งแวดล้อม แพร่กระจายไปในสิ่งแวดล้อมและติดเชื้อในสัตว์อื่นต่อไป (Coburn *et al.*, 2007; Corry *et al.*, 2002; Dargatz *et al.*, 2000; Monthon L. et al., 2010; Natvig *et al.*, 2002) ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาในประเทศ

ที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา พบว่า *S. enterica* เป็นสาเหตุหลักที่สำคัญของโรคติดเชื้อที่เกิดจากอาหารและน้ำเป็นสื่อ (food-borne disease) โดยในแต่ละปีจะมีผู้ติดเชื้อประมาณ 2-3 ล้านคน และเป็นสาเหตุให้เสียชีวิตประมาณ 500-2,000 คนต่อปี (Braden *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าซีโรวาร์ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อมากที่สุด คือ *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis (Galanis *et al.*, 2006; Herikstad *et al.*, 2002) สำหรับอุบัติการของโรคที่มีการประมาณการในแต่ละภูมิภาคต่าง ๆ ของโรค พบอุบัติการเกิดโรคต่อประชากรที่แตกต่างกัน เช่น ในภูมิภาค North Africa และ Middle East อัตราการเกิดโรคจะเท่ากับ 140 อัตราการเกิดโรคจะเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาและในประเทศยังไม่พัฒนา เช่น Sub-Saharan Africa พบอุบัติการการเกิดโรคอยู่ที่ 470 คนต่อประชากรแสนคน สำหรับในภูมิภาค Southeast Asia พบอุบัติการการเกิดโรคที่สูงมากถึง 3,980 คนคนต่อประชากรแสนคน (Majowicz *et al*., 2010) สำหรับข้อมูลการระบาดในประเทศไทย โดยสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค (ปี พ.ศ. 2558) พบว่าเชื้อ *S. enterica* เป็นสาเหตุสำคัญอันดับสองของโรคอาหารเป็นพิษที่พบในผู้ป่วยรองจากการติดเชื้อ *Vibrio parahemolyticus* (สำนักระบาดวิทยา 2558) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาในหลายรายงานที่พบว่า *S. enterica* เป็นสาเหตุหลักของโรคโรคติดเชื้อที่เกิดจากอาหารและน้ำเป็นสื่อ (Bangtrakulnonth *et al.*, 2004; Bernbom *et al.*, 2009; Padungtod *et al.*, 2006; Vaeteewootacharn *et al.*, 2005; ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และคณะ 2544)

2.3 การดื้อยาต้านจุลชีพในเชื้อ *Salmonella enterica*

ปัญหาสำคัญอีกประการที่พบมากขึ้นจากการติดเชื้อ *S. enterica* คือ เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพเพิ่มมากขึ้น มีปัจจัยหลายอย่างที่ช่วยเร่งให้เชื้อ *S. enterica* เกิดการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น เช่น การใช้ยาอย่างไม่รอบคอบในมนุษย์ และการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ พบว่ามากกว่า 50% ของยาต้านจุลชีพที่ใช้กันอยู่ปัจจุบัน เป็นการใช้เพื่อการเลี้ยงสัตว์ (Aarestrup, 1999) ซึ่งเป็นปัจจัยเร่งสำคัญทำให้เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งเชื้อ *S. enterica* เกิดการดื้อยาขึ้นอย่างรวดเร็ว มีรายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการใช้ยาในสัตว์ที่ส่งผลให้เกิดการดื้อยาและเป็นปัญหาสุขภาพในมนุษย์ตามมา เช่น การใช้ยา apramycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้เฉพาะในสัตว์เท่านั้น ยา apramycin เริ่มมีการใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 หลังจากนั้นประมาณปี ค.ศ. 1985 ก็เริ่มมีรายงานการพบเชื้อ *E. coli* และ *S. enterica* ที่แยกได้จากปศุสัตว์มีการดื้อยา gentimicin ที่ใช้ในมนุษย์ ซึ่งเป็นยาในกลุ่มเดียวกันกับ apramycin นอกจากนี้ยังมีรายถึงผลกระทบของเชื้อดื้อยาในสัตว์ต่อมนุษย์ โดยสามารถตรวจพบเชื้อ *S. enterica* ที่มีพลาสมิดควบคุมการดื้อยา apramycin ได้ทั้งในสัตว์และในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. Enterica* (Threlfall *et al.*, 1986) การศึกษา direct gene transfer ระหว่างเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดควบคุมการดื้อยาจากสุกร ก็สามารถพิสูจน์ให้เห็นว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดพลาสมิดไปยังเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่แยกได้จากมนุษย์ได้ (Johnson *et al.*, 1995) ในปัจจุบันพบเชื้อ *S. enterica* เริ่มดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolone โดยพบว่าหลังจากมีการนำยา enrofloxacin มาใช้ในทางสัตวแพทย์ตั้งแต่ปี 1989 เป็นต้นมาก็เริ่มมีการตรวจพบเชื้อ *S.enterica* หลายซีโรวาร์ดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone มากขึ้น (Threlfall *et al.*, 1997) การดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolone กำลังเป็นประเด็นที่นักวิจัยทั่วโลกให้ความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากเป็นยาที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ รวมทั้งการติดเชื้อ *S. enterica* นอกจากนี้เชื้อ *S. enterica* หลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากสัตว์ เริ่มพบการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactam และ cephalosporin กลไกการดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่มดังกล่าวที่พบได้บ่อยในเชื้อ *S. enterica* คือ การสร้างเอนไซม์กลุ่ม ESBL การออกฤทธิ์ของเอนไซม์จะไปจับกับยาและอาศัยปฏิกิริยา hydrolysis สลายพันธะ amide ที่เป็นประกอบเป็นโครงสร้างของวงแหวน β-lactam ring ส่งผลให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้

2.4 Extended-Spectrum β-lactamase (ESBL)

การดื้อยายาต้านจุลชีพ กลุ่ม β-lactam และ cephalosporin ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามพัฒนายาชนิดใหม่ทดแทนสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยากลุ่ม β-lactam โดยยาในกลุ่ม oxyimino cephalosporin (3rd generation cephalosporin) เป็นยา β-lactam ชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อการรักษาเชื้อโดยเฉพาะในกลุ่มของ Enterobacteriaceae ที่ดื้อต่อยากลุ่ม β-lactam กลุ่มเดิม โดยยากลุ่มนี้จะออกฤทธิ์อย่างกว้างขวาง (board spectrum) ต่อแบคทีเรียหลายชนิด เช่นยา cefixime, cefpodoxime, cefotaxime และ ceftriaxone ภายหลังจากมีการใช้ยาในกลุ่มนี้เพียงประมาณ 2 ปี ก็มีรายงานการพบเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาในกลุ่มดังกล่าว ทั้งในยุโรปและในเอเชียบางประเทศ (Knothe et al., 1983; Sirot *et al.*, 1987; Su *et al.*, 2004) กลไกการดื้อยาที่สำคัญ คือ แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ทำลายยากลุ่ม β-lactam และ cephalosporinกว้างขวางมากขึ้น ดังนั้นจึงเรียกเอนไซม์กลุ่มใหม่นี้ว่า Extended Spectrum β-Lactamase หรือ ESBL

ESBL สามารถสลายยา oxyimino-cephalosporins เอนไซม์กลุ่มนี้พบได้มากในแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะในวงศ์ Enterobacteriaceae ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์สามารถพบได้ทั้งบนโครโมโซมและบนพลาสมิด ทำให้ยีนดังกล่าวสามารถแพร่กระจายจากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์โดยกระบวนการ conjugation ได้ง่าย เป็นเหตุให้พบแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่มียีน ESBL แพร่กระจายอยู่ทั่วโลก เอนไซม์กลุ่ม ESBL แบ่งออกได้หลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม TEM และกลุ่ม SHV สามารถย่อยสลายยา ceftazidime เอนไซม์กลุ่ม CTX-M สามารถย่อยสลายยา cefotaxime เอนไซม์กลุ่ม OXA เป็นกลุ่มที่มีความไวต่อยา clavulanic acid ลดน้อยลงและดื้อต่อยา ceftzidime ในระดับที่สูง (Bradford, 2001) มีรายงานว่าเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จะดื้อต่อยา cephalosporins ทุกตัวรวมทั้งยากลุ่ม monobatam และเนื่องจากเอนไซม์ ESBL ถูกกำกับโดยพลาสมิด ขนาดใหญ่ขนาด 80 ถึง 300 กิโลเบส จึงมักพบว่ามียีนดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่มอื่นอยู่บนพลาสมิดนั้นด้วยเช่นยีนดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม aminoglycosides (gentamicin, amikacin, netilmicin) กลุ่ม trimethoprim/sulfamethoxazole, chloramphenicol และ tetracycline ทำให้เชื้อที่ได้รับถ่ายทอดพลาสมิดสามารถดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดร่วมกัน

2.5 การจัดกลุ่มของเอนไซม์ ESBL

เอนไซม์ ESBL สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 class ด้วยกันโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์และคุณสมบัติของกรดอะมิโน (Bradford, 2001) ได้แก่

1. Class A จะมี active site ที่เป็นกรดอะมิโน serine ประกอบด้วยเอนไซม์ เช่น TEM-1, (แยกได้จากผู้ป่วยชื่อ “Temoniera”), SHV-1 (Sulphydryl variable) และเอนไซม์ penicillinase ที่พบจากเชื้อ *S. aureus* พบว่าประมาณ 90% ของเชื้อ *E. coli* และ *S. enterica* ที่ดื้อต่อยา ampicillin สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ คุณสมบัติของ TEM-1 คือสามารถทำลายยา penicillin, early cephalosporin ได้ ปัจจุบันพบมีเอนไซม์ในกลุ่มของ TEM เป็นจำนวนมาก ประมาณว่ามากว่า 90 ชนิด ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งต่าง ๆ ของเอนไซม์ (Bradford, 2001)

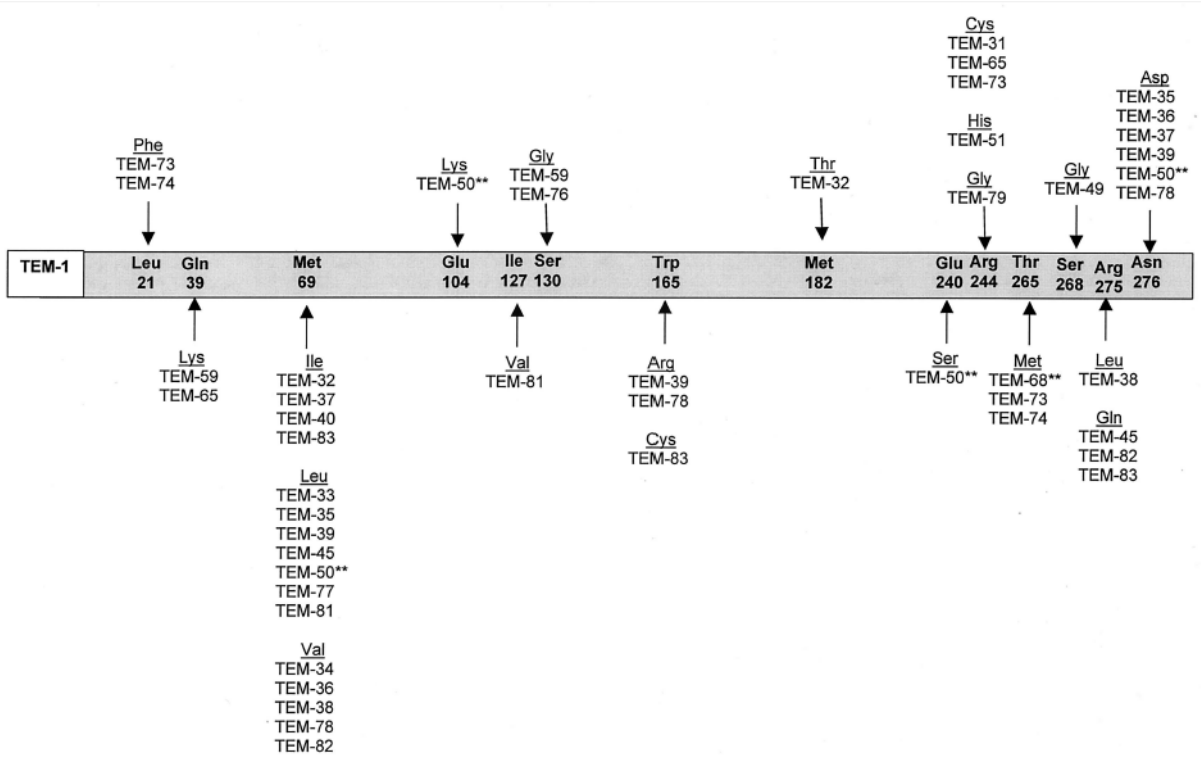
2. Class B enzyme มีคุณสมบัติเป็น metallo-β-lactamase มีความสามารถทำลายยา penicillin และ cephalosporins

3. Class C enzyme มีคุณสมบัติเป็น chromosomal cephalosporinase เช่น เอนไซม์กลุ่ม AmpC

4. Class D enzyme มีคุณสมบัติเป็น oxacillinase เอนไซม์ใน class A, C และ class D ซึ่งทางานได้โดยอาศัย serine based mechanism โดยมีกรดอะมิโน serine อยู่ที่บริเวณ active site ส่วนใน class B หรือ metallo β-lactamase นั้นมีลักษณะเด่น คือ ต้องใช้ธาตุที่เป็น divalent cation เช่น Zn^{2+} ไอออน เป็น co-factor ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ การสร้างเอนไซม์ β-lactamases ที่พบบ่อยในเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae คือ Class A และ Class C enzyme โดยเป็นได้ทั้งชนิด narrow spectrum และ broad spectrum enzyme

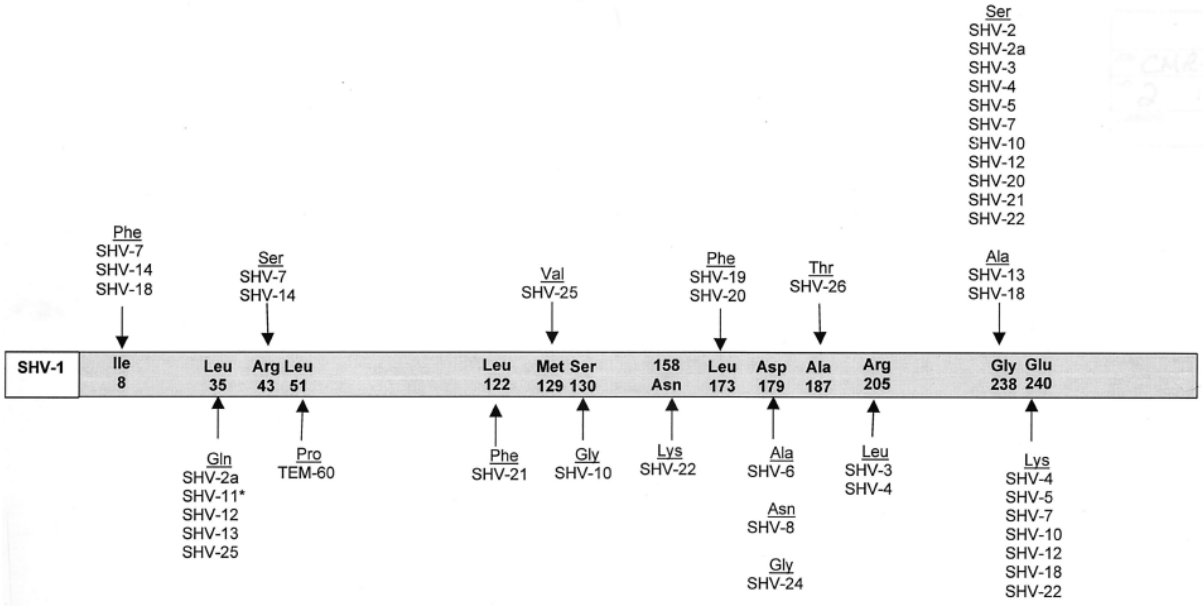
2.6 ชนิดของเอนไซม์ ESBL ที่สำคัญมีอยู่ด้วยกัน 5 กลุ่ม คือ (Bradford, 2001)

1. **เอนไซม์กลุ่ม TEM** พบบ่อยในกลุ่มแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบในเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยเฉพาะใน *E. coli* ที่ดื้อต่อยา ampicillin พบว่ามากกว่า 90% สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้ได้ คุณสมบัติของเอนไซม์ TEM-1 คือมีความสามารถในการทำลายยากลุ่ม penicillin และ early cephalosporin เช่น cephalothin และ cephaloridine ได้ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ยังแบ่งย่อยลงไปได้อีกจำนวนมาก โดยแต่ละชนิดเกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุดในยีน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ความหลากหลายยีน ESBL กลุ่ม TEM เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน
ที่มา: Bradford, (2001)

2. **เอนไซม์กลุ่ม SHV** พบได้ทั่วไปใน *Klebsiella pneumoniae* ยีนที่ควบคุมการสร้างจะอยู่บนพลาสมิด (plasmid-ampicillin resistance) หรืออาจจะอยู่บนยีนที่สามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งได้ (transposable genetic element) เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะทำลายยา ceftazidime ได้ดี เอนไซม์กลุ่ม HSV ยังแบ่งย่อยได้อีกจำนวนมากเช่นกัน ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ความหลากหลายยีน ESBL กลุ่ม SHV เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน
ที่มา: Bradford, (2001)

3. **เอนไซม์กลุ่ม CTX-M** เมื่อไม่นานมานี้มีการตรวจพบเอนไซม์ ESBL ชนิดใหม่ที่มียีนควบคุมการผลิตในพลาสมิด (plasmid mediated ESBLs) เรียกว่า CTX-M ซึ่งเอนไซม์นี้จะมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายยา cefotaxine ซึ่งพบในเชื้อ *S.* Typhimurium และเชื้อ *E. coli* แต่ก็สามารถพบใน Enterobacteriaceae อื่น ๆ ได้เช่นกัน เอนไซม์ ESBL กลุ่มนี้ประกอบไปด้วยเอนไซม์ CTX-M-1 หรือ MEN-1, CTX-M-2 จนถึง CTX-M-10, Toho-1 และ Toho-2 โดยเอนไซม์กลุ่มนี้ไม่มีความใกล้ชิด หรือความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ESBL กลุ่ม TEM หรือ SHV ซึ่งพบว่าเอนไซม์กลุ่ม CTX-M นี้มีความเหมือนกับเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้ประมาณเพียงร้อยละ 40 เท่านั้น

4. **เอนไซม์กลุ่ม OXA** กลุ่มนี้มีความต่างจากกลุ่ม TEM หรือ SHV เนื่องจากเอนไซม์นี้จัดอยู่ใน molecular class D เอนไซม์ ESBL กลุ่ม OXA นี้ก่อให้เกิดการดื้อต่อยา ampicillin และ cephalothin และมีความสามารถสูงในการทาลาย oxacillin และ cloxacillin โดยทั่วไปแล้วจะพบว่าเอนไซม์ ESBL ชนิดต่าง ๆ มักจะพบในเชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae* หรือ Enterobacteriaceae อื่น ๆ แต่เอนไซม์ ESBL กลุ่ม OXA นี้กลับพบได้ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นหลัก

5. **กลุ่มอื่น ๆ** ตัวอย่างเอนไซม์อื่น ๆ เช่น CME-1 แยกได้จากเชื้อ *Chryseobacterium meningosepticum* เอนไซม์ TLA-1 แยกได้จากเชื้อ *E. coli* จากผู้ป่วยในเม็กซิโก ซึ่งเอนไซม์ทั้งหมดนี้มีความเกี่ยวข้อง หรือความใกล้เคียงกันเพียงร้อยละ 40-50 เท่านั้น เอนไซม์กลุ่มนี้ก่อให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม oxyimino-cephalosporins โดยเฉพาะยา ceftazidime และ aztreonam ซึ่งจะมีลักษณะเหมือนเอนไซม์ cephalosporinases

2.7 ข้อมูลระบาดวิทยาของเอนไซม์ β-lactamase และ ESBL ในประเทศไทย

ข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นข้อมูลจาก Enterobacteriaceae อื่น ๆ ที่แยกได้จากผู้ป่วยจากโรงพยาบาลดังสรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาทางระบาดวิทยาของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่พบในประเทศไทย

สถานที่	แบคทีเรีย	เปอร์เซนต์การตรวจพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL % (cases)	ชนิดของยีน	อ้างอิง
โรงพยาบาลน่าน และโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดน่าน	*K. pneumoniae* *E. coli*	22.7 (2,097) 21.9 (1,191)	ไม่จำแนก	(เดชพิภัทร์ อมรทิพย์วงศ์ *et al.*, 2554)
โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ หาดใหญ่	*E. coli*	6 (100)	ไม่จำแนก	(Wanutsanun *et al.*, 2006)
โรงพยาบาลชลบุรี	*K. pneumonia* *E. coli*	44.6 38.7	ไม่จำแนก	(Waiwarawooth Jirachai *et al.*, 2006)
โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น	Entrobactriaceae	79 52 48 33 จากจำนวนทั้งหมด 48 cases	SHV CTX-M-9 TEM-1 VEB	(Aroonwadee *et al.*, 2007)
โรงพยาบาลศิริราช และโรงพยาบาลธรรมศาสตร์	*E. coli* จำนวน 235 isolates *K. pneumoniae* จำนวน 127 isolates		แบคทีเรียทั้งสองชนิดส่วนใหญ่พบยีน CTX-M-14 CTX-M-15 CTX-M-55 TEM-1	(Kiratisin *et al.*, 2008)

การศึกษาหลายรายงานพบว่าเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae จากผู้ป่วยสามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ได้จำนวนมาก และพบว่ามียีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่หลากหลาย ได้แก่กลุ่ม CTX-M, TEM และ SHV เป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามพบว่าข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อ *S. enterica* โดยเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสัตว์ที่เลี้ยงเป็นอาหารในประเทศไทยมีอยู่ค่อนข้างจำกัด ทั้งที่แบคทีเรียดังกล่าวเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และมีแหล่งรังโรคอยู่ในปศุสัตว์ที่มีโอกาสสัมผัสกับยาต้านจุลชีพที่สูง จึงอาจจะมีโอกาสเกิดการดื้อยาโดยสร้างเอนไซม์ ESBL เป็นแหล่งกับเก็บยีนดื้อยา และถ่ายทอดยีนดื้อยาไปสู่เชื้อที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ ทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL โอกาสเสียชีวิตสูงขึ้น ข้อมูลของเชื้อ *S. enterica* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL จากตัวอย่างจากสัตว์ที่เลี้ยงไว้เพื่อเป็นอาหาร เป็นข้อมูลสำคัญที่จะเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของการแพร่การดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์

2.8 การตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL สามารถแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ คือ

1. **การตรวจหาลักษณะปรากฏ (phenotypic test)** ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

➢ **การตรวจคัดคัดกรอง (screening test)**

แนวทางการตรวจคัดกรองสามารถทำได้ 2 วิธี คือ disc diffusion และการหาค่า MIC โดยใช้ยากลุ่ม 3rd generation cephalosporin เป็นยาทดสอบ โดยยาและการอ่านผลที่ CLSI แนะนำให้ใช้แสดงดังตารางที่ 2 อย่างไรก็ตามยาที่เป็นที่นิยใช้สำหรับการตรวจคัดกรอง คือ ยา cefpodoxime ทั้งนี้เพราะว่าเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทุกชนิดจะดื้อต่อยา cefpodoxime

ตารางที่ 2 ยากลุ่ม 3rd generation cephalosporin และการแปลผลการทดสอบการคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL (Centers for Disease Control and Prevention, 2015)

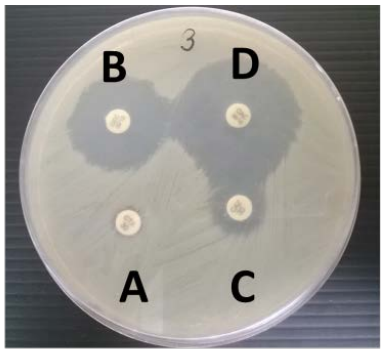
Disk diffusion	MICs
cefpodoxime ≤ 22 mm	cefpodoxime ≥ 2 µg/mL
ceftazidime ≤ 22 mm	ceftazidime ≥ 2 µg/mL
aztreonam ≤ 27 mm	aztreonam ≥ 2 µg/mL
cefotaxime ≤ 27 mm	cefotaxime ≥ 2 µg/mL
ceftriaxone ≤ 25 mm	ceftriaxone ≥ 2 µg/mL

➢ **การตรวจยืนยันผล (phenotypic confirmation test)**

การตรวจยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ ESBL สามารถทำได้หลายวิธีเช่นกัน เช่น

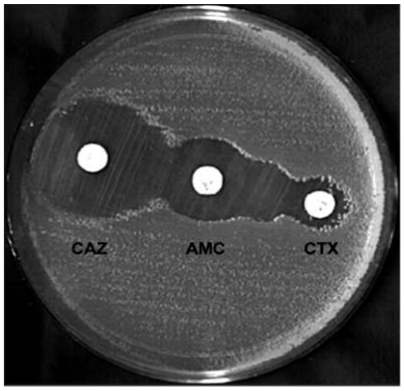
o วิธี combination disc assay เป็นวิธีมาตรฐานที่ CLSI กำหนด โดยมีหลักการ คือ ESBL ถูกยับยั้งด้วย β-lactamase inhibitor เช่น clavulanic acid ดังนั้นหากเปรียบเทียบ inhibition zone ที่เป็นผลจากยา กลุ่ม cephalosporin ที่มีส่วนผสมของ clavulanic acid กับยาชนิดเดียวกันที่ไม่มีส่วนผสมของ clavulanic acid ยาที่แนะนำให้ใช้ตามมาตรฐาน ได้แก่ cefotaxime (30 µg) กับ cefotaxime+clavulanate (30+10 µg), หรือ ceftazidime (30 µg) กับ ceftazidime+clavulanate (30+10 µg), หรือ cefpodoxime (10 µg) กับ cefpodoxime+clavulanate (10+1 µg) การแปลผล โดย inhibition zone ของแผ่นยาที่มี clavalanic acid กว้างกว่าที่ไม่มี clavulanic acid มากกว่า 5 mm แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ ESBL ได้ (รูปที่ 3)

o วิธี double disc assay เป็นวิธีที่อาศัยหลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ESBL โดย β-lactamase inhibitor เช่นเดียวกับวิธี combination disc assay ซึ่งทำได้โดยวาง disc ยาที่มีส่วนผสมของ clavulanic acid เช่น amoxicillin/clavulanate (AMC) และวางยากลุ่ม cephalosporin รอบ ๆ disc ยา AMC โดยให้ห่างจาก disc ยา AMC ประมาณ 30 mm การอ่านผลและแปลผลว่าเป็น บวก คือ เชื้อสร้างเอนไซม์ ESBL จะสังเกตจาก inhibition zone ของยากลุ่ม cephalosporin ในด้านที่อยู่ใกล้กับยา AMC จะแผ่ขยายออกไปจากวงปกติไม่เป็นวงกลมเข้าใกล้ disc ยา AMC (รูปที่ 4) ลักษณะที่เห็นดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยากลุ่ม cephalosporin กับ clavulanic acid ที่ผสมอยู่กับยา AMC



A.Cefotaxime (30 μg)
B.Cefotaxime/clavulanate (30+10 μg)
C.Ceftazidime (30 μg)
D.Ceftazidime/clavulanate (30+10 μg)

รูปที่ 3 การทดสอบ phenotypic confirmation โดยวิธี combination disc assay
ที่มา: การศึกษานี้



CAZ= CeftazidimeCefotaxime
AMC= Amoxycillin/calvulanic acid
CTX= Cefotaxime

รูปที่ 4 การทดสอบ phenotypic confirmation โดยวิธี double disc assay
ที่มา: Jure, *et al.* (2010)

2. การตรวจหายีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ (genotypic test)

เนื่องจากเอนไซม์ ESBL มีหลาย กลุ่มและในแต่ละกลุ่ม family เดียวกันยังแบ่งเป็นชนิดย่อยอีกจำนวนมาก ดังนั้นข้อมูลเฉพาะการตรวจยืนยันว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ ESBL ได้ อาจจะยังไม่เพียงพอเพื่อใช้สำหรับการรักษาผู้ติดเชื้อและการควบคุมการระบาดของเชื้อ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบถึงชนิดของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL วิธีการตรวจที่ให้ความถูกต้องสูง คือ การตรวจด้วยวิธี molecular technique เช่น PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละชนิดเพิ่มจำนวนยีน และ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่อนุมาน (amino acid deduction) จากยีนที่เพิ่มจำนวนได้จะสามารถบอกถึงกลุ่มและชนิดย่อยของยีนในแต่ละกลุ่มได้

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เชื้อ *Salmonella enterica*

ตัวอย่างเชื้อ *S. enterica* จะแยกจากตัวอย่างมูลสุกร มูลสัตว์ปีก มูลโค โดยตัวอย่างมูลสุกร เก็บใส่ถุงพลาสติกซิปและแช่ในกล่องน้ำแข็งระหว่างขนส่งกลับมายังห้องปฏิบัติการ สำหรับตัวอย่างจากสัตว์ปีกจะใช้ cotton swab ป้ายจาก cloaca ของสัตว์ปีกแล้วเก็บลงใน Carry Blair transport medium แช่ในกล่องน้ำแข็งและรีบนำส่งห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างมูลโค เก็บตัวอย่างจากมูลที่ใหม่ใส่ถุงพลาสติกที่ใหม่และสะอาดแช่ในกล่องควบคุมอุณหภูมิ 4-8 °C ตัวอย่างทั้งหมดเมื่อส่งถึงห้องปฏิบัติการจะดำเนินการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ทันที ตัวอย่างเชื้ออีกส่วนเป็นเชื้อ *S. enterica* ที่แยกจากเนื้อสุกร เนื้อไก่และผักสด โดยเป็นตัวอย่างเชื้อที่แยกไว้ก่อนหน้าในปี พ.ศ. 2552

3.2 การแยกและการจำแนกซีโรวาร์เชื้อ *Salmonella enterica*

การแยกเชื้อ *S. enterica* ทำโดยวิธี MSRV technique (Vuttigronpan, *et al.*, 1998) มีรายละเอียดขั้นตอน คือ ชั่งตัวอย่างมูลจำนวน 25 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW ปริมาตร 225 mL เขย่าเป็นเวลา 1–2 นาที นำไปบ่มเพาะที่ 37 °C เป็นเวลาประมาณ 18–24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยดเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน BPW ประมาณ 100 μL ลงในอาหาร Modify Semisolid Rappaport Vassiliadis Agar (MSRV) โดยหยดลงบนอาหาร MSRV ประมาณ 5 หยด ห่าง ๆ กัน นำไปบ่มเพาะที่ 42 °C เป็นเวลาประมาณ 18–24 ชั่วโมง และเชื้ออีกส่วนหนึ่งนำไป streak บนอาหาร Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) แล้วนำไปที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18–20 ชั่วโมง หลังจากนั้น เลือกเชื้อ *S. enterica* ที่เจริญในอาหาร MSRV โดยพิจารณาสีของอาหาร MSRV จะเปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินใสเป็นสีขาวขุ่นรอบ ๆ จุดที่หยดเชื้อลงไป ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อที่แผ่ไปไกลที่สุดจากตำแหน่งที่หยดเชื้อ แล้วนำมา stab และ streak ลงในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) agar และ stab ลงในอาหาร Lysine Indole Motile (LIM) agar นำไปบ่มเพาะที่ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การคัดเลือกเชื้อ *S. enterica* ที่เจริญบนอาหาร XLD ให้พิจารณาลักษณะลักษณะโคโลนีของเชื้อ ที่เจริญขึ้นมาโดยมีจุดสีดำตรงกลางโคโลนี ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีที่สงสัยดังกล่าว stab ลงในอาหาร TSI slant และ streak บนผิวหน้าอาหาร เช่นเดียวกับอาหาร MSRV จากนั้นนำบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่เจริญใน TSI และ LIM ที่ให้ผลการทดสอบบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *S. enterica* นำไปเพาะเพิ่มจำนวนใน Tryptic soy agar และทดสอบยืนยันเชื้อกับซีรัม O:antigen polyvalent (S&A reagent; Thailand) ต่อเชื้อ *S. entrica*

เชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จะจำแนกซีโรวาร์ ด้วยการทดสอบการตกตะกอน (agglutination) กับแอติบอดี (S&A reagent; Thailand) ที่จำเพาะต่อแอนติเจนของผนังเซลล์ (O: antigen) และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ flagella (H: antigen) ของเชื้อ

3.2 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

เชื้อ *S. entrica* ที่แยกได้ทุก isolate จะนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยวิธี micro-broth dilution technique โดยทดสอบกับยาต้านจุลชีพ 8 ชนิด คือ ampicillin, gentamicin, streptomycin, chloramphenicol, tetracycline, sulfamethoxazole, ciprofloxacin และ nalidixic acid (Bio-basic;

Canada) กระบวนการทดสอบกระทำตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standard institute (CLSI) (CLSI, 2014) มีรายละเอียด คือ

การเตรียมยาต้านจุลชีพสำหรับการทดสอบ โดยเตรียมความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพในปริมาตร 50 μL เมื่อผสมกับปริมาตรของเชื้อ 50 μL และอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 μL ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1,024 μg/mL

เตรียมเชื้อสำหรับทำการทดสอบ โดยปริมาตรของเชื้อที่ใช้ทดสอบเป็น 50 μL จะต้องมี เมื่อรวมกับปริมาตรของอาหารและยาที่ใช้สำหรับทดสอบแล้ว ให้มีปริมาณของเชื้อทดสอบสุดท้ายประมาณ 10^5 cfu/mL อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบ คือ Mueller Hinton broth (MH) โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของการเตรียมตามปกติ (double strength) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 100 μL ดังนั้นปริมาตรทั้งหมดเมื่อรวม เชื้อ และ ยา แล้วจะเท่ากับ 200 μL/well การทดสอบจะใช้เชื้อมาตรฐาน *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 เป็นสายพันธุ์เชื้อมาตรฐานควบคุม การวิเคราะห์ผลการทดสอบจะใช้ Program WHONET 5.6

3.3 การสกัด DNA

นำเชื้อตัวอย่างประมาณ 1-2 โคโลนี ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่มี TE buffer 100 μL นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ไปตรวจหายีนที่เกี่ยวข้อง หรือเก็บไปในอุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะมีการทดสอบ

3.4 การตรวจหายีนดื้อยาต้านจุลชีพและยีนกลุ่ม β-lactamase โดยวิธี PCR

เชื้อ *S. enterica* ทุกไอโซเลทที่พบว่ามีการดื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ นั้นจะนำมาตรวจหายีนที่ควบคุมการดื้อต่อยาชนิดนั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาที่ครบถ้วน การตรวจหายีนจะทำโดยเทคนิค PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีนดื้อยาต่าง ๆ (ตารางที่ 3) ขั้นตอนการทำ PCR ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, dNTPS 200 μM, primers 0.5 pmole, Taq DNA polymerase 1.25 units สำหรับสภาวะในการทำ PCR มีดังนี้ คือ denaturation ที่ 95 °C นาน 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing จะขึ้นอยู่กับ primer ดังแสดงในตารางที่ 3 เวลาสำหรับ annealing นาน 1 นาที และ extension ที่ 72 °C นาน 1 นาที ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ ผลผลิต PCR จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังต่างประเทศ

3.5 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL

Screening test เชื้อ *S. enterica* ที่ดื้อต่อยา ampicillin ทุก isolate จะนำมาตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี disc diffusion บนอาหาร Muller Hinton agar (MHA) ด้วยยา cefpodoxime (10 μg) (Himedia; India) การทดสอบกระทำตามมาตรฐานของ CLSI (CLSI, 2014)

Phenotypic confirmation test

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL จะทำโดยเทคนิค combination disc diffusion โดยมีหลักการเช่นเดียวกับการทดสอบ disc diffusion ซึ่งจะทำการเปรียบเทียบ inhibition zone ที่เกิดขึ้นระหว่างยา cefotaxime (30 μg) กับ inhibition zone ที่เกิดขึ้นระหว่างยา cefotaxime+clavulanic acid (30+10 μg) และยา ceftazidime (30 μg) กับ inhibition zone ที่เกิดขึ้นระหว่างยา ceftazidime+clavulanic acid

(30+10 μg) (Himedia; India) โดยทำการทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* ทุกไอโซเลทที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม β-lactam

Genotypic examination

ตัวอย่างของเชื้อ *Salmonella* ที่ผ่านการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่ให้ผลบวกจะนำมาตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องโดยวิธี PCR โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเชื้อ ประมาณ 1-2 colonies ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่มี TE buffer 100 μL (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที ตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ จะเก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะมีการนำมาทดสอบตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องในการดื้อยาโดยเทคนิค PCR สำหรับยีนเป้าหมายด้วย primers ที่จำเพาะ (ตารางที่ 4) ปฏิกิริยาPCR ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM. $MgCl_2$, dNTPS 200 μM, primers 0.5 pmole, Phusion High-Fedelity DNA polymerase 1.25 units/reaction สำหรับสภาวะในการทำ PCR มีดังนี้คือ denaturation ที่ 95 °C นาน 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing จะขึ้นอยู่กับ primers แต่ละคู่ (ตารางที่ 4) เวลาสำหรับ annealing นาน 1 นาที และ extension ที่ 72 °C นาน 1 นาที ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ ผลผลิต PCR จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังต่างประเทศ

ตารางที่ 3 รายละเอียดของ primers สำหรับตรวจหายีนที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพ (Türkyılmaz *et al.*, 2009)

Name	Sequence (5' to 3')	Annealing Temperature (°C)	Resistance Mechanism	Encoded Resistance
tetA	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	55	Efflux	TET
tetB	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG	53	Efflux	TET
tetC	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG ATGGTCGTCATCTACCTGCC	56	Efflux	TET
tetG	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC AGCAACAGAATCGGGAACAC	59	Efflux	TET
tetS	CATAGACAAGCCGTTGACC ATGTTTTTGGAACGCCAGAG	58	Ribosomal protection	TET
aadB	GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG CTGTTACAACGGACTGGCCGC	61	Aminoglycoside adenyltransferase	GEN
aacC	GGCGCGATCAACGAATTTATCCGA CCATTCGATGCCGAAGGAAACGAT	58	Aminoglycoside acetyltransferase	GEN
cat1	CCTATAACCAGACCGTTCAG TCACAGACGGCATGATGAAC	56	Chlorampenicol acetyltransferase	CHL
cat2	CCGGATTGACCTGAATACCT TCACATACTGCATGATGAAC	56	Chlorampenicol acetyltransferase	CHL
cat3	CCCACAATTCACCGTATTCC GAACCTGTACTGAGAGCGGC	58	Chlorampenicol acetyltransferase	CHL
floR	AACCCGCCCTCTGGATCAAGTCAA CAAATCACGGGCCACGCTGTATC	60	Efflux	CHL

ตารางที่ 4 ยีนเป้าหมายและ primers ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL และ β-lactamase

Name	Sequences (5'-3')	Annealing Temperature (°C)	References
ESBL-TEM F	TTTCGTGTCGCCCTTATTCC	52	(Hasman *et al.*, 2005)
ESBL-TEM R	ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGG		
ESBL-SHV F	CGCCTGTGTATTATCTCCCT	52	(Hasman et al., 2005)
ESBL-SHV R	CGAGTAGTCCACCAGATCCT		
ESBL-CTXM F	CGCTGTTGTTAGGAAGTGTG	50	(Hasman et al., 2005)
ESBL-CTXM R	GGCTGGGTGAAGTAAGTGAC		
ESBL-OXA F	ATGGCGATTACTGGATAGATGG	50	(Bali *et al.*, 2010)
ESBL-OXA R	AGTCTTGGTCTTGGTTGTGAG		
Bla*-CTX-M F	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	55	(Boyle *et al.*, 2010)
Bla-CTX-M R	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYSAGCGG		
Bla-SHV F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	50	(Gniadkowski, 2001)
Bla-SHV R	GATTTGCTGATTTCGCTCGG		
Bla-OXA F	ACCAGATTCAACTTTCAA	49	(Gallardo *et al.*, 1999)
Bla-OXA R	TCTTGGCTTTTATGCTTG		
Bla-TEM F	CATTTCCGTGTCGCCCTTAT	52	(Türkyılmaz et al., 2009)
Bla-TEM R	TCCATAGTTGCCTGACTCCC		

*Bla= primers for β-lactamase genes

3.5 การศึกษาการถ่ายโอนพลาสมิด (*In vitro* conjugation transfer)

การศึกษาการถ่ายโอนพลาสมิดทำตามวิธีของ Olufunke และคณะ (Zaidi *et al.*, 2006) โดยเลี้ยงเชื้อ *S. enterica* ทั้ง 3 ซีโรวาร์ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียตัวให้ (dornor strain) และใช้เชื้อ *E. coli* (ATCC 25922) เป็นแบคทีเรียตัวรับ (recipient strain) เลี้ยง dornor strain และ recipient strain ในอัตราส่วน 1:9 (dornor strain 50 μL+recipient strain 450 μL) ในอาหาร TSB นำไปบ่มเพาะ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการเจือจางแบคทีเรียตามลำดับขั้น (10-folds) ใช้เชื้อแบคทีเรีย 0.1 mL นำไป spread บนอาหาร MacConkey agar ที่ผสมยา ampicillin 100 μg/mL สังเกตโคโลนีสีชมพูของเชื้อ *E. coli* ถ้าหากได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจะสามารถเจริญบน MacConkey agar ที่ผสมยา ampicillin 100 μg/mL ได้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างมูลสุกร

ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อ *S. enterica* จากตัวอย่างมูลสุกรได้ทั้งหมดจำนวน 40 ไอโซเลท (ตารางที่ 5) ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อที่แยกได้ พบเชื้อ *S. enterica* ทั้งหมดจำนวน 22 ไอโซเลทดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ทดสอบ โดยพบการดื้อต่อยา sulfamethoxazole มากที่สุด คือ 82% รองลงมา คือ streptomycin 47%, ampicillin 45%, tetracycline และ nalidixic acid ในจำนวนที่เท่ากัน คือ 17% และ chloramphenicol 15% ไม่พบการดื้อต่อยา gentamicin และ crprofloxacin (รูปที่ 5) ผลการวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิด พบรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด ได้แก่ ampicillin, streptomycin, sulfamethoxazole และ tetracycline มากที่สุด คือ 7 ไอโซเลท รองลงมา คือ การดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 3 ชนิด ได้แก่ ampicillin, sulfamethoxazole และ tetracycline จำนวน 5 ไอโซเลท (ตารางที่ 6)

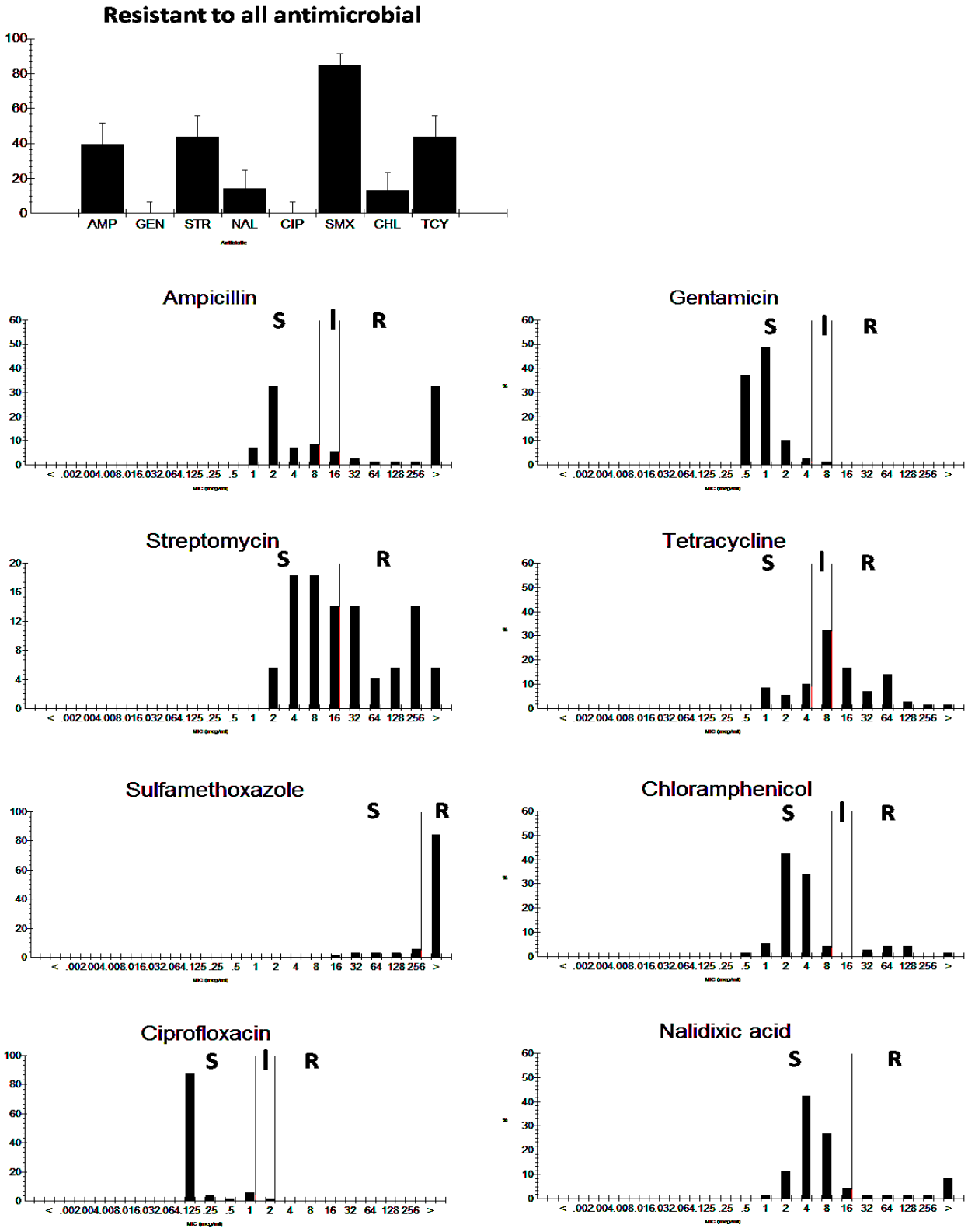
ตารางที่ 5 ผลการแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างมูลสุกร

Serovar	Isolate
Agama	1
Amsterdam	2
Braenderup	2
Cremieu	1
Panama	1
Paratyphi B II	2
Rissen	5
Saintpaul	1
Sandown II	1
Stratford	1
Typhimurium	7
Weltevreden	16
Total	40

ตารางที่ 6 รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิดของเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างมูลสุกร

Resistance profile	Number of isolates	% Isolates
CY	4	10
SMX	4	10
SMX TCY	3	7.5
AMP SMX	1	2.5
NAL SMX TCY	1	2.5
NAL STR SMX	2	5
CHL SMX TCY	1	2.5
AMP SMX TCY	5	12.5
AMP STR TCY	2	5
AMP STR SMX	1	2.5
CHL STR SMX TCY	1	2.5
AMP STR SMX TCY	7	17.5
AMP NAL STR SMX	2	5
AMP CHL SMX TCY	1	2.5
GEN NAL STR SMX TCY	1	2.5
AMP CHL STR SMX TCY	2	5
AMP CHL NAL STR SMX TCY	1	2.5

AMP= ampicillin, TCY= tetracycline, SMX= sulfamethoxazole, STR= streptomycin, GEN= gentamicin, CHL= chloramphenicol
NAL= nalidixic acid, CIP= ciprofloxacin



รูปที่ 5 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* แยกได้จากตัวอย่างมูลสุกร ทั้ง 40 ไอโซเลทต่อยาต้านจุลชีพ 8 ชนิด
แกน X เปอร์เซนต์ของเชื้อ แกน Y ระดับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ µg/mL
R= Resistance, I= Intermediate, S= Susceptible

4.2 การแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างมูลไก่

ผลการแยกเชื้อ *S. enterica* จากตัวอย่างมูลไก่ได้ทั้งหมดจำนวน 29 ไอโซเลท (ตารางที่ 7) ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อที่แยกได้ พบเชื้อ *S. enterica* ทั้งหมดจำนวน 23 ไอโซเลทดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ทดสอบ โดยพบการดื้อยา sulfamethoxazole มากที่สุด คือ 97% รองลงมา คือ streptomycin คือ 38% ดือต่อยา nalidixic aicd 31% และดื้อต่อยา tetracycline 10% ไม่พบการดื้อต่อยา ampicillin, chloramphenicol, gentamicin และ crprofloxacin (รูปที่ 6) ผลการวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิด พบรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 2 ชนิด ได้แก่ sulfamethoxazole และ tetracycline มากที่สุด คือ 10 ไอโซเลท (ตารางที่ 8)

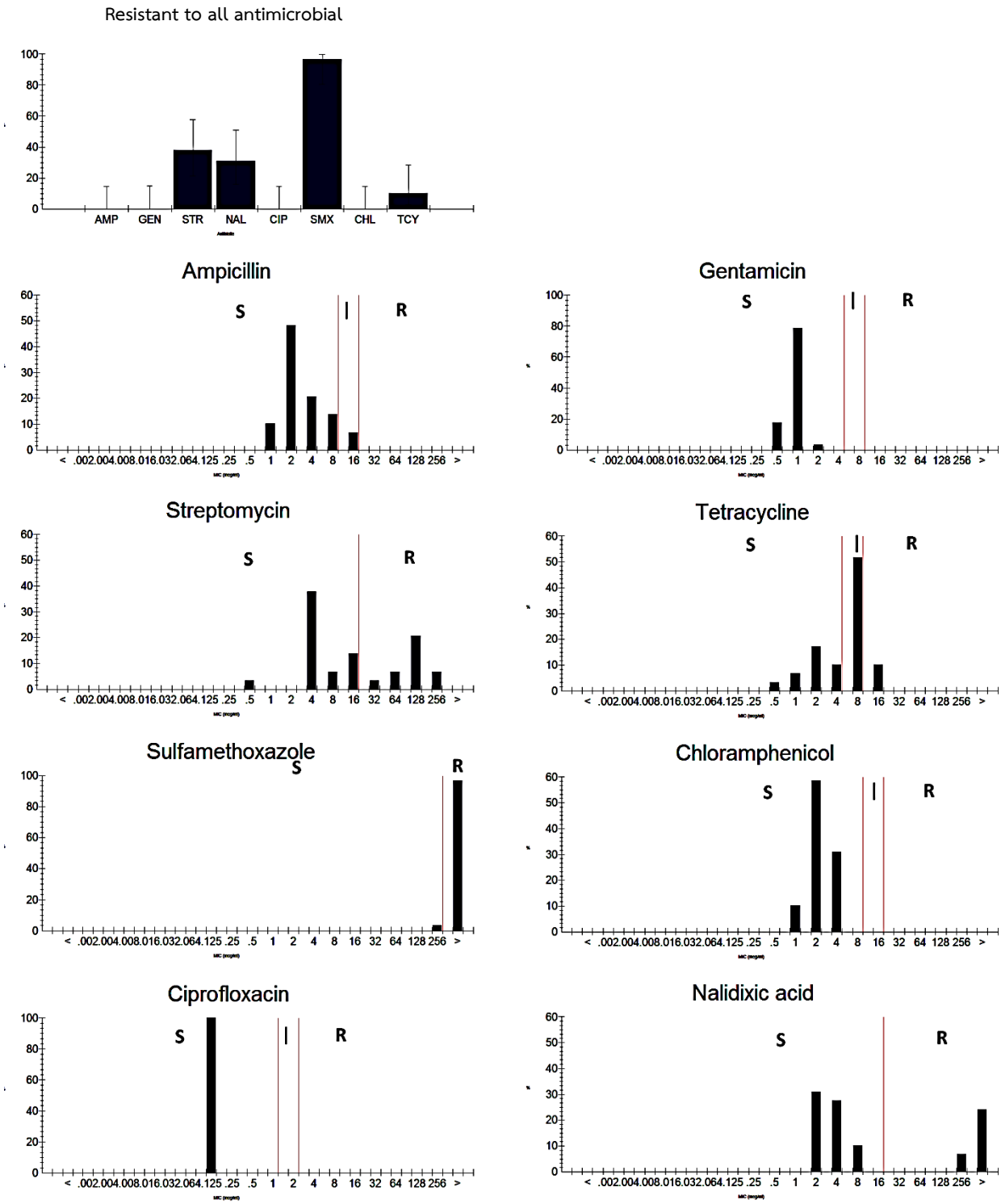
ตารางที่ 7 ผลการแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างมูลไก่

Serovar	Isolate
Muenchen	1
Bardor	3
Braenderup II	7
Choleresuis	1
Weltevreden	5
Fillmore	1
Glostrup	3
Hadar	1
Istanbul	1
Magherafelt	1
Mbandaka	1
Rissen	1
Sandown	1
Typhimurium	1
Virginia	1
Total	29

ตารางที่ 8 รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพใน *Salmonella enterica* จากตัวอย่างมูลไก่

Resistance profile	Number of isolates	% Isolates
SMX	2	6.8
SMX TCY	10	34.4
STR SMX TCY	1	3.4
NAL STR SMX	4	13.8
NAL STR SMX TCY	4	13.8
AMP STR SMX TCY	1	3.4
AMP NAL STR SMX TCY	1	3.4

AMP= ampicillin, TCY= tetracycline, SMX= sulfamethoxazole, STR= streptomycin, GEN= gentamicin, CHL= chloramphenicol
NAL= nalidixic acid, CIP= ciprofloxacin



รูปที่ 6 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* แยกได้จากตัวอย่างมูลไก่ทั้ง 29 ไอโซเลทต่อยาต้านจุลชีพ 8 ชนิด

แกน X เปอร์เซนต์ของเชื้อ แกน Y ระดับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ μg/mL

R= Resistance, I= Intermediate, S= Susceptible

4.3 การแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างมูลโค

ผลการแยกเชื้อ *S. enterica* จากตัวอย่างมูลโคได้ทั้งหมดจำนวน 6 ไอโซเลท (ตารางที่ 9) ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อที่แยกได้ พบเชื้อ *S. enterica* ทั้งหมดจำนวน 4 ไอโซเลทดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ทดสอบ โดยพบการดื้อยา sulfamethoxazole และ tetracycline มากที่สุด คือ 66% รองลงมา คือ ampicillin, streptomycin และ nalidixic aicd คือ 33% ไม่พบการดื้อต่อยา chloramphenicol, gentamicin และ crprofloxacin (รูปที่ 7) ผลการวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิด พบรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 2 ชนิด ได้แก่ streptomycin และ tetracycline มากที่สุด คือ 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 10)

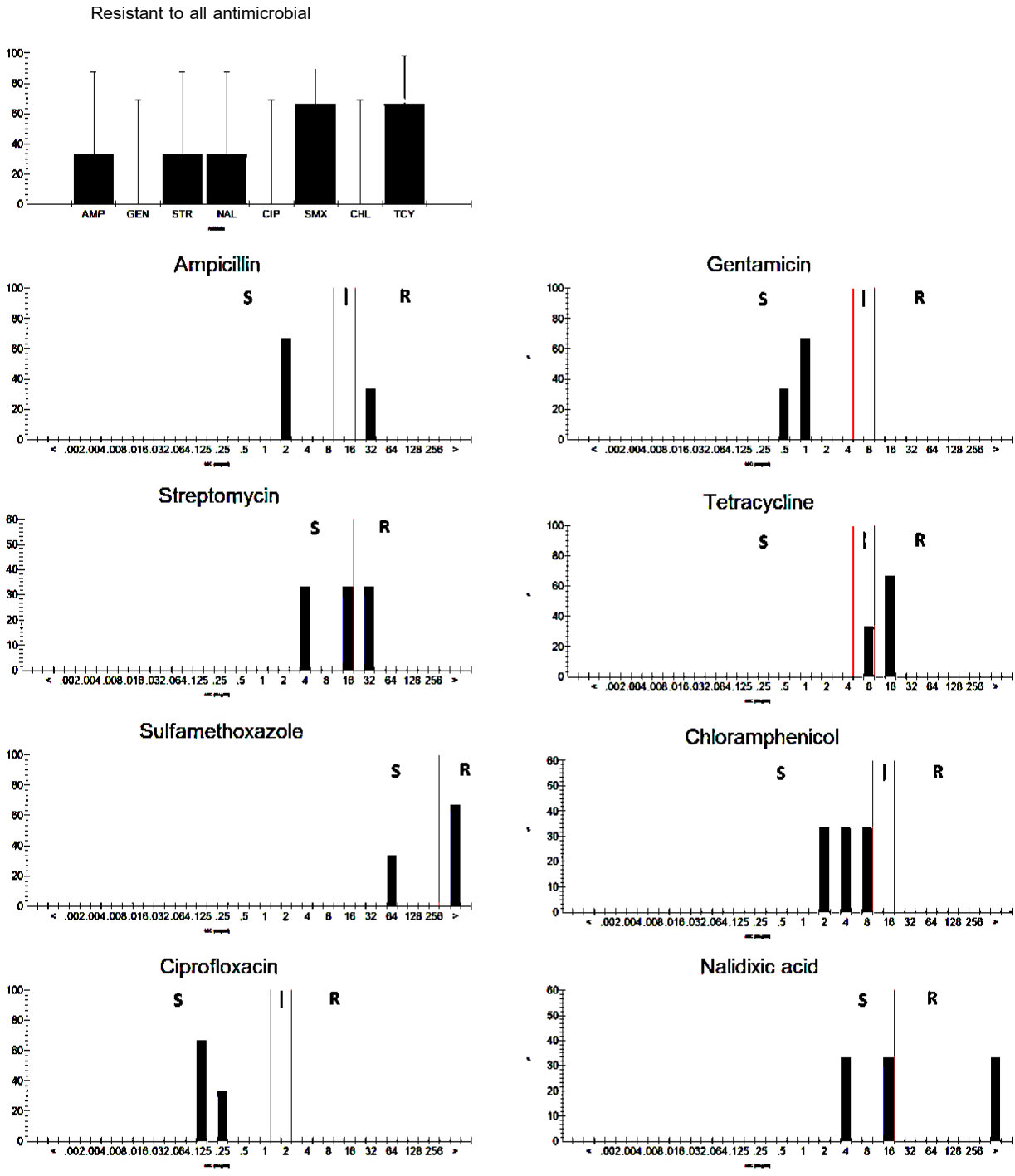
ตารางที่ 9 ผลการแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างมูลโค

Serovar	Isolate
Bardor	4
Weltevreden	2
Total	6

ตารางที่ 10 รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพใน *Salmonella enterica* จากตัวอย่างมูลโค

Resistance profile	Number of isolates	% Isolates
STR TCY	2	33.3
NAL SMX TCY	1	16.6
AMP SMX TCY	1	16.6

AMP= ampicillin, TCY= tetracycline, SMX= sulfamethoxazole, STR= streptomycin, GEN= gentamicin, CHL= chloramphenicol
NAL= nalidixic acid, CIP= ciprofloxacin



รูปที่ 7 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* แยกได้จากตัวอย่างมูลโคทั้ง 10 ไอโซเลท ต่อยาต้านจุลชีพ 8 ชนิด
แกน X เปอร์เซนต์ของเชื้อ แกน Y ระดับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ µg/mL
R= Resistance, I= Intermediate, S= Susceptible

4.4 การแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างเนื้อไก่

ผลการแยกเชื้อ *S. enterica* จากตัวอย่างเนื้อไก่ได้ทั้งหมดจำนวน 23 ไอโซเลท (ตารางที่ 11) ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อที่แยกได้ พบเชื้อ *S. enterica* ทั้งหมดจำนวน 22 ไอโซเลทดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ทดสอบ โดยพบการดื้อยา sulfamethoxazole และ streptomycin มากที่สุด คือ 87% รองลงมา คือ ampicillin คือ 78% tetracycline 73% nalidixic aicd 61% และ chloramphenicol 30% crprofloxacin 9% ไม่พบการดื้อต่อยา gentamicin (รูปที่ 8)) ผลการวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิดพบรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, nalidixic aicd, streptomycin, sulfamethoxazole และ tetracycline มากที่สุด คือ 6 ไอโซเลท (ตารางที่ 12)

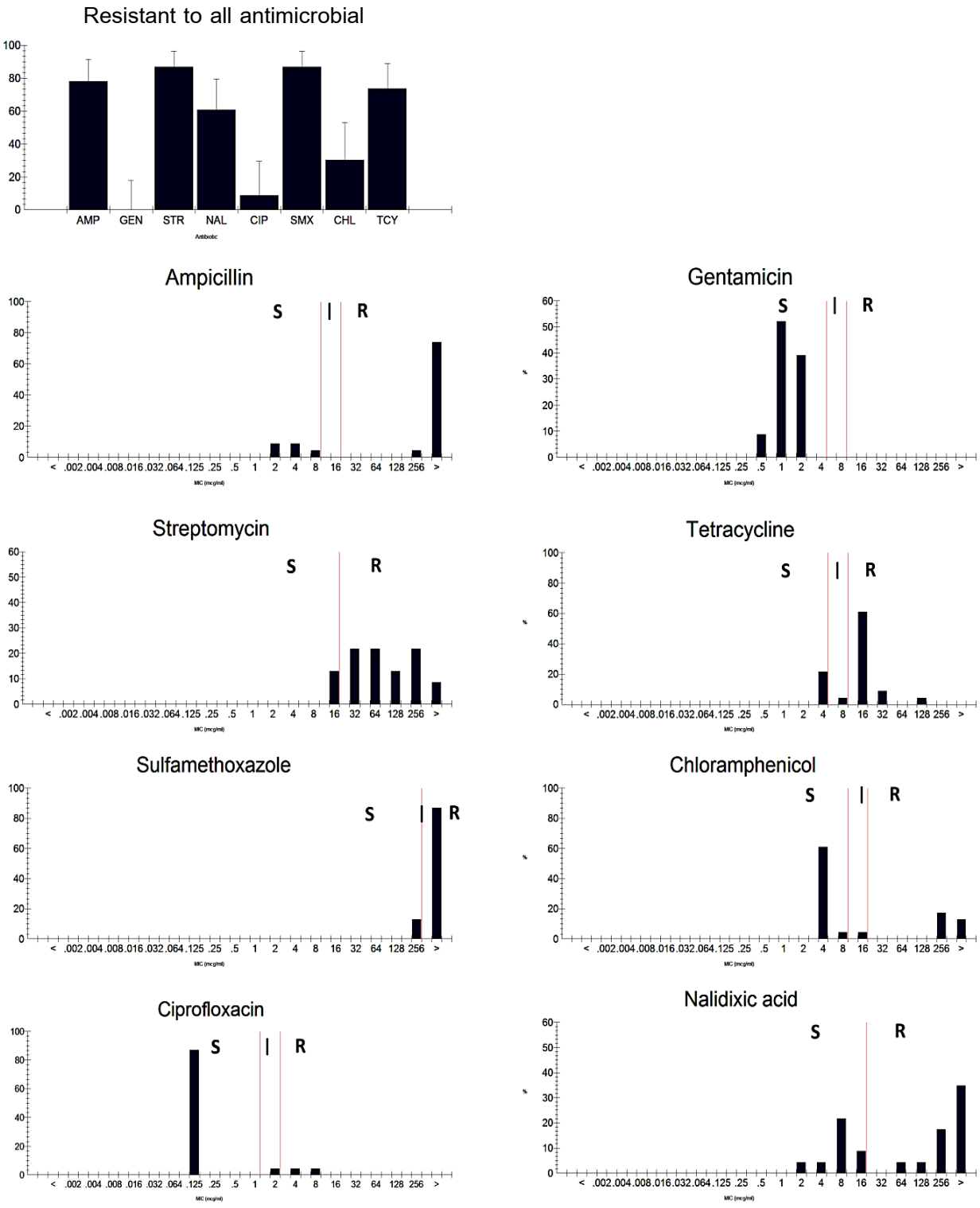
ตารางที่ 11 ผลการแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างเนื้อไก่

Serovar	Isolate
Rissen	3
Weltevreden	2
Typhimurium	4
Give	4
Kentucky	1
Albany	7
Hvittingfoss	1
Kalamu	1
Total	23

ตารางที่ 12 รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพใน *Salmonella enterica* จากตัวอย่างเนื้อไก่

Resistance profile	Number of isolates	% Isolates
SMX TCY	1	4.3
AMP TCY	2	8.6
NAL STR SMX TCY	2	8.6
AMP STR SMX TCY	5	21.7
AMP NAL STR SMX	2	8.6
CHL CIP NAL STR SMX	1	4.3
AMP NAL STR SMX TCY	1	4.3
AMP CIP NAL STR SMX	1	4.3
AMP CHL NAL STR SMX TCY	6	26.0
AMP CHL CIP NAL STR SMX TCY	1	4.3

AMP= ampicillin, TCY= tetracycline, SMX= sulfamethoxazole, STR= streptomycin, GEN= gentamicin, CHL= chloramphenicol
NAL= nalidixic acid, CIP= ciprofloxacin



รูปที่ 8 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* แยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่ทั้ง 23 ไอโซเลท ต่อยาต้านจุลชีพ 8 ชนิด

แกน X เปอร์เซนต์ของเชื้อ แกน Y ระดับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ μg/mL

R= Resistance, I= Intermediate, S= Susceptible

4.5 การแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างเนื้อสุกร

ผลการแยกเชื้อ *S. enterica* จากตัวอย่างเนื้อสุกร ไดทั้งหมดจำนวน 31 ไอโซเลท (ตารางที่ 13) ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อที่แยกได้ พบเชื้อ *S. enterica* ทั้งหมดจำนวน 30 ไอโซเลทดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ทดสอบ โดยพบการดื้อยา sulfamethoxazole มากที่สุด คือ 87% รองลงมา คือ tetracycline 77%, streptomycin 39%, ampicillin 32%, nalidixic aicd และ chloramphenicol 10% ไม่พบการดื้อต่อยา gentamicin และ ciprofloxacin (รูปที่ 9) ผลการวิเคราะห์รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพมากกว่า 1 ชนิดพบรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 2 ชนิด ได้แก่ sulfamethoxazole และ tetracycline มากที่สุด คือ 9 ไอโซเลท (ตารางที่ 14)

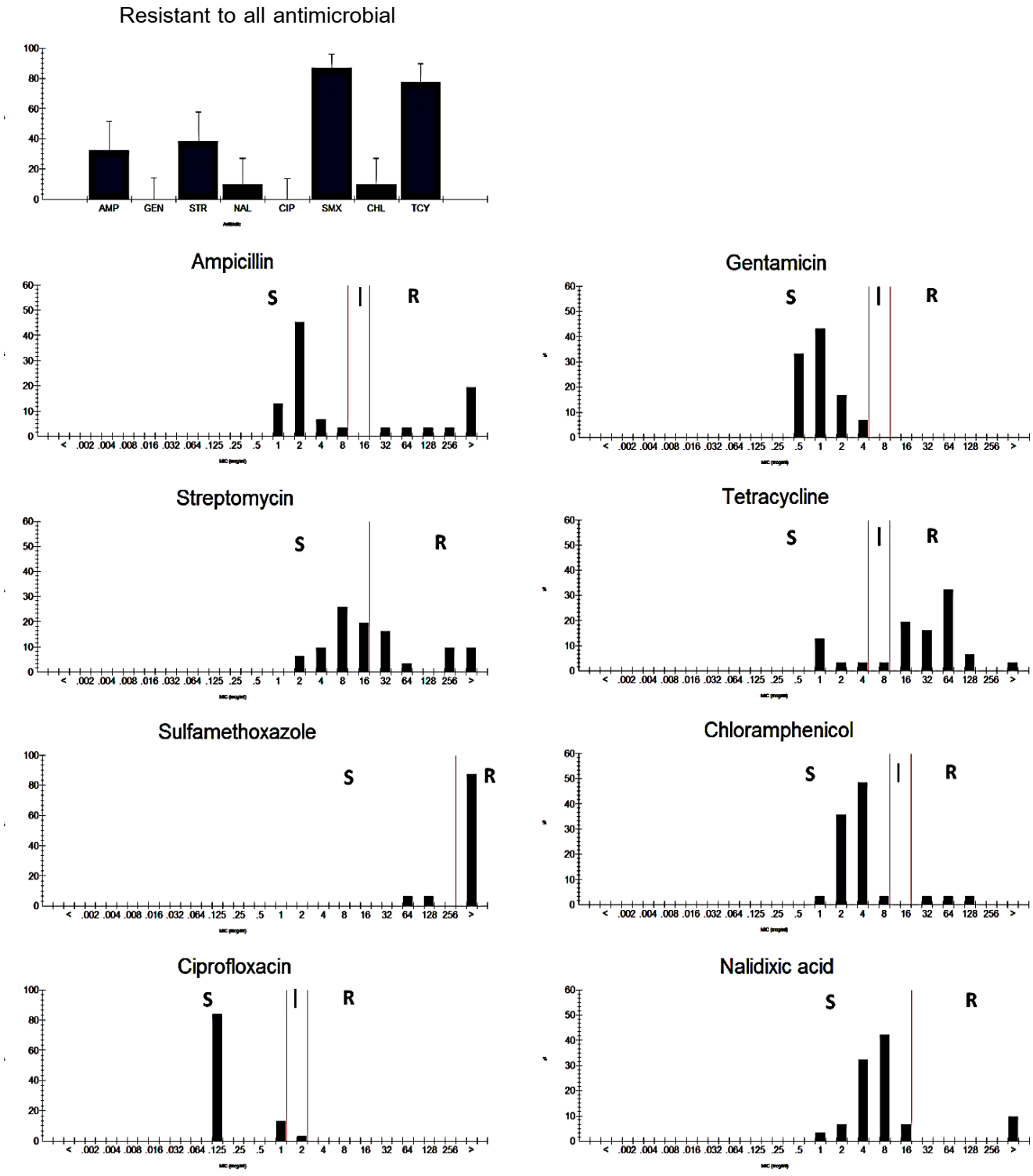
ตารางที่ 13 ผลการแยกและจำแนกเชื้อ *Salmonella enterica* จากตัวอย่างเนื้อสุกร

Serovar	Isolate
Rissen	7
Anatum	4
Weltevreden	5
Typhimurium	5
Give	4
Dirby	1
Kentucky	1
Bredeney	4
Total	31

ตารางที่ 14 รูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพใน *Salmonella enterica* จากตัวอย่างเนื้อสุกร

Resistance profile	Number of isolates	% Isolates
TCY	1	3.2
SMX	1	3.2
SMX TCY	9	29.0
NAL SMX	2	6.4
CHL SMX	1	3.2
AMP TCY	2	6.4
STR SMX TCY	4	12.8
NAL STR SMX	1	3.2
AMP SMX TCY	1	3.2
CIP SMX TCY	1	3.2
AMP STR SMX TCY	5	16.1
AMP CHL STR SMX TCY	2	6.4

AMP= ampicillin, TCY= tetracycline, SMX= sulfamethoxazole, STR= streptomycin, GEN= gentamicin, CHL= chloramphenicol
NAL= nalidixic acid, CIP= ciprofloxacin



รูปที่ 9 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* แยกได้จากตัวอย่างเนื้อสุกร ทั้ง 31 ไอโซเลท ต่อยาต้านจุลชีพ 8 ชนิด
แกน X เปอร์เซนต์ของเชื้อ แกน Y ระดับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ µg/mL
R= Resistance, I= Intermediate, S= Susceptible

4.6 ผลการตรวจจำแนกชนิดของยีนที่ควบคุมการดื้อยาในเชื้อ *Salmonella enterica*

นอกจากยา ampicillin เชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จากตัวอย่างต่าง ๆ ยังพบการดื้อยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด คือ tetracycline, sulfamenthoxazole, streptomycin และ chloramphenicol มากที่สุด (ตารางที่ 15) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ศึกษาถึงกลไกที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลสชีพทั้ง 4 ชนิด โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจหายีนที่ควบคุมการดื้อยาต้านจุลชีพ ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ tetracycline (*tetA, tetB, tetC, tetG* และ *tetS*), sulfamethoxazole (*sul1* และ *sul2*), streptomycin (*addB* และ *accC*) และ chloramphenicol (*cat1, cat2, cat3* และ *floR*) (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 15 จำนวนเชื้อ *Salmonella enterica* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ 4 ชนิด

Antimicrobial	Number of resistant isolates (%)				
	Swine feces (40 isolates)	Chicken feces (29 isolates)	Cattle feces (6 isolates)	Pork (31 isolates)	Chicken meat (23 isolates)
Tetracycline	17 (43.7)	3 (10.3)	4 (66.6)	24 (77.4)	18 (79.3)
Sulfamethoxazole	34 (84.5)	28 (96.6)	4 (66.6)	27 (87)	20 (87)
Streptomycin	17 (43.7)	11 (37.9)	2 (33.3)	12 (38.7)	12 (87)
Chloramphenicol	5 (12.7)	0 (0)	0 (0)	3 (9.7)	7 (30.4)

4.7 การตรวจหาชนิดของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ในเชื้อ *Salmonella enterica* ที่ดื้อต่อยา ampicillin

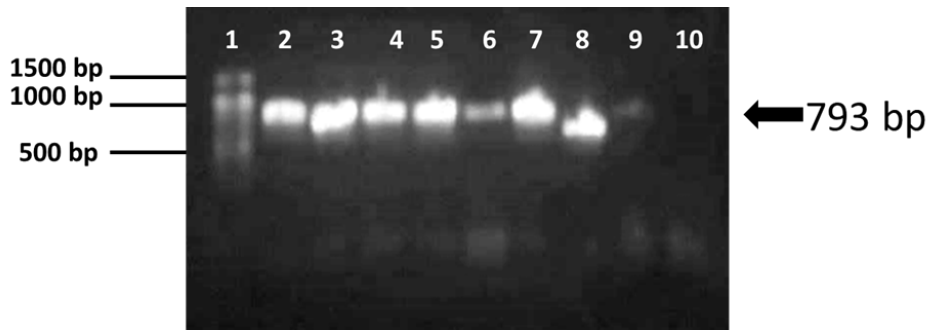
ตัวอย่างเชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จากมูลสุกรทั้งหมด 40 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด 16 ไอโซเลท ตัวอย่างที่แยกจากมูลไก่ทั้งหมด 29 ไอโซเลท ไม่พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ตัวอย่างที่แยกจากมูลโคจำนวน 6 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด 2 ไอโซเลท ตัวอย่างที่แยกจากเนื้อไก่จำนวน 23 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin 18 ไอโซเลท และตัวอย่างที่แยกจากเนื้อสุกรทั้งหมด 31 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด 10 ไอโซเลท

ผลการตรวจหายีนเอนไซม์ β-lactamase โดยวิธี PCR ในเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด 46 ไอโซเลท พบเชื้อทั้งหมด 25 ไอโซเลท ให้ผลบวกต่อยีน bla_{TEM} ทั้งหมด โดยเชื้อ *S. enterica* ที่เหลือจำนวน 21 ไอโซเลท ไม่สามารถตรวจพบยีน β-lactamase ด้วย primers ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนซึ่งอนุมานมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (amino acid deduction) และการเปรียบเทียบกับยีน β-lactamase ที่สืบค้นได้จาก GenBank พบว่ายีน bla_{TEM} ทั้งหมด มีความคล้ายคลึงกับยีนกลุ่ม bla_{TEM-1} (รูปที่ 10-11)

ตารางที่ 16 ผลการตรวจยีนควบคุมการดื้อยาในเชื้อ *Salmonella enterica* ที่แยกได้จากตัวอย่างต่าง ๆ

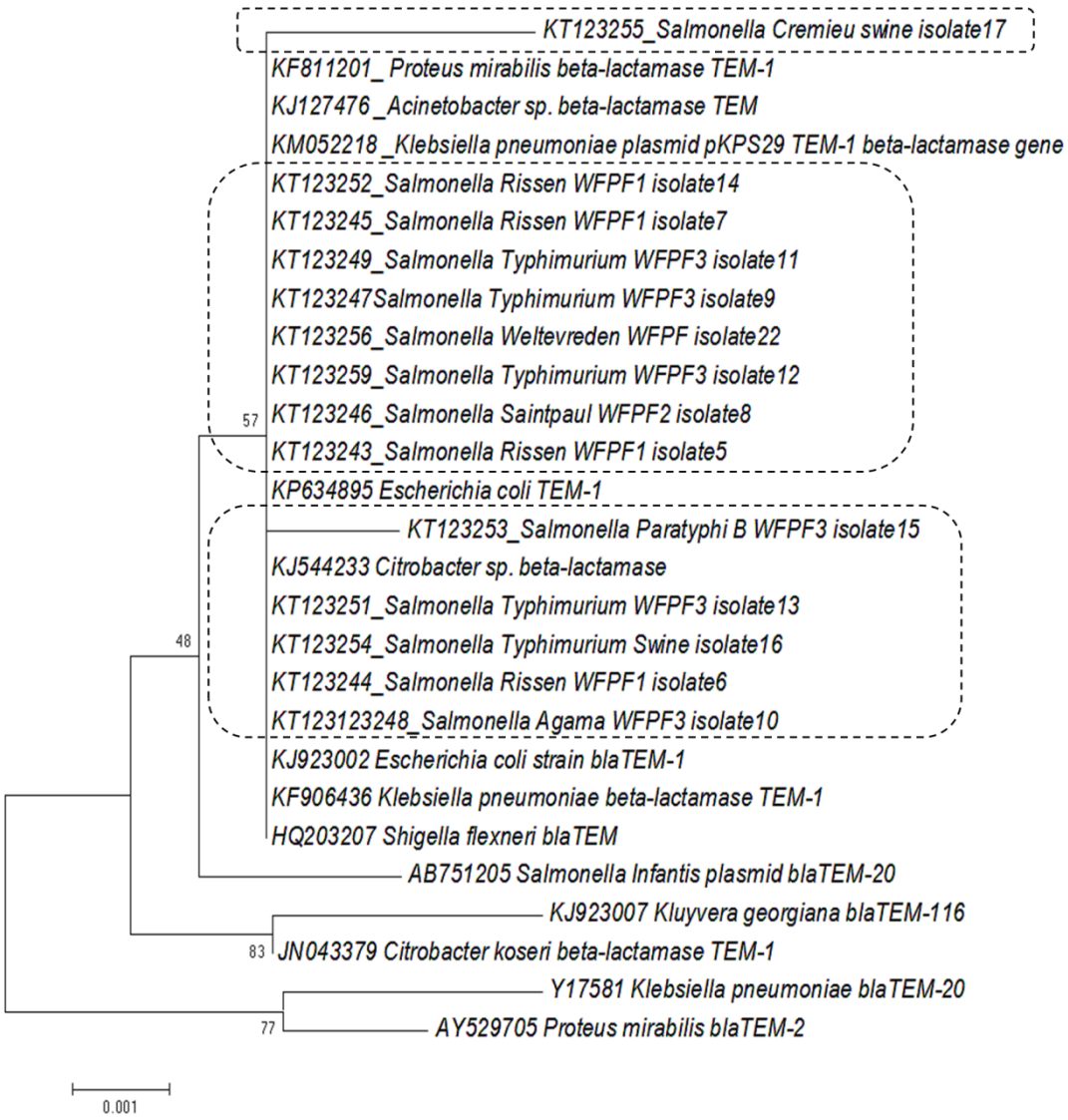
Genes	Resistance Mechanism	Encoded Resistance	Antimicrobial resistant genes of *Salmonella enterica* isolated from each sample				
			Swine feces	Chicken feces	Cattle feces	Pork	Chicken meat
tetA	Efflux	tetracycline	7/17*	0/3	0/4	9/24	6/18
tetB	Efflux	tetracycline	0/17	0/3	0/4	0/24	0/18
tetC	Efflux	tetracycline	0/17	0/3	0/4	0/24	0/18
tetG	Efflux	tetracycline	0/17	0/3	0/4	0/24	0/18
tetS	Ribosomal protection	tetracycline	0/17	0/3	0/4	0/24	0/18
sul1	Dihydropteroate synthase	Sulfonamides	3/34	2/28	0/4	4/27	3/20
sul2	Dihydropteroate synthase	Sulfonamides	14/34	16/28	2/4	16/27	15/20
cat1	Chlorampenicol acetyltransferase	chloramphenicol	0/5	0/0	0/0	0/3	0/7
cat2	Chlorampenicol acetyltransferase	chloramphenicol	1/5	0/0	0/0	0/3	2/7
cat3	Chlorampenicol acetyltransferase	chloramphenicol	0/5	0/0	0/0	0/3	0/7
floR	Efflux	chloramphenicol	2/5	0/0	0/0	1/3	2/7

* ตัวอย่างที่ตรวจพบยีนดื้อยา/ตัวอย่างทั้งหมดที่ดื้อต่อยาชนิดนั้น



รูปที่ 10 ตัวอย่างผลเชื้อ *Salmonella enterica* ที่ให้ผลบวกต่อยีน bla_{TEM}

1 DNA marker
2 Positive control (Plasmid DNA)
3 Isolate 7
4 Isolate 8
5 Isolate 9
6 Isolate 10
7 Isolate 11
8 Isolate 15
9 Isolate 13
10 Negative control



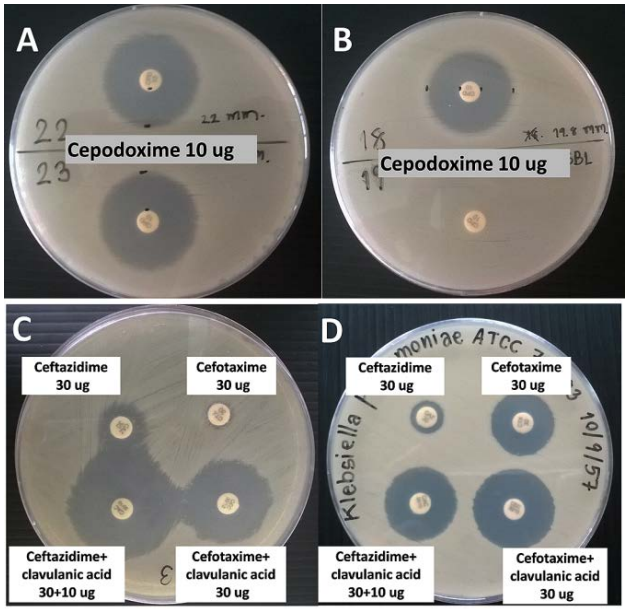
รูปที่ 11 Phylogenetic tree ของยีน bla_{TEM} จากเชื้อ *Salmonella enterica* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (สร้างจากลำดับของกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์; neighbor joining method; 1000 bootstrap)

4.8 การตรวจการสร้างสร้างเอนไซม์ ESBL และชนิดของเอนไซม์ ESBL ในเชื้อ *Salmonella enterica* ที่ดื้อต่อยา ampicillin

เมื่อนำเชื้อ *S. enterica* ที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้ง 46 ไอโซเลท มาตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับฟีโนไทป์ ด้วยวิธี combination disc พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 3 ไอโซเลท คือ *S.* Startford, *S.* Weltevreden และ *S.* Typhimurium ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ (รูปที่ 11) โดยทั้ง 3 ซีโรวาร์ที่พบการสร้างเอนไซม์ ESBL เป็นเชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จากมูลสุกร และเป็นเชื้อที่ให้ผลลบต่อการตรวจสอบยีน β-lactamase

เชื้อ *S. enterica* ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับฟีโนไทป์ (phenotype) จะนำไปทดสอบยืนยันผลในระดับจีโนไทป์ (genotype) ต่อด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่มี

ความจำเพาะต่อยีนกลุ่ม TEM, SHV, OXA และ CTX-M (ตารางที่ 4) ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *S. enterica* ทั้ง 3 ไอโซเลทให้ผลบวกต่อการเพิ่มจำนวนยีนด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีนกลุ่ม CTX-M (รูปที่ 12)



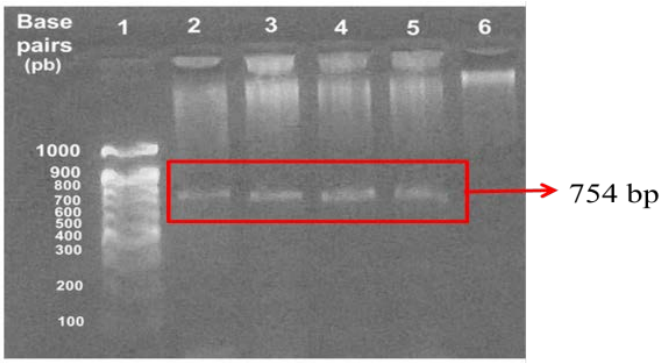
รูปที่ 12 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับฟีโนไทป์ ขั้นตอนการคัดกรองและขั้นตอนการตรวจยืนยัน

A ผลลบในขั้นตอนการคัดกรอง

B ผลบวกในขั้นตอนการคัดกรอง

C ผลบวกในขั้นตอนการยืนยัน

D Positive control (*K. pneumonia*: ATCC 700603)



รูปที่ 13 ผลการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับจีโนไทป์โดยวิธี PCR ผลผลิต DNA ของยีน CTX-M มีขนาดประมาณ 754 bp

Lane 1 1000 bp DNA marker

Lane 2 *S*. Startford

Lane 3 *S*. Weltevreden

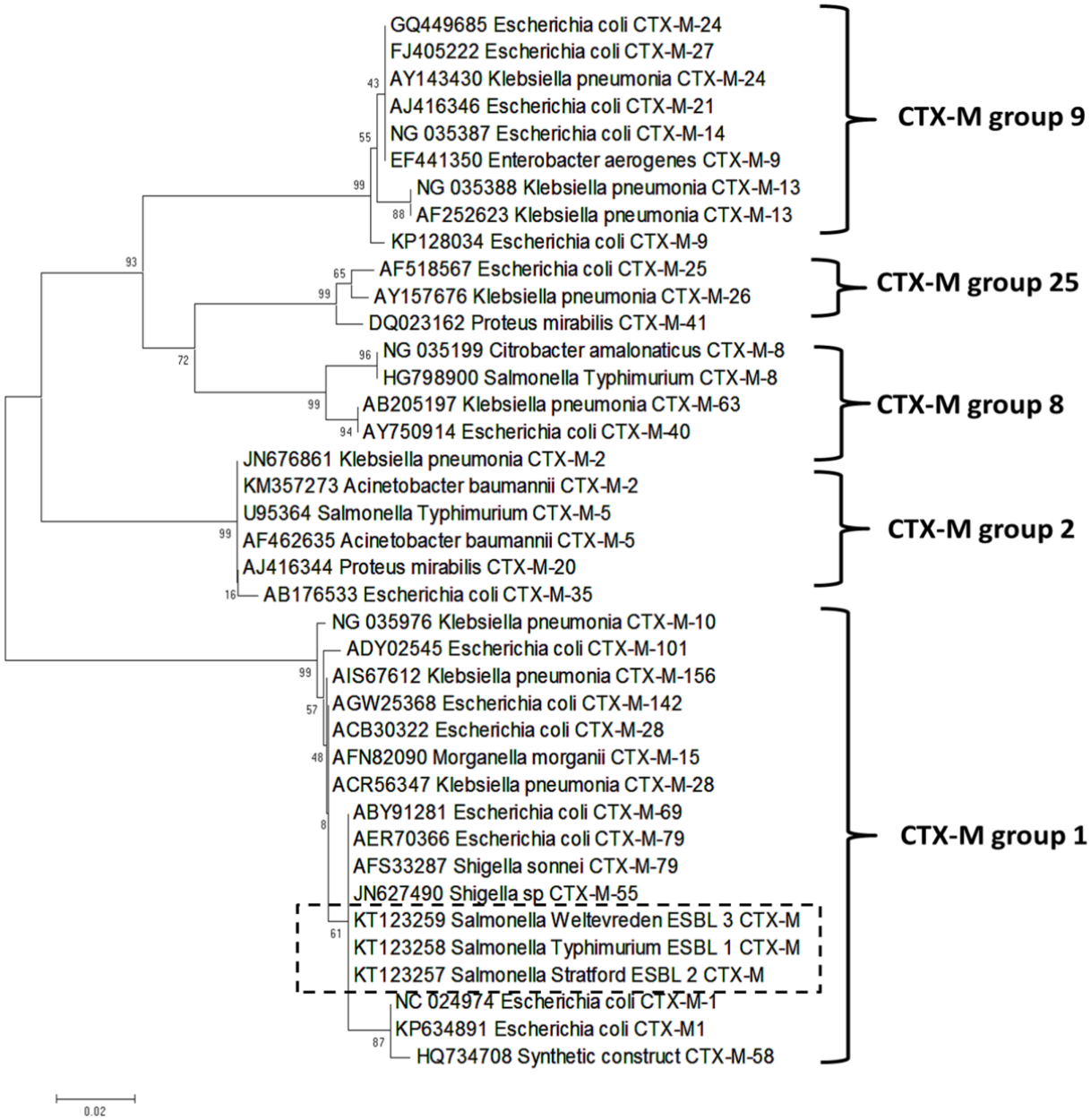
Lane 4 *S*. Typhimurium

Lane 5 Positive control (CTX-M plasmid DNA)

Lane 6 Negative control

4.9 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน ESBL

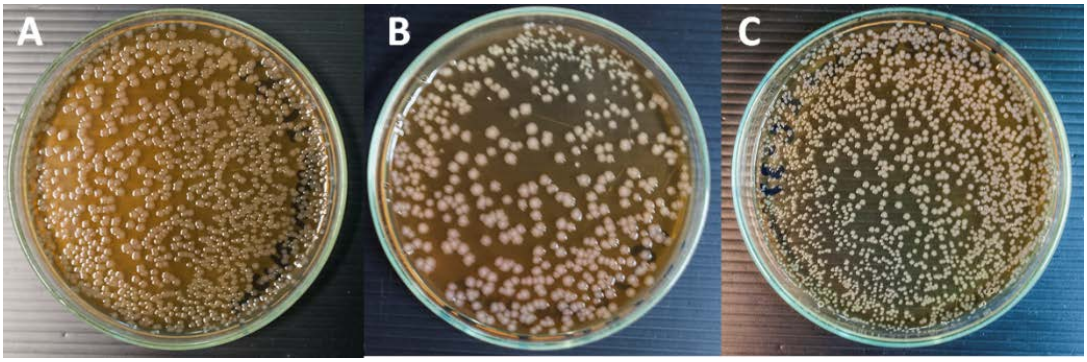
เชื้อ *S. enterica* ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ให้ผลบวกต่อการการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับจีโนไทป์ ด้วยวิธี PCR เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน ซึ่งอนุมานมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (amino acid deduction) และเปรียบเทียบกับยีน ESBL จากฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน ESBL จากเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทมีความใกล้เคียงกับยีน CTX-M ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งคล้ายคลึงกับ CTX-M79 มากที่สุด (รูปที่ 13)



รูปที่ 14 Phylogenetic tree ของยีน ESBL จากเชื้อ *Salmonella enterica* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (สร้างจากลำดับของกรดอะมิโนที่อนุมานมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์: neighbor joining method; 1000 bootstrap)

4.10 ผลการถ่ายโอนพลาสมิด (*In vitro* conjugation transfer)

ผลการทดสอบการถ่ายโอนพลาสมิดในเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922) พบว่าเชื้อ *S. enterica* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ทั้ง 3 ซีโรวาร์ (*S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden, *S*. Startford) ไม่สามารถถ่ายโอนพลาสมิดไปยังเชื้อ *E. coli* ได้ ซึ่งการ spread เชื้อที่ศึกษาในอาหาร MacConKey agar ที่ผสมยา ampicillin 100 μg/mL ไม่พบโคโลนีสีชมพูของเชื้อ *E. coli* (รูปที่ 14)



รูปที่ 15 ผลการทดสอบการถ่ายโอนพลาสมิดที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL จากเชื้อ *Salmonella enterica* ไปสู่เชื้อ *E.* (media: MacConkey agar+100 μg/mL, A=*S.* Typhimurium, B= *S.* Weltevreden, C= *S.* Startford)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกเชื้อ *S. enterica* ได้ทั้งหมดจำนวน 129 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างมูลสุกร จำนวน 40 ไอโซเลท มูลไก่ จำนวน 29 ไอโซเลท มูลโคจำนวน 6 ไอโซเลท เนื้อเนื้อไก่ จำนวน 23 ไอซเลท และเนื้อสุกรจำนวน 31 ไอโซเลท

ผลการทดสอบการดื้อยา ampicillin พบว่า เชื้อ 40 ไอโซเลท จากตัวอย่างมูลสุกรพบเชื้อที่ดื้อยา ทั้งหมด 16 ไอโซเลท ตัวอย่างที่แยกจากมูลไก่ทั้งหมด 29 ไอโซเลท ไม่พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ตัวอย่างที่แยกจากมูลโคจำนวน 6 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด 2 ไอโซเลท ตัวอย่างที่แยกจากเนื้อไก่ จำนวน 23 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin 18 ไอโซเลท และตัวอย่างที่แยกจากเนื้อสุกรทั้งหมด 31 ไอโซเลท พบเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ผลการตรวจหายีนเอนไซม์ β-lactamase โดยวิธี PCR พบเชื้อทั้งหมด 25 ไอโซเลท ให้ผลบวกต่อยีน bla_{TEM} ทั้งหมด โดยเชื้อ *S. enterica* ที่เหลือจำนวน 21 ไอโซเลท ไม่สามารถตรวจพบยีน β-lactamase ด้วยprimers ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่อนุมานมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (amino acid deduction) และการเปรียบเทียบกับยีน β-lactamase ที่สืบค้นได้จาก GenBank พบว่ายีน bla_{TEM} ทั้งหมด มีความคล้ายคลึงกับยีนกลุ่ม bla_{TEM-1} การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ในระดับฟีโนไทป์ ด้วยวิธี combination disc พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 3 ไอโซเลท คือ *S.* Startford, *S.* Weltevreden และ *S.* Typhimurium ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบทั้งในระดับการตรวจคัดกรอง การตรวจยืนยันผลในระดับจีโนไทป์ (genotype) นอกจากนี้การตรวจด้วยวิธี PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิกรดอะมิโนที่อนุมานมาจากลำดับนิวคลีโอท์พบว่ายีน ESBL ที่ตรวจพบเป็นยีนกลุ่ม CTX-M กลุ่มที่ 1 ซึ่งคล้ายคลึงกับ CTX-M79 มากที่สุด

การศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพ 8 ชนิดในภาพรวมพบว่าเชื้อ *S. enterica* จากตัวอย่างทุกชนิดที่แยกได้จากจังหวัดพัทลุงดื้อต่อยา sulfamethoxazole มากที่สุด รองลงมา คือ streptomycin และ tetracycline และไม่พบการดื้อต่อยา gentamicin และ ciprofloxacin การดื้อต่อยา sulfamethoxazole จากเชื้อที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าส่วนใหญ่ถูกควบคุมด้วยยีน *sul2* และส่วนน้อยเกิดจากยีน *sul1* ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ในเชื้อ *S.* Weltevreden จากตัวอย่างในประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ยุโรป และอเมริกา จำนวนมากกว่า 500 ไอโซเลท พบว่าการดื้อยากลุ่ม sulphonamides ตรวจพบยีน *sul2* เป็นหลักเช่นกัน(Aarestrup et al., 2003) แตกต่างจากรายงานการศึกษาในประเทศโปรตุเกส ซึ่งพบว่าเชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้ตรวจพบยีน *sul1* มากที่สุด รองลงมา คือ *sul2* และ *sul3* ตามลำดับ (Antunes *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาเชื้อ *S. enterica* ที่แยกจากตัวอย่าง สุกรและสัตว์ปีกในประเทศไทยในก่อนหน้านี้รายงานว่าการดื้อยากลุ่ม sulphonamides เกิดจากการควบคุมด้วยยีน *sul2* และ *sul1* ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน แต่ในรายงานดังกล่าวพบว่า ตัวอย่าง *S. enterica* ที่แยกจากตัวอย่างสุกรส่วนใหญ่ตรวจพบยีน *sul3* และมีเชื้อ *S. enterica* บางตัวอย่างตรวจพบยีนควบคุมการดื้อยากลุ่ม sulphonamides มากกว่า 1 ยีน (Chuanchuen & Padungtod, 2009) ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจหายีนดังกล่าว ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่เหลือที่ให้ผลลบต่อยีน *sul1* และ *sul2* ในการศึกษาครั้งนี้อาจจะมียีน *sul3* เป็นสาเหตุของการดื้อยากลุ่ม sulphonamides ยีนควบคุมการดื้อยา *sul1* และ *sul2* ควบคุมการสร้างเอนไซม์

dihydropteroate synthase ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ folic acid และเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งด้วยยากลุ่ม sulphonamides รายงานการศึกษาพบว่า ยีน *sul1* พบอยู่บน calss-1 integron ซึ่งมีความสามารถถ่ายทอดจากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกเซลล์ได้ ยีน *sul2* พบอยู่บน non-conjugate plasmid มีความสามารถส่งผ่านยีนดื้อยาได้ต่ำ (Skold, 2000) สำหรับยีน *sul3* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ dihydropteroate synthase เช่นเดียวกับ *sul1* และ *sul2* แต่พบอยู่บน conjugative plasmid ซึ่งรายงานครั้งแรกในเชื้อ *E. coli* (Perreten *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2010) การพบยีนกลุ่ม *sul2* ในเชื้อที่แยกได้ สันนิษฐานว่าเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่พัฒนาการดื้อยากลุ่ม sulphonamides ขึ้นเองตามธรรมชาติซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ จากการที่เชื้อสัมผัสยากลุ่มดังกล่าวเป็นเวลานานต่อเนื่อง และเชื้อถ่ายทอดยีนดื้อยาผ่านทางแนวดิ่ง (vertical transfer) เป็นส่วนใหญ่

ในการศึกษานี้ยังพบว่าเชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้ดื้อต่อยา streptomycin และ tetracycline ในระดับที่สูงเช่นกัน ในการศึกษานี้ได้ตรวจหายีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside-3-adenyltransferase (*addB*) และ aminoglycosides-N3-acetyltransferase (*accC*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides ผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถตรวจพบยีนทั้งสองชนิด ซึ่งแตกต่างรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าที่พบว่า เชื้อ *S.* Weltevreden จากตัวอย่างในประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ยุโรป และอเมริกาที่ดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides ตรวจพบยีน *aphA2* มากที่สุด รองลงมาคือ *addA* และยีน *strA* (Aarestrup et al., 2003) และรายงานในประเทศไทยซึ่งตรวจเชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จากตัวอย่างสุกรและสัตว์ปีก ก็พบว่าเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides สามารถตรวจพบยีน *strA* และ *strB* ได้มากที่สุด (Chuanchuen *et al*., 2008) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่ากลไกการดื้อยา streptomycin ในเชื้อที่แยกได้จากการศึกษานี้อาจจะเกิดจากการควบคุมด้วยเอนไซม์ *addA, aphA* และ *straA* และ *strB* ซึ่งไม่ได้ศึกษาในครั้งนี้

กลไกการดื้อยากลุ่ม aminoglycosides มีกลไกเกี่ยวข้องหลายกลไก เช่น การสร้างเอนไซม์ออกมาเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของยา (antibiotic modification) โดยกลไกการดื้อยา aminoglycoside ในแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae ที่พบได้มากที่สุด คือ การสร้างเอนไซม์ aminoglycoside-3-adenyltransferase (*add*), เอนไซม์ N-Acetyltransferases (*acc*) เอนไซม์ O-Adenyltransferases (ANT), เอนไซม์ aminoglycoside-3-phosphotransferase (*strA*) และเอนไซม์ aminoglycoside-6-Phosphotransferase (*strB*) (Doi *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2004; Ramirez *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังพบกลไกอื่น ๆ เช่น กระบวนการ methylation ในยีน 16S rRNA โดยเอนไซม์ methyltransferases (*Arm* and *Rmt*) (Doi & Arakawa, 2007) และกลไก Efflux pump (AcrD) (Rosenberg *et al.*, 2000) สำหรับการดื้อยากลุ่ม tetracycline พบว่าเชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จากมูลสุกร (7 ไอโซเลท) เนื้อหมู (9 ไอโซเลท) และเนื้อไก่ (6 ไอโซเลท) เท่านั้นที่ตรวจพบยีน *tetA* ในขณะที่ไอโซเลทที่เหลือไม่สามารถตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา tetracycline โดย primers ที่ใช้ในการศึกษานี้ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าการดื้อยากลุ่ม tetracycline ในเชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จากตัวอย่างไก่และสุกรควบคุมด้วยยีน *tetA* (Chuanchuen *et al*., 2008)

การดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactam ในเชื้อ *S. enterica* เป็นปัญหาสำคัญที่พบแพร่กระจายเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก ส่วนหนึ่งเกิดจากปัญหาการใช้ยารักษาโรคที่ขาดความระมัดระวัง และรวมถึงการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ กลไกการดื้อยากลุ่ม β-lactam ในเชื้อ *S. enterica* เกิดจากการสร้างเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด คือ β-lactamase และ ESBL ยา ampicillin เป็นยากลุ่ม β-lactam ที่มีการใช้ทางคลีนิกอย่างกว้างขวาง ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้ยาดังกล่าวเป็นตัวแทนสำหรับการศึกษาการดื้อยากลุ่ม β-lactam เพื่อตรวจคัดกรองเชื้อที่คาดว่าจะสร้างเอนไซม์ β-lactamase และ ESBL ได้ ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า

เชื้อ *S. enterica* ที่แยกได้จากตัวอย่างต่าง ๆ ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด จำนวน 46 ไอโซเลท ผลการตรวจหายีน β-lactamase พบเชื้อทั้งหมด 25 (54%) ไอโซเลท ตรวจพบยีน bla_{TEM} และการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าความคล้ายคลึงกับยีนกลุ่ม bla_{TEM-1} ทั้งหมด การศึกษาความชุกของยีนกลุ่ม β-lactamase มีรายงานค่อนข้างน้อย รายงานส่วนใหญ่จะให้ความสำคัญไปที่ยีนกลุ่ม ESBL ดังนั้นข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาของยีนกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญ ทั้งนี้เพราะยีนกลุ่ม β-lactamase มีโอกาสกลายพันธุ์และพัฒนาไปเป็นกลุ่ม ESBL ได้ ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบว่าเชื้อ *S. enterica* ที่แยกจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่ดื้อยากลุ่ม β-lactam พบยีนดื้อยากลุ่ม bla_{CYM} มากที่สุด (50%) รองลงมาคือ bla_{TEM-1} (47%)(Zhao *et al.*, 2009) แม้ว่าการศึกษานี้จะใช้ primers ที่คลอบคลุมยีนกลุ่ม β-lactamase จำนวน 4 กลุ่ม (bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, bla_{OXA} และ bla_{TEM}) ซึ่งทั้งหมดเป็นยีนกลุ่มที่มีรายงานพบได้มากในเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae แต่ก็พบว่ามีเชื้อาจำนวนหนึ่งที่ตรวจไม่พบยีน β-lactamase ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจจะเป็นไปได้ว่ากลไกการดื้อยาของเชื้อดังกล่าวเกิดจากยีน β-lactamase กลุ่มอื่น

ผลการศึกษาการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเชื้อที่ดื้อต่อยา ampicillin ทั้งหมด 46 ไอโซเลท พบมีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ได้ โดยพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่แยกได้จากมูลสุกร ซึ่งไม่พบยีนดื้อยา β-lactamase การจำแนกซีโรวาร์ พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท คือ *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden และ *S.* Startford การตรวจหายีนสร้างเอนไซม์ ESBL ที่มีรายงานส่วนใหญ่ในประเทศไทยเป็นการศึกษาในตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นส่วนใหญ่ มีรายงานการศึกษาที่พบในโรงพยาบาลโดยการตรวจคัดกรองด้วยวิธี double disc พบว่าเอนไซม์ ESBL มักจะแยกได้จากเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* โดยพบได้ประมาณ 17-38 % ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง โดยมักจะพบ ESBL ในเชื้อ *K. pneumoniae* สูงกว่าใน *E. coli* (Waiwarawooth. Jirachai *et al.,* 2006) อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาจากแบคทีเรียที่แยกได้จากสัตว์ในประเทศไทยยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะรายงานในเชื้อ *S. enterica* รายงานส่วนใหญ่เป็นข้อมูลจากต่างประเทศ ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *S. enterica* ประมาณ 13.6 % (3/22) สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ได้ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae อื่น ๆ ที่แยกได้จากสัตว์ในประเทศอื่น (Carattoli, 2008; Geser *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2012) ข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ในระดับ genotype พบว่ายีน ESBL จากเชื้อที่แยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นกลุ่ม CTX-M และเมื่อวิเคราะห์ลาดับกรดอะมิโนพบว่ามีความใกล้เคียงกับกลุ่ม CTX-M-79 จากการสืบค้นเอกสารที่เกี่ยวข้องยังไม่พบรายงานของ CTX-M-79 ที่แยกจากเชื้อ *S. enterica* ในตัวอย่างจากสัตว์ในประเทศไทยมาก่อน เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของยีน ESBL จากตัวอย่างเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลในประเทศไทยก็พบว่าส่วนใหญ่เป็นยีน ESBL กลุ่ม CTX-M เช่นกัน (Jitsurong *et al.*, 2006; Tangkoskul *et al.*, 2012) อาจมีความเป็นไปได้ที่เชื้อที่แยกได้จากสัตว์อาจจะเป็นตัวกักเก็บ (reservoir host) และแพร่กระจายยีนดื้อยาดังกล่าวมาสู่เชื้อก่อโรคในมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษานี้ไม่สามารถยืนยันได้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีน CTX-M ที่แยกได้จากสัตว์ และเชื้อที่แยกได้จากมนุษย์ นอกจากนี้การศึกษาการถ่ายโอนพลาสมิดจากเชื้อ *S. enterica* ทั้ง 3 ซีโรวาร์ไปสู่ *E. coli* (ATCC 25922) ไม่พบการถ่ายโอนพลาสมิดระหว่างกัน ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากความสามารถการถ่ายโอนของตัวพลาสมิดเอง หรืออาจเป็นเพราะการเลือกใช้ host ที่ยังไม่เหมาะสม

สำหรับเทคนิคการตรวจคัดกรอง การตรวจยืนยันในการศึกษาครั้งนี้ได้กระทาตามวิธีมาตรฐานที่กำหนดโดย CLSI และผลการตรวจที่ได้ยังได้รับการตรวจยืนยันอีกครั้งด้วยเทคนิค PCR ด้วย Phusion High-Fedelity DNA polymerase และการวิเคราะห์ลาดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้มีความมั่นใจในระดับหนึ่งในการรายงานกลุ่มยีน อย่างไรก็ตามผลการเพิ่มจานวนยีนโดยเทคนิค PCR ที่ศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้เพิ่มจานวนยีนที่สมบูรณ์ (intact gene) ซึ่งอาจจะมีความเป็นไปได้ที่ยีนนั้นจะเป็น CTX-M ตัวอื่น สำหรับรายงานในต่างประเทศยีน ESBL

กลุ่ม CTX-M นั้นพบได้มากในเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* แต่อาจจะเป็น sub-group ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมหรือรูปแบบการใช้ยาต้านจุลชีพที่แตกต่างกัน

การพบเชื้อ *S. enterica* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ได้ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะวงศ์ Enterobacteriaceae ที่พบในสัตว์อาจจะเป็น reservoir ที่สำคัญที่จะแพร่กระจายยีนดื้อยากลุ่ม ESBL ไปในสัตว์ และสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบมาถึงมนุษย์ได้ ถ้าเกิดการติดเชื้อดังกล่าว

5. คำขอบคุณ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2557 สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ หน่วยวิจัยการจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ และสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์เครื่องมือสำหรับการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณ นางสาวสิริลักษณ์ หนูมี นางสาวยุวดี แซ่อึ้ง นางสาวกรชนก เกียรติดำรงค์ และนายธีรยุทธ เกษมสันต์ นิสิตปริญญาโท และนิสิตปริญญาตรีสาขาชีววิทยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำปฏิบัติการในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Aarestrup, F. M. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. **Internatinal Journal of Antimicrobial Agents**. 12. 279-285.

Aarestrup, F. M. 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic Clinical Pharmacology and Toxicology**. 96. 271-281.

Aarestrup, F. M., Bager, F., Jensen, N. E., Madsen, M., Meyling, A., & Wegener, H. C. 1998. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). **Apmis**. 106. 745-770.

Aarestrup, F. M., Kruse, H., Tast, E., Hammerum, A. M., & Jensen, L. B. 2000. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway. **Microbial Drug Resistance**. 6. 63-70.

Aarestrup, F. M., Lertworapreecha, M., Evans, M. C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T., Hendriksen, R. S., & Wegener, H. C. 2003. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 52. 715-718.

Ajiboye, R. M., Solberg, O. D., Lee, B. M., Raphael, E., Debroy, C., & Riley, L. W. 2009. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. **Clinical and Infectious Diseases**. 49. 365-371.

Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., & Peixe, L. 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 49. 836-839.

Aroonwadee, C., Aroonlug, L., Wanlop, K., Viraphong, L., Sukanya, S., & Preecha, H. 2007. CTX-M Extended-Spectrum β-Lactamase Among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in a Thai University Hospital. **Southeast Asian Journla of Tropical Medicine and Public Health**. 38. 493-500.

Bali, E. B., Acik, L., & Sultan, N. 2010. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum beta-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella isolates* in a Turkish hospital. **African Journal of Microbiology Research**. 4. 650-654.

Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Sawanpanyalert, P., Hendriksen, R. S., Lo Fo Wong, D. M., & Aarestrup, F. M. 2004. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. **Emerging and Infectiou Diseases**. 10. 131-136.

Bernbom, N., Ng, Y. Y., Paludan-Muller, C., & Gram, L. 2009. Survival and growth of *Salmonella* and *Vibrio* in som-fak, a Thai low-salt garlic containing fermented fish product. **International Journal of Food Microbiology**. 134. 223-229.

Boyle, F., Morris, D., O'Connor, J., Delappe, N., Ward, J., & Cormican, M. 2010. First report of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolated from poultry in Ireland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 54. 551-553.

Braden, C. R., & Tauxe, R. V. 2013. Emerging Trends in Foodborne Diseases. **Infectious Disease Clinics of North America** 27. 517.

Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical and Microbiology Reviews**. 14. 933-951, table of contents.

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**. 38. 2465-2467.

Brinas, L., Zarazaga, M., Saenz, Y., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. 2002. Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 46. 3156-3163.

Carattoli, A. 2008. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. **Clinical Microbiology and Infection** 14. 117-123.

Centers for Disease Control and Prevention. (2015). Laboratory Detection of Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBLs) Retrieved August 19,, 2015, from http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/lab_esbl.html

Chuanchuen, R., & Padungtod, P. 2009. Antimicrobial Resistance Genes in *Salmonella enterica* Isolates from Poultry and Swine in Thailand. **Journal of Veterinary Medical Science** 71. 1349-1355.

Chuanchuen, R., Padungtod, P., & Pathanasophon, P. 2008. Antimicrobial Resistance Genes among Salmonella enterica isolates from Poultry and Swine in Thailand. **International Journal of Infectious Diseases** 12. E117-E117.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests Approved Standard–Twenty Fourth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M100-*S24,* 2014.

Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunololgy and Cell Biology**. 85. 112-118.

Corry, J. E., Allen, V. M., Hudson, W. R., Breslin, M. F., & Davies, R. H. 2002. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. **Journal of Apply Microbiology**. 92. 424-432.

The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP). 1998. **Apmis** 106. 605.

Dargatz, D. A., Fedorka-Cray, P. J., Ladely, S. R., & Ferris, K. E. 2000. Survey of *Salmonella* serotypes shed in feces of beef cows and their antimicrobial susceptibility patterns. **Journal of Food Protection**. 63. 1648-1653.

Davies, J., & Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 74. 417-433.

Doi, Y., & Arakawa, Y. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clinical and Infectious Diseases**. 45. 88-94.

Freeman, J. T., Sexton, D. J., & Anderson, D. J. 2009. Emergence of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Community Hospitals throughout North Carolina: A Harbinger of a Wider Problem in the United States? **Clinical and Infectious Diseases**. 49. E30-E32.

Galanis, E., Wong, D. M. A. L. F., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Surv, W. G. S. 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. **Emerging and Infectious Diseases**. 12. 381-388.

Gallardo, F., Ruiz, J., Marco, F., Towner, K. J., & Vila, J. 1999. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. **Journal of Medical Microbiology**. 48. 367-374.

Geser, N., Stephan, R., & Hachler, H. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Veterinary Research**. 8. 21.

Gniadkowski, M. 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. **Clinical Microbiology and Infection**. 7. 597-608.

Han, H. S., Koh, Y. J., Hur, J. S., & Jung, J. S. 2004. Occurrence of the strA-strB streptomycin resistance genes in *Pseudomonas* species isolated from kiwifruit plants. **Journal of Microbiology**. 42. 365-368.

Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., & Aarestrup, F. M. 2005. beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**. 56. 115-121.

Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P., & Molbak, K. 2002. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella typhimurium*. **Emerging and Infectious Diseases**. 8. 490-495.

Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlsmose, S., Lo Fo Wong, D. M., Jensen, A. B., Wegener, H. C., & Aarestrup, F. M. 2011. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens Diseases**. 8. 887-900.

Herikstad, H., Motarjemi, Y., & Tauxe, R. V. 2002. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiology and Infection**. 129. 1-8.

Jiang, H. X., Tang, D., Liu, Y. H., Zhang, X. H., Zeng, Z. L., Xu, L., & Hawkey, P. M. 2012. Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 67. 2350-2353.

Jirachai, W., Kamonwon, J., & Wacharee, J. 2006. The Prevalence and Susceptibility Patterns of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Chonburi Hospital. **Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents.** 23. 53-65.

Jitsurong, S., & Yodsawat, J. 2006. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced in blood isolates of gram-negative bacteria in a teaching hospital in southern Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 37. 131-135.

Johnson, A. P., Malde, M., Woodford, N., Cunney, R. J., & Smyth, E. G. 1995. Urinary isolates of apramycin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Dublin. **Epidemiology and Infection**. 114. 105-112.

Jure, M. A., Aulet, O., Trejo, A., & Castillo, M. 2010. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Oranienburg (CTX-M-2 group) in a pediatric hospital in Tucuman, Argentina. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 43. 121-124.

Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Laesripa, C., & Saifon, P. 2008. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 52. 2818-2824.

Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., & Mitsuhashi, S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**. 11. 315-317.

Lertworapreecha, M., Sutthimusik, S., & Tontikapong, K. 2013. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolated From Pork, Chicken, and Vegetables in Southern Thailand. **Jundishapur Journal of Microbiology** 6. 36-41.

Li, X. Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., & Adewoye, L. 2007. beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**. 121. 197-214.

Lin, M. Y., & Hayden, M. K. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus: recognition and prevention in intensive care units. **Critical Care Medicine**. 38. S335-344.

Lunguya, O., Lejon, V., Phoba, M. F., Bertrand, S., Vanhoof, R., Glupczynski, Y., Jacobs, J. 2013. Antimicrobial resistance in invasive non-typhoid *Salmonella* from the Democratic Republic of the Congo: emergence of decreased fluoroquinolone susceptibility and extended-spectrum beta lactamases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 7. e2103.

Lynne, A. M., Kaldhone, P., David, D., White, D. G., & Foley, S. L. 2009. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolated from food animals. **Foodborne Pathogens Diseases**. 6. 207-215.

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Hoekstra, R. M. 2010. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. **Clinical and Infectious Diseases**. 50. 882-889.

Martinez-Martinez, L., Lopez-Hernandez, I., Pascual, A., Suarez, A. I., & Perea, E. J. 1997. Resistance of Streptococcus pneumoniae to penicillin, erythromycin and third-generation cephalosporins in Seville, Southern Spain. **Clinical Microbiology and Infection**. 3. 382-385.

Molbak, K., Gerner-Smidt, P., & Wegener, H. C. 2002. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Emerging and Infectious Disease**. 8. 514-515.

Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperband, L. R., & Roper, T. R. 2002. Salmonella enterica serovar Typhimurium and Escherichia coli contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. **Apply Environmental Microbiology**. 68. 2737-2744.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2002.Outbreak of multidrug-resistant Salmonella newport--United States, January-April. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. 51. 545-548.

Padungtod, P., & Kaneene, J. B. 2006. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. **International Journal of Food Microbiology**. 108. 346-354.

Perreten, V., & Boerlin, P. 2003. A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 47. 1169-1172.

Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistace Update**. 13. 151-171.

Rosenberg, E. Y., Ma, D., & Nikaido, H. 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. **Journal of Bacteriology**. 182. 1754-1756.

Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., Cluzel, R. 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 20. 323-334.

Skold, O. 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resistance Update**. 3. 155-160.

Su, L. H., Chiu, C. H., Chu, C., & Ou, J. T. 2004. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. **Clinical and Infectious Diseases**. 39. 546-551.

Tangkoskul, T., Tiengrim, S., Onsomang, S., Pati, N., Aswapokee, N., Thamlikitkul, V., & Chayakulkeeree, M. 2012. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases and its correlation with clinical laboratory standards institute interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing in enterobacteriaceae isolates in Thaialnd. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 43. 1461-1469.

Threlfall, E. J., Rowe, B., Ferguson, J. L., & Ward, L. R. 1986. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of Salmonella typhimurium phage type 204c isolated in Britain. **Journal of Hygiene (Lond)**. 97. 419-426.

Threlfall, E. J., Ward, L. R., Skinner, J. A., & Rowe, B. 1997. Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal salmonellas from humans in England and Wales: a comparison of data for 1994 and 1996. **Microbial Drug Resistance**. 3. 263-266.

Türkyılmaz, S., Ş., H., & B., B. 2009. Anatimicrobial Susceptibility and Resistance Genes in Salmonella enterica Serovar Enteritidis Isolated from Turkeys. **Israel Journal of Veterinary Medicine**. 64. 72-77.

Vaeteewootacharn, K., Sutra, S., Vaeteewootacharn, S., Sithigon, D., Jamjane, O., Chomvarin, C., Thaewnon-giew, K. 2005. Salmonellosis and the food chain in Khon Kaen, northeastern Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 36. 123-129.

Vuttigronpan U, Deangchat P, & Rodma P 1998. Detection of Salmonella by MSRV technique and standard conventional method. **Proceedings of the** 36**th Kasetsart University Annual Conference** 36. 159.

Wanutsanun, T., & Pornpimol, P. 2006. Extended-spectrum Beta-lactamases in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Community-acquired Urinary Tract Infection at Songklanagarind Hospital, Thailand. **Journal of Infectious Disease and Antimicrobial Agents** 23. 51-56.

Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., & Jensen, L. B. 2010. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among Escherichia coli from pigs, pig carcasses and human. **Acta Veterinary Scandinavica**. 52. 47.

Wybot, I., Wildemauwe, C., Godard, C., Bertrand, S., & Collard, J. M. 2004. Antimicrobial drug resistance in nontyphoid human Salmonella in Belgium: trends for the period 2000-2002. **Acta Clinica Belgica**. 59. 152-160.

Zaidi, M. B., McDermott, P. F., Fedorka-Cray, P., Leon, V., Canche, C., Hubert, S. K., Tollefson, L. 2006. Nontyphoidal Salmonella from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. **Clinical and Infectious Diseases**. 42. 21-28.

Zhao, S., Blickenstaff, K., Glenn, A., Ayers, S. L., Friedman, S. L., Abbott, J. W., & McDermott, P. F. 2009. beta-Lactam resistance in salmonella strains isolated from retail meats in the United States by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System between 2002 and 2006. **Apply Environmental Microbiology**. 75. 7624-7630.

เดชพิภัทร์ อมรทิพย์วงศ์, ปวีญา มงคลวิสุทธิ์, พวงมณี จิตตวงศ์พันธุ์, อำไพ สุภาจีน, & วิภัสรา นนทสิทธิ์. 2554. ความชุกของเชื้อ K. pneumoniae และ E. coli ชนิดสร้างเอนไซม์ extended spectrum β-lactamase ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลน่าน และโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดน่านระหว่าง ปี พ.ศ. 2547-2553. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 44. 169-176.

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ, จิโรจน์ ศศิปรียจันทร์, ชาญณรงค์ รอดคำ, & มณฑล เลิศวรปรีชา. (2544). รายงานผลการวิจัย เรื่อง "การเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียเอ็นเทอโรค๊อคคัส และซาลโมเนลล่าที่ดื้อยาในไก่เนื้อ". จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. สำนักระบาดวิทยา. (2558). รายงานการเฝ้าระวังโรค from http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/506wk/y58/d03_2458.pdf