



# ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์

จุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: -  
ที่แยกในประเทศไทย

Study on Antimicrobial Resistance of *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: -  
Isolated in Thailand

นามผู้วิจัย นายการ์นต์ ชีพนุรัตน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( รองศาสตราจารย์ปฐมมาพร เอมะวิศิษฏ์, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์รววิทย์ วัชชวัลคุ, D.M.S. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์ปฐมมาพร เอมะวิศิษฏ์, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วัน ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: -  
ที่แยกในประเทศไทย

Study on Antimicrobial Resistance of *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: -  
Isolated in Thailand

โดย

นายการ์นต์ ชีพนุรัตน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2552

การ์นต์ ชิพนูร์ตัน 2552: การศึกษาการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i - ที่แยกในประเทศไทย ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์) สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ปฐมพร เอมะวิศิษฎ์, Ph.D. 84 หน้า

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i - ที่แยกในประเทศไทย โดยเป็นตัวอย่างจำนวน 79 ตัวอย่างจากผู้ป่วยของโรงพยาบาลศูนย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่เก็บช่วงเดือน มกราคม ถึง กันยายน ปี พ.ศ. 2549 และอีก 10 ตัวอย่างจากฟาร์มสุกร ที่เก็บในช่วงเดือนมีนาคม ปี พ.ศ. 2547 เชื้อถูกนำมาตรวจหาซีโรวาร์ และ phage type ด้วยวิธี duplex polymerase chain reaction เพื่อหาความสัมพันธ์กับเชื้อ *S. Typhimurium* phage type DT104 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงและดื้อยาต้านจุลชีพ นอกจากนี้เชื้อทั้งหมดจะถูกนำมาตรวจหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) โดยวิธี micro dilution plate test และตรวจการสร้างเอ็นไซม์เบต้าแลคเตมแบบขยายด้วยวิธี double disk test

ผลการทดลองพบว่า เชื้อตัวอย่างที่แยกจากผู้ป่วยและจากฟาร์มสุกร ให้ผลบวกต่อซีโรวาร์ *S. Typhimurium* โดยมีเชื้อ 71 ตัวอย่างที่แยกจากผู้ป่วย และเชื้อ 10 ตัวอย่างจากฟาร์มสุกรให้ผลบวกต่อ phage type DT104 สำหรับการตรวจหาค่า MICs พบว่าเชื้อทุกตัวอย่างมีความไวต่อ ciprofloxacin และเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วยพบการดื้อสารต้านจุลชีพมีสัดส่วนดังนี้คือ trimethoprim-sulfamethoxazole (81.01%), ampicillin (75.95%), cefoperazone (74.68%), gentamicin (63.29%), nalidixic acid (54.43%) และ chloramphenicol (41.77%) รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพที่พบมากที่สุด คือ AMP-CFP-GEN-NAL-SXT (22.47%) ส่วนเชื้อตัวอย่างจากฟาร์มสุกรพบการดื้อสารต้านจุลชีพมีสัดส่วนดังนี้ คือ ampicillin (100%), cefoperazone (100%), chloramphenicol (90%), gentamicin (100%), nalidixic acid (100%) และ trimethoprim-sulfamethoxazole (100%) รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพที่พบมากที่สุด คือ AMP-CFP-CHL-GEN-NAL-SXT (90%) ผลการตรวจหาเอ็นไซม์เบต้าแลคเตมแบบขยาย พบว่าเชื้อ 3 ตัวอย่างที่แยกจากผู้ป่วยสามารถสร้างเอ็นไซม์นี้ ซึ่งส่งผลต่อการดื้อยาในกลุ่ม cephalosporins

Karun Cheepnurat 2009: Study on Antimicrobial Resistance of *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - Isolated in Thailand. Master of Science (Veterinary Microbiology), Major Field: Veterinary Microbiology, Department of Microbiology and Immunology. Thesis Advisor: Associate Professor Patamaporn Amavisit, Ph.D. 84 pages.

The purpose of this research was to study on antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - in Thailand. Seventy nine isolates were derived from the patients of the hospital center of the Ministry of Public Health during January to September 2006 and ten isolates from swine farm collected in March 2004. These isolates were examined serovar and phage type by duplex polymerase chain reaction in order to find out the relation with *S. Typhimurium* phage type DT104 that is the virulent strain and resistant to several antimicrobials. Samples were tested for minimum inhibitory concentration (MIC) using micro dilution plate test and examined for extended-spectrum beta-lactamases by double disk test.

The result was found that all isolates were positive to serovar Typhimurium by using the PCR assay. Seventy one isolates from humans and 10 isolates from pig farm showed positive to phage type DT104. For the MICs determination, all isolates were sensitive to ciprofloxacin. The isolates from human were resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole (81.01%), ampicillin (75.95%), cefoperazone (74.68%), gentamicin (63.29%), nalidixic acid (54.43%) and chloramphenicol (41.77%). The antimicrobial resistance pattern mostly found was AMP-CFP-GEN-NAL-SXT (22.47%). Those isolates from pig farm were resistance to ampicillin (100%), cefoperazone (100%), chloramphenicol (90%), gentamicin (100%), nalidixic acid (100%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (100%), whereas, the most common antimicrobial resistance pattern was AMP-CFP-CHL-GEN-NAL-SXT (90%). Furthermore, three human isolates produced ESBLs enzyme which would have an effect on the treatment of infectious disease with cephalosporins.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ปฐมมาพร เอมะวิศิษฎ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์วรวิทย์ วัชชวัลคุ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกันทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและให้ความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปและขอขอบคุณ อาจารย์อรุณ บำงตระกูลนนท์ นายสัตวแพทย์ชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์ คุณปิติมน พลวิชัย สัตวแพทย์หญิง ดร. พัชรา เผือกเทศ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและเชื้อรา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ คุณศรีสมัช วิริยารัมภะและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาสาธารณสุขศาสตร์และการวินิจฉัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ

ความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบแต่ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรมและให้กำลังใจตลอดในทุกเรื่อง ที่สำคัญคือ คุณชนาพร ชีพนุรัตน์ (ภรรยา) และน้องไอซ์ (ลูกสาว) ที่เสียสละเวลา ให้การสนับสนุนและ เป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด

ทั้งนี้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ให้ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีการศึกษา 2551

การันต์ ชีพนุรัตน์

กันยายน 2552

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	24
ผล	24
วิจารณ์	31
สรุปและข้อเสนอแนะ	35
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	36
ภาคผนวก	49
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	50
ภาคผนวก ข สารเคมี	55
ภาคผนวก ค ขั้นตอนการทดลอง	58
ภาคผนวก ง ผลการทดลอง	66
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	84

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 เชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ที่มีการจำแนกซีโรวาร์ในปี ค.ศ.2001	5
2 ตัวอย่างของรูปแบบซีโรวาร์ (serotypic profile) จำแนกตามหลักการของ Kauffmann-White	7
3 เชื้อ <i>Salmonella</i> spp. 5 ซีโรวาร์แรกที่ตรวจพบในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2546-2549	11
4 กลไกการออกฤทธิ์และกลไกการดื้อสารของเชื้อแบคทีเรีย	14
5 เชื้อ <i>Salmonella</i> spp. ที่ไวต่อยากลุ่ม beta-lactam รวบรวมจากโรงพยาบาลเครือข่าย จำนวน 31 แห่ง ในปี พ.ศ. 2550	17
6 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของ <i>Salmonella</i> spp.	21
7 รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศูนย์ สังกัดกระทรวงสาธารณสุข ตามจังหวัดต่างๆ ระหว่างเดือน มกราคม- กันยายน ปี พ.ศ. 2549	26
8 รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากจากฟาร์มสุกรในเดือนมีนาคม ปี พ.ศ. 2547	27
9 การตรวจคัดกรอง (screening test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test ของเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วยและฟาร์มสุกร	29
10 การตรวจยืนยัน (confirmatory test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test	29
<b>ตารางผนวกที่</b>	
ค1 ตัวอย่างละลายและตัวเจือจางที่ใช้เตรียมสารต้านจุลชีพสำหรับการทดสอบ	61
ค2 การเตรียมสารต้านจุลชีพที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	62
ง1 การตรวจซีโรวาร์ <i>S. Typhimurium</i> DT104 และรูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วย	67
ง2 การตรวจซีโรวาร์ <i>S. Typhimurium</i> DT104 และรูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากฟาร์มสุกร	73

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ง3	การตรวจคัดกรอง (screening test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test ของเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วย	74
ง4	การตรวจคัดกรอง (screening test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test ของเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากฟาร์มสุกร	78
ง5	การตรวจยืนยัน (confirmatory test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test ของเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วย	79
ง6	การตรวจยืนยัน (confirmatory test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test ของเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากฟาร์มสุกร	83



## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การควบคุมการสร้าง phase 1,2 ของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp.	6
2	การตรวจสอบขนาด PCR product ของยีน <i>mdh</i> และ phage type DT104 ในเชื้อ <i>S. enterica</i> serovar 1, 4, [5], 12: i: -	24
3	การตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs โดยวิธี double disk test	30
<b>ภาพผนวกที่</b>		
ค1	ขั้นตอนการตรวจซีโรวาร์ของ <i>Salmonella</i> spp.	60
ค2	การเตรียม microdilution plate ของยา ampicillin	63
ค3	การวางแผนยาในการตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test	64
ค4	เชื้อตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ ESBLs ด้วยวิธี double disk test	65

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	Base pair
CFU	=	Colony forming units
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
ESBLs	=	Extended-spectrum $\beta$ -lactamases
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
g	=	Gram
LPS	=	Lipopolysaccharide
L	=	Litre
<i>K. pneumoniae</i>	=	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MAC	=	MacConkey agar
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
<i>mdh</i>	=	Malic acid dehydrogenase gene
MHA	=	Muller-Hinton agar
MHB	=	Muller-Hinton broth
MICs	=	Minimum inhibitory concentrations
MW	=	Molecular weight
NA	=	Nutrient agar
PBS	=	Phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
PFGE	=	Pulsed field gel electrophoresis
$\mu$ g	=	Microgram
$\mu$ m	=	Micrometre
$\mu$ M	=	Micromolar
<i>S. Typhimurium</i>	=	<i>Salmonella</i> Typhimurium
spp.	=	species
TBE	=	Tris-borate EDTA electrophoresis buffer solution

การศึกษาการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i -  
ที่แยกในประเทศไทย

Study on Antimicrobial Resistance of *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i -  
Isolated in Thailand

คำนำ

เชื้อ *Salmonella* spp. เกือบทุกซีโรวาร์ตรวจพบและก่อโรคในสัตว์เช่น สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญในการแพร่เชื้อมาสู่คน โดยเชื้อที่พบเป็นปัญหาสำคัญคือ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ส่วนบางซีโรวาร์ตรวจพบและก่อโรคเฉพาะในคน เช่น *S. Typhi* และ *S. Paratyphi* (Miller and Pegues, 2000) อาการของการติดเชื้อมี 3 แบบ คือ 1. ภาวะเฉาและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) 2. ไข้เอนเทอริก (enteric fever) 3. โลหิตเป็นพิษ (septicemia)

รายงานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ทำการแยกเชื้อจากผู้ป่วย ในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2536 ถึง 2545 พบว่าเชื้อ 5 ซีโรวาร์ที่พบมากที่สุดคือ *S. Weltevreden*, *S. Enteritidis*, *S. Anatum*, *S. Derby* และ *Salmonella* 1, 4, 5, 12: i - (Bangtrakulnonth *et al.*, 2004b) รายงานต่อมาระหว่างปี พ.ศ. 2546 ถึง 2549 พบว่าซีโรวาร์ที่พบมากที่สุดคือ *S. Enteritidis*, *S. Stanley*, *S. Weltevreden*, *S. Rissen* และ *monophasic Salmonella* (Bangtrakulnonth *et al.*, 2003; Bangtrakulnonth *et al.*, 2004a; Bangtrakulnonth *et al.*, 2005; Bangtrakulnonth and Tishyadhigama, 2006) เมื่อนำเชื้อตัวอย่างบางส่วนมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด คือ ampicillin, cefotaxime, nalidixic acid, chloramphenicol, sulfamethoxazole/trimethoprim และ norfloxacin พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีความไวต่อยา cefotaxime แต่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพอีก 5 ชนิด (Pulsrikarn *et al.*, 2006) จะเห็นว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยมีซีโรวาร์อุบัติใหม่เกิดขึ้นคือ *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i - เมื่อตรวจสอบระดับโมเลกุลพบว่ามิลักษณะเหมือนกับเชื้อ *S. Typhimurium* ซึ่งมีการดื้อต่อสารต้านจุลชีพหลายชนิด

การศึกษานี้เป็นการศึกษารูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i - ที่แยกในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังเชื้อมารวมทั้งเป็น

ประโยชน์ต่อการเลือกใช้สารต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อซึ่งส่งผลให้การรักษาและความคุ้มครอง  
โรคมียุติประสิทธิภาพมากขึ้น

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจจำแนกย่อย (subtyping) ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - กับเชื้อ *S. Typhimurium* phage type DT 104
2. เพื่อศึกษารูปแบบการสื่อสารด้านจุลชีพของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกในประเทศไทย
3. เพื่อตรวจหาการสร้างเอ็นไซม์เบต้าแลคแตมแบบขยายของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: -

## การตรวจเอกสาร

### ลักษณะของเชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น มีขนาดความกว้าง 0.5  $\mu\text{m}$  และยาว 2-4  $\mu\text{m}$  ไม่สร้างสปอร์ และแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว (peritrichous flagella) ยกเว้น *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* (Jordan and Pattison, 1996) เชื้อสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิตั้งแต่ 8-45 ° C และสามารถทนต่อความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำได้ดีแม้ในสถานะแช่แข็ง ซึ่งเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและสามารถเพิ่มจำนวนได้ใหม่เมื่อนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (Janda and Abbott, 1998) เชื้อสามารถสร้างกรดและก๊าซ  $\text{H}_2\text{S}$  จากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส และให้ผลบวกต่อการทดสอบ catalase, citrate แต่ให้ผลลบต่อการทดสอบ oxidase และ urease (Quinn *et al.*, 1994)

### การจัดกลุ่มเชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. แบ่งออกได้เป็น 2 สปีชีส์ (species) คือ *Salmonella bongori* และ *Salmonella enterica* โดย *Salmonella enterica* สามารถแบ่งออกได้อีก 6 สปีชีส์ย่อย (subspecies) คือ *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* และ *S. enterica* subsp. *indica* ส่วน *Salmonella bongori* มีเพียง 1 สปีชีส์ย่อย (subspecies) คือ *S. bongori* subsp. *bongori* โดย มีการจำแนกซีโรวาร์ของเชื้อตามหลักการของ Kauffmann-White และปรับปรุงอยู่เป็นประจำจนถึงปี ค.ศ. 2001 ตรวจได้จำนวนมากกว่า 2,500 ซีโรวาร์ดังตารางที่ 1 (Popoff, 2001)

ตารางที่ 1 เชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีการจำแนกซีโรวาร์ในปี ค.ศ.2001

Species	Subspecies	Serovar
<i>Salmonella enterica</i>	subsp. <i>enterica</i>	1478
	subsp. <i>salamae</i>	489
	subsp. <i>arizonae</i>	94
	subsp. <i>diarizonae</i>	327
	subsp. <i>houtenae</i>	71
	subsp. <i>indica</i>	12
<i>Salmonella bongori</i>	subsp. <i>bongori</i>	21
รวม		2,501

ที่มา : Popoff (2001)

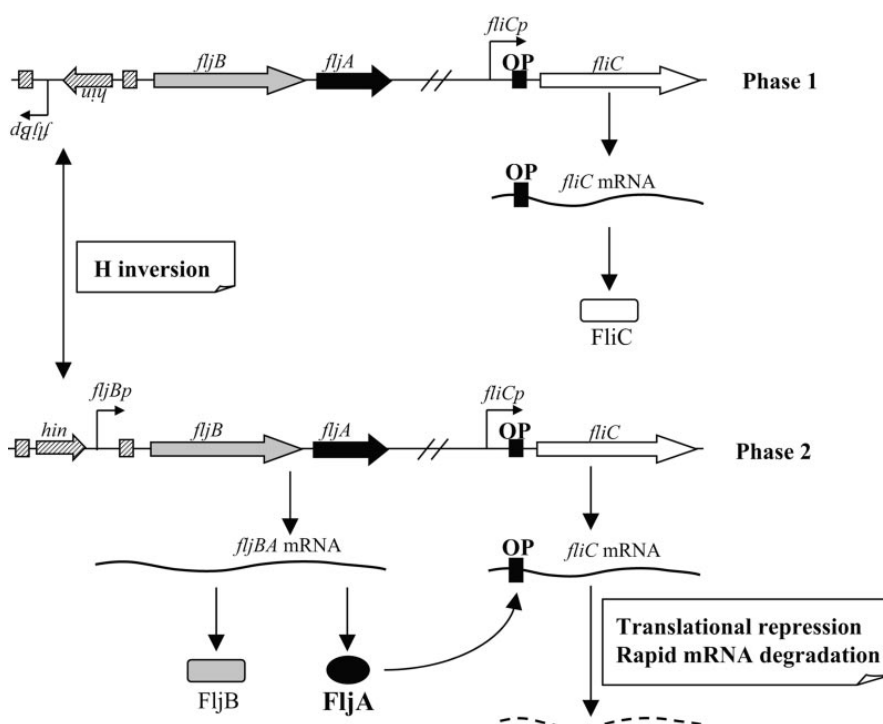
โครงสร้างแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* spp.

ลักษณะโครงสร้างของแอนติเจน O และ H ที่มีความแตกต่างกันในเชื้อ *Salmonella* spp. ทำให้สามารถจำแนกเชื้อออกได้เป็นซีโรวาร์ต่างๆ ได้ตามหลักการของ Kauffmann- White คือ

1. แอนติเจน O (somatic antigen) เป็นสารประกอบไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (LPS) อยู่บนผิวชั้นนอกของผนังเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนที่ต่างกัน คือ ส่วนแรกเป็นส่วนที่มีหน่วยซ้ำๆ กันของ oligosaccharide ทำหน้าที่เป็น O แอนติเจน ซึ่ง O แอนติเจนสามารถแบ่งออกได้หลาย O group แต่ละ O group จะมี O factor ย่อยๆ เป็นองค์ประกอบ ซึ่งใช้ในการแยกซีโรไทป์ของเชื้อ *Salmonella* spp. (Fitzgerld *et al.*, 2003) ส่วนที่สองของผนังเซลล์ เป็นส่วนของ core polysaccharide และส่วนที่สามเป็นส่วนของ lipid A

2. แอนติเจน H (flagella antigen) เป็นส่วน filament ของ flagella ซึ่งแอนติเจน H ประกอบด้วยสารโปรตีน ที่เรียกว่า flagellin ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ flagella ที่อยู่ตรงส่วนกลางของ flagella โดยการแสดงออก (expression) ของ flagellin antigen ถูกควบคุมโดยยีนที่จะสร้าง flagellin แต่ละ type เช่น type B flagellin (FljB), inhibitor (FljA) และ type C flagellin (FliC) การ

สร้างเส้น (flagella) ของเชื้อ *Salmonella* spp. ควบคุมโดยยีน *fljB*, *fljA* และ *fliC* โดยการสร้าง phase 1 เกิดจากการทำงานของโปรโมเตอร์ (*fliCp*) ที่ควบคุมยีน *fliC* ทำให้มีการสร้าง type C flagellin (FliC) ออกมา ซึ่งในขั้นตอนนี้ยีน *fljB* และ *fljA* จะไม่ทำงานทำให้ไม่มีการสร้าง type B flagellin (FljB) และ inhibitor (FljA) ออกมา ส่วนการสร้าง phase 2 นั้นโปรโมเตอร์ (*fljBp*) ที่ควบคุมการทำงานของยีน *fljB* และยีน *fljA* ทำงานทางส่วน downstream ทำให้ยีน *fljB* สร้าง type B flagellin (FljB) ส่วนยีน *fljA* จะสร้าง inhibitor (FljA) ออกมา และ inhibitor (FljA) จะทำหน้าที่กีดการสร้าง type C flagellin (FliC) โดย inhibitor (FljA) จะเข้าไปจับกับ 5'-UTR ของ *fliC* mRNA ทำให้ไม่สามารถสร้าง type C flagellin (FliC) ออกมาได้ (ภาพที่ 1) (Yamamoto and Kutsukake, 2006) ถ้าเชื้อ *Salmonella* spp. สร้าง flagellin antigen 1 เส้นเรียกว่า monophasic จะเกิดขึ้นได้บางซีโรวาร์เช่น *S. Enteritidis*, *S. Typhi* เป็นต้น ถ้าสร้างทั้ง 2 เส้นจะเรียกว่า diphasic เช่น *S. Typhimurium* เป็นต้น (Todar, 2008) ซึ่ง phase 1 จะกำหนดแทนด้วยอักษรตัวเล็ก a ถึง z ( $z_1$ - $z_{59}$ ) ส่วน phase 2 กำหนดด้วยหมายเลข (Popoff, 2001) (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 1 การควบคุมการสร้าง phase 1, 2 ของเชื้อ *Salmonella* spp.

ที่มา : Yamamoto and Kutsukake (2006)



**ตารางที่ 2** ตัวอย่างของรูปแบบซีโรวาร์ (serotypic profile) จำแนกตามหลักการของ Kauffmann-White

ซีโรวาร์	กลุ่ม	แอนติเจน O	แอนติเจน H	
			phase 1	phase 2
<i>S. Paratyphi</i>	A	1, 2, 12	a	[1, 5]
<i>S. Typhimurium</i>	B	1, 4, [5], 12	i	1, 2
<i>S. Choleraesuis</i>	C	6,7	c	1,5
<i>S. Virchow</i>	C	6, 7, 14	r	1, 2
<i>S. Enteritidis</i>	D	1, 9, 12	g, m	-
<i>S. Gallinarum</i>	D	1, 9, 12	-	-
<i>S. Anatum</i>	E <sub>1</sub>	3, 10 [15] [15, 34]	e, h	1,6
<i>S. Hongkong</i>	E <sub>4</sub>	1, 3, 19	z	Z <sub>6</sub>

**หมายเหตุ** สัญลักษณ์  คือ O factor ที่สามารถตรวจพบหรือตรวจไม่พบ โดยมีความสัมพันธ์กับ phage ถ้าตรวจไม่พบให้ตรวจ phage ต่อ

[  ] คือ O หรือ H factor ที่สามารถตรวจพบหรือตรวจไม่พบโดยไม่มี ความสัมพันธ์กับ phage เช่น [5] ซึ่งเป็น O แอนติเจนของกลุ่ม B ส่วน H factor ที่อยู่ใน [  ] หมายถึงตรวจพบได้แต่ไม่พบใน wild strains

[  ] คือ O factor ที่มีอยู่ในเชื้ออาจตรวจพบหรือตรวจไม่พบ ถ้าตรวจไม่พบให้ ตรวจ phage typing ต่อ

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Popoff (2001)

**การศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ *Salmonella* spp.**

การศึกษาสายพันธุ์เชื้อทางระบาดวิทยา เพื่อประโยชน์ในการควบคุม การรักษา และการวางแผนการป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ แบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ

1. Phenotypic typing methods เป็นการแยกชนิดของเชื้อ โดยใช้ลักษณะทาง phenotype ซึ่งมีหลายวิธีที่นิยมกัน เช่น

1.1 Bacteriophage typing เป็นการจัดกลุ่มเชื้อวิธีการหนึ่งในทางระบาดวิทยาโดย phage ซึ่งจะมี receptor ที่จำเพาะกับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ phage type บางชนิดจะสัมพันธ์กับแหล่งที่มา เช่น *S. Typhimurium* phage type DT 104 ที่ตรวจพบทั้งในคนและสัตว์ และยังพบว่า เป็น phage type ที่มียีนคือยาที่สำคัญด้วย ปัจจุบัน phage type ของ *S. Typhimurium* ที่พบมีมากกว่า 200 ชนิด (Threlfall and Frost, 1990)

1.2 Antimicrobial susceptibility testing เป็นวิธีการศึกษารูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียวิธีนี้มีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ออกจากกัน เนื่องจากเชื้อต่างสายพันธุ์กันอาจมีรูปแบบการดื้อยาเหมือนกันได้ (Olsen *et al.*, 1993) เพราะยีนดื้อยาในพลาสมิดอาจมีการกระจายตัวไปยังพลาสมิดตัวอื่นหรือยีนบน transposon สามารถกระจายตัวไปยังเชื้อตัวอื่นๆได้ง่าย (Threlfall and Frost, 1990)

1.3 Biotyping เป็นการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ วิธีการที่นิยมในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป เช่น การทดสอบ sorbitol, indole, TSI, voges proskauer, methyl red, citrate เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้ไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ต่างสายพันธุ์ออกจากกันได้ เช่น *Salmonella enterica* มีบาง subspecies ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายกัน เช่น subsp. *enterica*, subsp. *salamae*, subsp. *arizonae*, subsp. *diarizonae*, subsp. *houtenae* และ subsp. *bongori* ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ sorbitol เหมือนกัน (Popoff, 2001)

2. Molecular genetic typing methods เป็นวิธีการในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อที่ลึกลงกว่าในระดับของ species ซึ่งวิธีการนี้ต้องอาศัยเทคนิคในระดับอนุชีววิทยา (molecular biology) โดยสามารถใช้หลักการต่างๆกัน เช่น

2.1 Plasmid profile analysis เป็นวิธีการศึกษาองค์ประกอบของพลาสมิดในแบคทีเรีย ซึ่งพลาสมิดเป็นหน่วยพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซม แต่สามารถบรรจุยีนดื้อยาได้และพลาสมิดสามารถเคลื่อนย้ายไปยังเชื้อแบคทีเรียตัวอื่นได้ มีการแลกเปลี่ยนกันได้ง่าย จึงทำให้ไม่มีความเสถียร (Mayer, 1988)

2.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นวิธีการแยกขนาดและจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ที่ถูกตัดด้วย restriction endonuclease โดยผ่านกระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำ DNA ที่อยู่ใน agarose gel ให้เคลื่อนที่ หลังจากที่ยกชิ้นส่วนของ DNA บน agarose gel แล้ว

สามารถย้าย DNA ไปยัง membrane และทำ hybridization กับ DNA ที่รู้จัก ซึ่งช่วยในการศึกษาและเปรียบเทียบชิ้น DNA นั้นกับ DNA ที่ทราบแล้ว (Southern *et al.*, 1975)

2.3 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) เป็นวิธีการที่สามารถแยกชิ้นส่วนขนาดใหญ่ของโครโมโซมขนาดตั้งแต่ 10-70 kb (Olive and Bean, 1999) โดยเลือกใช้ restriction endonuclease ที่ตัดโครโมโซมไม่ถี่เกินไป เมื่อทำ electrophoresis ด้วย pulsed field gel จะได้แถบ DNA ขนาดใหญ่ ที่แยกจากกันจนสามารถสังเกตได้ เทคนิคนี้มีความสม่ำเสมอของการทดสอบ (specificity) เชื้อ *Salmonella* จึงทำให้ผลการ typing มีความน่าเชื่อถือสูง

2.4 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นวิธีการที่ใช้เทคนิค PCR เป็นพื้นฐาน โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ DNA template โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease จนเป็นชิ้นย่อยๆแล้วนำไปติดกับ double stranded oligonucleotide จากนั้นนำ template ใหม่ไปทำ PCR กับ primers ที่ออกแบบไว้ทำให้ PCR จะ amplify เฉพาะ DNA template ที่มี restriction site เท่านั้น (Vos *et al.*, 1995)

### โรคติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในคน

อาการสำคัญของการติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในคนที่สำคัญ ได้แก่

1. ภาวะและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โดยเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยคือ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ผู้ป่วยจะแสดงอาการประมาณ 6-48 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารและน้ำเข้าไป ผู้ป่วยจะมีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายอุจจาระแต่ไม่มีมูกเลือด บางครั้งอาจพบอาการ มีไข้ ปวดเกร็งท้อง และปวดศีรษะ อาการแบบนี้อาจพบได้ในช่วง 2-7 วัน ก่อนการหายของโรค (Murray *et al.*, 1998)

2. ไข้เอนเทอริก (enteric fever) หรือไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) เกิดจากการกินเชื้อ *S. Typhi* เข้าไป ทำให้เกิดลำไส้อักเสบ เชื้อจะผ่านเข้าเยื่อเมือกของลำไส้และถูกกินโดยเซลล์ macrophage หลังจากนั้นเชื้อจะเพิ่มจำนวนและกระจายไปยังตับ ม้ามและไขกระดูก (Murray *et al.*, 1998) ในช่วงแรกของการได้รับเชื้อผู้ป่วยจะมี ไข้ ครั่นเนื้อครั่นตัว ซึม ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและปวดศีรษะ ในช่วงนี้ เชื้อจะกระจายเข้าสู่กระแสเลือดไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย ต่อมาเชื้อจะกลับสู่ระบบทางเดินอาหาร

สามารถพบเชื้อในอุจจาระและน้ำเสีย ซึ่งจะทำให้ลำไส้อักเสบและเกิดแผลหลุม ระยะนี้ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง (40 °C) ปวดท้อง ท้องเสีย และอาเจียน ประมาณ 3% ของผู้ป่วยที่หายจากไข้ไทฟอยด์ จะเป็นพาหะของโรคและขับเชื้อออกมาด้วยอุจจาระ (Jensen *et al.*, 1997)

3. โลหิตเป็นพิษ (septicemia) เชื้อ *Salmonella* spp. หลายชนิดสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ โดยเฉพาะ *S. Choleraesuis*, *S. Paratyphi* และ *S. Typhi* อาการของโรคจะรุนแรงในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง อาการของโรคทั่วไปคล้ายกับอาการของการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกระแสเลือด อย่างไรก็ตามพบว่า 10 % ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อกลุ่มนี้จะพบอาการกระดูกอักเสบ ข้ออักเสบ และเยื่อโพรงหัวใจอักเสบ (Murray *et al.*, 1998)

### เชื้อ *Salmonella* spp. ในสัตว์

สัตว์ที่เป็นแหล่ง พาหะของเชื้อทั่วไป คือ ไก่ ไก่วง หมูและวัว รวมทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าทั่วไป เพราะเชื้อชนิดนี้สามารถมีชีวิตรอดในชิ้นเนื้อ และผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของลื่นคล้ายนม โดยผลิตภัณฑ์เหล่านี้คือพาหะที่สำคัญของการแพร่กระจายของเชื้อ (Giannella, 2007) ซึ่งเมื่อแยกเชื้อ *Salmonella* spp. จากวัวส่วนใหญ่จะพบเชื้อ *S. Typhimurium* *S. Dublin* และ *S. Newport* และสุกรส่วนใหญ่จะพบเชื้อ *S. Typhimurium* และ *S. Choleraesuis* (Hirsh, 2004)

### การติดต่อของโรค

การติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในคนเกิดจากการรับประทานอาหารหรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ เช่น เนื้อไก่ ไข่ และผลิตภัณฑ์จากนม ส่วนในเด็กสามารถติดเชื้อโดยตรงจากการปนเปื้อนเชื้อจากอุจจาระของเด็กป่วยไปยังเด็กปกติได้ (Murray *et al.*, 1998)

### ความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. ในประเทศไทย

Boonmar *et al.* (1998) ได้รายงานการแยกเชื้อ *Salmonella* spp. ในระหว่างปี พ.ศ.2536-2539 ในประเทศไทย พบเชื้อจำนวน 8,775 ตัวอย่าง โดยเป็นเชื้อจากเนื้อไก่แช่แข็ง 7,285 ตัวอย่าง อาหารปรุงสุก 1,014 ตัวอย่าง และกุ้งแช่แข็ง 476 ตัวอย่าง ซึ่งเชื้อที่พบมากที่สุดใ้เนื้อไก่แช่แข็งคือ *S. Enteritidis* (25.6%) อาหารปรุงสุกคือ *S. Anatum* (15.6%) และในกุ้งแช่แข็งคือ *S. Weltevreden* (25.0%) ส่วนการแยกเชื้อจากผู้ป่วยพบเชื้อจำนวน 18,722 ตัวอย่าง เป็นเชื้อในอุจจาระผู้ป่วย 16,122 ตัวอย่าง

เลือด 2,172 ตัวอย่าง และจากส่วนอื่นๆ เช่น น้ำปัสสาวะ หนอง น้ำไขสันหลัง 428 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่าง จากอุจจาระพบ *S. Weltevreden* (13.4%) มากที่สุด ในเลือดพบมากที่สุดคือ *S. Enteritidis* (41.4%) ส่วน ตัวอย่างจากส่วนอื่นๆพบ *S. Enteritidis* (47.2%) มากที่สุด

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ทำการแยกเชื้อ *Salmonella* spp. จาก คนป่วยในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2536-2545 พบ 5 ซีโรวาร์แรกคือ *S. Weltevreden* (12.5%), *S. Enteritidis* (11.4%), *S. Anatum* (7.4%), *S. Derby* (6.6%), *Salmonella* 1, 4, 5, 12: i: - (6.4%) (Bangtrakulnonth *et al.*, 2004b) และระหว่างปี พ.ศ. 2546-2549 มีการแยกเชื้อจากคนป่วยอีกพบ 5 ซีโรวาร์แรกคือ *S. Enteritidis* (12.6%) *S. Stanley* (11.1%) *S. Weltevreden* (8.3%) *S. Rissen* (7.7%) และ monophasic *Salmonella* (7.1%) (Bangtrakulnonth *et al.*, 2003; Bangtrakulnonth *et al.*, 2004a; Bangtrakulnonth *et al.*, 2005; Bangtrakulnonth and Tishyadhigama, 2006) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เชื้อ *Salmonella* spp. 5 ซีโรวาร์แรกที่ตรวจพบในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2546-2549

ซีโรวาร์	ปี พ.ศ. และจำนวนตัวอย่าง (%)				
	2546	2547	2548	2549	รวม
Enteritidis	393 (11.2)	370 (10.6)	403 (11.0)	541 (18.5)	1,707 (12.6)
Stanley	293 (8.3)	448 (12.9)	456 (12.4)	313 (10.7)	1,510 (11.1)
Weltevreden	380 (10.8)	365 (10.5)	176 (4.8)	202 (6.9)	1,123 (8.3)
Rissen	218 (6.2)	300 (8.6)	327 (8.9)	224 (7.6)	1,069 (7.7)
monophasic	235 (6.7)	235 (6.8)	259 (7.1)	236 (8.1)	965 (7.1)

หมายเหตุ monophasic *Salmonella* : *S. I.* 4, 5, 12: i: -, *S. I.* 4, 12: i: -, *S. I.* 1, 4, 5, 12: i: -,  
*S. I.* 1, 4, 5, 12, 27: i: -, *S. I.* 4, 5, 12, 27: i: -, *S. I.* 4, 12, 27: i: -, *S. I.* 1, 4, 12: i: -,  
*S. I.* 4, 5, 12: b: -, *S. I.* 4, 5, 12: -: -, *S. I.* 4, 12: b: -, *S. I.* 6, 7: c: -,  
*S. I.* 1, 4, 12: d: -, *S. I.* 4, 5, 12: d: -, *S. I.* 4, 5, 12: eh: -, *S. I.* 4, 5, 12: z<sub>10</sub>: -,  
*S. I.* 4, 5, 12: H rough

ที่มา: Bangtrakulnonth *et al.* (2003); Bangtrakulnonth *et al.* (2004a); Bangtrakulnonth *et al.* (2005); Bangtrakulnonth and Tishyadhigama (2006)

## การดื้อยาของเชื้อ *Salmonella* spp.

การดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นและซับซ้อนมากขึ้น ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและเศรษฐกิจ ซึ่งการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียอาจเกิดจากการปรับตัวของเชื้อต่อยา โดยวิธีการต่างๆ เช่นการสร้างเอ็นไซม์ เพื่อที่จะขัดหรือลดประสิทธิภาพของยาด้านจุลชีพ และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้อทำให้ยาไม่สามารถเข้าไปทำลายได้ (ตารางที่ 4)

กลไกการดื้อยามีหลายแบบ เช่น

1. Enzymatic drug inactivation โดยการที่แบคทีเรียสร้างเอ็นไซม์ออกมาทำลายยาหรือทำให้ยาหมดฤทธิ์ ก่อนที่ยาจะเข้าไปในเซลล์ เช่น เอ็นไซม์  $\beta$ -lactamases จะทำลายยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactams (Lee and Bishop, 1997) โดยเอ็นไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บน plasmid หรือ transposon บางครั้งอาจพบบน chromosomal DNA (Hachler *et al.*, 1996) โดยยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์  $\beta$ -lactamases ที่สำคัญ คือ ยีน  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{OXA}$  (Olesen *et al.*, 2004),  $bla_{CTX}$  (Bonnet, 2004) ส่วนยีน  $catA$ ,  $catB$  ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ acetyltransferases ออกมาทำลายยา chloramphenicol (Schwarz *et al.*, 2006)

2. Modification of the drug target วิธีการนี้เป็นผลมาจากเอ็นไซม์ที่เชื้อผลิตออกมาไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตำแหน่งเป้าหมาย (target site) ของยาทำให้ยาไม่สามารถเข้าไปจับกับตำแหน่งเป้าหมายได้ เช่นยาในกลุ่ม tetracycline, macrolides, glycopeptides และ quinolones เป็นต้น (Macfarlane and Hancock, 2000; Taylor *et al.*, 2004) ยีนที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตำแหน่งเป้าหมายที่สำคัญ คือยีน  $tet$  (tetracycline),  $vanA$ ,  $vanB$  (glycopeptides),  $gyrA$  (quinolones),  $dfr$  (trimethoprim) และยีน  $sul$  (sulfonamides) (Aarts *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2006)

3. Drug trapping โดยวิธีการนี้เชื้อที่ดื้อยาจะสร้าง alternative target ขึ้นมาใหม่ที่สามารถดึงดูดยาเข้าไปจับได้ดี และยังเป็นกลไกลดความเข้มข้นของยาลดลง ทำให้ยาไปจับกับตำแหน่งเป้าหมายได้น้อยลง จึงเป็นสาเหตุทำให้เชื้อดื้อยาตามมา (Guardabassi and Courvalin, 2006) เช่น เชื้อ *E. coli* ที่มียีน  $aph$  ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I โดยเอ็นไซม์นี้มีความสามารถเข้าไปจับกับยา tobramycin ได้ดี ทำให้ความเข้มข้นของยาลดลง ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยา tobramycin (Manard *et al.*, 1993)

4. Reduced drug uptake โดยเชื้อจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ เช่น โครงสร้างของโปรตีน ลดขนาดของรูเข้าออกของสารที่ผนังเซลล์ ทำให้การแพร่ของสารเข้าเซลล์ลดลง ((Lee and Bishop, 1997) เช่น ผนังเซลล์ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ยอมให้ยาผ่านเข้าเซลล์น้อยกว่า *E. coli* ถึง 10 % จึงทำให้เชื้อดื้อยาได้ง่าย เช่น ยากลุ่ม quinolones และ fluoroquinolones (Guardabassi and Courvalin, 2006)

5. Drug efflux pump เป็นวิธีการที่แบคทีเรียมีกลไกป้องกันตัวโดยการนำยาออกนอกเซลล์ ซึ่งจะลดความเข้มข้นของยาใน cytoplasm ลง โดยเชื้อส่วนใหญ่จะมีกลไก efflux pump ต่อยาด้านจุลชีพหลายชนิด ซึ่ง efflux pump สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ SDR pump ทำให้เชื้อดื้อยาได้บางชนิด เช่นการดื้อยา tetracycline ของเชื้อแกรมลบ ส่วน MDR pump ทำให้เชื้อดื้อยาได้หลายชนิดๆพร้อมกัน (Guardabassi and Courvalin, 2006) ยีนที่ควบคุมการทำงานของ efflux pump เช่นยีน *tet* (tetracycline) และยีน *cmlA* (chloramphenicol) (Schwarz *et al.*, 2006)

การดื้อยาของเชื้อ *Salmonella* spp. ในประเทศไทย ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ทดสอบการดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เก็บระหว่างปี 2546-2548 โดยการสุ่มเข้ามาจำนวน 694 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อดื้อต่อยา ampicillin (38.65%), chloramphenicol (23.20%), nalidixic acid (65.68%) และ sulfamethoxazole-trimethoprim (34.58%) (Pulsrikarn *et al.*, 2006)

การศึกษาการดื้อยาของเชื้ออุบัติใหม่ คือ *Salmonella* 1, 4, [5], 12: i : - โดย Amavisit *et al.* (2005) ได้ทดสอบการดื้อยาของเชื้อ *S. Typhimurium* และ *Salmonella* 1, 4, [5], 12: i : - ที่แยกในประเทศไทยพบว่า 26% ของตัวอย่างมีรูปแบบการดื้อยาด้านจุลชีพคือ AMP-CHL-STR-SXT-TET (AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; STR, streptomycin; SXT, sulfatrimetroprim; TET, tetracycline) ส่วน Pomruangwong *et al.* (2008) ได้ทดสอบการดื้อยาของเชื้อ *S. Typhimurium* และ *Salmonella* 1, 4, [5], 12: i : - ที่แยกจากผู้ป่วยและสุกรในประเทศไทยระหว่างปี พศ. 2546-2549 โดยเป็นเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 30 ตัวอย่าง และ *Salmonella* 1, 4, [5], 12: i : - จำนวน 108 ตัวอย่าง พบว่า *S. Typhimurium* ดื้อต่อยา tetracycline (73.3%), sulfamethoxazole-trimethoprim (60.0%), ampicillin (53.3%) และ streptomycin (30.0%) ส่วน *Salmonella* 1, 4, [5], 12: i : - ดื้อยา ampicillin (92.6%) tetracycline (80.5%) sulfamethoxazole-trimethoprim (71.3%) streptomycin (65.7%) และ chloramphenicol (33.3%) และพบอีกว่าร้อยละ 80 ของ *S. Typhimurium* และร้อยละ 95.4 ของ *Salmonella* 1, 4, [5], 12: i : - พบการดื้อยาตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป

ตารางที่ 4 กลไกการออกฤทธิ์และกลไกการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรีย

สารต้านจุลชีพ	กลไกการออกฤทธิ์	กลไกการดื้อยา
$\beta$ -lactams	Inhibition of cell wall biosynthesis and assembly, stimulation of autolysins	Enzymatic modification of drug
Glycopeptides	Inhibition of cell wall synthesis	Structural modification of peptidoglycan
Aminoglycosides	Inhibition of protein synthesis Inhibition of initiation of DNA synthesis	Enzymatic modification of drug, efflux Alterations in energy of uptake, mutation of target
Macrolides	Inhibition of protein synthesis	Target modification
Tetracycline	Inhibition of protein synthesis	Increased efflux
Chloramphenicol	Inhibition of protein synthesis	Enzymatic modification of drug
Quinolones	Inhibition of DNA gyrase	Target modification, decreases uptake
Fluoroquinolones		due to porin modification
Fusidans	Inhibition of polypeptide chain elongation	Efflux
Novobiocin	Inhibition of DNA gyrase	Efflux
Rifamycins	Inhibition of nucleic acid synthesis	Target modification
Sulfonamides	Inhibition of folic acid synthesis	Target modification, efflux
Trimethoprim	Inhibition of folic acid synthesis	Target modification, efflux
Polymyxins	Disruption of outer membrane	LPS modification
Colistin		

ที่มา: Macfarlane and Hancock (2000)



นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *Salmonella* spp. เพื่อหาความสัมพันธ์ของเชื้อ ระหว่างสัตว์และคน โดย Angkitittrakul *et al.* (2005) ได้ทดสอบการดื้อยาของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ แยกจากเนื้อไก่ จำนวน 30 ตัวอย่างและเนื้อสุกรจำนวน 26 ตัวอย่าง จากตลาดในจังหวัดขอนแก่น และ ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่าง (110 ตัวอย่าง) คือดื้อยา streptomycin และ sulfamethoxazole แต่ไม่พบการ ดื้อต่อยา norfloxacin และ ciprofloxacin โดยตัวอย่างจากเนื้อไก่คือดื้อยา amoxicillin (30.0%), chloramphenicol (26.7%), gentamicin (6.7%), sulfamethoxazole-trimethoprim (71.3%), tetracycline (100.0%) และ ตัวอย่างจากเนื้อสุกรคือดื้อยา amoxicillin (15.4%), chloramphenicol (15.4%), gentamicin (3.9%), sulfamethoxazole-trimethoprim (15.4%) และ tetracycline (88.5%) ส่วนตัวอย่างจากผู้ป่วยพบ การดื้อยา amoxicillin (27.8.4%), chloramphenicol (20.4%), gentamicin (5.6%) sulfamethoxazole-trimethoprim (31.5%) และ tetracycline (92.6%) และยังพบว่าการดื้อยาไม่มีความแตกต่างของ แหล่งที่มาของตัวอย่างด้วยมีความเป็นไปได้ว่ามีการปนเปื้อนเชื้อจากเนื้อไก่และเนื้อสุกรมาสู่ผู้บริโภค

#### เอ็นไซม์เบต้าแลคแทมแบบขยาย (ESBLs)

$\beta$ -lactamases เป็นเอ็นไซม์ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตขึ้นมาทำให้เชื้อคือต่อยากลุ่ม penicillins, first-, second-, third-generation cephalosporins และ carbapenems (Paterson and Bonomo, 2005) แต่มีสารเคมี บางชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของ  $\beta$ -lactamases ได้ เช่น clavulanic acid, sulbactam และ tazobactam เป็นต้น (Bradford, 2001) กลุ่มของเอ็นไซม์  $\beta$ -lactamases แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการทำลายยาที่ แตกต่างกันสามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ (Livermore, 1998) ยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์  $\beta$ -lactamases พบอยู่บน plasmid, transposone, gene cassette และ chromosomal DNA แต่ส่วนใหญ่พบบน plasmid (Hachler *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 2006) กลุ่ม  $\beta$ -lactamases ที่สำคัญที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียคือดื้อยา เช่น

1. TEM-beta-lactamases โดยเอ็นไซม์กลุ่มนี้มีอยู่หลายชนิด TEM 1 พบครั้งแรกในเชื้อ *E. coli* มาจากคนไข้ในประเทศกรีซ โดยเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยา penicillin มากกว่า 90 % เป็นผลมาจาก TEM 1 (Livermore, 1995) ซึ่ง TEM 1 มีความสามารถในการทำลายยา penicillin, cephalothin และ cephaloridine ได้ แต่มีสารเคมีบางชนิดเช่น clavulanic acid สามารถยับยั้งการทำงานของ TEM 1 ได้ เอ็นไซม์ TEM พบมากในแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* นอกจากนี้ยัง พบได้ในเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ตัวอื่น เช่น *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*,

*Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* และ *Salmonella* spp. (Marchandin *et al.*, 1999; Perilli *et al.*, 2000; Morosini *et al.*, 1995)

2. SHV-beta-lactamases โดยเอ็นไซม์กลุ่มนี้ตรวจพบมากกว่าเอ็นไซม์ ESBLs กลุ่มอื่นๆ (Jacoby, 1997) สมาชิกสำคัญของกลุ่มนี้คือ SHV 1 ที่พบมากในเชื้อ *K. pneumoniae* ซึ่งมีความสามารถทำลายยา cefotaxime ได้ดีกว่ายา ceftazidime นอกจากนี้เอ็นไซม์กลุ่มนี้ยังพบในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ตัวอื่นได้และมีรายงานการ outbreak ของเอ็นไซม์กลุ่มนี้ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter* spp. (Huang *et al.*, 2004; Poirel *et al.*, 2004)

3. CTX-M-beta-lactamases เป็นเอ็นไซม์กลุ่มหนึ่งของ ESBLs ที่สามารถทำลายยา cefotaxime ได้ดีกว่ายา ceftazidime (Bonnet, 2004) เชื้อที่สร้างเอ็นไซม์ชนิดนี้ทำให้เชื้อดื้อยา cefotaxime (>64 µg/ml) แต่มีความไวต่อยา ceftazidime (2-8 µg/ml) (Baraniak *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2002; Sturenburg *et al.*, 2004) ดังนั้นการตรวจหาเอ็นไซม์กลุ่มนี้จะวัดจากค่า MICs ของ ceftazidime แต่ก็มีสมาชิกของ CTX-M บางตัวที่ดื้อต่อยา ceftazidime ได้ (Poirel *et al.*, 2002) มีการรายงานการตรวจพบเอ็นไซม์ CTX-M มากกว่า 40 ชนิด เอ็นไซม์กลุ่มนี้สามารถตรวจพบได้ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ยกตัวอย่างเช่น *Salmonella* spp. (Bradford *et al.*, 1998)

4. OXA-beta-lactamases เอ็นไซม์กลุ่มนี้พบครั้งแรกในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (Hall *et al.*, 1993) โดยจะทำให้เชื้อดื้อต่อยา ceftazidime นอกจากนี้ OXA-17 จะทำให้เชื้อดื้อต่อยา cefotaxime และ ceftriaxone (Danel *et al.*, 1999) สมาชิกที่พบใหม่ๆของเอ็นไซม์กลุ่ม OXA ส่วนใหญ่พบใน *Pseudomonas aeruginosa* (Philippon *et al.*, 1997)

5. PER-beta-lactamases พบครั้งแรกในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยมีการตรวจพบ PER-1 ในประเทศตุรกี (Nordmann *et al.*, 1993) ต่อมามีการตรวจพบใน *Salmonella* Typhimurium (Vahaboglu *et al.*, 1995) และ *Acinetobacter baumannii* (Vahaboglu *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังตรวจพบ PER-2 ใน *S. Typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *Proteus mirabilis* (Paterson and Bonomo, 2005)

ในประเทศไทยมีการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรีย โดยศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รายงานผลการทดสอบความไวของเชื้อ *Salmonella* spp. ต่อยากลุ่ม beta-lactam รวบรวมข้อมูลจากโรงพยาบาลเครือข่ายจำนวน 31 แห่ง ในปี พ.ศ. 2550 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เชื้อ *Salmonella* spp. ที่ไวต่อยาในกลุ่ม beta-lactam รวบรวมจากโรงพยาบาลเครือข่าย  
จำนวน 31 แห่ง ในปี พ.ศ. 2550

เชื้อ	จำนวนเชื้อที่ไวต่อยา (จำนวนเชื้อทั้งหมด)		
	ampicillin	cefotaxime	ceftriaxone
<i>Salmonella</i> Typhi	93 (95)	92 (92)	92 (93)
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	8 (9)	8 (8)	9 (9)
<i>Salmonella</i> non-typhoid	1,145 (2,290)	579 (690)	458 (509)

ที่มา: National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand [NARST] (2007)

### การตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs

การตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

#### 1. Phenotypic methods

1.1 Double disc diffusion test เป็นวิธีการตรวจหา ESBLs แบบง่ายโดยการพัฒนาของ Jarlier และคณะ ในปี 1980 อาศัยหลักการที่ว่า ESBLs ถูกยับยั้งด้วยสารต้านเบต้าแลคตาเมส จึงใช้ clavulanic acid ในยา amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg) วางตรงกลางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller-Hinton agar แล้ววางแผ่นยา cefpodoxime (10 µg) , ceftazidime (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftriaxone (30 µg) หรือ aztreonam (30 µg) ให้ห่างจากจุดศูนย์กลางของแผ่นยา amoxicillin-clavulanic acid ถึงจุดศูนย์กลางยาอื่นๆ 30 mm ถ้าวางแผ่นยาห่างกัน 20 mm จะทำให้เห็นผลการเสริมฤทธิ์กันของยาชัดเจนขึ้น (Thomson and Sanders, 1992) ระยะห่างของการวางยาในการตรวจวิธี double disk test มีค่าตามเกณฑ์ที่แนะนำโดยกลุ่มผู้วิจัยส่วนใหญ่ คือ ตั้งแต่ 20 mm ถึง 40 mm (Jarlier *et al.*, 1988; Thomson and Sanders, 1992; Ho *et al.*, 1998; Tzelepi *et al.*, 2000) การใช้แผ่นยาหลายชนิดจะช่วยให้ตรวจพบ ESBLs ประเภทอื่นๆ ข้อควรระวังในการตรวจด้วยวิธีนี้คือระยะห่างของแผ่นยาที่มีความแตกต่างกันของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และเอ็นไซม์ ESBLs มีหลายประเภทจนอาจทำให้การตรวจหา ESBL ไม่ครบทุกประเภทถ้าใช้ยาไม่ครบทุกชนิด เช่น การตรวจหา TEM และ SHV ใช้ยา ceftazidime และ cefotaxime และ CTX-M ใช้ยา cefotaxime (Bradford, 2001) การตรวจวิธีนี้มีความไว (sensitive) ในการตรวจอยู่ในช่วง 79-97 % และมีความจำเพาะ (specific) อยู่ในช่วง 94-100 % (Thomson and

Sanders, 1992; Vercauteren *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2000; Bedenic *et al.*, 2001; MacKenzie *et al.*, 2002)

1.2 Combinations disc test มีหลักการเหมือนกับวิธี double disc diffusion test โดยเปรียบเทียบ inhibition zone ของแผ่นยาที่มี cephalosporin เพียงตัวเดียวกับแผ่นยาที่มี cephalosporin ร่วมกับ clavulanic acid เช่น cefotaxime (30 µg) กับ cefotaxime+ clavulanic acid (30+10 µg) ceftazidime (30 µg) กับ ceftazidime+ clavulanic acid (30+10 µg) และ cefpodoxime (10 µg) กับ cefpodoxime + clavulanic acid (10+1 µg) โดยแผ่นยาที่มี clavulanic acid จะกว้างกว่ายาที่ไม่มี clavulanic acid  $\geq 5$  mm แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ ESBLs (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2007) การตรวจวิธีนี้ถ้าใช้แผ่นยา ceftazidime ร่วมกับ cefotaxime ให้ความไวในการตรวจถึง 93 % (M'Zali *et al.*, 2000)

1.3 Broth dilution test เป็นการเปรียบเทียบค่า MIC ระหว่างหลอดที่มี cephalosporin เพียงตัวเดียว กับหลอดที่มี cephalosporin ร่วมกับ clavulanic acid สำหรับการวัด MIC จะทำการเจือจางยาต้านจุลชีพแล้วใส่ clavulanic acid 4 µg/ml ลงในทุกหลอด ค่า MIC ที่ลดลงจากการใส่ clavulanic acid  $\geq 3$  เท่าของ twofold dilution แสดงว่าเชื้อสร้าง ESBLs (CLSI, 2007)

1.4 E-test เป็นวิธีการตรวจที่ผสมผสานกันระหว่างวิธี combinations disc test กับวิธี broth dilution test โดยทำให้มีสารต้านจุลชีพทั้งสองด้านของแถบยา (double-ended strips) โดยด้านหนึ่งจะมีความเข้มข้นของยา oxyimino-beta lactam ร่วมกับ clavulanic acid ในการตรวจหา CTX-M จะใช้ยา cefotaxime และ ceftazidime (Cormican *et al.*, 1996) การตรวจวิธีนี้มีความไว (sensitive) ในการตรวจ ESBLs อยู่ในช่วง 87-100 % และมีความจำเพาะ (specific) อยู่ในช่วง 95-100 % (Cormican *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 1998; Schooneveldt *et al.*, 1998)

## 2. Molecular methods

เทคนิคการตรวจหาเอนไซม์ ESBLs ทางโมเลกุลมีหลายวิธี เช่น DNA probe ใช้ตรวจหา กลุ่มของ TEM และ SHV แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสมาชิกในกลุ่มของ TEM และ SHV ได้ และวิธี PCR เป็นการตรวจที่ง่ายและมีความจำเพาะในการตรวจ ESBLs กลุ่ม TEM และ SHV แต่ก็มีข้อจำกัดเหมือนกับวิธี DNA probes ส่วนวิธี nucleotide sequencing เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจแยกชนิดและสมาชิกของเอนไซม์ในกลุ่มของ ESBL แต่ละตัวได้ (Bradford, 2001)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมเชื้อตัวอย่าง

เชื้อตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i- จำนวน 89 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศูนย์ สังกัดกระทรวงสาธารณสุข ตามจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย ช่วงเดือน มกราคม ถึง กันยายน ปี พ.ศ. 2549 จำนวน 79 ตัวอย่างโดยเป็นตัวอย่าง เลือดจำนวน 26 ตัวอย่าง หนองจำนวน 5 ตัวอย่าง สำลีพันปลายไม้ป้ายทวารจำนวน 13 ตัวอย่าง อุจจาระจำนวน 32 ตัวอย่าง ปัสสาวะจำนวน 3 ตัวอย่าง และเชื้ออีก 10 ตัวอย่างมาจากฟาร์มสุกร ที่เก็บในช่วงเดือนมีนาคม ปี พ.ศ. 2547 โดยเป็นตัวอย่างจาก อุจจาระลูกสุกรคุดนมจำนวน 1 ตัวอย่าง อุจจาระลูกสุกรอนุบาลจำนวน 3 ตัวอย่าง อุจจาระสุกรขุนจำนวน 3 ตัวอย่าง อาหารสุกรจำนวน 2 ตัวอย่าง และน้ำจำนวน 1 ตัวอย่าง

หลังจากนั้นนำเชื้อตัวอย่างมาเพาะเชื้อซ้ำ (subculture) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (Merck, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วยืนยันผลตรวจทางชีวเคมี (biochemical confirmation) กับอาหารเลี้ยงเชื้อ triple sugar iron agar (TSI), lysine iron agar (LIA) และ sulfide indole motile medium (SIM) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผลที่เกิดขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด (Ewing, 1986)

### 2. การตรวจซีโรวาร์ด้วยวิธี Gard technique

การตรวจซีโรวาร์ของเชื้อ *Salmonella* spp. มี 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกตรวจหา O typing โดยนำโคโลนีของเชื้อทดสอบกับ polyvalent O antiserum (OMA, OMB, OMC, OMD, OME, OMF, OMG) (S&A Laboratory Ltd., Thailand) เลือกกกลุ่ม polyvalent O antiserum ที่ให้ผลบวกมาทดสอบต่อ กับ group ย่อย หลังจากนั้นเลือก group ย่อยที่ให้ผลบวก มาทดสอบต่อกับ factor ย่อย

ขั้นตอนที่สอง นำเชื้อมาตรวจหา H typing (ตรวจ phase 1 และ phase 2) โดยนำเชื้อจาก nutrient agar มาแตะลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อกิ่งเหล็ก (swarm agar) เพื่อตรวจหา phase 1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกเชื้อตัวอย่างที่สร้าง motility zone บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อกิ่งเหล็ก แล้วใช้รูปแตะที่บริเวณขอบของ motility zone มาทดสอบกับ polyvalent H antiserum โดยทดสอบ polyvalent H antiserum (HMA, HMB, HMC, HMD) (S&A Laboratory Ltd., Thailand) แล้ว

เลือกกลุ่ม polyvalent H antiserum ที่ให้ผลบวกมาทดสอบต่อกับ factor ย่อย จากนั้นตรวจหา phase 2 โดยการหยด antiserum H ของ factor ย่อยที่ให้ผลบวกจากการตรวจหา phase 1 ที่ระดับความเข้มข้น 1:800 จำนวน 0.09 ml ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว แล้วใช้ลูปแตะที่บริเวณขอบด้านนอกของเชื้อที่เจริญนำมาเพาะเชื้อซ้ำ (subculture) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลวที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 18-24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อสร้าง motility zone ให้มาทดสอบต่อกับ non specific 1 complex และ antiserum H complex (Gard, 1938) หลังจากนั้นนำผลการทดสอบ O typing และ H typing มาเปรียบเทียบชนิดของซีโรวาร์ตามหลักการ Kauffmann-White scheme (ภาพผนวกที่ 1) (Popoff, 2001)

### 3. การตรวจซีโรวาร์ *S. Typhimurium* phage type DT104 ด้วยวิธี duplex PCR

#### 3.1 การสกัด DNA

นำเชื้อตัวอย่างมาเพาะบน tryptic soy agar (BBL, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37° C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีของเชื้อมา 5 โคโลนี ละลายในน้ำกลั่น (DW) 50 µl ในหลอด microtube หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 95 ° C นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 12,000 X g นาน 5 นาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 ° C และใช้ส่วนใสเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในปฏิกิริยา PCR

#### 3.2. การทำ duplex PCR

ส่วนผสมในการทำ duplex PCR แต่ละหลอดตัวอย่างมีจำนวน 25 µl ซึ่งมีส่วนประกอบของ 2X Qiagen<sup>®</sup> multiplex PCR master mix (Qiagen, Germany) 12.5 µl 10X primer mix ( 2.0 µM ของแต่ละ primer ) 2.5 µl (ตารางที่ 6) น้ำกลั่น (DW) 8 µl และสารละลายดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) 2.0 µl ตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วจะถูกนำเข้าเครื่อง PCR (Px2, Thermo Hybaid) โดยตั้งอุณหภูมิสำหรับการทำ PCR ซึ่งประกอบด้วย ปฏิกิริยาเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94° C นาน 15 นาที 1 รอบ ตามด้วย 35 รอบของอุณหภูมิ 94° C นาน 30 วินาที 55° C นาน 30 วินาที และ 72° C นาน 30 วินาที และสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 72° C นาน 5 นาที (Amavisit *et al.*, 2005) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA) (DNA marker: GeneRuler<sup>™</sup> Fermentas Life sciences) โดยใช้ 1.5% agarose gel (Seaken<sup>®</sup>, FMC BioProducts) ผสมเอทิลีเนียมโบรไมด์ (EtBr) เป็นตัวกลางในการทำ electrophoresis ใช้ 1X TBE เป็น

buffer โดยผ่านสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 volt นาน 30 นาที แล้วนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV illuminator

**ตารางที่ 6** ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ *Salmonella* spp.

primers	ลำดับเบส (5'-3')	แหล่งอ้างอิง
DT 104-F	GTCAGCAGTGTATGGAGCGA	Pritchett <i>et al.</i> , 2000
DT 104-R	AGTAGCGCCAGGACTCGTTA	Pritchett <i>et al.</i> , 2000
MDH-F	TGCCAACGGAAGTTGAAGTG	Ridley and Threlfall, 1998
MDH-R	CGCATTCCACCACGCCCTTC	Ridley and Threlfall, 1998

หมายเหตุ คู่ primer DT ใช้ตรวจหา phage type DT104 ส่วน คู่ primer MDH ใช้ตรวจหา *mdh* ซึ่งจำเพาะกับเชื้อ *S. Typhimurium*

#### 4. การหาค่า Minimum inhibitory concentrations (MICs) ของ *S. enterica* serovar 1, 4, [5],

12: i: -

##### 4.1 การเตรียม stock สารต้านจุลชีพ

สารต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ คือ ampicillin (Bio Basic Inc., Canada), cefoperazone, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, nalidixic acid และ trimetoprim-sulfamethoxazole (Sigma, England) ผงสารต้านจุลชีพแต่ละชนิดจะเตรียมในรูปสารละลายโดยสารต้านจุลชีพแต่ละตัวจะมีตัวทำละลายและตัวเจือจางที่แตกต่างกัน (CLSI, 2007)

สารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบจะเตรียม stock ยาก่อน โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 10 เท่าของความเข้มข้นสูงสุดที่จะทดสอบ เช่น ความเข้มข้นสูงสุด = 512 µg/ml จะเตรียมสารต้านจุลชีพให้มีความเข้มข้น เป็น 5,120 µg/ml โดยใช้ตัวทำละลายและตัวเจือจางตามตารางผนวกที่ 1 และกรองผ่าน membrane filter แล้วเก็บยาในหลอด polypropylene vials ที่อุณหภูมิ -70 ° C (National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS], 2003a)

#### 4.2 การเตรียม micro dilution plate

การเลือกระดับความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบยึดหลักตารางการแปรผลทาง MICs ใน M100-S17 Table 2A โดยใช้ เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุม หยอดสารต้านจุลชีพ ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลุมของ micro plate หลุมละ 100  $\mu$ l โดยเรียงจากความเข้มข้นสูงสุดจากหลุมที่ 1 จนถึงหลุมที่ 11 ส่วนหลุมที่ 12 เป็นหลุมควบคุมจะไม่มีสารต้านจุลชีพ โดย micro plate 1 อัน จะทดสอบเชื้อได้ 6 ตัวอย่างโดยแถวที่ 7 จะเป็นเชื้อควบคุม และแถวที่ 8 เป็นตัวควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ (CLSI, 2007)

#### 4.3 การเตรียมเชื้อตัวอย่าง

เพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างบน MacConkey agar (Merck, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเลือกเชื้อมา 3-5 โคโลนี เขี่ยลงในหลอด Mueller-Hinton broth (Merck, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C แล้วเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 ก่อนนำไปใช้ทดสอบ เชื้อจากเชื้อตัวอย่างลง 10 เท่า (NCCLS, 2003a)

#### 4.4 การหาค่า MICs

เติมเชื้อตัวอย่างที่เตรียมได้ในปริมาตร 10  $\mu$ l ลงใน micro plate แถวละ 1 เชื้อ ตั้งแต่หลุมที่ 1-12 ส่วนแถวที่ 7 จะใช้เชื้อควบคุมแทน และแถวที่ 8 จะไม่ใส่เชื้อลงไป ปิดฝาครอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดสอบ (CLSI, 2007)

### 5. การตรวจหาเอ็นไซม์เบต้าแลคแตมแบบขยาย (Extended-spectrum $\beta$ -lactamases, ESBLs)

ของ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: -

#### 5.1 การตรวจคัดกรอง (screening test) ด้วยวิธี disk diffusion test

เพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างบน MacConkey agar (Merck, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เขี่ยเชื้อลงในหลอด Mueller-Hinton broth (Merck, USA) ปริมาตร 2 ml บ่มที่ อุณหภูมิ 37 ° C แล้วนำมาวัดความขุ่นเทียบกับ McFarland No.0.5 หลังจากนั้นเชื้อไปแล้ว 1 ชั่วโมงและวัดทุกๆ 15-30 นาที เพื่อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 (NCCLS, 2003a)



การตรวจคัดกรองหาเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test (NCCLS, 2003b) ซึ่งใช้ยา ceftazidime (CAZ, 30 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), ceftriaxone (CRO, 30 µg) และ aztreonam (ATM, 30 µg) (Oxoid, England) นำเชื้อตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วมาป้ายกวาดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (Merck, USA) ให้ทั่วแล้ววางแผ่นยาลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 18-24 ชั่วโมง ควบคุมคุณภาพการทดสอบโดยเชื้อ *E. coli* ATCC25922 เป็นเชื้อควบคุมลบ และเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC700603 เป็นเชื้อควบคุมบวก อ่านผลจากค่าโซนใส (inhibition zone) แปรผลค่า breakpoint ของการ screening test หา ESBLs ใน M100-S17 table 2A (CLSI, 2007)

## 5.2 การตรวจยืนยัน (confirmatory test) ด้วยวิธี double disk test

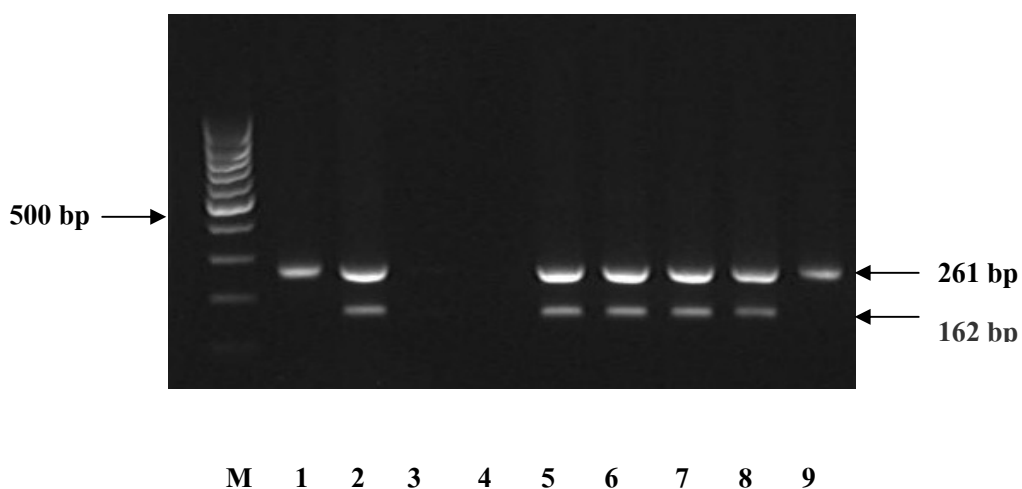
เชื้อตัวอย่างที่ผ่านการตรวจคัดกรองด้วยวิธี disk diffusion test แล้วนำมาตรวจยืนยันหาเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test เพื่อดูการเกิดการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง amoxicillin-clavulanic acid (AMC, 20/10 µg) กับยา ceftazidime (CAZ, 30 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), ceftriaxone (CRO, 30 µg) และ aztreonam (ATM, 30 µg) (Oxoid, England) นำเชื้อตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วมาป้ายกวาดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (Merck, USA) ให้ทั่วแล้ววางแผ่นยา amoxicillin-clavulanic acid ลงตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยา ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone และ aztreonam ในลักษณะ 4 มุม โดยมีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของแผ่นยา 4 ชนิดกับแผ่นยา amoxicillin-clavulanic acid ออกไปด้านละ 21 mm (ภาพผนวกที่ 3) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 18-24 ชั่วโมง ควบคุมคุณภาพการทดสอบโดยเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุมลบ และเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC700603 เป็นเชื้อควบคุมบวก อ่านผลโดยดูการเสริมฤทธิ์ (synergy) ของยา AMC กับยาทั้ง 4 ชนิด (Jarlier *et al.*, 1988)

## ผลและวิจารณ์

### ผล

#### 1. การตรวจซีโรวาร์ *S. Typhimurium* phage type DT 104 ด้วยวิธี duplex PCR

ผลการตรวจซีโรวาร์ *S. Typhimurium* phage type DT 104 ของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12:i:- โดยเป็นเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วย 79 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากฟาร์มสุกร 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธี duplex PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *mdh* ซึ่งเป็นยีนพบในเชื้อ *S. Typhimurium* และ primer ที่จำเพาะกับ phage type DT 104 ผลการตรวจพบว่า เชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วย ให้ผลบวกต่อ ยีน *mdh* ทั้งหมด (100%) โดยมีขนาด PCR product เท่ากับ 261 bp และให้ผลบวกต่อ phage type DT 104 จำนวน 71 ตัวอย่าง (88.61%) มีขนาด PCR product เท่ากับ 162 bp ส่วนเชื้อตัวอย่างทั้งหมดจากฟาร์มสุกรให้ผลบวกต่อ ยีน *mdh* และต่อ phage type DT 104 (100%) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การตรวจสอบขนาด PCR product ของยีน *mdh* และ phage type DT104 ในเชื้อ

*S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: -

ช่อง M = DNA marker (100 bp DNA ladder), ช่อง 1-9 = *S. Typhimurium*,

*S. Typhimurium* DT 104, *E. coli* ATCC 25922, negative control, HU1, HU2, HU3,

HP1 และ HP2

## 2. การหาค่า Minimum inhibitory concentrations (MICs) ของ *S. enterica* serovar 1, 4, [5],

### 12: i: -

ผลการทดลองพบว่าเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วย 79 ตัวอย่างไวต่อ ciprofloxacin ( $MIC \geq 4 \mu\text{g/mL}$ ) และเชื้อคือต่อสารต้านจุลชีพ ดังนี้ คือ ampicillin จำนวน 60 ตัวอย่าง (78.65%,  $MIC \geq 32 \mu\text{g/mL}$ ), cefoperazone จำนวน 59 ตัวอย่าง (77.53%,  $MIC \geq 64 \mu\text{g/mL}$ ), chloramphenicol จำนวน 33 ตัวอย่าง (47.19%,  $MIC \geq 32 \mu\text{g/mL}$ ), gentamicin จำนวน 50 ตัวอย่าง (67.43%,  $MIC \geq 8 \mu\text{g/mL}$ ), nalidixic acid จำนวน 43 ตัวอย่าง (59.55%,  $MIC \geq 32 \mu\text{g/mL}$ ) และ trimethoprim-sulfamethoxazole จำนวน 64 ตัวอย่าง (83.15%,  $MIC \geq 8/152 \mu\text{g/mL}$ ) รูปแบบการคือที่พบบ่อย คือ AMP-CFP-GEN-NAL-SXT (15.19%) (ตารางที่ 7)

ส่วนเชื้อตัวอย่างจากฟาร์มสุกรจำนวน 10 ตัวอย่างพบว่า ไวต่อ ciprofloxacin ทั้งหมด (100%) และคือต่อยาต้านจุลชีพ ดังนี้ ampicillin จำนวน 10 ตัวอย่าง (100%), cefoperazone จำนวน 10 ตัวอย่าง (100.0%), chloramphenicol จำนวน 9 ตัวอย่าง (90.0%), gentamicin จำนวน 10 ตัวอย่าง (100.0%), nalidixic acid จำนวน 10 ตัวอย่าง (100.0%) และ trimethoprim-sulfamethoxazole จำนวน 10 ตัวอย่าง (100%) รูปแบบการคือยาที่พบบ่อย คือ AMP-CFP-CHL-GEN-NAL-SXT (90%) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศูนย์ สังกัดกระทรวงสาธารณสุข ตามจังหวัดต่างๆ ระหว่างเดือนมกราคม- กันยายน ปี พ.ศ. 2549

รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพ <sup>a</sup>	เชื้อตัวอย่าง <sup>b</sup>	จำนวนตัวอย่าง (%)
AMP-CFP-GEN-NAL-SXT	HB6, HB10, HB11, HB14, HB23, HP5, HRS10, HS5, HS23, HS26, HS30, HS32	12 (15.2)
AMP-CFP-CHL-GEN-NAL-SXT	HS1, HS2, HS3, HS4, HS6, HS7, HS8, HS13, HS18, HS19, <u>HS21</u> <sup>c</sup>	11 (13.9)
AMP-CFP-CHL-GEN-SXT	HB16, HB18, HB21, HS14, HS17, HP1, HP4, HU2	8 (10.1)
AMP-CFP-NAL-SXT	HB2, HB12, HS25, HS27, HS28, HS29	6 (7.6)
AMP-CFP-SXT	HB5, HB9, HRS14, HS20, HS31, HU1	6 (7.6)
AMP-CFP-GEN-SXT	HB4, HB7, HB8, HB27, HRS11	5 (6.3)
AMP-CFP-CHL-GEN	HS9, <u>HS10</u> <sup>c</sup> , <u>HS22</u> <sup>c</sup>	3 (3.8)
AMP-CFP-CHL-NAL	HB1, HB19	2 (2.5)
AMP-GEN-NAL-SXT	HRS3, HS15	2 (2.5)
CFP-CHL-GEN-NAL-SXT	HRS4, HRS7	2 (2.5)
CHL-GEN-NAL-SXT	HRS6, HU3	2 (2.5)
AMP-CFP-CHL-GEN-NAL	HB15	1 (1.3)
AMP-CFP-CHL	HS24	1 (1.3)
AMP-CHL-SXT	HS11	1 (1.3)
AMP-NAL-SXT	HS16	1 (1.3)
AMP-SXT	HRS13	1 (1.3)
CFP-GEN-NAL-SXT	HRS9	1 (1.3)
CFP-CHL-SXT	HS12	1 (1.3)
CHL-GEN-SXT	HB3	1 (1.3)
GEN-NAL-SXT	HB17	1 (1.3)

## ตารางที่ 7 (ต่อ)

รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพ <sup>๑</sup>	เชื้อตัวอย่าง <sup>๒</sup>	จำนวนตัวอย่าง (%)
GEN-SXT	HB22	1 (1.3)
NAL-SXT	HRS2	1 (1.3)
NAL	HRS8	1 (1.3)
SXT	HB13	1 (1.3)
เชื้อที่ไม่ดื้อสารต้านจุลชีพ	HB24, HB25, HB26, HP2, HP3, HRS5, HRS12	7 (8.9)
รวมตัวอย่าง		79

หมายเหตุ <sup>๑</sup>AMP, ampicillin; CFP, cefoperazone; CHL, chloramphenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole

<sup>๒</sup>ชื่อระบุที่มาของตัวอย่างคือ H, human; B, blood; P, pus; RS, rectal swab; S, stool; U, urine

<sup>๓</sup>\_\_\_\_, ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการสร้างเอ็นซัยม์เบต้าแลคเตมแบบขยาย

ตารางที่ 8 รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกได้จากฟาร์มสุกรในเดือนมีนาคม ปี พ.ศ. 2547

รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพ <sup>๑</sup>	เชื้อตัวอย่าง <sup>๒</sup>	จำนวนตัวอย่าง (%)
AMP-CFP-CHL-GEN-NAL-SXT	NF1, NF3, FF1, FF2, FF3, SF1, F1, F2, W1	9 (90.0)
AMP-CFP-GEN-NAL-SXT	NF2	1(10.0)
รวมตัวอย่าง		10

หมายเหตุ <sup>๑</sup>AMP, ampicillin; CFP, cefoperazone; CHL, chloramphenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole

<sup>๒</sup>ชื่อที่ระบุที่มาของตัวอย่าง คือ NF, nursing feces; FF, fattening feces; SF, sucking feces; F, feed; W, water

### 3. การตรวจหาเอ็นไซม์เบต้าแลคแทมแบบขยาย (Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamases, ESBLs)

ของ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: -

การตรวจคัดกรองหาเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test โดยใช้ยา cefotaxime (30  $\mu$ g) ceftazidime (30  $\mu$ g), ceftriaxone (30  $\mu$ g) และ aztreonam (30  $\mu$ g) ซึ่งมีค่า breakpoint ของยา cefotaxime  $\leq 27$  mm, ceftazidime  $\leq 22$  mm, ceftriaxone  $\leq 25$  mm และ aztreonam  $\leq 27$  mm (CLSI, 2007) ผลการทดสอบ พบเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วยจำนวน 79 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อการคัดกรองเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยยา cefotaxime จำนวน 72 ตัวอย่าง (91.14%), ceftazidime จำนวน 6 ตัวอย่าง (7.59%), ceftriaxone จำนวน 15 ตัวอย่าง (18.99%) และ aztreonam จำนวน 52 ตัวอย่าง (65.82%) ส่วนตัวอย่างจากฟาร์มสุกรจำนวน 10 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อยา cefotaxime จำนวน 7 ตัวอย่าง (70.0%), ceftazidime จำนวน 2 ตัวอย่าง (20.0%), ceftriaxone จำนวน 4 ตัวอย่าง (40.0%) และ aztreonam จำนวน 7 ตัวอย่าง (70.0%) (ตารางที่ 9)

การตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs โดยวิธี double disk test ของเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ผ่านการตรวจคัดกรองด้วยวิธี disk diffusion test พบเชื้อตัวอย่างให้ผลบวกต่อยา cefotaxime จำนวน 3 ตัวอย่าง, ceftazidime จำนวน 3 ตัวอย่าง, ceftriaxone จำนวน 3 ตัวอย่าง และ aztreonam จำนวน 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 10) โดยเชื้อตัวอย่างที่ให้ผลบวก คือ HS10 มีการเสริมฤทธิ์กัน (synergy) ระหว่างยา AMC กับยา CAZ, CRO, CTX และ ATM (ภาพที่ 3) ส่วน HS21 และ HS22 มีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยา AMC กับยา CAZ, CRO, CTX และ ATM เหมือนกันกับ HS10 (ภาพผนวกที่ 4) ส่วนตัวอย่างจากฟาร์มสุกรให้ผลลบต่อการตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs

**ตารางที่ 9** การตรวจคัดกรอง (screening test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test ของ เชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วยและฟาร์มสุกร

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (%)			
	CTX	CAZ	CRO	ATM
1. ตัวอย่างจากผู้ป่วย	72 (91.14)	6 (7.59)	15 (18.99)	52 (65.82)
2. ตัวอย่างจากฟาร์มสุกร	7 (70.0)	2 (20.0)	4 (40.0)	7 (70.0)

**หมายเหตุ** CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CRO, ceftriaxone; ATM, aztreonam

<sup>a</sup>ค่า breakpoints ของการตรวจคัดกรอง (screening test) หาเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test (CLSI, 2007)

**ตารางที่ 10** การตรวจยืนยัน (confirmatory test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (%)			
	CTX	CAZ	CRO	ATM
ตัวอย่างจากผู้ป่วย	3	3	3	3
	(4.14%, 3/72)	(50.0%, 3/6)	(20.0%, 3/15)	(5.77%, 3/52)

**หมายเหตุ** CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; ATM, aztreonam



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

**ภาพที่ 3** การตรวจหาเอนไซม์ ESBLs โดยวิธี double disk test

รูป ก คือ เชื้อ *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ควบคุมบวก)

รูป ข คือ เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (ควบคุมลบ)

รูป ค คือ ตัวอย่าง HS10 (ผลบวก)

รูป ง คือ ตัวอย่าง HRS4 (ผลลบ)



## วิจารณ์

### 1. การตรวจความสัมพันธ์ระหว่าง *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - กับ *S. Typhimurium*

การหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - กับเชื้อ *S. Typhimurium* ด้วยวิธี duplex PCR เพื่อหา ยีน *mdh* ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะกับเชื้อ *S. Typhimurium* (Lin and Tsen, 1999) พบว่าเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วยและฟาร์มสุกร จำนวน 89 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อการตรวจหา ยีน *mdh* ทั้งหมด อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - เป็นเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงมาจาก *S. Typhimurium* (Echeita *et al.*, 2001; Tavechio *et al.*, 2007) เมื่อดูรูปแบบซีโรวาร์ตามการจำแนกตามหลักการของ Kauffman-White พบว่าเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - คล้ายกันมากกับเชื้อ *S. Typhimurium* 1, 4, [5], 12: i: 1, 2 การสร้างเส้นของเชื้อ *S. Typhimurium* มี ยีนควบคุมอยู่ 2 ชนิดคือ ยีน *fliC* และ *fliB* โดยยีน *fliC* จะควบคุมการสร้างแอนติเจน i (phase 1) และ ยีน *fliB* ควบคุมการสร้างแอนติเจน 1, 2 (phase 2) (Stocker, 1949) มีรายงานการตรวจเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - พบว่าให้ผลลบต่อการตรวจหา ยีน *fliB* (Echeita *et al.*, 2001) การเกิด monophasic ของเชื้อปกติที่เป็น biphasic อาจเกิดจากการผ่าเหล่าทำให้เกิดการสูญเสียการทำงานของ switching mechanism ในการสร้างเส้น ของเชื้อ (Burnens *et al.*, 1996)

การหาความสัมพันธ์ของ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - กับ *S. Typhimurium* โดยวิธี pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ด้วย endonuclease *XbaI* พบว่า 80% ของ *S. Typhimurium* และ 71.3% ของ *S. enterica* serovar 4, [5], 12: i: - มีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 85 % ใน 7 รูปแบบหลักของ PFGE (Pomruangwong *et al.*, 2008)

### 2. รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกในประเทศไทย

ผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกได้จากผู้ป่วย 79 ตัวอย่าง พบว่า รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพไม่มีความสัมพันธ์ต่อชนิดของตัวอย่าง และเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - มีแนวโน้มการดื้อ ampicillin, chloramphenicol และ trimethoprim-sulfamethoxazole คล้ายกับเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วยและสุกรในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2546-2549 (Pomruangwong *et al.*, 2008) ซึ่งสูงกว่าเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้ในระหว่างปี พ.ศ. 2546-2548 (Pulsrikarn *et al.*, 2006) เชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5],

12: i:- ส่วนใหญ่ (84.81%) คือยาแบบ multi-drug resistance (MDR) คือ ตื้อต่อยาตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป (ตารางที่ 7) การดื้อสารต้านจุลชีพแต่ละชนิดในตัวอย่างจากผู้ป่วยพบว่าเชื้อดื้อสารต้านจุลชีพสูงกว่า 70% ในยา trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, cefoperazone รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพที่พบมากที่สุดคือ AMP-CFP-GEN-NAL-SXT (15.19%) ส่วนตัวอย่างจากฟาร์มสุกรจำนวน 10 ตัวอย่างพบการดื้อสารต้านจุลชีพทุกชนิดสูงกว่า 90% โดยมีรูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพ 2 แบบ คือ AMP-CFP-CHL-GEN-NAL-SXT (90%) และ AMP-CFP-GEN-NAL-SXT (10%) เมื่อดูที่มาของตัวอย่างพบว่ามาจากฟาร์มเดียวกันซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อมีการปนเปื้อนไปทั้งฟาร์ม

ผลทดสอบครั้งนี้ยังพบว่าเชื้อตัวอย่างทั้งจากผู้ป่วยและฟาร์มสุกรพบการดื้อยา nalidixic acid แต่มีความไวต่อยา ciprofloxacin ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Randall *et al.* (2005) ที่พบว่าเชื้อ *S. Typhimurium* DT104 ดื้อยา nalidixic acid แต่ไวต่อยา ciprofloxacin ที่เป็นยากลุ่มเดียวกัน และการผ่าเหล่าของยีน *gyrA* ที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสคู่สมเพียง 1 คู่ (point mutation) ทำให้เชื้อมีความไวต่อยา ciprofloxacin ลดลง Giraud *et al.* (2000) ได้ศึกษาการผ่าเหล่าของยีน *gyrA* ร่วมกับการทำงานของ efflux pump ชนิด AcrA ในเชื้อ *S. Typhimurium* พบว่าค่า MIC ของยา nalidixic acid มีค่า > 1,024 µg/ml และ MIC ของยา ciprofloxacin มีค่าสูงถึง 8 µg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ไม่มีการผ่าเหล่าของยีน *gyrA* มีค่า MIC ของยา nalidixic acid เท่ากับ 8 µg/ml และ MIC ของยา ciprofloxacin เท่ากับ 0.03 µg/ml

การทดสอบการดื้อยากลุ่ม cephalosporins ของเชื้อ โดยทั่วไปจะเลือกใช้ยา 1 ชนิดในยา 5 ชนิด คือ cefpodoxime, ceftazidime, aztreonam, cefotaxime และ ceftriaxone ถ้าใช้ยามากกว่า 1 ชนิดจะมีความไวในการตรวจมากขึ้น (CLSI, 2007) การดื้อยากลุ่ม cephalosporins มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของ penicillin-binding proteins (PBPs) ทำให้ยามีความสามารถจับกับ PBPs ลดลง (Yotsuji *et al.*, 1988) และเชื้อสร้างเอนไซม์  $\beta$ -lactamases ออกมาทำลายยากลุ่มนี้ (Paterson and Bonomo, 2005) ในการทดสอบการดื้อยากลุ่ม cephalosporins จะใช้ยา cefpodoxime และ ceftazidime เนื่องจากมีความไวในการตรวจหาเอนไซม์ TEM, SHV และ CTX-M ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ ESBLs (Emery and Weymouth, 1997; Poirel *et al.*, 2002) โดยเฉพาะเอนไซม์ SHV ซึ่งมีอุบัติการณ์ตรวจพบมากกว่าเอนไซม์ ESBLs กลุ่มอื่น (Jacoby, 1997)

การดื้อยาของ *S. Typhimurium* มีความเกี่ยวข้องกับ phage type DT104 ซึ่งเป็น phage ที่พบการดื้อยาหลายชนิด (MDR) คือ AMP-CHL-STR-SSS-TET (Threlfall *et al.*, 1994) ซึ่งรูปแบบการดื้อยาค้นพบมีรายงานหลายประเทศ (Briggs and Fratamico, 1999; Ridley and Threlfall, 1998) จากการ

ตรวจหา phage type DT104 ด้วยวิธี duplex PCR ของเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วย 79 ตัวอย่างนั้นพบเชื้อให้ผลบวกต่อยีนที่จำเพาะของ phage type DT 104 จำนวน 71 ตัวอย่าง (89.87%) ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อยีนจำเพาะของ phage type DT 104 พบการดื้อยา 3 ชนิดขึ้นไปสูงถึง 79.74% และมีรูปแบบการดื้อยา คือ AMP-CFP-CHL-GEN-NAL-SXT (13.9%) นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีเชื้อตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง (HB11, HS30 และ HS25) ที่ตรวจไม่พบ phage type DT104 แต่ก็มีรูปแบบการดื้อยา (AMP-CFP-GEN-NAL-SXT และ AMP-CFP-NAL-SXT) ที่เด่นเหมือนกัน สอดคล้องกับการดื้อยาของ *S. Typhimurium* และ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i - ที่แยกในประเทศไทยพบว่า 26% ของตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อ phage type DT104 มีรูปแบบการดื้อยาเหมือนกับ *S. Typhimurium* phage type DT104 คือ AMP-CHL-STR-SXT-TET ซึ่งเป็นรูปแบบการดื้อยาที่มีการรายงานในหลายประเทศ (Amavisit *et al.*, 2005) ส่วนเชื้อตัวอย่างจากฟาร์มสุกรให้ผลบวกต่อการตรวจหา phage type DT104 ทั้งหมด

### 3. การสร้างเอ็นไซม์เบต้าแลคแตมแบบขยายของ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i -

ผลการตรวจยืนยันหาเอ็นไซม์ ESBLs โดยวิธี double disk test ของเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วยและจากฟาร์มสุกร พบเชื้อตัวอย่างให้ผลบวกต่อการสร้างเอ็นไซม์ ESBLs จำนวน 3 ตัวอย่าง เป็นเชื้อตัวอย่างที่แยกจากอุจจาระผู้ป่วย (ตารางผนวกที่ 7) ส่วนเชื้อตัวอย่างจากฟาร์มสุกรที่ผ่านการตรวจคัดกรอง ตรวจไม่พบการสร้างเอ็นไซม์ ESBLs (ตารางผนวกที่ 8) เมื่อพิจารณาเฉพาะค่า MIC ของยา cefoperazone ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม third-generation cephalosporins เพียงชนิดเดียว พบว่าเชื้อตัวอย่างจากผู้ป่วยคือต่อยานี้สูงถึง 74.68% ส่วนตัวอย่างจากฟาร์มสุกรคือต่อยา cefoperazone ทั้งหมด (100%) มีรายงานการดื้อยา cefoperazone ของเชื้อ *S. Typhimurium* ที่แยกจากผู้ป่วยในตุรกี พบว่าตัวอย่างเชื้อที่ดื้อยา cefoperazone แต่มีความไวต่อยา ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime, ceftizoxime และ aztreonam เมื่อนำเชื้อกลุ่มนี้ไปตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs โดยวิธี double disk test ให้ผลลบต่อการสร้างเอ็นไซม์ ESBLs ถึง 47% (25 ตัวอย่าง) (Otkun *et al.*, 2001) ปรกติแล้วการดื้อยา cefoperazone เป็นผลมาจากเอ็นไซม์ TEM-1, TEM-2 และ SHV-1 (Jacoby and Sutton, 1985; Jacoby and Carreras, 1990) ความแรงของการดื้อยา cefoperazone ขึ้นกับปริมาณของเอ็นไซม์ TEM และ SHV ที่เชื้อสร้างออกมา (Livermore *et al.*, 1986; Seetulsingh *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1994)

การตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs ซึ่ง CLSI กำหนดให้ตรวจโดยวิธี disk diffusion test และ broth microdilution test คือ การตรวจคัดกรอง (screening test) โดยวิธี disk diffusion test จะเลือกใช้ยา 1 ชนิดในยา 5 ชนิดหรือมากกว่า 1 ชนิด คือยา cefpodoxime, ceftazidime, aztreonam, cefotaxime และ ceftriaxone แล้วตรวจยืนยัน (confirmatory test) โดยวิธี combinations disc test ซึ่งจะใช้ยา ceftazidime

กับ ceftazidime-clavulanic acid และยา cefotaxime กับ cefotaxime-clavulanic acid ส่วนการคัดกรอง โดยวิธี broth microdilution test จะใช้ยา ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, cefpodoxime หรือ aztreonam ถ้าเชื่อให้ผลบวกต่อเอ็นไซม์ ESBLs ให้ตรวจยืนยันต่อโดยวิธี broth microdilution test ซึ่งจะใช้ยา ceftazidime เปรียบเทียบกับ ceftazidime + clavulanic acid และยา cefotaxime เปรียบเทียบกับ cefotaxime + clavulanic acid (CLSI, 2007)

ผลที่ได้จากการตรวจ screening test กับ confirm test การสร้างเอ็นไซม์ ESBLs ของตัวอย่างมีความต่างกันมาก เนื่องจากค่า breakpoint ของการตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs โดยวิธี disk diffusion test เป็นของเชื้อ *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* และ *E. coli* (CLSI, 2007) เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการตรวจ screening test มาตรวจ confirm test การสร้างเอ็นไซม์โดยวิธี double disk test พบให้ผลบวก 3 ตัวอย่าง (HS10, HS21 และ HS22) ส่วนตัวอย่างจากฟาร์มสุกรให้ผลลบในการตรวจเอ็นไซม์ ESBLs โดยวิธี double disk test ทั้งหมด

## สรุปและข้อเสนอแนะ

1. ผลการตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - กับเชื้อ *S. Typhimurium* พบว่าเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วยและฟาร์มสุกร ทั้งหมดนั้นให้ผลบวกกับยีนจำเพาะ (*mdh*) ของ *S. Typhimurium* อาจเป็นไปได้ว่า *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - เป็นเชื้อที่เปลี่ยนแปลงมาจาก *S. Typhimurium* การศึกษาขั้นต่อไปควรศึกษาโปรโมเตอร์และยีนที่จำเพาะกับการสร้างเส้นของ *S. Typhimurium* เพื่อยืนยันผลการตรวจทาง serotyping

2. รูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกในประเทศไทย พบว่ารูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของตัวอย่างจากผู้ป่วยที่พบมากที่สุดคือ AMP-CFP-GEN-NAL-SXT (15.19%) ส่วนตัวอย่างจากฟาร์มสุกรที่พบมากที่สุดคือ AMP-CFP-CHL-GEN-NAL-SXT (90%) ซึ่งตัวอย่างจากฟาร์มสุกรพบรูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพไม่ต่างกันมาก เนื่องจากเป็นตัวอย่างจากฟาร์มเดียวกัน การเลือกใช้สารต้านจุลชีพเพื่อศึกษาการดื้อยาของเชื้อที่มีความสัมพันธ์กับ phage type DT104 ควรเลือกยาที่เกี่ยวข้องกับ phage type DT104 ด้วยคือ ampicillin (AMP), chloramphenicol (CHL), streptomycin (STR), sulfonamides (SSS) และ tetracycline (TET) เพื่อเปรียบเทียบการดื้อยาของ *S. Typhimurium* phage type DT104 ที่พบทั่วโลก ซึ่งจะใช้ประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรค

3. การสร้างเอ็นไซม์เบต้าแลคเตมแบบขยายของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - จากการตรวจด้วยวิธี double disk test พบเชื้อสร้างเอ็นไซม์ ESBLs เพียง 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อตัวอย่างจากอุจจาระผู้ป่วย การตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test มีข้อจำกัดอยู่มาก ถ้าเชื้อสร้างเอ็นไซม์ออกมาน้อยจะทำให้โซนใสกว้างมากขึ้น จะรบกวนการเสริมฤทธิ์กันของยา ควรเลือกใช้ยาในการหาค่า MICs ก่อนเพื่อคัดกรองก่อนตรวจวิธี double disk test การเลือกใช้ยา cefpodoxime ในการตรวจ จะมีความไวและความจำเพาะในการตรวจดียิ่งขึ้น และควรมีการศึกษาในระดับโมเลกุลโดยใช้ primer ที่จำเพาะกับเอ็นไซม์ ESBLs ชนิดต่างๆ เพื่อยืนยันผลการตรวจทาง phenotype

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Aarts, H. J. M., B. Guerra and B. Malorny. 2006. Molecular methods for detection of antibiotic resistance, pp.37-48. In F. M. Aarestrup, eds. **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. ASM press, Washington, DC.
- Amavisit, P., W. Boonyawiwat and A. Bangtrakulnont. 2005. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1, 4, [5],12 :i: - isolates in Thailand. **J. Clin. Microbiol.** 43: 2736-2740.
- Angkititrakul, S., C. Chomvarin, T. Chaita, K. Kanistanon and S. Waethewutajarn. 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from pork, chicken meat and humans in Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** 36: 1510-1515.
- Bangtrakulnonth, A., G. Bunyaraksyotin and P. Nantanawoot. 2004a. **Annual report of confirmed *Salmonella* and *Shigella* in Thailand 2004**. The National *Salmonella* and *Shigella* Center, National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Thailand.
- \_\_\_\_\_ and P. Tishyadhigama. 2006. **Annual report of confirmed *Salmonella* and *Shigella* in Thailand 2006**. The National *Salmonella* and *Shigella* Center, National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Thailand.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, G. Bunyaraksyotin and P. Nantanawoot. 2003. **Annual report of confirmed *Salmonella* and *Shigella* in Thailand 2003**. The National *Salmonella* and *Shigella* Center, National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Thailand.

- Bangtrakulnonth, A., S. Pornreongwong and C. Pulsrikarn. 2005. **Annual report of confirmed *Salmonella* and *Shigella* in Thailand 2005**. The National *Salmonella* and *Shigella* Center, National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Thailand.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, P. Sawanpanyalert, R. S. Hendriksen, D. M. A. Lo Fo Wong and F. M. Aarestrup. 2004b. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993–2002. **Emerg. Infect. Dis.** 10:131-136.
- Baraniak, A., J. Fiett, W. Hryniewicz, P. Nordmann and M. Gniadkowski. 2002. Cefotaxime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. **J. Antimicrob. Chemother.** 50: 393-396.
- Bedenic, B., C. Randegger, A. Boras and H. Haechler. 2001. Comparison of five different methods for detection of SHV extended-spectrum beta-lactamases. **J. Chemother.** 13: 24–33.
- Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48: 1-14.
- Boonma, S., A. Bangtrakulnonth, S. Pornrunangwong, N. Marnrim, K. Kaneko and M. Ogawa. 1998. Predominant serovars of *Salmonella* in humans and foods from Thailand. **J. Vet. Med. Sci.** 60: 877-880.
- Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.** 14: 933-951.
- \_\_\_\_\_, Y. Yang, D. Sahm, I. Grope, D. Gardovska and G. Storch. 1998. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella* Typhimurium in Latvia. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42:1980-1984.

- Briggs, C. E., and P. M. Fratamico. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 846-849.
- Brown, D. F., J. Andrews, A. King and A. P. MacGowan. 2000. Detection of extended-spectrum beta-lactamases with E test and double-disc potentiation methods. **J. Antimicrob. Chemother.** 46: 327-328.
- Burnens, A. P., J. Stanley, I. Sechter and J. Nicolet. 1996. Evolutionary origin of a monophasic *Salmonella* serovar, 9,12: 1,v: 2, revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the *fljB* gene. **J. Clin. Microbiol.** 34: 1641-1645.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests; seventeenth informational supplement. M100-S17. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa.
- Cormican, M. G., S. A. Marshall and R. N. Jones. 1996. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) - producing strains by the E test ESBL screen. **J. Clin. Microbiol.** 34: 1880-1889.
- Danel, F., L. M. C. Hall, B. Duke, D. Gur and D. M. Livermore. 1999. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10  $\beta$ -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 3: 1362-1366.
- Echeita, M. A., S. Herrera and M. A. Usera. 2001. Atypical, *fljB*-Negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4, 5, 12: i: 2 appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. **J. Clin. Microbiol.** 34: 2981-2983.
- Emery, C. L. and L. A. Weymouth. 1997. Detection and clinical significance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in tertiary-care medical center. **J. Clin. Microbiol.** 35: 2061-2067.



- Ewing, W. H. 1986. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**, 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
- Fitzgerld, C., R. Sherwood, L. L. Gheesling, F. W. Brenner and P. I. Fields. 2003. Molecular analysis of the *rfb* O antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O: 6, 14 and development of a serogroup-specific PCR assay. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 6099-6105.
- Gard, A. 1938. Das Schwarmphanomen in der *Salmonella*-gruppe und seine praktische Ausnutzung. **Z. Hyg. Infektionskr.** 120: 615-619.
- Giannella, R. A. 2007. **Salmonella**. Available Source: <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch021.htm>, December 1, 2007
- Giraud, E., A. Cloeckert, D. Kerboeuf and E. Chaslus-Dancla. 2000. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 1223-1228.
- Guardabassi, L. and P. Courvalin. 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance, pp. 1-18. In F. M. Aarestrup, eds. **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. ASM press, Washington, DC.
- Hachler, H., P. Santarnam and F.H. Kayser. 1996. Sequence and characterization of a novel chromosomal aminoglycoside phosphotransferase gene *aph(3')-IIb* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40: 1254-1256.
- Hall, L. M, D. M. Livermore, D. Gur, M. Akova and H. E. Akalin. 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Psuedomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37: 1637-1644.

- Hirsh, D. C. 2004. *Enterobacteriaceae: Salmonella*, pp. 69-74. In D. C. Hirsh, N. J. MacLachlan and R. L. Walker, eds. **Veterinary Microbiology**. Blackwell Publishing.
- Ho, P. L., K. H. Chow, K. Y. Yuen, W. S. Ng and P. Y. Chau. 1998. Comparison of a novel, inhibited-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **J. Antimicrob. Chemother.** 42: 49-54.
- Huang, Z. M, P. H. Mao, Y. Chen, L. Wu and J. Wu. 2004. Study on molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase encoding genes of multiple-drug -resistant *Acinetobacter baumannii*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.** 25: 425-427.
- Jacoby, G.A. 1997. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** 11: 875-887.
- \_\_\_\_\_ and I. Carreras. 1990. Activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 34: 858-862.
- \_\_\_\_\_ and L. Sutton. 1985.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -lactam resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 28: 703-706.
- Janda, J. M. and S. L. Abbott. 1998. **The Enterobacteria**. Lippincott-Raven publishers. Philadelphia, New York.
- Jarlier, V., M. H. Nicolas, G. Fournier and A. Philippon. 1988. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis.** 10: 867-878.

Jensen, M. M., D. N. Wright and R. A. Robinson. 1997. **Microbiology for the Health Sciences**, 4<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall International, Inc. London, England.

Jordan, F.T. W. and M. Pattison. 1996. **Poultry diseases**. 4<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company Ltd. London, England.

Lee, G. and P. Bishop. 1997. **Microbiology and infection control for health professionals**. Prentice Hall Australia Pty Ltd, Sydney, Australia.

Lin, J., and H. Tsen. 1999. Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in stool and food samples. **J. Food Prot.** 62: 1103-1110.

Livermore, D. M. 1995.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** 8: 557-584.

\_\_\_\_\_. 1998.  $\beta$ -Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. **J. Antimicrob. Chemother.** 41: 25-41.

\_\_\_\_\_, F. Moosdeen, M. A. Lindridge, P. Kho and J. D. Williams. 1986. Behaviour of TEM-1  $\beta$ -lactamase as a resistance mechanism to mezlocillin, ampicillin and azlocillin in *Escherichia coli*. **J. Antimicrob. Chemother.** 17: 139-146.

Macfarlane, E. L. A. and R. E. W. Hancock. 2000. Antibiotic resistance and survival in the host, pp. 93-104. In K.A. Brogden, J. A. Roth, T. B. Stanton, C. A. Bolin, F. C. Minion and M. J. Wannemuehler, eds. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**. 3<sup>rd</sup> ed. ASM Press, Washington, D.C.

MacKenzie, F. M., C. A. Miller and I. M. Gould. 2002. Comparison of screening methods for TEM- and SHV-derived extended-spectrum betalactamase detection. **Clin. Microbiol. Infect.** 8: 715-724.

- Manard, R., C. Molinas, M. Arthur, J. Duval, P. Courvalin and R. Leclercq. 1993. Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37: 78-83.
- Marchandin, H., C. Carriere, D. Sirot, H. Jean-Pierre and H. Darbas. 1999. TEM-24 produced by four different species of *Enterobacteriaceae*, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 2069-2073.
- Mayer, L. W. 1988. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** 1: 228-243.
- Miller, S. I. and D. A. Pegues. 2000. *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. In G. L. Mandell, J. E. Bennett and R. Dolin, eds. **Principles and Practice of Infectious Diseases.** 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania.
- Morosini, M. I., R. Canton, J. Martinez-Beltran, M. C. Negri, J. C. Perez-Diaz, F. Baquero and J. Blazquez. 1995. New extended spectrum TEM-type  $\beta$ -lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. **Antimicrob. Agents Chemother.** 39: 458-461.
- Murray, P.R., K. S. Rosenthal, G. S. Kobayashi and M. A. Pfaller. 1998. **Medical Microbiology.** 3<sup>rd</sup> ed. United States of America, Harcourt health sciences.
- M'Zali, F. H., A. Chanawong, K. G. Kerr, D. Birkenhead and P. M. Hawkey. 2000. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. **J. Antimicrob. Chemother.** 45: 881-885.

- Nordmann , P., E. Ronco, T. Nass, C. Duport, Y. Michel-Briand and R. Labia. 1993.  
Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 37: 962-969.
- National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand. 2007. **Antimicrobial Susceptibility**.  
Available Source: [http:// narst. dmsc. moph. Go.th.](http://narst.dmsc.moph.go.th), May 10, 2009
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003a. Methods for dilution  
antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard,  
6<sup>th</sup> ed. M7-A6. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pa.
- \_\_\_\_\_. 2003b. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved  
standard, 8<sup>th</sup> ed. M2-A8. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**,  
Wayne, Pa.
- Olesen, I., H Hasman and F. M. Aarestrup. 2004. Prevalence of  $\beta$ - lactamases among ampicillin  
resistant *Escherichia coli* and Salmonella isolated from food animals in Denmark.  
**Microb. Drug Resist.** 10: 334-340.
- Olive, J. E. and P. Brean. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of  
microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.** 37: 1661-1669.
- Olsen, J. E., D. J. Brown, M. N. Shov and J. P. Christensen. 1993. Bacterial typing methods  
suitable for epidemiology analysis. Application in investigations of salmonellosis among  
livestock. **Vet. Q.** 15: 125-135.
- Otkun, M., B. Erdem, F. Akata, M. Tatman-Otkun, D. Gerceker, S. Yagci and E. Ozkan. 2001.  
Antibiotic resistance patterns and plasmid profiles of *Salmonella* Typhimurium isolates  
in Turkey. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 20: 206-209.

- Paterson, D. L. and R. A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. **Clin. Microbiol. Rev.** 18: 657-686.
- Perilli, M., B. Segatore, M. R. D. Massis. 2000. TEM-72 a new extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 2537-2539.
- Philippon, L. N., T. Nass, A-T. Bouthor, V. Barakett and P. Nordmann. 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 41: 2188-2195.
- Poirel, L., E. Lebessi, M. Castro, C. Fevre, M. Foustokou and P. Nordmann. 2004. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48: 2277-2279.
- \_\_\_\_\_, M. Gniadkowski and P. Nordmann. 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. **J. Antimicrob. Chemother.** 50: 1031-1034.
- Popoff, M. Y. 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8<sup>th</sup> ed. **W. H. O. Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella.**  
Institute Pasteur, Paris, France.
- Pornruangwong, S., T. Sriyanpai, C. Pulsrikarn, P. Sawanpayalert, S. Boonma and A. Bangtrakulnonth. 2008. The epidemiological relationship between *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12: i: - isolates from humans and swine in Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** 39: 288-296.

- Pritchett, L. C., M. E. Konkel, J. M. Gay and T. E. Besser. 2000. Identification of DT104 and U302 phage type among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. **J. Clin. Microbiol.** 38: 3484-3488.
- Pulsrikarn, C., A. Bangtrakulnonth, S. Pornruangwong, T. Sriyapai and P. Sawanpanyalert. 2006. **Prevalence of non – typhoidal *Salmonella* isolated from human blood and antimicrobial resistance in Thailand, 2003 -2005.** Available Source: [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_nih/a\\_nih\\_5\\_001c.asp?info\\_id=1106](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_5_001c.asp?info_id=1106), December 10, 2007
- Quinn, P. J., M. E. Carter, B. Markey and G. R. Carter. 1994. **Clinical Veterinary Microbiology.** Wolfe, London, England.
- Randall, L. P., D. J. Eaves, S. W. Cooles, V. Ricci, A. Buckley, M. J. Woodward and L. V. Piddock. 2005. Fluoroquinolone treatment of experimental *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infections in chickens selects for both *gyrA* mutations and changes in efflux pump gene expression. **J. Antimicrob. Chemother.** 56: 297-306.
- Ridley, A., and E. J. Threlfall. 1998. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella* Typhimurium DT104. **Microb. Drug Resist.** 4:113-118.
- Schooneveldt, J. M., G. R. Nimmo and P. Giffard. 1998. Detection and characterisation of extended- spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial infection. **Pathology.** 39: 164-168.
- Schwarz, S., A. Cloeckaert and M. C. Roberts. 2006. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents, pp. 73-98. In F. M. Aarestrup, eds. **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin.** ASM press, Washington, DC.

- Seetulsingh, P., L. M. C. Hall and D. M. Livermore. 1991. Activity of clavulanate combinations against TEM-1  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolates obtained in 1982 and 1989. **J. Antimicrob. Chemother.** 27: 749-759.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** 98: 503-517.
- Stocker, B. A. D. 1949. Measurements of rate of mutation of flagellar antigenic phase in *Salmonella* Typhimurium. **J. Hyg.** 47: 398-413.
- Sturenburg, E., A. Kuhn, D. Mack and R. Laufs. 2004. A novel extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance. **J. Antimicrob. Chemother.** 54: 406-409.
- Tavechio A. T., C. R. Fernandes and A. Sueli. 2007. Multiplex PCR identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- in Sao Paulo state, Brazil: frequency and antibiotic resistance patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 46: 115-117.
- Taylor, D. E., A. Gibreel, T. D. Lawley and D. M. Tracz. 2004. Antibiotic resistance plasmids, pp. 437-491. In B. E. Funnell and G. J. Phillips, eds. **Plasmid Biology.** ASM Press, Washington, D.C.
- Todar, K. 2008. **Salmonella and Salmonellosis.** Available Source: [http://textbookofbacteriology.net/salmonella\\_2.html](http://textbookofbacteriology.net/salmonella_2.html), May 30, 2009
- Thomson, K. S. and C. C. Sanders. 1992. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in member of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional test. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 36: 1877-1882.



- Threlfall, E. J. and J. A. Frost. 1990. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. **J. Appl. Bacteriol.** 68: 5-16.
- \_\_\_\_\_, J. A. Frost, L. R. Ward and B. Rowe. 1994. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella* Typhimurium DT104 with chromosomally integrated drug resistance. **Vet. Rec.** 134: 157.
- Tzelepi, E., A. Giakkoupi, D. Sofianou, V. Loukova, A. Kemeroglou and A. Tsakris. 2000. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. **J. Clin. Microbiol.** 38: 542-546.
- Vahaboglu, H., L. M. C. Hall, L. Mulazimoglu, S. Dodanli, I. Yildirim and D. M. Livermore. 1995. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1  $\beta$ -lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul. **Turkey J. Med. Microbiol.** 43: 294-299.
- \_\_\_\_\_, R. Ozturk, G. Aygun, F. Coskuncan, A. Yaman, A. Kaygusuz, H. Leblebicioglu, I. Balik, K. Aydin and M. Otkun. 1997. Wide spread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicentre study. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 41: 2265-2269.
- Vercauteren, E., P. Descheemaeker, M. Ieven, C. C. Sanders and H. Goossens. 1997. Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. **J. Clin. Microbiol.** 35: 2191-219.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zaneau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4411.

- Wu, P. J., K. Shannon and I. Phillips. 1994. Effect of hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to  $\beta$ -lactam antibiotics. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 38: 494-498.
- Yamamoto, S. and K. Kutsukake. 2006. FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.** 188: 958-967.
- Yotsuji, A., J. Mitsuyama, R. Hori, T. Yasuda, I. Saikawa, M. Inoue and S. Mitsuhashi. 1988. Mechanism of Action of Cephalosporins and Resistance Caused by Decreased Affinity for Penicillin-Binding Proteins in *Bacteroides fragilis*. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 32: 1848-1853.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อ

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1 MacConkey agar (Merck, USA) ประกอบด้วย

สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Peptone from casein	17.0
Peptone from meat	3.0
Sodium chloride	5.0
Lactose	10.0
Bile salt mixture	1.5
Neutral red	0.03
Crystal violet	0.001
Agar-agar	13.5

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ต้มจนละลาย ใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 °C, 15 นาที

### 2. Mueller-Hinton broth (Merck, USA) ประกอบด้วย

สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Meat infusion	2.0
Casein hydrolysate of casein	17.5
Starch	1.5

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 21 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ต้มจนละลาย ใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 °C, 15 นาที

### 3. Mueller-Hinton agar (Merck, USA) ประกอบด้วย

สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Meat infusion	2.0
Casein hydrolysate	17.5
Starch	1.5
Agar-agar	13.0

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 37 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ต้มจนละลาย ใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 °C, 15 นาที

### 4. Tryptic Soy agar (BBL™, USA) ประกอบด้วย

สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Pancreatic digest of casein	15.0
Papaic digest of soybean meal	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 40 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ต้มจนละลาย ใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 °C, 15 นาที

### 5. Swarm agar ประกอบด้วย

สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Bacto beef extract	3.0
Bacto peptone	5.0
Bacto agar	5.0
Natriumdesoxycholal (C <sub>2</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>4</sub> )	0.3

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนละลาย ใส่ขวด แล้วฆ่าเชื้อที่ 121 °C, 15 นาที

## 6. Triple Sugar Iron agar (Merck, USA) ประกอบด้วย

สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Peptone from casein	15.0
Peptone from meat	5.0
Meat extract	3.0
Yeast extract	3.0
Sodium chloride	5.0
Lactose	10.0
Sucrose	10.0
D(+)-glucose	1.0
Ammonium iron (III) citrate	0.5
Sodium thiosulfate	0.5
Phenol red	0.024
Agar-agar	12.0

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 65 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ต้มจนละลาย ใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 °C, 15 นาที

## 7. Sulfide Indole Motile medium (Merck, USA) ประกอบด้วย

สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Peptone from casein	20.0
Peptone from meat	6.65
Ammonium iron (II) citrate	0.2
Sodium thiosulfate	0.2
Agar-agar	3.0

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ต้มจนละลาย ใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 °C, 15 นาที

### 8. Lysine Iron agar (Merck, USA) ประกอบด้วย

สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Peptone from meat	5.0
Yeast extract	3.0
D(+)-glucose	1.0
L-lysine monohydrochloride	10.0
Sodium thiosulfate	0.04
Ammonium iron (III) citrate	0.5
Bromocresol purple	0.02
Agar-agar	12.5

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 32 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ต้มจนละลาย ใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 °C, 15 นาที

### 9. Nutrient agar (Merck, USA) ประกอบด้วย

สารเคมี	น้ำหนัก (กรัม)
Peptone	15.0
Yeast extract	3.0
Sodium chloride	6.0
Glucose	1.0
Agar-agar	12.0

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 37 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ต้มจนละลาย ใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 °C, 15 นาที



ภาคผนวก ข

สารเคมี

## สารเคมี

### 1. 0.1 mol/L NaOH

การเตรียมสารละลาย ใช้ NaOH (MW = 40 g) น้ำหนัก 4 กรัม ผสมลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะให้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 mol/L NaOH

### 2. 2.5 mol/L NaOH

การเตรียมสารละลาย ใช้ NaOH (MW = 40 g) น้ำหนัก 100 กรัม ผสมลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะให้ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 mol/L NaOH

### 3. Phosphate buffer

#### 1. เตรียมสารละลาย A (0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

ใช้  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (MW = 120 g) น้ำหนัก 24 กรัม ผสมลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะให้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

#### 2. เตรียมสารละลาย B (0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

ใช้  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (MW = 142 g) น้ำหนัก 28.4 กรัม ผสมลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะให้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Phosphate buffer pH 6, 0.1 mol/L นำสารละลาย A (0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ปริมาตร 87.7 ml ผสมกับสารละลาย B (0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ปริมาตร 12.3 ml ให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นอีก 100 ml จะได้ Phosphate buffer pH 6 ความเข้มข้น 0.1 mol/L ปริมาตร 200 ml

Phosphate buffer pH 8, 0.1 mol/L นำสารละลาย A (0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ปริมาตร 5.3 ml ผสมกับสารละลาย B (0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ปริมาตร 94.7 ml ให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นอีก 100 ml จะได้ Phosphate buffer pH 8 ความเข้มข้น 0.1 mol/L ปริมาตร 200 ml

#### 4. McFarland No.0.5

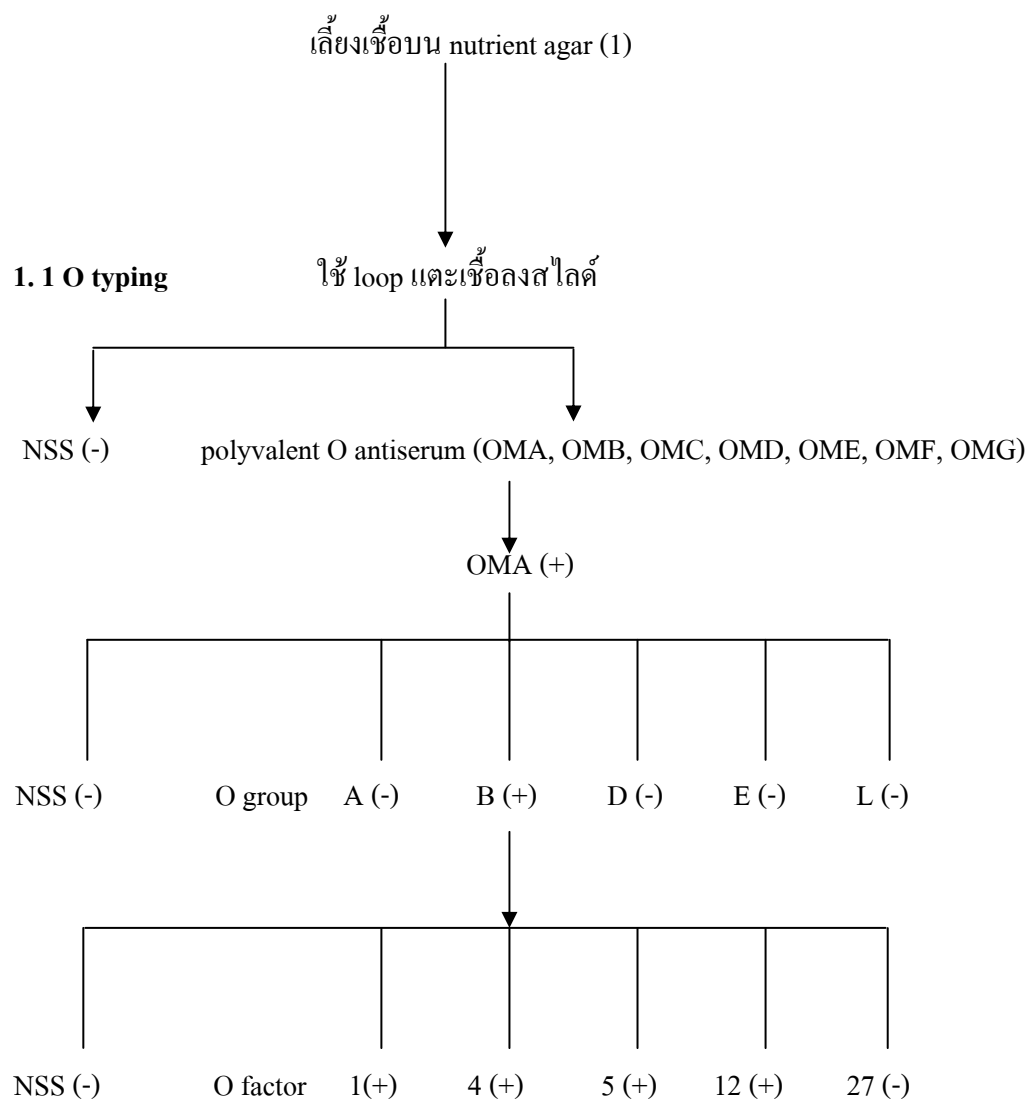
การเตรียมสารละลาย จากสารละลาย 1.175 % barium chloride dihydrate ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ปริมาตร 0.05 ml ผสมลงใน 1% sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ปริมาตร 9.95 ml จะได้ McFarland No.0.5 ปริมาตร 10 ml (NCCLS, 2003a)

#### 5. 10X TBE

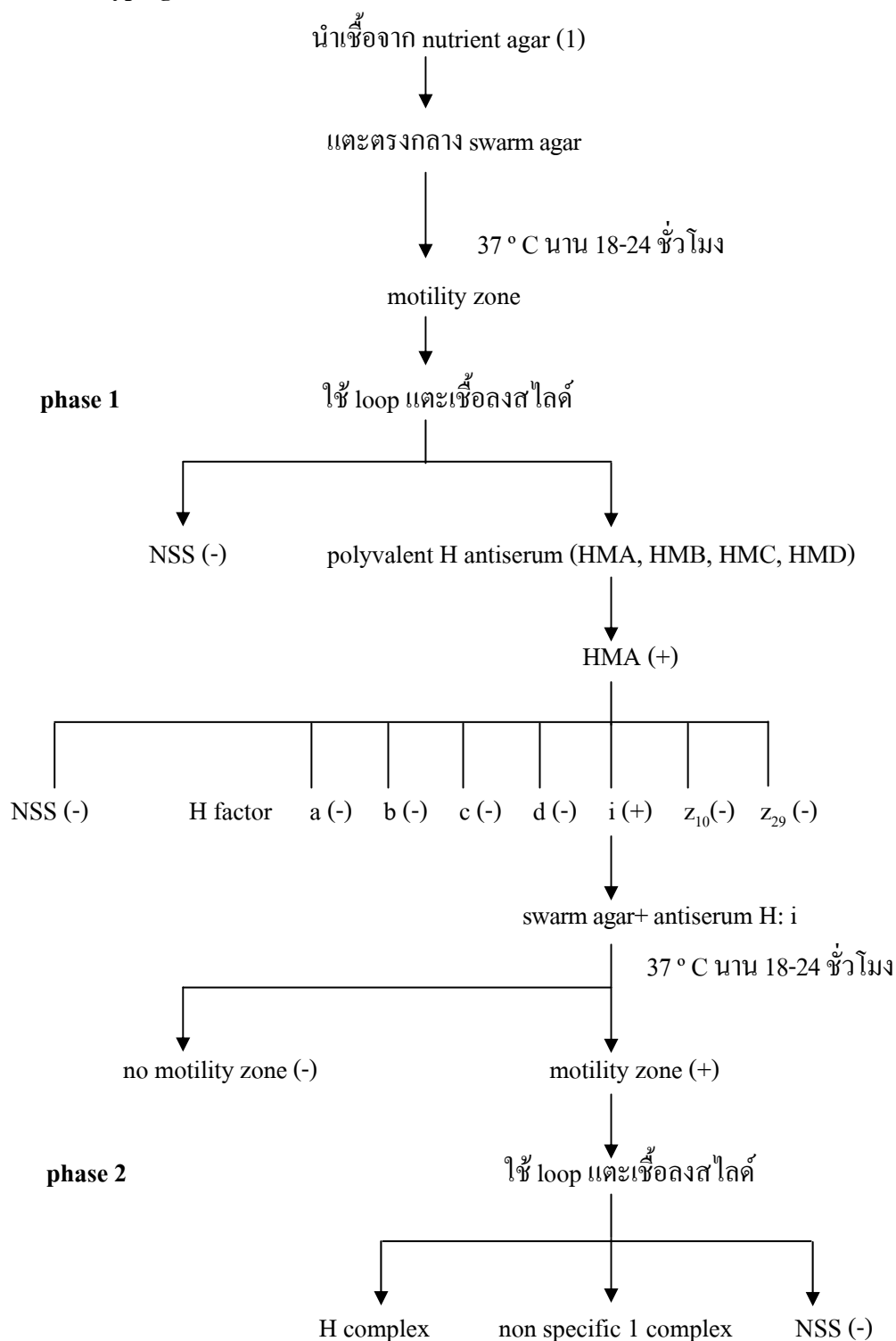
สารละลายประกอบด้วย Tris base 108 กรัม boric acid 95 กรัม และ  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  9.3 กรัม เติมน้ำกลั่นครบ 1 ลิตร ใส่ขวด แล้วฆ่าเชื้อที่  $121^\circ\text{C}$  นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง นำมาใช้ในความเข้มข้น 1X โดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1: 10

ภาคผนวก ก  
ขั้นตอนการทดลอง

### 1. การตรวจซีโรวาร์ด้วยวิธี Gard technique (Gard, 1938)



## 1.2 H typing



## 1.3 O typing - H typing → Kauffmann-White scheme (Popoff, 2001)

ภาพผนวกที่ ๑1 ขั้นตอนการตรวจซีโรวาร์ของ *Salmonella* spp.

## 2. การหาค่า Minimum inhibitory concentrations (MICs)

### 2.1 การเตรียม stock สารต้านจุลชีพ

สารต้านจุลชีพที่จะใช้ทดสอบต้องนำมาคำนวณความเข้มข้นที่ต้องการนำมาทดสอบกับเชื้อตัวอย่าง โดยจะดูจากค่า QC strain ซึ่งเชื้อ *Salmonella* spp. จะใช้ค่า QC strain ของ *Escherichia coli* ATCC 25922 จาก M100-S17 table 3 (CLSI, 2007) สูตรการคำนวณปริมาณสารต้านจุลชีพ คือ

$$\text{Weight (mg)} = \text{Volume (ml)} \times \text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) / \text{Assay potency } (\mu\text{g/mg})$$

$$\text{Weight (mg)} = \text{น้ำหนักของผงยา, volume (ml)} = \text{ปริมาตรของ stock ยาที่ต้องการ}$$

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{ความเข้มข้นเริ่มต้นของ stock ยา}$$

$$\text{Assay potency } (\mu\text{g/mg}) = \text{ความแรงของยา}$$

สารต้านจุลชีพที่คำนวณได้จะนำผงยามาเตรียมทำ stock ก่อน โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 10 เท่าของความเข้มข้นสูงสุดที่จะทดสอบ เช่น ความเข้มข้นสูงสุด 512  $\mu\text{g/ml}$  จะเตรียมสารต้านจุลชีพให้มีความเข้มข้นเป็น 5,120  $\mu\text{g/ml}$  โดยใช้ตัวทำละลายและตัวเจือจางตามตารางผนวกที่ 1

#### ตารางผนวกที่ 1 ตัวทำละลายและตัวเจือจางที่ใช้เตรียมสารต้านจุลชีพสำหรับการทดสอบ

ผงสารต้านจุลชีพ	ตัวทำละลาย	ตัวเจือจาง
1. nalidixic acid	½ volume of water, 0.1 mol/L NaOH drop wise to dissolve	
2. ciprofloxacin	water	water
3. ampicillin	phosphate buffer, pH 8.0, 0.1 mol/L	phosphate buffer, pH 6.0, 0.1 mol/L
4. trimetroprim	HCl 10% final volume	water
5. sulfamethoxazole	2.5 mol/L NaOH	water
6. chloramphenicol	95% ethanol	water
7. gentamicin	water	water
8. cefoperazone	water	water

ที่มา: ดัดแปลงจาก CLSI (2007)

## 2. 2 การเตรียม micro dilution plate

นำ stock สารต้านจุลชีพมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆในหลอดเตรียมยา (ตารางผนวกที่ 2) การเลือกช่วงการทดสอบให้ดูจากตารางการแปรผลทาง MIC ใน M100-S17 table 2A โดยใช้ เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุม จากนั้นหยอดสารต้านจุลชีพความเข้มข้นต่างๆ แต่ละแถวของ micro plate ในปริมาณหลุมละ 100  $\mu$ l โดยเรียงจากความเข้มข้นสูงสุดจากหลุมที่ 1 จนถึงหลุมที่ 11 ส่วนหลุมที่ 12 เป็นหลุมควบคุม (control) จะไม่มีสารต้านจุลชีพ แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อตัวอย่าง ซึ่งแถวที่ 1-6 จะหยอดเชื้อตัวอย่าง ส่วนแถวที่ 7 จะหยอดเชื้อควบคุม และแถวที่ 8 เป็นตัวควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ (media control) (CLSI, 2007) เช่น การเตรียมยา ampicillin (ภาพผนวกที่ 2)

**ตารางผนวกที่ ค2** การเตรียมสารต้านจุลชีพที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ขั้นตอน	ความเข้มข้น	แหล่งที่มา	ปริมาตรของสารละลาย			ความเข้มข้นสุดท้าย
1	5,120 $\mu$ g/ml	stock	1 ml	+	9 ml	= 512 $\mu$ g/ml
		สารต้านจุลชีพ				
2	512	ขั้นตอน 1	1		1	256
3	512	ขั้นตอน 1	1		3	128
4	512	ขั้นตอน 1	1		7	64
5	64	ขั้นตอน 4	1		1	32
6	64	ขั้นตอน 4	1		3	16
7	64	ขั้นตอน 4	1		7	8
8	8	ขั้นตอน 7	1		1	4
9	8	ขั้นตอน 7	1		3	2
10	8	ขั้นตอน 7	1		7	1
11	1	ขั้นตอน 10	1		1	0.5
12	1	ขั้นตอน 10	1		3	0.25
13	1	ขั้นตอน 10	1		7	0.125

ที่มา: CLSI (2007)



	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	control
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
sample 1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
sample 2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
sample 3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
sample 4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
sample 5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
sample 6	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>E. coli</i> ATCC 25922	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
media control	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

ภาพผนวกที่ ค2 การเตรียม micro dilution plate ของยา ampicillin

### 2.3 การเตรียมเชื้อตัวอย่าง

เพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างบน MacConkey agar (Merck, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกลโคไลเดี่ยวๆ 3-5 โคไลนี เขี่ยลงในหลอด Mueller-Hinton broth (Merck, USA) ปริมาตร 2 ml นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C แล้วนำมาวัดความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) แล้วเจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1: 10 (1.0 ml ใน MHB 9.0 ml) ( $1.5 \times 10^7$  CFU/ml) ก่อนนำเชื้อไปใช้ทดสอบกับสารต้านจุลชีพใน micro dilution plate (NCCLS, 2003a)

### 2.4 การวัดค่า MICs

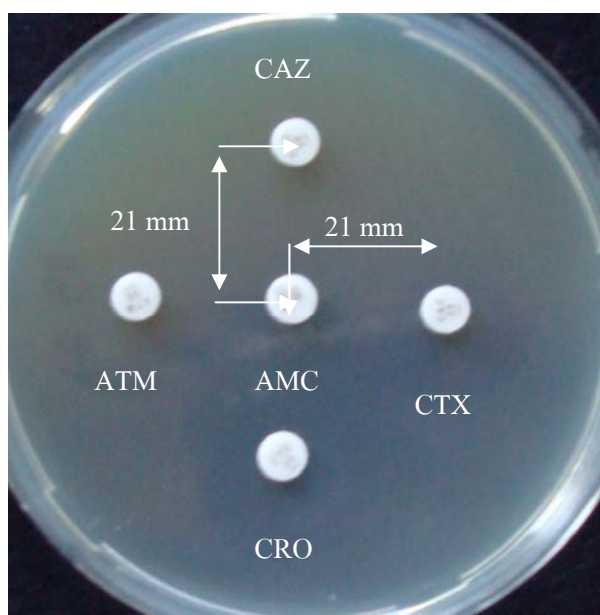
เติมเชื้อตัวอย่างที่เตรียมในปริมาตร 10 µl ลงใน micro plate แถวละ 1 ตัวอย่าง ตั้งแต่หลุมที่ 1-12 โดยเรียงจากแถวที่ 1-6 ส่วนแถวที่ 7 จะเติมเชื้อควบคุม (*Escherichia coli* ATCC 25922) และแถวที่ 8 จะไม่ใส่เชื้อลงไป (media control) หลังจากนั้นปิดฝาครอบ micro plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยอ่านค่า QC strain ของ *E. coli* ATCC 25922 เทียบกับค่า QC strain ใน M100-S17 table 3 ส่วนแถวที่ 8 (media control) จะให้ผลลบ (negative) และหลุม

ควบคุม (control) ทุกแถวจะให้ผลบวก (positive) หลังจากนั้นจึงอ่านค่า MICs ของเชื้อตัวอย่างเทียบกับ M100-S17 table 2A และวิเคราะห์ค่า breakpoint โดยอ้างอิงจาก Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007)

### 3. การตรวจหาเอ็นไซม์เบต้าแลคเตมแบบขยาย

#### 3.1 การวางแผ่นยาบน Mueller-Hinton agar

วางแผ่นยา amoxicillin-clavulanic acid ลงตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยา ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone และ aztreonam ในลักษณะ 4 มุม โดยมีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของแผ่นยา 4 ชนิดกับแผ่นยา amoxicillin-clavulanic acid ออกไปด้านละ 21 mm (ภาพผนวกที่ 3)



ภาพผนวกที่ 3 การวางแผ่นยาในการตรวจหาเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test

AMC, amoxicillin-clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime;

CRO, ceftriaxone; ATM, aztreonam



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพผนวกที่ ๓๔ เชื้อตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ ESBLs ด้วยวิธี double disk test

รูป ก คือ เชื้อ *K. pneumoniae* ATCC 700603 (คววมบวก)

รูป ข คือ เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (คววมลบ)

รูป ค คือ ตัวอย่าง HS10 (ผลบวก)

รูป ง คือ ตัวอย่าง HS21 (ผลบวก)

รูป จ คือ ตัวอย่าง HS22 (ผลบวก)

รูป ฉ คือ ตัวอย่าง HRS4 (ผลลบ)

ภาคผนวก ง  
ผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ง1 การตรวจซีโรวาร์ *S. Typhimurium* DT104 และรูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i - ที่แยกจากผู้ป่วย

No.	Lab no.	serovar	S.T/DT104	AMP	CFP	CHL	CIP	GEN	NAL	SXT
1	HB1	S. 1,4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.031/S	2/S	≥128/R	0.125/S
2	HB2	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	64/R	16/I	1/S	2/S	≥128/R	≥32/R
3	HB3	S. 1,4,12:i:-	+/+	2/S	1/S	128/R	0.015/S	32/R	8/S	≥32/R
4	HB4	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	128/R	8/S	0.015/S	64/R	16/S	≥32/R
5	HB5	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	16/I	0.031/S	2/S	16/S	≥32/R
6	HB6	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	16/I	0.5/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
7	HB7	S. 1,4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.031/S	64/R	8/S	≥32/R
8	HB8	S. 1,4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.015/S	64/R	8/S	≥32/R
9	HB9	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	128/R	8/S	0.008/S	1/S	8/S	≥32/R
10	HB10	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.25/S	64/R	≥128/R	≥32/R
11	HB11	S. 4,5,12:i:-	+/-	≥128/R	≥128/R	8/S	0.25/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
12	HB12	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.25/S	4/S	≥128/R	≥32/R
13	HB13	S. 4,12:i:-	+/+	1/S	1/S	8/S	0.008/S	0.5/S	8/S	≥32/R
14	HB14	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.25/S	32/R	≥128/R	≥32/R
15	HB15	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	128/R	64/R	0.25/S	≥64/R	≥128/R	0.5/S

ตารางผนวกที่ ง1 (ต่อ)

No.	Lab no.	serovar	S.T/DT104	AMP	CFP	CHL	CIP	GEN	NAL	SXT
16	HB16	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	64/R	0.015/S	32/R	8/S	≥32/R
17	HB17	S. 4,12:i:-	+/+	1/S	1/S	8/S	0.25/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
18	HB18	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.015/S	32/R	8/S	≥32/R
19	HB19	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.5/S	2/S	≥128/R	0.25/S
20	HB21	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	32/R	0.063/S	64/R	8/S	≥32/R
21	HB22	S. 4,5,12:i:-	+/+	4/S	8/S	8/S	0.031/S	64/R	8/S	≥32/R
22	HB23	S. 1,4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	1/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
23	HB24	S. 4,5,12:i:-	+/-	8/S	16/S	8/S	0.031/S	2/S	8/S	0.063/S
24	HB25	S. 4,5,12:i:-	+/-	4/S	4/S	8/S	0.031/S	2/S	4/S	0.125/S
25	HB26	S. 4,12:i:-	+/-	4/S	4/S	8/S	0.031/S	2/S	4/S	0.063/S
26	HB27	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.031/S	64/R	4/S	≥32/R
27	HP1	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	128/R	128/R	0.031/S	≥64/R	8/S	≥32/R
28	HP2	S. 4,12:i:-	+/-	1/S	1/S	16/I	0.031/S	2/S	4/S	0.25/S
29	HP3	S. 4,5,12:i:-	+/+	1/S	0.5/S	8/S	0.015/S	2/S	8/S	0.5/S
30	HP4	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.31/S	64/R	4/S	≥32/R

ตารางผนวกที่ ง1 (ต่อ)

No.	Lab no.	serovar	S.T/DT104	AMP	CFP	CHL	CIP	GEN	NAL	SXT
31	HP5	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	16/I	0.5/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
32	HRS2	S. ,5,12:i:-	+/+	2/S	1/S	8/S	0.25/S	2/S	≥128/R	≥32/R
33	HRS3	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	8/S	8/S	0.25/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
34	HRS4	S. 4,12:i:-	+/+	0.063/S	≥128/R	64/R	0.031/S	≥64/R	32/R	≥32/R
35	HRS5	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	0.015/S	1/S	16/I	0.031/S	0.5/S	16/S	0.125/S
36	HRS6	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	0.063/S	16/S	64/R	0.125/S	32/R	≥128/R	≥32/R
37	HSR7	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	0.25/S	≥128/R	≥128/R	0.5/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
38	HRS8	S. 4,5,12:i:-	+/+	0.125/S	1/S	8/S	0.25/S	0.5/S	≥128/R	0.125/S
39	HRS9	S. 4,5,12:i:-	+/+	0.125/S	≥128/R	8/S	0.25/S	32/R	≥128/R	≥32/R
40	HRS10	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.25/S	64/R	≥128/R	≥32/R
41	HRS11	S. 1,4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.031/S	≥64/R	8/S	≥32/R
42	HRS12	S. 4,5,12:i:-	+/+	4/S	0.5/S	16/I	0.031/S	2/S	16/S	0.125/S
43	HRS13	S. 4,5,12:i:-	+/-	≥128/R	16/S	16/I	0.015/S	1/S	4/S	≥32/R
44	HRS14	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.015/S	2/S	4/S	≥32/R
45	HS1	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	≥128/R	2/I	≥64/R	≥128/R	≥32/R

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

No.	Lab no.	serovar	S.T/DT104	AMP	CFP	CHL	CIP	GEN	NAL	SXT
46	HS2	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	≥128/R	2/I	64/R	≥128/R	≥32/R
47	HS3	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	2/I	≥64/R	≥128/R	≥32/R
48	HS4	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	≥128/R	2/I	≥64/R	≥128/R	≥32/R
49	HS5	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	16/I	2/I	≥64/R	≥128/R	≥32/R
50	HS6	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	64/R	0.125/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
51	HS7	S. 1,4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	≥128/R	1/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
52	HS8	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	≥128/R	1/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
53	HS9	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	128/R	128/R	0.063/S	64/R	8/S	0.25/S
54	HS10	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.063/S	≥64/R	8/S	0.25/S
55	HS11	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	0.5/S	64/R	0.063/S	2/S	16/S	≥32/R
56	HS12	S. 4,5,12:i:-	+/+	2/S	≥128/R	128/R	0.063/S	2/S	4/S	≥32/R
57	HS13	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	1/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
58	HS14	S. 1,4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	64/R	0.031/S	32/R	8/S	≥32/R
59	HS15	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	16/S	8/S	1/S	64/R	≥128/R	≥32/R
60	HS16	S. 4,12:i:-	+/+	32/R	1/S	4/S	0.25/S	2/S	≥128/R	≥32/R



ตารางผนวกที่ ง1 (ต่อ)

No.	Lab no.	serovar	S.T/DT104	AMP	CFP	CHL	CIP	GEN	NAL	SXT
61	HS17	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.015/S	64/R	4/S	≥32/R
62	HS18	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	≥128/R	0.5/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
63	HS19	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.125/S	64/R	≥128/R	≥32/R
64	HS20	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	4/S	0.015/S	2/S	8/S	≥32/R
65	HS21	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	64/R	2/I	≥64/R	32/R	≥32/R
66	HS22	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	≥128/R	1/S	≥64/R	16/S	2/S
67	HS23	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	16/I	0.25/S	64/R	≥128/R	≥32/R
68	HS24	S. 1,4,12:i:-	+/+	≥128/R	128/R	32/R	0.015/S	2/S	8/S	0.25/S
69	HS25	S. 1,4,5,12:i:-	+/-	≥128/R	≥128/R	16/I	0.25/S	2/S	≥128/R	≥32/R
70	HS26	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	16/I	0.5/S	64/R	≥128/R	32/R
71	HS27	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.25/S	2/S	≥128/R	≥32/R
72	HS28	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	1/S	2/S	≥128/R	≥32/R
73	HS29	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	128/R	8/S	0.25/S	2/S	≥128/R	≥32/R
74	HS30	S. 4,5,12:i:-	+/-	≥128/R	≥128/R	8/S	1/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
75	HS31	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.015/S	2/S	8/S	≥32/R

ตารางผนวกที่ ๑ (ต่อ)

No.	Lab no.	serovar	S.T/DT104	AMP	CFP	CHL	CIP	GEN	NAL	SXT
76	HS32	S. 4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.25/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
77	HU1	S. 1,4,5,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	8/S	0.015/S	2/S	4/S	≥32/R
78	HU2	S. 4,12:i:-	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.031/S	≥64/R	4/S	≥32/R
79	HU3	S. 1,4,12:i:-	+/+	8/S	2/S	64/R	0.063/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R

หมายเหตุ AMP, ampicillin; CFP, cefoperazone; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid;

SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; S.T, *S. Typhimurium*; DT104, phage type DT104

ชื่อที่ระบุที่มาของตัวอย่าง คือ H, human; B, blood; P, pus; RS, rectal swab; S, stool; U, urine;

ตารางผนวกที่ ๒ การตรวจซีโรวาร์ *S. Typhimurium* DT 104 และรูปแบบการดื้อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากฟาร์มสุกร

No.	Lab.No	serovar	S.T/DT104	AMP	CFP	CHL	CIP	GEN	NA	SXT
1	NF1	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	≥128/R	32/R	0.25/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
2	NF2	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	≥128/R	16/I	0.125/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
3	NF3	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	64/R	32/R	0.25/S	64/R	≥128/R	≥32/R
4	FF1	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	32/R	64/R	0.25/S	64/R	≥128/R	≥32/R
5	FF2	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	128/R	32/R	0.125/S	64/R	≥128/R	≥32/R
6	FF3	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	≥128/R	32/R	0.125/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R
7	SF1	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	128/R	64/R	0.5/S	64/R	≥128/R	≥32/R
8	F1	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	≥128/R	64/R	0.125/S	64/R	≥128/R	≥32/R
9	F2	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.125/S	64/R	≥128/R	≥32/R
10	W1	S. I. 4,5,12 : i: -	+/+	≥128/R	≥128/R	128/R	0.25/S	≥64/R	≥128/R	≥32/R

หมายเหตุ AMP, ampicillin; CFP, cefoperazone; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid;

SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; S.T, *S. Typhimurium*; DT104, phage type DT104

ชื่อที่ระบุที่มาของตัวอย่าง คือ NF, nursing feces; FF, fattening feces; SF, sucking feces; F, feed; W, water

**ตารางผนวกที่ 3** การตรวจคัดกรอง (screening test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test ของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วย

No.	Lab.No	ค่าโซนใส (mm)			
		CTX ( $\leq 27$ ) <sup>a</sup>	CAZ ( $\leq 22$ )	CRO ( $\leq 25$ )	ATM ( $\leq 27$ )
1	HB1	25.0 (+)	22.0 (+)	26.0 (-)	25.0 (+)
2	HB2	31.5 (-)	29.0 (-)	31.0 (-)	31.0 (-)
3	HB3	27.0 (+)	24.3 (-)	25.0 (+)	26.5 (+)
4	HB4	26.5 (+)	24.0 (-)	27.0 (-)	26.0 (+)
5	HB5	27.5 (-)	24.5 (-)	26.0 (-)	26.4 (+)
6	HB6	30.0 (-)	27.5 (-)	28.5 (-)	29.0 (-)
7	HB7	27.0 (+)	24.0 (-)	25.5 (-)	27.0 (+)
8	HB8	27.5 (-)	25.0 (-)	25.0 (+)	28.0 (-)
9	HB9	27.0 (+)	23.3 (-)	27.0 (-)	26.5 (+)
10	HB10	25.0 (+)	22.0 (+)	25.0 (+)	26.0 (+)
11	HB11	25.0 (+)	23.0 (-)	25.0 (+)	25.0 (+)
12	HB12	27.0 (+)	24.0 (-)	26.5 (-)	28.5 (-)
13	HB13	28.0 (-)	23.5 (-)	27.5 (-)	27.0 (+)
14	HB14	27.0 (+)	22.0 (+)	24.0 (+)	28.0 (-)
15	HB15	29.0 (-)	25.0 (-)	29.0 (-)	24.5 (+)
16	HB16	23.0 (+)	26.0 (-)	27.0 (-)	24.5 (+)
17	HB17	25.5 (+)	30.0 (-)	28.0 (-)	31.5 (-)
18	HB18	25.0 (+)	28.5 (-)	26.0 (-)	26.5 (+)
19	HB19	24.0 (+)	26.0 (-)	28.0 (-)	26.0 (+)
20	HB21	25.0 (+)	28.0 (-)	26.0 (-)	28.0 (-)
21	HB22	26.0 (+)	29.5 (-)	28.0 (-)	28.5 (-)
22	HB23	24.0 (+)	27.0 (-)	26.0 (-)	26.5 (+)
23	HB24	25.0 (+)	28.0 (-)	28.0 (-)	29.0 (-)
24	HB25	24.0 (+)	28.5 (-)	26.0 (-)	27.5 (-)
25	HB26	26.0 (+)	29.5 (-)	27.5 (-)	28.0 (-)

## ตารางผนวกที่ 33 (ต่อ)

No.	Lab.No	ค่าไซนัส (mm)			
		CTX ( $\leq 27$ ) <sup>a</sup>	CAZ ( $\leq 22$ )	CRO ( $\leq 25$ )	ATM ( $\leq 27$ )
26	HB27	23.0 (+)	26.0 (-)	27.0 (-)	25.0 (+)
27	HP1	25.0 (+)	27.2 (-)	26.5 (-)	26.0 (+)
28	HP2	23.8 (+)	26.7 (-)	26.0 (-)	25.0 (+)
29	HP3	24.0 (+)	28.0 (-)	27.0 (-)	25.6 (+)
30	HP4	26.5 (+)	27.6 (-)	28.0 (-)	27.8 (-)
31	HP5	23.0 (+)	27.5 (-)	26.5 (-)	27.0 (+)
32	HRS2	24.4 (+)	27.5 (-)	26.0 (-)	27.0 (+)
33	HRS3	24.1 (+)	27.4 (-)	29.0 (-)	26.5 (+)
34	HRS4	24.0 (+)	27.0 (-)	27.5 (-)	26.0 (+)
35	HRS5	22.0 (+)	25.0 (-)	24.5 (+)	24.5 (+)
36	HRS6	25.0 (+)	27.6 (-)	27.3 (-)	26.5 (+)
37	HSR7	22.2 (+)	26.0 (-)	27.5 (-)	26.4 (+)
38	HRS8	26.0 (+)	28.5 (-)	28.4 (-)	29.0 (-)
39	HRS9	25.5 (+)	29.0 (-)	29.5 (-)	28.2 (-)
40	HRS10	25.1 (+)	29.4 (-)	27.2 (-)	28.8 (-)
41	HRS11	25.0 (+)	27.2 (-)	27.4 (-)	26.8 (+)
42	HRS12	24.0 (+)	27.2 (-)	26.0 (-)	24.2 (+)
43	HRS13	23.5 (+)	27.0 (-)	27.0 (-)	25.0 (+)
44	HRS14	23.3 (+)	27.0 (-)	26.0 (-)	26.5 (+)
45	HS1	26.0 (+)	29.0 (-)	29.5 (-)	30.0 (-)
46	HS2	22.5 (+)	26.0 (-)	26.5 (-)	28.0 (-)
47	HS3	25.0 (+)	28.0 (-)	26.5 (-)	26.5 (+)
48	HS4	23.0 (+)	27.0 (-)	27.0 (-)	27.2 (-)
49	HS5	21.0 (+)	24.5 (-)	27.0 (-)	27.5 (-)
50	HS6	25.0 (+)	27.0 (-)	29.0 (-)	28.5 (-)
51	HS7	20.5 (+)	23.0 (-)	25.5 (-)	25.0 (+)

## ตารางผนวกที่ 33 (ต่อ)

No.	Lab.No	ค่าไซนัส (mm)			
		CTX ( $\leq 27$ ) <sup>a</sup>	CAZ ( $\leq 22$ )	CRO ( $\leq 25$ )	ATM ( $\leq 27$ )
52	HS8	22.0 (+)	26.0 (-)	26.5 (-)	25.4 (+)
53	HS9	23.5 (+)	26.5 (-)	27.0 (-)	26.0 (+)
54	HS10	22.0 (+)	10.0 (+)	9.0 (+)	20.0 (+)
55	HS11	23.5 (+)	25.0 (-)	26.0 (-)	27.0 (+)
56	HS12	25.5 (+)	29.0 (-)	28.0 (-)	28.0 (-)
57	HS13	23.0 (+)	25.5 (-)	26.5 (-)	24.0 (+)
58	HS14	22.5 (+)	26.0 (-)	24.0 (+)	25.0 (+)
59	HS15	23.5 (+)	28.0 (-)	25.5 (-)	26.4 (+)
60	HS16	27.5 (-)	27.0 (-)	29.5 (-)	29.0 (-)
61	HS17	25.5 (+)	28.0 (-)	27.6 (-)	28.0 (-)
62	HS18	20.5 (+)	24.0 (-)	25.0 (+)	25.0 (+)
63	HS19	24.0 (+)	27.4 (-)	28.0 (-)	27.0 (+)
64	HS20	24.0 (+)	27.5 (-)	27.0 (-)	26.5 (+)
65	HS21	20.0 (+)	11.0 (+)	9.5 (+)	12.0 (+)
66	HS22	11.4 (+)	8.7 (+)	7.4 (+)	13.0 (+)
67	HS23	22.0 (+)	24.4 (-)	24.0 (+)	23.0 (+)
68	HS24	23.5 (+)	25.0 (-)	24.0 (+)	25.0 (+)
69	HS25	22.6 (+)	27.0 (-)	26.0 (-)	29.0 (-)
70	HS26	22.0 (+)	25.0 (-)	26.0 (-)	24.0 (+)
71	HS27	22.0 (+)	26.0 (-)	25.0 (+)	27.0 (+)
72	HS28	25.0 (+)	27.0 (-)	27.0 (-)	27.5 (-)
73	HS29	21.5 (+)	26.0 (-)	25.0 (+)	24.5 (+)
74	HS30	23.3 (+)	26.5 (-)	26.5 (-)	26.6 (+)
75	HS31	23.6 (+)	29.0 (-)	26.0 (-)	27.2 (-)
76	HS32	26.0 (+)	29.5 (-)	27.0 (-)	26.5 (+)
77	HU1	24.5 (+)	27.6 (-)	26.3 (-)	26.3 (+)

## ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

No.	Lab.No	ค่าโซนใส (mm)			
		CTX ( $\leq 27$ ) <sup>a</sup>	CAZ ( $\leq 22$ )	CRO ( $\leq 25$ )	ATM ( $\leq 27$ )
78	HU2	23.5 (+)	26.4 (-)	26.0 (-)	24.8 (+)
79	HU3	25.5 (+)	29.0 (-)	28.5 (-)	30.0 (-)
	<i>E.coli</i> ATCC 25922	29.9 (-)	26 (-)	28.0 (-)	28.0 (-)
	<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	18.0 (+)	13.0 (+)	17.0 (+)	11.4 (+)
	รวม(%)	72 (91.14)	6 (7.59)	15 (18.99)	52 (65.82)

หมายเหตุ CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; ATM, aztreonam

ชื่อที่ระบุที่มาของตัวอย่าง คือ H, human; B, blood; P, pus; RS, rectal swab; S, stool;  
U, urine

<sup>a</sup>ค่า breakpoint ของการตรวจคัดกรอง (screening test) หาเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test (CLSI, 2007)

สัญลักษณ์ +, ให้ผลบวกต่อการทดสอบ; -, ให้ผลลบต่อการทดสอบ

ตารางผนวกที่ 4 การตรวจคัดกรอง (screening test) หาเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test ของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากฟาร์มสุกร

No.	Lab.No	ค่าโซนใส (mm)			
		CTX ( $\leq 27$ ) <sup>a</sup>	CAZ ( $\leq 22$ )	CRO ( $\leq 25$ )	ATM ( $\leq 27$ )
1	NF1	26.3 (+)	23.0 (-)	28.0 (-)	26.0 (+)
2	NF2	23.4 (+)	22.0 (+)	24.5 (+)	22.5 (+)
3	NF3	28.0 (-)	26.2 (-)	28.5 (-)	25.0 (+)
4	FF1	27.3 (-)	23.6 (-)	27.6 (-)	27.5 (-)
5	FF2	26.7 (+)	23.6 (-)	26.5 (-)	25.5 (+)
6	FF3	26.3 (+)	23.4 (-)	25.0 (+)	27.0 (+)
7	SF1	26.5 (+)	23.5 (-)	26.0 (-)	27.4 (-)
8	F1	24.5 (+)	23.2 (-)	24.5 (+)	27.0 (+)
9	F2	23.4 (+)	21.3 (+)	23.5 (+)	20.3 (+)
10	W1	29.0 (-)	28.5 (-)	30.0 (-)	29.5 (-)
	<i>E.coli</i> ATCC 25922	29.9 (-)	26 (-)	28.0 (-)	28.0 (-)
	<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	18.0 (+)	13.0 (+)	17.0 (+)	11.4 (+)
	รวม(%)	7 (70.0)	2 (20.0)	4 (40.0)	7 (70.0)

หมายเหตุ CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; ATM, aztreonam

ชื่อที่ระบุที่มาของตัวอย่าง คือ NF, nursing feces; FF, fattening feces; SF, sucking feces; F, feed; W, water

<sup>a</sup>ค่า breakpoint ของการตรวจคัดกรอง (screening test) หา ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test (CLSI, 2007)



ตารางผนวกที่ ๓๕ การตรวจยืนยัน (confirmatory test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test ของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากผู้ป่วย

No.	Lab.No	double disk test			
		CTX	CAZ	CRO	ATM
1	HB1	-	-	-	-
2	HB2	-	-	-	-
3	HB3	-	-	-	-
4	HB4	-	-	-	-
5	HB5	-	-	-	-
6	HB6	-	-	-	-
7	HB7	-	-	-	-
8	HB8	-	-	-	-
9	HB9	-	-	-	-
10	HB10	-	-	-	-
11	HB11	-	-	-	-
12	HB12	-	-	-	-
13	HB13	-	-	-	-
14	HB14	-	-	-	-
15	HB15	-	-	-	-
16	HB16	-	-	-	-
17	HB17	-	-	-	-
18	HB18	-	-	-	-
19	HB19	-	-	-	-
20	HB21	-	-	-	-
21	HB22	-	-	-	-
22	HB23	-	-	-	-
23	HB24	-	-	-	-
24	HB25	-	-	-	-
25	HB26	-	-	-	-

## ตารางผนวกที่ ๓๕ (ต่อ)

No.	Lab.No	double disk test			
		CTX	CAZ	CRO	ATM
26	HB27	-	-	-	-
27	HP1	-	-	-	-
28	HP2	-	-	-	-
29	HP3	-	-	-	-
30	HP4	-	-	-	-
31	HP5	-	-	-	-
32	HRS2	-	-	-	-
33	HRS3	-	-	-	-
34	HRS4	-	-	-	-
35	HRS5	-	-	-	-
36	HRS6	-	-	-	-
37	HSR7	-	-	-	-
38	HRS8	-	-	-	-
39	HRS9	-	-	-	-
40	HRS10	-	-	-	-
41	HRS11	-	-	-	-
42	HRS12	-	-	-	-
43	HRS13	-	-	-	-
44	HRS14	-	-	-	-
45	HS1	-	-	-	-
46	HS2	-	-	-	-
47	HS3	-	-	-	-
48	HS4	-	-	-	-
49	HS5	-	-	-	-
50	HS6	-	-	-	-
51	HS7	-	-	-	-

## ตารางผนวกที่ ๓๕ (ต่อ)

No.	Lab.No	double disk test			
		CTX	CAZ	CRO	ATM
52	HS8	-	-	-	-
53	HS9	-	-	-	-
54	HS10	+	+	+	+
55	HS11	-	-	-	-
56	HS12	-	-	-	-
57	HS13	-	-	-	-
58	HS14	-	-	-	-
59	HS15	-	-	-	-
60	HS16	-	-	-	-
61	HS17	-	-	-	-
62	HS18	-	-	-	-
63	HS19	-	-	-	-
64	HS20	-	-	-	-
65	HS21	+	+	+	+
66	HS22	+	+	+	+
67	HS23	-	-	-	-
68	HS24	-	-	-	-
69	HS25	-	-	-	-
70	HS26	-	-	-	-
71	HS27	-	-	-	-
72	HS28	-	-	-	-
73	HS29	-	-	-	-
74	HS30	-	-	-	-
75	HS31	-	-	-	-
76	HS32	-	-	-	-
77	HU1	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ๖ (ต่อ)

No.	Lab.No	double disk test			
		CTX	CAZ	CRO	ATM
78	HU2	-	-	-	-
79	HU3	-	-	-	-
	<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
	<i>K.pneumoniae</i>				
	ATCC 700603	+	+	+	+
	รวมตัวอย่าง	3	3	3	3

หมายเหตุ CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; ATM, aztreonam  
 ชื่อที่ระบุที่มาของตัวอย่างคือ H, human; B, blood; RS, rectal swab; S, stool  
 สัญลักษณ์ +, ให้ผลบวกต่อการทดสอบ; -, ให้ผลลบต่อการทดสอบ

ตารางผนวกที่ ๓6 การตรวจยืนยัน (confirmatory test) การผลิตเอ็นไซม์ ESBLs ด้วยวิธี double disk test ของเชื้อ *S. enterica* serovar 1, 4, [5], 12: i: - ที่แยกจากฟาร์มสุกร

No.	Lab.No	double disk test			
		CTX	CAZ	CRO	ATM
1	NF1	-	-	-	-
2	NF2	-	-	-	-
3	NF3	-	-	-	-
4	FF2	-	-	-	-
5	FF3	-	-	-	-
6	SF1	-	-	-	-
7	F1	-	-	-	-
8	F2	-	-	-	-
<i>E.coli</i> ATCC 25922		-	-	-	-
<i>K.pneumoniae</i>					
ATCC 700603		+	+	+	+
รวมตัวอย่าง		0	0	0	0

หมายเหตุ CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; ATM, aztreonam

ชื่อที่ระบุที่มาของตัวอย่างคือ NF, nursing feces; FF, fattening feces; SF, sucking feces;

F, feed; W, water

สัญลักษณ์ +, ให้ผลบวกต่อการทดสอบ; -, ให้ผลลบต่อการทดสอบ

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายการ์นต์ ชีพนุรัตน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	11 พฤษภาคม 2513
สถานที่เกิด	ตำบลจุมพล อำเภอโพธิ์ชัย จังหวัดหนองคาย
ประวัติการศึกษา	สพ. บ. (สัตวแพทยศาสตร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	หัวหน้าสาขา วิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี ราชมงคลธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีการศึกษา 2551