รางวัลรองชนะเลิศ ลำดับที่ 1 การประกวดบทความ กลุ่มวิทยาศาสตร์สุขภาพ

อุบัติการณ์และคุณสมบัติของเชื้อเอสเชอริเชียโคไลดื้อยาหลายขนานในเนื้อสัตว์ปีก

อรรถพล ตันไสว และพรรณนิกา ฤตวิรุฬห์*

Occurrence and Characteristics of Multidrug Resistant *Escherichia coli* in Poultry Meat Products

Uttapoln Tansawai and Pannika Ritvirool*

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก
Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand
* Corresponding author. E-mail address: pannikan@nu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาบทบาทของเนื้อสัตว์ปีกในการเป็นแหล่งของแบคทีเรียดื้อยา โดยเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก (เนื้อไก่และเนื้อเป็ด) ที่ขายในซูเปอร์มาร์เกตในเขตจังหวัดพิษณุโลก จำนวน 103 ตัวอย่าง มาทำการแยกเชื้อ *Escherichia coli* ที่ลดความไวต่อยา cephalosporin รุ่น 3 โดยการนำตัวอย่างเนื้อสัตว์มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมยา cefotaxime (เลือก 1 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง) ในการศึกษานี้พบเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างเนื้อสัตว์จำนวน 65 ตัวอย่าง (ร้อยละ 63) การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการดื้อยาหลายขนาน และพบเชื้อจำนวน 18 ไอโซเลท (ร้อยละ 28) ลดความไวต่อยาที่มีประสิทธิภาพสูง คือ imipenem นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) ถึงร้อยละ 69 การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้าง ESBL 2 ชนิด คือ bla_{TEM} และ bla_{SHV} โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) พบ ยีน bla_{TEM} และ bla_{SHV} ในเชื้อจำนวน 27 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากเนื้อไก่ทั้งหมด ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาหลายขนาน รวมทั้งเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBLในเนื้อสัตว์ปีก ซึ่งอาจถ่ายทอดสู่คนได้โดยการบริโภคและส่งผลถึงสุขภาพของประชาชนต่อไป

คำสำคัญ: เอสเชอริเชียโคไล การดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน อีเอสบีแอล สัตว์ปีก

Abstract

The potential role of poultry meat products as a possible reservoir for resistant bacteria was assessed. In this study, 103 poultry meat samples (chicken and duck) obtained from supermarkets in Phitsanulok province were investigated for the presence of antimicrobial resistant *Escherichia coli*. Samples were inoculated onto cefotaxime-containing media for isolation of *E. coli* with reduced susceptibility to broad spectrum cephalosporin (one isolate/sample). *E. coli* isolates were detected in 65 (63%) of the poultry meat samples. Antimicrobial susceptibility testing showed that the majority of isolates were classified as multidrug resistant *E. coli*. Reduced susceptibility to imipenem, the high efficacy antibiotic, was found in 18 isolates (28%). Interestingly, a high rate of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing *E. coli* (69%) was detected. The presence of ESBL-encoding genes (bla_{TEM} and bla_{SHV}) was investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR). bla_{TEM} and bla_{SHV} genes were found 27 and 1 *E. coli* isolates, respectively, all from chicken meat. These results pose a serious health concern as contamination of poultry meat products by Multidrug resistant *E. coli* (MDR *E. coli*), especially the ESBL-producing isolate, may contribute to the transmission of resistant bacteria from food to humans.

Keywords: *Escherichia coli*, multidrug resistance, ESBL

บทนำ

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียจัดเป็นปัญหาที่สำคัญมากในทางการแพทย์และสาธารณสุข โรคที่เกิดจากเชื้อดื้อยาจัดเป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่เป็นอันตรายร้ายแรง ผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยาจะมีค่าใช้จ่ายในการรักษาและอัตราการตายสูง ปัจจุบันเชื้อดื้อยาไม่ได้พบเฉพาะในโรงพยาบาลเท่านั้น แต่พบมากในสัตว์เช่นกัน และเชื้อดื้อยานี้สามารถติดต่อจากสัตว์สู่สัตว์หรือสัตว์สู่คนได้ เนื่องจากเชื้อดื้อยาหลายชนิดมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงจัดว่าเชื้อดื้อยาในสัตว์มีผลกระทบต่อสุขภาพของคนเป็นอย่างมาก (Seiffert, Hilty, Perreten, & Endimiani, 2013, pp. 22-45)

เชื้อดื้อยาพบได้ในสัตว์หลายชนิดทั้งสัตว์เศรษฐกิจและสัตว์เลี้ยง โดยเชื้อดื้อยาในสัตว์ที่มีรายงานกันมากนั้นเป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ในการวิจัยนี้จะเน้นการศึกษาในเชื้อ *Escherichia coli* เนื่องจากเชื้อนี้พบมากในสิ่งแวดล้อม เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อทั้งในคนและสัตว์หลายชนิด มีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่กับที่พบในผู้ป่วยมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียระหว่างสัตว์และคนเกิดขึ้น (Johnson, et al., 2006, pp. 71-78; Leverstein-van Hall, et al., 2011, pp. 873-880) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าเชื้อ *E. coli* มีการดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistant *E. coli*, MDR *E. coli*) มากขึ้น ปัจจุบันการดื้อยาที่ได้รับความสนใจกันมาก ได้แก่ การดื้อยา cephalosporin รุ่น 3 เช่น cefotaxime และ ceftazidime ซึ่งกลไกการดื้อยาที่สำคัญ คือ การที่เชื้อสร้างเอนไซม์ Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) ออกมาทำลายยา (Seiffert, et al., 2013, pp. 22-45) โดยเอนไซม์ ESBL นี้มีขอบข่ายในการออกฤทธิ์กว้าง สามารถทำลายยา beta-lactam ได้หลายชนิด ทำให้เกิดปัญหาในการรักษาในกรณีที่คนได้รับเชื้อที่สามารถสร้าง ESBL ได้ ปัจจุบัน ESBL ส่วนใหญ่เป็น derivatives ของ narrow-spectrum TEM- และ SHV-type beta-lactamase โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนใน ESBL รอบๆบริเวณ active site ทำให้เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายยา beta-lactam ชนิดใหม่ๆได้หลายชนิด ยีนที่กำหนดการสร้าง ESBL นั้นมักจะอยู่บน self-transmissible plasmid และเป็น plasmid ที่กำกับการดื้อยาหลายชนิด ทำให้การแพร่กระจายของ ESBL เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ปัจจุบันมีรายงานของ ESBLs ที่พบใน Enterobacteriaceae ที่แตกต่างกันหลายร้อยชนิด (www.lahey.org/Studies)

การปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาหลายขนานที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเนื้อสัตว์ มีรายงานจากหลายประเทศทั้งในทวีปยุโรป อเมริกา และแอฟริกา ซึ่งจะมีอัตราการพบ MDR *E. coli* และ ESBL-producing *E. coli* แตกต่างกัน โดยมีรายงานตั้งแต่ไม่พบเชื้อดื้อยาเลย (Tham, Walder, Melander, & Odenholt, 2012, pp. 143-147; Geser, Stephan, & Hächler, 2012, p. 21) พบน้อยมาก (Jensen, Hasman, Agersø, Emborg, & Aarestrup, 2006, pp. 793-794) หรือพบมากถึงร้อยละ 90 (Egea, et al., 2012, pp. 69-73) สำหรับในประเทศไทยก็มีรายงานการศึกษาเชื้อดื้อยาในเนื้อสัตว์เช่นเดียวกัน แต่ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Campylobacter* spp. โดยพบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีการดื้อต่อยาหลายขนาน (Chaisatit, Tribuddharat, Pulsrikarn, & Dejsirilert, 2012, pp. 527-534; Chokboonmongkol, Patchanee, Gölz, Zessin, & Alter, 2013, 462-467) ยังพบว่าอัตราการพบเชื้อดื้อยาในเนื้อสัตว์ที่ขายตามท้องตลาดนั้นสูงกว่าที่พบในฟาร์มมาก (Padungtod, & Kaneene, 2006, pp. 346-354) จะเห็นได้ว่าการศึกษาในเรื่องการปนเปื้อนดื้อยาโดยเฉพาะเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ในเนื้อสัตว์ในประเทศไทยยังมีจำกัด ในขณะที่เนื้อสัตว์หลายชนิดจัดว่าเป็นแหล่งของเชื้อดื้อยาที่สำคัญ ปัจจุบันมีข้อมูลทางวิชาการที่ชี้ชัดว่าสัตว์ปีก โดยเฉพาะไก่และเป็ด จัดเป็นสัตว์ที่พบเชื้อดื้อยารวมทั้ง ESBL-producing *E. coli* มากกว่าสัตว์ชนิดอื่น (Li, et al., 2010, pp. 1387-1392; Ma, et al., 2012, pp. 3668-3673) และยังพบว่าสัตว์ปีกมีอัตราการปล่อยเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมมากที่สุด (Horton, et al., 2011, pp. 3715-3719) การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอุบัติการณ์และคุณสมบัติด้านการดื้อยาของเชื้อ MDR *E. coli* ในเนื้อสัตว์ปีกที่ขายในซูเปอร์มาร์เกต

ในเขตจังหวัดพิษณุโลก ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีกและการแยกเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime

เก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก (ไก่ และเป็ด) ที่ขายตามซูเปอร์มาร์เกตในเขตจังหวัดพิษณุโลก จำนวน 103 ตัวอย่าง ในขั้นตอนแรกนำตัวอย่างเนื้อสัตว์ 25 g ใส่ใน Buffer Peptone Water 225 ml ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Stomacher (Stomacher 400 Lab blender, Seward, London, UK) จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 10 ml ใส่ลงใน EE broth 90 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue agar (EMB) ที่มีการเติมยา cefotaxime ความเข้มข้น 2 mg/L บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ (metallic sheen) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *E. coli* มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar โดยเลือก 1 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป RapID™ system (Remel Products, Thermo Fischer Scientific, KS, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การตรวจหาความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility testing)

ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆด้วยวิธี Disk diffusion test โดยเตรียมความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 (1.5×10^8 cfu/ml) จากนั้นทำการ swab เชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar แล้ววาง antibiotic disk (Oxoid, Basingstoke, UK) ลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดของ inhibition zone จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานที่กำหนดไว้โดย Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) รายงานผลความไวต่อยา 3 ระดับ คือ ไวต่อยา (susceptible) ไวต่อยาระดับกลาง (intermediate) และดื้อยา (resistant)

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ ESBL จะใช้วิธี Combination disk method ตามวิธีการของ CLSI โดยทำ Disk diffusion test ตามวิธีการข้างต้น แต่เป็นการศึกษาเปรียบเทียบ inhibition zone ของแผ่นยา cefotaxime (30 µg) กับ cefotaxime+clavulanic acid (30+10 µg) และ ceftazidime (30 µg) กับ ceftazidime +clavulanic acid (30 +10 µg) (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) วิธีการอ่านผล คือ ถ้า inhibition zone ของแผ่นยาที่มี clavulanic acid กว้างกว่าแผ่นยาที่ไม่มี clavulanic acid มากกว่าหรือเท่ากับ 5 mm อ่านว่าผลบวก แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยใช้ *E. coli* DMST 4212 เป็นตัวควบคุมผลลบและใช้เชื้อ ESBL-producing *E. coli* (Niumsup, Tansawai, Boonkerd, Polwichai, & Dejsirilert, 2008, pp. 404-408) เป็นตัวควบคุมผลบวก

การตรวจหา ESBL-encoding genes (bla_{TEM} และ bla_{SHV}) โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBL จากการทดสอบโดยวิธี Combination disk method จะนำมาตรวจหายีน bla_{TEM} และ bla_{SHV} โดยวิธี PCR ซึ่ง template นั้นเตรียมได้โดยใช้โคโลนีของเชื้อผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ส่วน primers ที่ใช้และขนาดของ PCR product แสดงไว้ดังตารางที่ 1 ปฏิกิริยาของการทำ PCR ประกอบด้วย template 1 µl, 10 µM forward primer, 10 µM reverse primer, 200 µM dNTPs, 1.5 µM $MgCl_2$, 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Selangor, Malaysia), 1x amplification buffer และ sterile deionized water ปรับปริมาตรรวม 25 µl สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR คือ 94°C 5 นาที 1 รอบ, 94°C 45 วินาที, 42°C (bla_{SHV}=56°C) 45 วินาที, 72°C 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72°C 7 นาที 1 รอบ ตรวจผลการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 1 แสดง primers ที่ใช้ในการตรวจหา bla_{TEM} และ bla_{SHV}

Primers	Sequences (5′⟶ 3′)	Expected PCR Product (bp)	References
TEM-F	ATAAAATTCTTGAAGAC	1,076	Mabilat, & Goussard, 1995, pp. 553-557
TEM-R	TTACCAATGCTTAATCA		
SHV-F	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	930	Rasheed, et al., 1997, pp. 647-653
SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC		

ผลการศึกษา

การเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีกและการแยกเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime

จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีกที่วางขายในซูเปอร์มาร์เกตในเขตจังหวัดพิษณุโลกทั้งหมด 103 ตัวอย่าง (เนื้อไก่ 92 ตัวอย่าง และเป็ด 11 ตัวอย่าง) พบเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime จำนวน 65 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 63 โดยเป็นตัวอย่างเนื้อไก่ 61 ตัวอย่าง และ เป็ด 4 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงผลการแยกเชื้อ การทดสอบการสร้าง ESBL และการตรวจหา ESBL-encoding gene จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนตัวอย่างที่พบ *E. coli*	จำนวนตัวอย่างที่พบ ESBL-producing *E. coli*	จำนวนตัวอย่างที่พบ ESBL-encoding gene	
				bla_{TEM}	bla_{SHV}
เนื้อไก่	92	61	41	27	0
เนื้อเป็ด	11	4	4	0	1
รวม	103	65	45	27	1

การศึกษาความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

การตรวจหาความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้งหมด 18 ชนิด แบ่งเป็นยาในกลุ่ม beta-lactam 8 ชนิด, aminoglycoside 3 ชนิด, tetracycline 2 ชนิด, quinolone 2 ชนิด และยาอื่น ๆ อีก 3 ชนิด ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 3 และ 4 โดยเชื้อทุกไอโซเลทดื้อต่อยา 6 ชนิด คือ ampicillin, cefuroxime, cefazolin, cefotaxime, cefpodoxime และ streptomycin เชื้อมากกว่าร้อยละ 50 ดื้อต่อยา ceftazidime, aztreonam, gentamicin, amikacin, tetracycline, doxycline, nalidixic acid และ ciprofloxacin นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจำนวน 18 ไอโซเลท ลดความไวต่อยา imipenem อย่างไรก็ตามเชื้อส่วนใหญ่ยังคงไวต่อยา fosfomycin

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime ต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactams โดยวิธี Disk diffusion test[1]

เชื้อ	beta-lactams							
	IPM	AMP	CXM	KZ	CTX	CPD	CAZ	ATM
E. coli (n=65)	65(100)	65(100)	65(100)	65(100)	65(100)	57(88)	60(92)	18(28)

Abbreviations: AMP, ampicillin; CXM, cefuroxime; KZ, cefazolin; CTX, cefotaxime; CPD, cefpodoxime; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam และ IPM, imipenem

[1]ตัวเลขแสดงจำนวนเชื้อ (ร้อยละ) ที่ลดความไวต่อยาปฏิชีวนะ (ให้ผลเป็น I หรือ R)

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime ต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม non beta-lactams โดยวิธี Disk diffusion test[1]

เชื้อ	aminoglycosides			tetracyclines		quinolones		others		
	CN	AK	S	TE	DO	NA	CIP	C	SXT	FOS
E. coli (n=65)	47(72)	47(72)	65(100)	49(75)	43(66)	37(57)	37(57)	16(25)	28(43)	2(3)

Abbreviations: CN, gentamicin; AK, amikacin; S, streptomycin; TE, tetracycline; DO, doxycycline; NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; C, chloramphenicol; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole และ FOS, fosfomycin

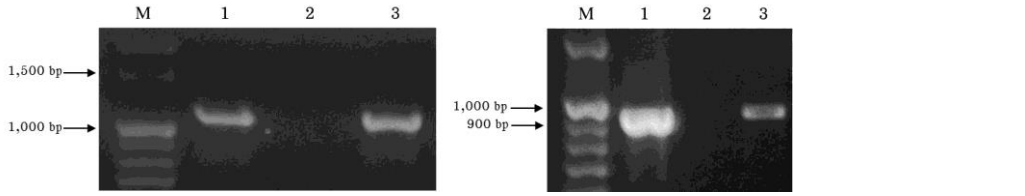
[1] ตัวเลขแสดงจำนวนเชื้อ (ร้อยละ) ที่ลดความไวต่อยาปฏิชีวนะ (ให้ผลเป็น I หรือ R)

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ ESBL

การสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime จำนวน 65 ไอโซเลท พบว่าให้ผลบวกจำนวน 45 ไอโซเลท (เนื้อไก่ 41 ตัวอย่าง และเป็ด 4 ตัวอย่าง) คิดเป็นร้อยละ 69 (ตารางที่ 2)

การตรวจหายีน bla_{TEM} และ bla_{SHV}

เชื้อ ESBL-producing *E. coli* จำนวน 45 ไอโซเลท ที่แยกได้จากเนื้อสัตว์ปีก มีการตรวจพบยีน bla_{TEM}และ bla_{SHV} จำนวน 27 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งเป็นตัวอย่างจากเนื้อไก่ทั้งหมด (รูปที่ 1 และตารางที่ 2)



รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจหา bla_{TEM} (a) และ bla_{SHV} (b) ในเชื้อ ESBL-producing *E. coli* โดยวิธี PCR บน 1% agarose gel electrophoresisใน 0.5x TBE buffer

(a) bla_{TEM} gene (1,076 bp) และ (b) bla_{SHV} gene (930 bp)

Lane M คือ 100 bp ladder DNA marker (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan)

Lanes 1-2 คือ positive control และ negative control สำหรับ bla_{TEM} และ bla_{SHV}

Lane 3 คือ PCR product ของเชื้อที่ให้ผลบวก

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาการแยกเชื้อ *E. coli* ที่ลดความไวต่อยา cefotaxime จากเนื้อสัตว์ปีกที่ขายในซูเปอร์มาร์เกตในเขตจังหวัดพิษณุโลกนั้นพบมากถึงร้อยละ 63 เมื่อนำเชื้อมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ทั้งหมดมีการดื้อยาหลายชนิด จัดเป็น MDR *E. coli* โดยเชื้อมีการดื้อต่อยาทั้งกลุ่ม beta-lactamsรวมทั้งยา cepharosporin รุ่น 3 (เช่น cefotaxime หรือ ceftazidime), aminoglycosides, tetracyclines และ quinolones ซึ่งยาปฏิชีวนะเหล่านี้จัดเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* สิ่งที่น่าสนใจ คือ พบว่ามีเชื้อถึง 18 ไอโซเลท ที่มีการลดความไวต่อยา imipenem โดยเชื้อที่แสดงผลเป็น I และ R มีจำนวน 10 และ 8 ไอโซเลท ตามลำดับ (results not shown) ซึ่งยา imipenem นั้นจัดเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูง การดื้อยาหลายขนานของเชื้อ MDR *E. coli* จึงเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ ส่งผลถึงอัตราการตายที่อาจจะเพิ่มสูงขึ้น ในประเทศไทยมีรายงานหลายฉบับที่ตรวจพบเชื้อ MDR *E. coli* จากผู้ป่วย (Kiratisin, et al., 2008, pp. 460-464; Niumsup, et al., 2008, pp. 404-408) แต่ข้อมูลเรื่องเชื้อ MDR *E. coli* จากเนื้อสัตว์ยังมีจำกัด มีรายงานการวิจัยแบคทีเรียดื้อยาจากเนื้อไก่ 200 ตัวอย่างในเขตกรุงเทพมหานคร พบ MDR *E. coli* เช่นกัน อย่างไรก็ดีเชื้อเหล่านี้ไวต่อยา cephalosporins รุ่น 3 และcarbapenem

(Chaisatit, et al., 2012, pp. 527-534)

อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้มีอัตราการพบ MDR *E. coli* ที่สูงกว่ามาก นอกจากนี้ยังพบ ESBL-producing *E. coli* ถึงร้อยละ 69 ซึ่งจัดว่าเป็นอัตราที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับหลาย ๆ ประเทศในทวีปยุโรป ซึ่งบางประเทศก็พบเชื้อ ESBL-producing *E. coli* ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ค่อนข้างน้อยหรือไม่มีเลย เช่น การศึกษาในเนื้อสัตว์จำนวน 732 ตัวอย่าง จากประเทศเดนมาร์ก พบ ESBL-producing *E. coli* เพียง 1 ตัวอย่าง (Jensen, et al., 2006, pp. 793-794) รายงานจากประเทศสวีเดนซึ่งเป็นการศึกษาในเนื้อไก่ทั้งหมด 419 ตัวอย่าง นั้น ไม่พบเชื้อ ESBL-producing *E. coli* (Tham, et al., 2012, 143-147) เช่นเดียวกับรายงานจากเมืองซูริค ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ซึ่งเป็นการศึกษาในตัวอย่างเนื้อหมู 104 ตัวอย่าง ไม่พบว่ามีเชื้อที่สร้าง ESBL (Geser, et al., 2012, p. 21) การพบเชื้อดื้อยาในสัตว์น้อยอาจเป็นเพราะมีการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์อย่างเคร่งครัด (Cogliani, Goossens, & Greko, 2011, pp. 273-279)

อัตราการพบเชื้อ MDR *E. coli* รวมทั้ง ESBL-producing *E. coli* ที่สูงทั้งในเนื้อไก่และเป็ดอาจมีสาเหตุมาจากผู้ประกอบการเลี้ยงสัตว์ปีกมีการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณสูง โดยใช้ในการรักษาโรคและผสมในอาหารสัตว์เพื่อเป็น growth promoter อีกด้วย ทำให้เชื้อแบคทีเรียในสัตว์ปรับตัวให้มีการดื้อต่อยา มีรายงานการวิจัยที่สนับสนุนว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* (Lei, et al., 2010, pp. 85-89) เมื่อเชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นมาแล้ว ถึงแม้ว่าเมื่อหยุดการใช้ยา แต่คุณสมบัติในการดื้อยาก็ยังคงอยู่ (Katsunuma, et al., 2007, pp. 273-279) และสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่นได้ เนื่องจากยีนที่กำหนดการดื้อยามักอยู่บนหน่วยพันธุกรรมที่เคลื่อนที่ได้ (mobile genetic element) (Seifert, et al., 2013, pp. 22-45) ส่งผลให้การแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาหลายขนานเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว

การตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL นั้น พบ bla_{TEM} ในปริมาณมากกว่า bla_{SHV} ซึ่งอาจจะเป็นเพราะชนิดของ bla_{TEM} มีมากกว่า (www.lahey.org/Studies) อย่างไรก็ตามมีในเชื้อ ESBL-producing *E. coli* อีก 17 ไอโซเลทที่ตรวจไม่พบ bla_{TEM} หรือ bla_{SHV} ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมี ESBL gene ชนิดอื่น หรือการดื้อยาเป็นผลมาจากกลไกอื่นที่ไม่ใช่การสร้างเอนไซม์ เช่น การลดการนำเข้าของยา หรือ การขับยาออกนอกเซลล์

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มีอัตราการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ที่มีการดื้อยาหลายขนานจากเนื้อสัตว์ปีก นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ ESBL อีกด้วย ส่งผลให้เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของสัตว์ปีกในการเป็นแหล่งที่สำคัญในการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในสัตว์ และอาจส่งผลถึงการลดอัตราการเกิดการติดเชื้อดื้อยาในคนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยนเรศวร อรรถพล ตันไสว ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Beta-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Retrieved April 10, 2014, from www.lahey.org/Studies

Chaisatit, C., Tribuddharat, C., Pulsrikarn, C., & Dejsirilert, S. (2012). Molecular characterization of antibiotic-resistant bacteria in contaminated chicken meat sold at supermarkets in Bangkok, Thailand. *Jpn J Infect Dis.*, *65*(6), 527-534.

Chokboonmongkol, C., Patchanee, P., GÖlz, G., Zessin, K. H., & Alter, T. (2013). Prevalence, quantitative load, and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. from broiler ceca and broiler skin samples in Thailand. *Poult Sci.*, *92*(2), 462-467.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement M100-S17*. USA: Wayne, Pennsylvania.

Cogliani, C., Goossens, H., & Greko, C. (2011). Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microb.*, *6*(6), 274-279.

Egea, P., López-Cerero, L., Torres, E., GÓmez-Sánchez Mdel, C., Serrano, L., Navarro Sánchez-Ortiz, M. D., et al. (2012). Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *Int J Food Microbiol.*, *159*(2), 69-73.

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

Horton, R. A., Randall, L. P., Snary, E. L., Cockrem, H., Lotz, S., Wearing, H., et al. (2011). Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol.*, *77*(11), 3715-3719.

Jensen, L. B., Hasman, H., Agersø, Y., Emborg, H. D., & Aarestrup, F. M. (2006). First description of an oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *J Antimicrob Chemother.*, *57*(4), 793-794.

Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M., & Garau, J. (2006). Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *J Infect Dis.*, *194*(1), 71-78.

Katsunuma, Y., Hanazumi, M., Fujisaki, H., Minato, H., Hashimoto, Y., & Yonemochi, C. (2007). Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci in the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *J Gen Appl Microbiol.*, *53*(5), 273-279.

Kiratisin, P., Chattammanat, S., Sa-Nguansai, S., Dansubutra, B., Nangpatharapornthawee, P., Patthamalai, P., et al. (2008). A 2-year trend of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Thailand: an alert for infection control. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, *102*(5), 460-464.

Lei, T., Tian, W., He, L., Huang, X. H., Sun, Y. X., Deng, Y. T., et al. (2010). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. *Vet Microbiol.*, *146*(1-2), 85-89.

Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., van den Munckhof, M. P., van Essen-Zandbergen, A., et al. (2011). National ESBL surveillance group. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.*, *17*(6), 873-880.

Li, J., Ma, Y., Hu, C., Jin, S., Zhang, Q., Ding, H., et al. (2010). Dissemination of cefotaxime-M-producing *Escherichia coli* isolates in poultry farms, but not swine farms, in China. *Foodborne Pathog Dis.*, *7*(11), 1387-1392.

Ma, J., Liu, J. H., Lv, L., Zong, Z., Sun, Y., Zheng, H., et al. (2012). Characterization of extended-spectrum beta-lactamase genes found among *Escherichia coli* isolates from duck and environmental samples obtained on a duck farm. *Appl Environ Microbiol.*, *78*(10), 3668-3673.

Mabilat, C., & Goussard, S. (1995). PCR detection and identification of genes for extended-spectrum beta-lactamases. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover & T. J. White (Eds.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications* (pp. 553-557). American Society for Microbiology, Washington, DC.

Niumsup, P. R., Tansawai, U., Boonkerd, N., Polwichai, P., & Dejsirilert, S. (2008). Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Thai hospitals. *J Infect Chemother.*, *14*(6), 404-408.

Padungtod, P., & Kaneene, J. B. (2006). *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *Int J Food Microbiol.*, *108*(3), 346-354.

Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., et al. (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.*, *41*(3), 647-653.

Seiffert, S. N., Hilty, M., Perreten, V., & Endimiani, A. (2013). Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health?. *Drug Resist Update.*, *16*(1-2), 22-45.

Tham, J., Walder, M., Melander, E., & Odenholt, I. (2012). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in food. *Infect Drug Resist.*, 5, 143-147.